

Kvalitetskontrol i afkodning af genomet

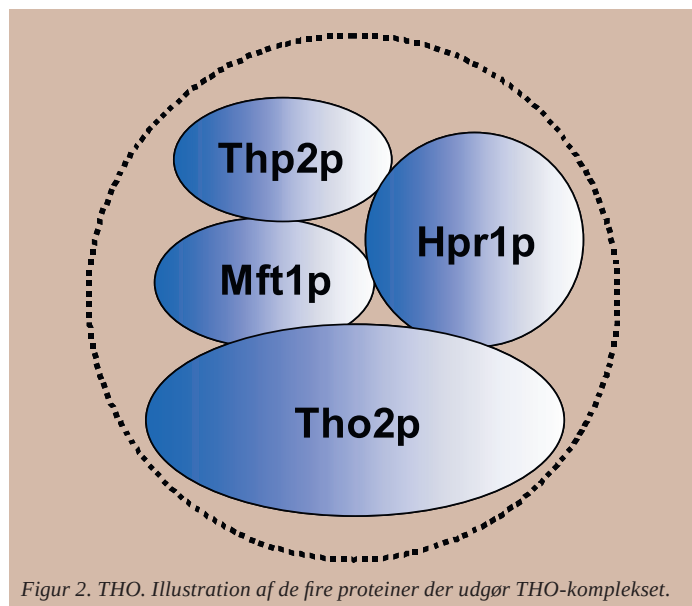
Celler overvåger kvaliteten af de livsvigtige molekyler, som er ansvarlige for oversættelse af arvelig information til proteiner

Af Mathias Bach Poulsen, ph.d.-studerende, Center for mRNP Biogenese og Metabolisme, Molekylærbiologisk Institut, Aarhus Universitet

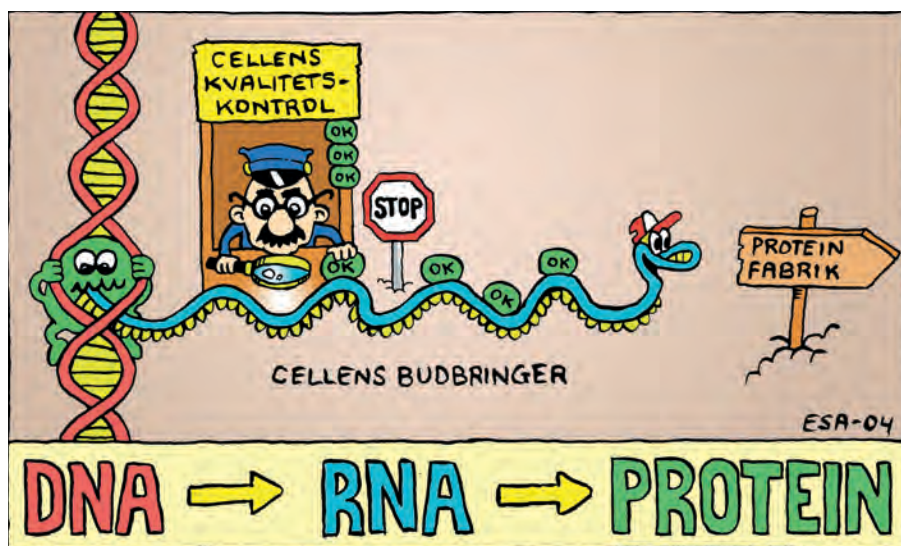
Præcis afkodning af genomet (genekspres-sion) er af vital betydning for alle organismer. Nøjagtigheden afhænger af kvalitetskontrollsystemer, der konstant overvåger de enkelte trin i genekspressionen og fjerner fejl, der ellers kan have fatale følger [1]. En grundlæggende forståelse af det molekylære maskineri, der er ansvarlig for kvalitetskontrol, er derfor vigtig for forståelsen og behandlingen af mange sygdomme. Her beskrives forskning udført i vores grundforskningsfundscenter i en af de mekanismer, som kontrollerer dannelsen af transportmolekyler, der fører genetisk information fra DNA til proteinsyntese.

