



UPPSALA
UNIVERSITET

Degradering av mRNA kräver ett elegant samspel mellan olika proteinkomplex och faktorer samt kan vara lokaliserad till P-bodies.

Joakim Bergström

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, höstterminen 2009
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Degraderingen av mRNA kräver ett elegant samspel mellan olika proteinkomplex och faktorer samt kan vara lokaliserad till P-bodies.

Joakim Bergström

Självständigt arbete i biologi 2009

Sammandrag

Att förstå hur processen bakom nedbrytningen av mRNA går till och hur den kan reglera uttrycket av gener på en post-transkriptionell nivå har genom åren blivit allt viktigare. Man har genom fynd som RNA-interferens och mikro-RNA konstaterat att genreglering på den post-transkriptionella nivån spelar en större roll än vad man först trodde. För nedbrytning av mRNA i cytoplasman finns generellt två huvudvägar och båda involverar interaktioner mellan olika proteinkomplex och de karaktäristiska strukturerna för ett eukaryot mRNA. Nämligen den 5' lokaliserade 7-metylguanosincappen och den 3' lokaliserade poly(A) svansen. Det gemensamma för båda är att de initieras av hydrolys av poly(A) svansen följt av antingen total nedbrytning av molekylerna följt av hydrolys av cappen via en 3'→5' nedbrytningsmekanism, eller via hydrolys av cappen följt av en 5'→3' nedbrytning. Processerna är oerhört komplexa och innefattar väldigt många olika enzymer och faktorer, som tillsammans samverkar för att bryta ned molekylerna. Till följd av dess komplexitet finns det utrymme för reglering och finjustering. Där en av de viktigaste regleringsmekanismerna för kontroll av mRNA-degradering involverar modulering av stabiliteten hos molekylerna via AU-rika sekvenser i 3'-UTR och olika RNA-bindande proteiner. Bevis har även uppkommit att nedbrytningen skulle vara lokaliserad till granulära strukturer i cytoplasman, så kallade P-bodies. Syftet med uppsatsen är att redogöra för dessa delar, vilka de ingående komponenterna är och vad de har för funktion samt att försöka svara på hur cellen genom degradering av mRNA kan reglera genuttrycket. Reglering av genuttryck via nedbrytning av mRNA kan bland annat åstadkommas genom modulering av stabiliteten hos mRNA molekylerna till följd av feedback mekanismer, men även via yttre stimuli.

Inledning

Det centrala dogmat inom molekylärbiologin är definierat som en rad olika processer vars uppgift är att beskriva flödet av information lagrad i DNA via mRNA (messenger RNA) till protein (Crick, 1970). Det här är ett begrepp, som idag är väldigt vedertaget inom biologin och som vi tar för givet. Det var inte förrän i början av 1960-talet, som idén om att det fanns en molekyl vars funktion var att överföra informationen från DNA till det färdiga proteinet började ta form. Tack vare arbeten utförda av Francois Jacob, Sidney Brenner och Mathew Meselson med flera kunde man på ett elegant sätt visa att denna molekyl bestod av RNA, hade en kort livstid och besatt samma uppsättning av nukleotider som sin motsvarande gen (Brenner *et al.* 1961). Genom den här upptäckten föddes begreppet mRNA. Informationsöverföringen från DNA till ett prekursor mRNA (pre-mRNA), det vill säga ett icke processat mRNA, är ett exempel på en process som kallas för transkription. Transkriptionsprocessen är lokaliserad till kärnan hos eukaryoter, där proteinkodande gener i DNA transkriberas till pre-mRNA via enzymet RNA polymeras II (RNA pol II), som katalyserar polymerisationen av ribonukleotider. Polymerisationen sker i 5' till 3' riktning (Kornberg 2001). Efter att pre-mRNA har transkriberats, bearbetas eller processas det till ett

moget mRNA genom att två element karaktäristiska för ett eukaryot mRNA adderas, nämligen en 5'-Cap och en 3'-Poly(A) sekvens känd, som Poly(A) svansen (se figur 1) (Shatkin och Manley 2000).