Dårligt mRNP sendes til destruktions

Til denne undersøgelse benyttede vi forskellige stammer af bagegær (*Saccharomyces cerevisiae*), der hver især mangler komponenter af proteinkomplekset "THO". Det fungerer i pakningen af messenger RNA (mRNA) med proteiner til funktionelle mRNA/proteinkomplekser, de såkaldte mRNPer [2]. De THO-muterede celler producerer misformede mRNPer, som cellen gerne skal skille sig af med. Vi har tidligere vist, at disse "dårlige" mRNPer bliver tilbageholdt i cellekernen og hurtigt bliver nedbrudt [3]. Herved sikrer cellen sig, at et forkert mRNP ikke bliver transporteret til cytoplasma, hvor det kan forårsage stor skade, f.eks. via fremstillingen af et dominant negativt protein.



Figur 2. THO. Illustration af de fire proteiner der udgør THO-komplekset.



Figur 1. Fra gen til produkt. Illustration af vejen fra den genetiske kode (DNA) til produktet (protein). Til venstre ses et DNA-molekyle (rødt), som er ved at få aflæst sin genetiske kode af en RNA-polymerase (grøn). Polymerasen producerer et mRNA (blåt), som er afskrift af den genetiske kode. mRNA bliver tjekket for fejl af cellens kontrolsystem (illustreret ved en mand med lup), hvorefter fejlfrit mRNA sendes til cellens proteinfabrikker.

Layout Ebbe Sloth Andersen.

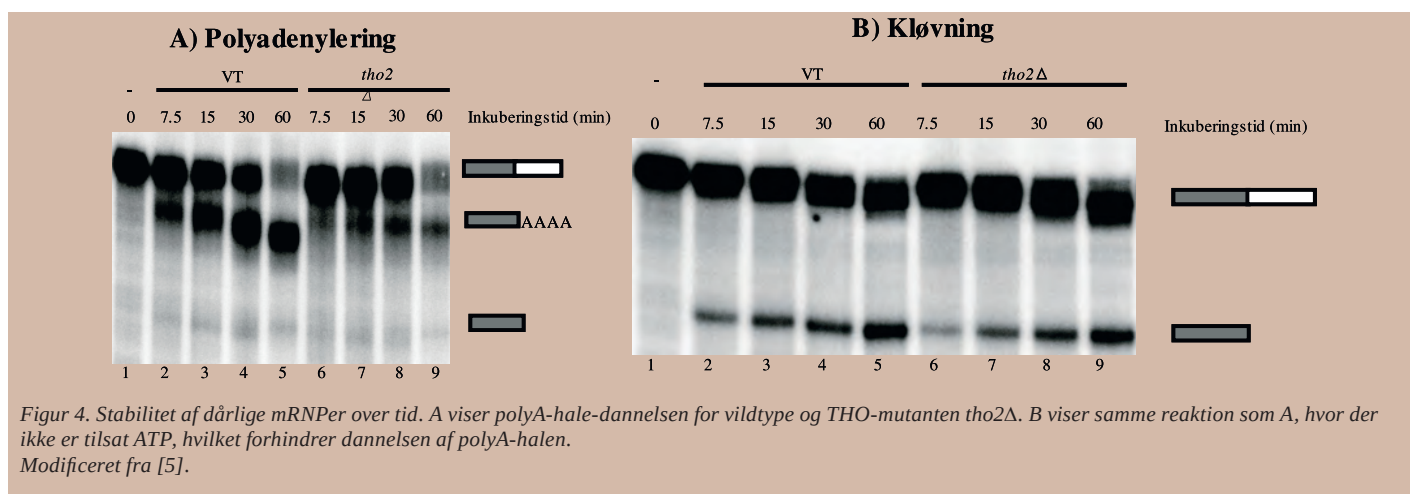
RNA beskyttes

I højere organismer findes generne i cellernes kerner, mens proteinsyntesen foregår i det omkringliggende cytoplasma. mRNA er det molekyle, der bærer informationen fra generne i cellekernen ud i cytoplasma. Af hensyn til denne transport pakkes mRNA sammen med proteiner og danner herved de funktionelle mRNP-partikler. Alle områder i cellen indeholder RNA-nedbrydende enzymer, der ødelægger ubeskyttede RNA-molekyler og udsætter mRNA for konstant risiko for eliminering. Derfor er et af de første trin i normal dannelse af mRNA påsætning af beskyttende strukturer på molekylets ender [4].