Därefter transporteras det mogna mRNA ut ur kärnan till cytoplasman (Hamm och Mattaj 1990). I cytoplasman translateras mRNA till ett funktionellt protein, som speglar koden i DNA, sedan degraderas mRNA.

Transkriptionen av DNA till pre-mRNA har under en lång tid ansetts vara det allra viktigaste steget där cellen kan reglera uttryck av gener och då framförallt genom att reglera initieringen av transkriptionen. Det har visat sig under senare år att en stor del av regleringen av genuttryck utspelar sig på mRNA-nivå istället för på DNA-nivå, som man tidigare trodde. Det har påvisats genom omfattande analyser, vars resultat pekar på, att en stor del av regleringen av genuttryck är beläget på mRNA nivå och påverkas framförallt utav mRNA degradering och inte av transkription (Fan *et al.* 2002). Forskarna har även alldeles nyligen snubblat över en väldigt intressant upptäckt. Nämligen att mRNA nedbrytningen kan vara organiserad i speciella strukturer i cytoplasman, så kallade processing bodies (P-bodies) (Sheth och Parker 2003). Andra nya upptäckter, så som RNA interferens (RNAi) och mikro-RNA (miRNA) pekar också på att en stor del av regleringen är belägen på posttranskriptionell nivå, det vill säga mRNA nivå.

Syftet med uppsatsen är att ge en djupare förståelse och belysa ämnet mRNA degradering samt att försöka klargöra för hur det kan reglera genuttryck i den eukaryota cellen. Uppsatsen kommer att försöka ge svar på hur mRNA degradering går till. Vilka mekanismer, som finns, hur de fungerar och hur de kan regleras. Tyngdpunkten kommer att ligga på hur mekanismerna fungerar och en avslutande diskussion om hur de kan bidra till att reglera genuttrycket i den eukaryota cellen. Uppsatsen kommer också att försöka ge svar på vilka proteiner, som är inblandade i de olika mekanismerna, vilken deras roll är och vad de har för funktion. Tidigare har det nämnts att kännetecknen för ett eukaryot mRNA är närvaron av en 5'-Cap och 3'-Poly (A). En intressant fråga kan då vara om dessa element har någon betydelse för nedbrytningen av mRNA om så, på vilket sätt? Det mest intressanta kan nog vara P-Bodies. Vad är P-Bodies, vilken betydelse har de och vad är deras kända funktion? För att lägga en grund för förståelse för uppsatsens alla delar kommer även det eukaryota mRNA att behandlas. Där ligger fokus på processningsmekanismen och addering av 5'-Cap och 3'-Poly (A).

Eukaryot mRNA

Gemensamt för alla mRNA, om det så är i prokaryoter eller i eukaryoter, är att de tjänar som en mellanhand i överföringen av information från DNA till protein. Ett mRNA har vanligtvis en kort livslängd. Livslängden kan variera mellan allt från ett par minuter till över ett dygn. Det gäller då främst eukaryoter, då mRNA hos prokaryoter oftast har en betydligt kortare livslängd, vilket skulle kunna relateras till deras korta generationstid och förmåga att svara på yttre förhållanden oerhört snabbt. Det sätter då krav på att mRNA nivåerna ska kunna förändras väldigt snabbt så att cellen kan anpassa sig till en variabel miljö och dirigera sitt genuttryck därefter för att kunna hantera förändringarna (Nilsson 2008). Den största skillnaden mellan prokaryota mRNA och eukaryota är att i det senare fallet besitter de mogna mRNA molekylerna två karaktäristiska element i dess 5' och 3' ände (se figur 1). I 5'-ändan finns en cap struktur lokaliserad som utgörs av en inverterad och metylerad guanosin rest, som brukar betecknas m⁷GpppG. I 3'-ändan finns en poly adenosin (Poly(A)) sekvens (Shatkin och Manley 2000). Tillägget av dessa element är oerhört viktigt för att generera ett

moget mRNA som kan translateras i cytoplasman. Vål i cytoplasman förekommer mRNA nästan aldrig som ”nakna” molekyler utan cappen, Poly(A)-svansen och andra element utgör viktiga interaktionspunkter för en arsenal av RNA bindande proteiner (RBP), som påverkar en rad olika egenskaper hos RNA, så som interaktionen mellan olika RNA, stabiliteten hos RNA samt funktionen hos RNA med mera. Tillsammans bygger de upp de så kallade messenger ribinukleär partikel (mRNP) (Glisovic *et al.* 2008). Frågan, som då genast väcks till liv är: Hur går dessa viktiga processningsmekanismer till, som leder till capping och polyadenylering?



Figur 1. Schematisk skiss över ett eukaryot mRNA

Capping, addering av 5'-Cap

Den första processen, som har en stor betydelse för att skapa ett moget mRNA är adderingen av en 5'-Cap.

Når det primära transkriptet når en längd mellan 25-30 nukleotider adderas en m⁷GpppG cap till 5'ändan. Reaktionsmekanism för adderingen kan delas upp i tre konsekutiva steg och involverar olika enzym så väl som RNA pol II (Shatkin och Manley 2000 Cho *et al.* 1997). Vid transkription av DNA till RNA via RNA pol II skapas en 5'-ände med en fri trifosfatgrupp på det primära RNA transkriptet.

Det första steget av cappingmekanismen är att den tredje fosfatgruppen (γ -fosfatet) på den första nukleotiden, vanligtvis ett G, men kan också vara ett A, hydrolyseras genom en 5'-trifosfatas aktivitet, som hos däggdjur katalyseras av det bifunktionella capping enzymet (CE) (Kiong Ho *et al.* 1998). I studier gjorda på jäst, *Saccharomyces cerevisiae*, har man funnit att trifosfatasaktiviteten är lokaliserad till proteinet Cet1p, som har en molekylvikt på 80-kDa och tillhör klassen divalenta katjon-beroende RNA trisfosfater (Lima *et al.* 1999). Det andra steget involverar en överföring av GMP (guanosin monofosfat) från GTP (guanosin trifosfat) genom en guanylyltransferas aktivitet, som hos däggdjur katalyseras av CE (Kiong Ho *et al.* 1998). Även i det här steget finns en skillnad mellan de ingående komponenterna i däggdjursystem och jäst. Hos jäst har man funnit att guanylyltransferaset finns på en separat polypeptidkedja, Ceg1p, som har en molekylvikt på 53-kDa (Shibagaki *et al.* 1992 Itoh *et al.* 1987). Konsekvensen av guanylyltransferas aktiviteten är att en ovanlig och inverterad 5' till 5' bindning mellan den första nukleotiden (G eller A) och GMP skapas. De två första stegen resulterar i en 5'GpppG-cap struktur. I det sista steget överförs en metylgrupp till den sjunde N-atomen i purinringen på den nyligen adderade GMP-gruppen via ett metyltransferas. Alla steg tillsammans frambringar den slutgiltiga m⁷GpppG cap strukturen (för sammanfattning se nedan) (Shatkin och Manley 2000).

Steg 1 katalyserad av trifosfatasaktivitet
pppG \rightarrow ppG + Pi

Steg 2 katalyserad av guanylyltransferasaktivitet
ppG+GTP \rightarrow GpppG + PPi

Steg 3 katalyserad av metyltransferasaktivitet
GpppG + S-adenosylmetionin \rightarrow m⁷GpppG + S-adenosylhomocystein

Forskning har visat att hela cappingprocessen är kopplad till transkriptionen av mRNA prekursor. Det har bevisats genom att man har identifierat interaktioner mellan C-terminal domänen (CTD) hos RNA pol II och de enzymer, som är inblandade i capping av 5'-änden (Schroeder *et al.* 2000). Ytterligare en intressant upptäckt är att det har visat sig att det finns ett släktskap mellan CTD hos CE och guanylyltransferaset (Ceg1p) hos *S.cerevisiae* (Takagi *et al.* 1997).