Selvom dannelse af mRNP er et centralt trin i genekspres-sion, ved man kun lidt om kvalitetskontrol af denne proces. Under studier af mRNA-dannelse i bagegær gjorde vi den overraskende opdagelse, at korrekt pakning af mRNA til mRNP-partikler er en forudsætning for påsætning af en beskyttende struktur, den såkaldte "polyA-hale", på mRNA-molekylets bagende. PolyA-halen laves under den såkaldte polyadenylerings-proces, som er et af de sidste trin før mRNAet eksporteres til cytoplasma. Defekter i mRNP-pakningen har således en negativ indflydelse på beskyttelse af mRNA og fører i sidste ende til destruktions af defekte partikler.

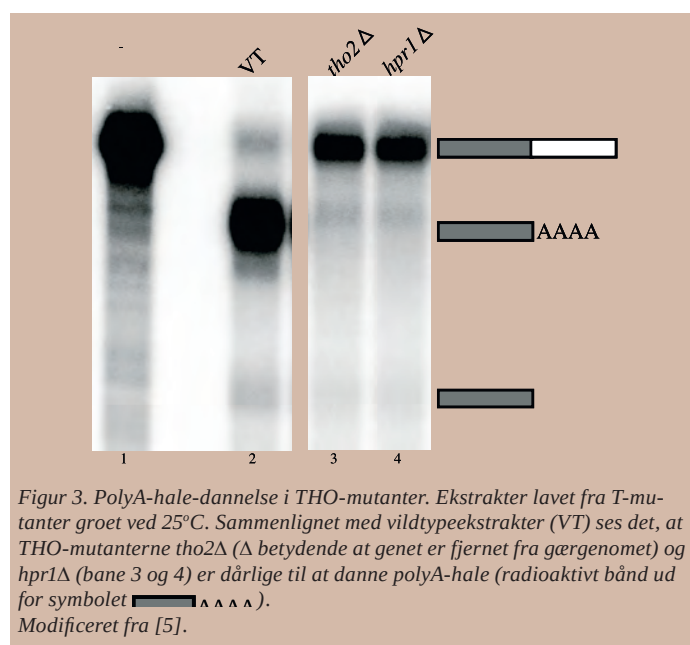
Sammenhæng mellem dårlige mRNPer og polyadenylering

Opdagelsen af denne mekanisme tog sin start via genetiske



studier. Ved at kombinere mutanter i THO-komplekset med muterede proteiner, der normalt medvirker i syntesen af mRNA, opdagede vi en genetisk kobling mellem THO-proteinerne og de polyA-hale-dannende proteiner.

For at undersøge denne kobling foretog vi forsøg med proteinekstrakter fra ovennævnte gærstammer, der manglede dele af THO-komplekset og undersøgte, hvordan processeringen af mRNAets bagende blev foretaget i THO-mutanter ift. normal "vildtype"-gær.



I dette forsøg blev protein ekstrakterne tilsat et stykke RNA, som var radioaktivt mærket, så vi kunne følge kløvning og efterfølgende polyadenylering af dette RNA (figur 3).

Til vores overraskelse viste det sig, at ekstrakter fra mutanter, der ikke danner funktionelt THO-kompleks, kun foretog meget svag syntese af polyA-halen sammenlignet med vildtypeekstrakter (figur 3, sammenlign bane 3 og 4 med bane 2). Ydermere viste det sig, at den totale mængde af RNA i THO-mutantekstrakterne faldt sammenlignet med vildtypeekstrakt, altså bliver RNA som tilsættes til THO-mutantekstrakter nedbrudt.

Langsom syntese af poly(A)-halen kvæler mRNAet

For yderligere at undersøge i hvilken del af processeringsprocessen denne nedbrydning specifikt finder sted, foretog vi et

eksperimentelt tidsstudie (figur 4). Under dette forsøg gjorde vi den spændende observation, at det tilsatte RNA forsvandt fra topbåndet med samme hastighed i både THO- og vildtypeekstrakter, men i THO-mutanten var der meget mindre RNA i det bånd, der indeholder mRNA med påsat polyA-hale (figur 4 A). Når vi kun kiggede på kløvning uden polyA-syntese, viste det sig, at begge ekstrakter kløver med ens kinetik (figur 4 B). Dvs. at både det tilsatte RNA og det kløvningsprodukt, som dannes før polyadenylering, er stabile i begge ekstrakter, hvorimod det RNA, der påsættes polyA-hale bliver nedbrudt. Vi konkluderer derfor, at den ineffektive polyadenylering i THO-mutantekstrakter inducerer RNA-nedbrydning.

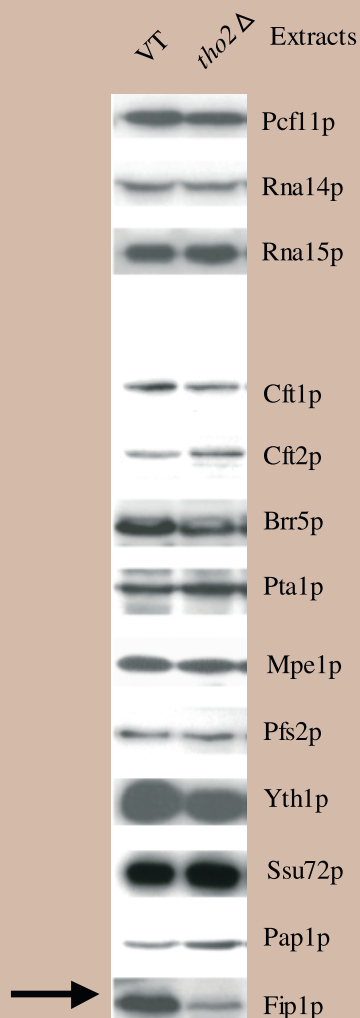
C. I-Analyse
Gasanalyse – Gasalarmer – CEM systemer – Rådgivning – Service – Nanopartikler – Aerosoler – IAQ

Servomex model 5200

Food Pack analysator
O2og/ellerCO2
O2måling ved pM, paramagnetisk
CO2måling ved NDIR, infrarød absorption
RS 232, datalogging, op til 200målinger
Password beskyttet
Indbygget sampling pumpe
Opfylder kravene i
(MAP) modified atmosphere packaging

C. I-Analyse · Nattergalevej 7 · DK-3650 Ølstykke · Tlf.: +45 4717 9299 · Mobil: +45 2961 1783
www.ihle-andersen.dk · claus@ihle-andersen.dk

5 A



Figur 5. Proteinniveau af de forskellige polyA-hale-dannende proteiner. Niveaue af forskellige polyA-hale-dannende proteiner er blevet målt i en THO-mutant og vildtype (VT)-ekstrakt. Det ses, at den eneste faktor, der er påvirket af THO-mutationer, er Fip1p (indikeret med en pil). Modificeret fra [5].

Dannelse af dårligt mRNP trigger ødelæggelse af et polyadenyleringsprotein

For at finde ud af hvordan mutationer af THO-komplekset direkte påvirker polyadenyleringsraten, sammenlignede vi mængderne af de proteiner, som deltager i polyadenyleringen i THO-ekstrakterne med vildtypeekstrakt. Den eneste faktor der blev ændret i niveau er Fip1p (figur 5), som er kendt som proteinet, der danner bro mellem det kompleks, der styrer dannelsen af poly(A)-halen, og det protein som foretager selve syntesen af halen på mRNAPet. Det giver derfor god mening, at et dårligt mRNP, som dem vi ser i THO-mutanterne vil give signal til nedbrydning af Fip1p og dermed forhindre det poly(A)-hale-dannende protein i at blive rekrutteret til mRNAet. I sidste ende resulterer denne signalering i en langsom syntese af polyA-halen med efterfølgende RNA-destabilisering.