Polyadenylering, addering av 3'-Poly(A)

Den andra viktiga delen i processen att gå från ett pre-mRNA till ett fullt funktionellt moget mRNA är via polyadenylering av 3' änden. Genom studier gjorda på HeLa celler kunde Mary Edmonds, med medarbetare i början av 1970-talet bevisa att det fanns RNA molekyler, som bar en kovalent bunden poly(A) sekvens om cirka 150-200 nukleotider i längd. Resultaten fick de genom att studera radioaktivt inmärkta nukleära RNA (hnRNA) och RNA från cytoplasman, vilka troligtvis utgjordes av mRNA molekyler (Edmonds *et al.* 1971). En intressant fråga, som då väcks är: Hur går polyadenyleringen till?

Polyadenylering av 3' änden är en process, som kan delas upp i två steg och involverar en mängd olika cis element och transfaktorer. Det första steget innefattar en endonukleolytisk klyvning av pre-mRNA molekylen där två RNA sekvenser (cis element) spelar en avgörande roll. Denna klyvning initieras genom att ett peptidkomplex, bestående av flera subenheter, kallat cleavage and polyadenylation specificity factor (CPSF) binder till en konserverad polyadenylerings signal, som har sekvensen AAUAAA. Denna sekvens är lokaliserad till 3' UTR (untranslated region) hos pre-mRNA (Ryan *et al.* 2004). Efter interaktionen mellan CPSF och AAUAAA klyvs molekylen 10-30 nukleotider nedströms om poly (A) signalen (Mandel *et al.* 2006, Ryan *et al.* 2004, Whale 1990). Forskare var intresserade av att identifiera enzymet, som ansvarade för klyvningen. Mandel med medarbetare lade fram bevis för att det var en komponent av CPSF, som klöv pre-mRNA. Komponenten identifierades och gavs beteckningen CPSF-73 (Mandel *et al.* 2006). Det andra viktiga cis elementet för klyvningen av mRNA prekursor är en GU-rik sekvens placerad nedströms om klyvningsstället. Denna sekvens känns igen av en annan faktor kallad cleavage-stimulating factor (CstF). CstF är en heterotrimer, hos däggdjur, det vill säga ett komplex bestående av tre olika subenheter. Dess funktion är att göra klyvningen mer effektiv genom att stabilisera interaktionen mellan AAUAAA och CPSF (Ryan *et al.* 2004, Shatkin och Manley 2000). Efter klyvningen adderas 200-250 adenosinrester hos däggdjur till den nyklivna 3' änden via enzymet poly(A)-polymeras (PAP) (Nilsson 2008). PAP behöver inget templat för att syntetisera Poly(A) sekvensen, dock behöver det en fri 3'-OH. Den fria hydroxylgruppen skapas via klyvningsprocessen förmedlad genom CPSF och CstF. Även polyadenylering har visat sig vara kopplad till transkriptionen av pre-mRNA genom att närvaron av RNA pol II stimulerar polyadenylering. Bevis har framkommit, som visar att RNA pol II stimulerar polyadenylering genom att CTD hos RNA pol II interagerar med CstF och CPSF, vilket i sin tur stimulerar klyvning av mRNA prekursor (Adamson *et al.* 2005, McCracken *et al.* 1997).

Vad händer sen?

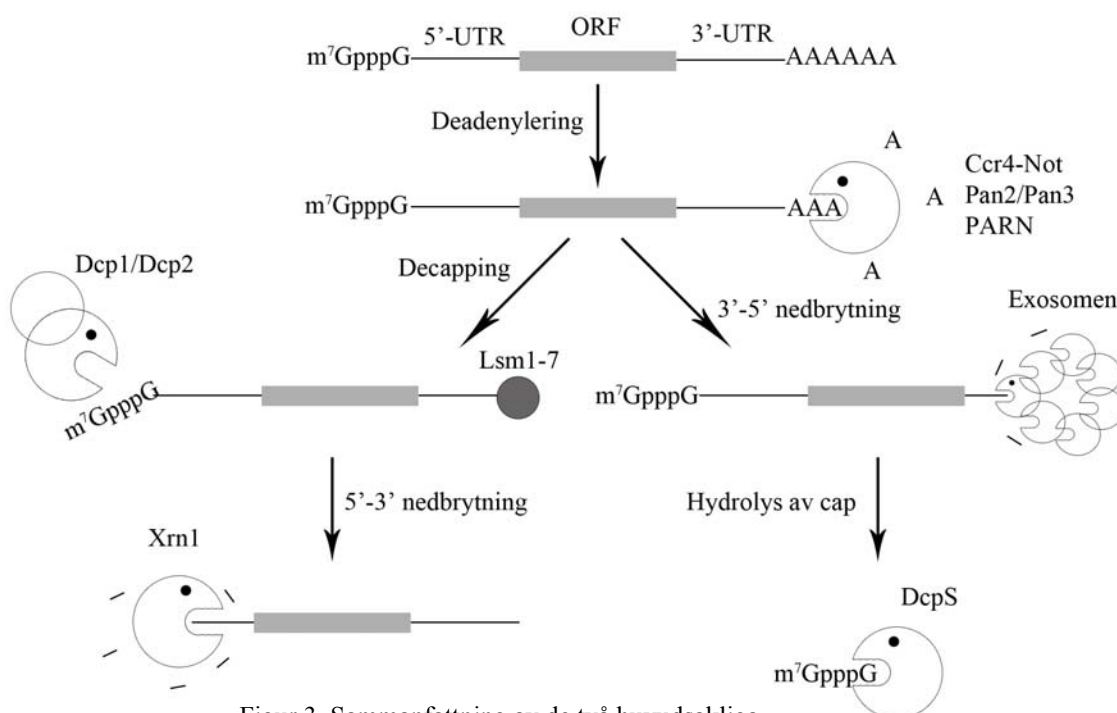
Efter i synnerhet dessa två viktiga processningsmekanismer transporteras det mogna mRNA:t till cytoplasman. Innan det lämnar kärnan är 3'-Poly(A) bundet till poly(A)-binding-protein II (PABPII) och 5'-Cap är bundet till ett protein komplex, som brukar benämnas cap binding complex (CBC) (Visa *et al.* 1996). När mRNA väl når cytoplasman kommer PABPII att ersättas med poly(A)-binding-protein I (PABPI) och den eukaryota translations initieringsfaktorn 4E (eIF4E) kommer att ersätta CBC om att binda till den 5' lokaliserade 7-metylguanosin cappen (Garneau, *et al.* 2007, Marcotrigiano *et al.* 1997). Dessa proteiner (CBC

och PABPI) har, som funktion att skydda mRNA molekylerna mot degradering av exonukleaser samt att göra initieringen av translationen mer effektiv.

mRNA degradering

Det finns två stora grenar inom fältet mRNA degradering, som är kända idag. Den första är när ett mRNA har transkriberats, processats på ett korrekt sätt och transporterats ut ur kärnan till cytoplasman för translation fyller den sin roll, som budbärare av information mellan DNA och protein. När cellen sedan känner av att den specifika genprodukten, som translateras från ett specifikt mRNA inte längre behövs bryts mRNA molekylerna ned. Detta ger cellen en möjlighet att på ett effektivt och snabbt sätt kunna reglera mängden protein, som kodas av en specifik gen, det vill säga reglera genuttrycket. Den andra stora vägen är kvalitetskontrollen av ett mRNA. Där mRNA molekyler kontrolleras i kärnan och de mRNA, som är defekta eller skadade på något vis genomgår nedbrytning för att skydda cellen mot potentiellt toxiska proteiner (Wagner och Lykke-Andersen 2002).