Med disse opdagelser melder sig nye spørgsmål, som vi nu forsøger at besvare. F.eks. hvilke molekulære mekanismer ligger til grund for denne regulering af Fip1p, og hvorfor fører ineffektiv polyadenylering til nedbrydning af mRNAPet.

I et mere overordnet perspektiv tyder vore fund på, at mRNA-kvalitetskontrol fungerer efter et strengt darwinistisk princip: kun de bedst egnede mRNPer overlever. En sådan benhård eliminering af ikke-optimalt biologisk materiale kan forekomme ødselt, men sikrer formentlig en høj grad af præcision i genekspression.

E-mail-adresse

Mathias Bach Poulsen: mbp@mb.au.dk

Referencer

1. Doma, M.K., and Parker, R. (2007). RNA quality control in eukaryotes. *Cell* 131, 660-668.
2. Jensen, T.H., Boulay, J., Olesen, J.R., Colin, J., Weyler, M., and Libri, D. (2004). Modulation of transcription affects mRNP quality. *Mol Cell* 16, 235-244.
3. Libri, D., Dower, K., Boulay, J., Thomsen, R., Rosbash, M., and Jensen, T.H. (2002). Interactions between mRNA export commitment, 3'-end quality control, and nuclear degradation. *Mol Cell Biol* 22, 8254-8266.
4. Saguez, C., Olesen, J.R., and Jensen, T.H. (2005). Formation of export-competent mRNP: escaping nuclear destruction. *Curr Opin Cell Biol* 17, 287-293.
5. Saguez, C., Schmid, M., Olesen, J.R., Ghazy, M.A., Qu, X., Poulsen, M.B., Nasser, T., Moore, C., and Jensen, T.H. (2008). Nuclear mRNA surveillance in THO/sub2 mutants is triggered by inefficient polyadenylation. *Mol Cell* 31, 91-103.

Nyt om...

....Flydende helium fylder 100 år

For 100 år siden, nærmere betegnet den 10. juli 1908, kun 40 år efter dets spektrallinje var blevet påvist i solen under en solformørkelse, lykkedes det den hollandske fysiker Heike Kamerlingh Onnes at kondensere helium ved at nedkøle det til -269°C, som er lige under kogepunktet. Efter hydrogen er helium det mest almindelige grundstof i universet. Hovedparten blev dannet umiddelbart efter the Big Bang, men det dannes stadig fra hydrogen i stjerner ved fusion. Hovedparten af helium produceres i USA, mens Algeriet er den næststørste producer.

Carsten Christophersen

Nyt om...

... Stinkende signalmolekyle

Gasserne nitrogenoxid (NO) og carbonmonoxid (CO) har længe været kendt som fysiologiske signalstoffer, og nu er hydrogensulfid (H₂S) optaget i dette eksklusive udvalg af "gasotransmittere". Under fysiologiske betingelser dannes H₂S af enzymet cystathionin γ -lyase. Når kodningen for enzymet fjernes fra arveanlægget hos mus, får de kraftigt forhøjet blodtryk og blodkarrenes evne til udvidelse forringes. Opdagelsen åbner for forståelse af grundlæggende mekanismer for forhøjet blodtryk og dermed for mulighederne for at finde nye behandlinger for denne ubehagelige og udbredte lidelse.

Carsten Christophersen

Kilde

H₂S as a Physiologic Vasorelaxant: Hypertension in Mice with Deletion of Cystathionine γ -Lyase Guangdong Yang *et al.* *Science* 2008 Bind 322 side 587-590.