Det finns en stor variation i hur ett mRNA kan degraderas och det finns en minst lika stor variation hos de proteiner, som är inblandade i de olika nedbrytningsmekanismerna. Syftet med den här delen är att redogöra för de vanligast förekommande degraderingsmekanismerna, som idag är kända samt vad proteinerna spelar för roll och vad deras funktion är. När ett eukaryot mRNA har kommit till punkten i sitt liv att det ska degraderas så finns det två möjliga vägar att gå. Antingen bryts molekylerna ned i 5'→3' eller 3'→5'. Dessa har generellt två stora likheter. Den första är att de flesta mekanismer, som är inblandade i att degradera mRNA involverar olika typer av exonukleaser (Garneau *et al.* 2007). Den andra gemensamma faktorn är att det första och kanske det viktigaste steget, som initierar nedbrytningen, är att 3'-Poly(A) svansen kortas ned genom hydrolysis. Denna process brukar gå under namnet deadenylering (Decker och Parker 1993). Deadenylering, som är en reversibel process, tillsammans med borttagning av 5'-Cappen, vilken är en irreversibel process, dömer ett mRNA till nedbrytning. För sammanfattning se figur 3. Hur går dessa processer till?



Figur 3. Sammanfattning av de två huvudsakliga cytoplasmatiska degraderingsvägarna. Omritad efter Garneau *et al.* 2007.

Deadenylering

Deadenylering (nedkortning av 3' lokaliserad Poly(A)) är, som tidigare har nämnts, det första steget i initieringen av mRNA degradering. Detta viktiga steg sker inte spontant och måste därför katalyseras. Denna katalys hanteras av cytoplasmatiska enzymer, som går under namnet deadenylaser. En förståelse för deadenylaserna och hur de fungerar är essentiellt för att erhålla en bra förståelse för hur ett mRNA degraderas.

Forskare har under ett antal år identifierat ett flertal av dessa enzymer, som har som huvudsakliga funktion att deadenylera eukaryota mRNA (Garneau *et al.* 2007). Det första enzymkomplexet, som kommer att behandlas, är ett exonukleas vid namn PAN2/PAN3.

PAN2/PAN3

PAN står för poly(A)-nukleas och, som namnet antyder är det ett enzym vars funktion är att bryta ned poly(A) det vill säga det är ett deadenylas. PAN2/PAN3 är ett exonukleas som degraderar poly(A) i 3'→5' med AMP, som biprodukt. PAN2/PAN3 kräver Mg^{2+} för att bibehålla enzymatisk aktivitet. Man har funnit att PAN2/PAN3 är en heterodimer bestående av två subenheter en 127-kDa tung polypeptid (PAN2), som kodas av genen *PAN2*, och en 76-kDa tung polypeptid (PAN3), som kodas av genen *PAN3*. Båda subenheterna krävs för att bibehålla funktionalitet (Brown *et al.* 1996). Det har visat sig att PAN2/PAN3 kräver en närvaro av PABPI för sin enzymatiska funktion. Det har man visat genom studier av bindningsinteraktioner mellan PAN2/PAN3 och RNA samt mellan PAN2/PAN3 och PABPI. Försöken man använde sig av var affinitetsanalyser i sepharose innehållandes poly(U) och PABPI. Det man fann var att enzymet band både RNA och PABPI även vid förhållanden med en väldigt hög jonstyrka, vilket tyder på en stark interaktion (Brown *et al.* 1996 Sachs och Deardorff 1992). Hos *S.cerevisiae* har PAN2/PAN3, som funktion att trimma poly(A)-svansen ,på nyligen processade mRNA, till en längd mellan 60-80 nukleotider (Brown och Sachs 1998). Hos däggdjur däremot har man visat att PAN2/PAN3 har en initial roll i deadenyleringsprocessen av mRNA där poly(A)-svansen kortas ned från ~200 nukleotider till ~110. Studien, som visade detta använde sig av mRNA för β -globin, vilket är ett stabilt mRNA, isolerat från NIH3T3 fibroblaster hos möss. De kunde visa att den kompletta deadenyleringen var uppdelad i två faser där den första faser, nedkortning från 200 till 110 nukleotider, sköttes av PAN2/PAN3. Efter att PAN2/PAN3 har degraderat poly(A) ner till ~100 nukleotider initieras den andra faser, som hanteras av ett annat enzymkomplex, det så kallade Ccr4-Not komplexet (Yamashita *et al.* 2005).

Ccr4-Not

Ccr4-Not komplexet är ett gigantiskt 1,9MDa komplex med nio subenheter där några exempel är Ccr4, Not1-5, Caf1 (även känd under namnet Pop2). Huvudaktörerna i detta enorma komplex, som besitter 3'→5' exonukleasaktivitet har visat sig vara Ccr4 och Caf1 (Chen *et al.* 2002, Tucker *et al.* 2001). Tucker med medarbetare kunde visa att om generna som kodar för Ccr4 och Caf1 togs bort, det vill säga man konstruerade olika jästmutanter med *ccr4* Δ och *caf1* Δ , kunde man se en negativ påverkan på deadenyleringen hos olika reporter mRNA i *S.cerevisiae*. Deadenyleringen påverkades negativt gällande två aspekter. Den första effekten man kunde se hos mutanter i *Ccr4* och *Caf1* var att hastigheten med avseende på deadenylering sjönk markant från ca 13 nukleotider per minut till en hastighet på 2-3 nukleotider per minut. Den andra effekten, som kunde ses var att deadenyleringen avstannade för tidigt. Hos vildtypen pågår deadenyleringen tills poly(A)-svansen når en längd omkring 10-12 nukleotider. Mutanterna uppvisade poly(A)-element, som hade en längd omkring ~15-25 nukleotider. Dessa två upptäckter samt att strängar defekta i *Ccr4* och *Caf1* tycks stabilisera en rad av olika transkript pekar på att Ccr4 och Caf1 är essentiella för deadenylering via Ccr4-Not komplexet. De kunde även se att de negativa effekterna var större

för *ccr4Δ* än för *caf1Δ*, vilket i sin tur tyder på att funktionen hos Ccr4 skulle spela en större roll än Caf1 (Tucker *et al.* 2001). Tucker med medarbetare kunde även ett år senare, genom studier gjorda på jäst, demonstrera att Ccr4 katalytiska aktivitet inhiberas av PABPI, vilket bidrar med bevis att PABPI inte bara kan stimulera deadenylering utan att det även besitter inhibitoriska egenskaper. De kunde även samtidigt visa att Ccr4 är den subenheten hos Ccr4-Not komplexet, som innehar den katalytiska förmågan (Tucker *et al.* 2002). Vad spelar då Caf1 för roll? Caf1 har identifierats, som ett exonukleas, tillhörande familjen RNas D. Studier har gjorts, som visat att Caf1 har deadenylerande egenskaper *in vitro* (Daugeron *et al.* 2001). Röntgenkristallografiska och mutationsanalyser har utförts, som lade fram bevis för att Caf1 inte nödvändigtvis agerar som ett exonukleas *in vivo*. Detta såg man genom att mutera aminosyror essentiella för det katalytiska centrat hos enzymer inom RNas D familjen. Det man såg var att deadenyleringen inte påverkades. Man har lagt märke till att mutationer i Caf1, som raderar interaktion med Ccr4 påverkar deadenyleringen negativt *in vivo*. Folk har tolkat detta och lagt fram en modell, som säger att Caf1 skulle ha en stor betydelse för kontakten mellan Ccr4 och de andra proteinerna i komplexet istället för att agera som ett exonukleas (Thore *et al.* 2003 Nilsson 2008). Det sista och kanske det mest intressanta enzymet, som är inblandad i deadenyleringen av 3'-Poly(A) är poly(A)-specifikt ribonukleas (PARN).

Poly(A)-specifikt ribonukleas (PARN)

PARN är en 75kDa tung polypeptid, som har 3'→5' exonukleasaktivitet besläktad med familjen RNas D och dess katalytiskt aktiva form är i form av en oligomer på 180-220kDa bestående av tre subenheter. PARN kräver en obunden 3'-OH för aktivitet och avger 5'-AMP som restprodukt (Garneau *et al.* 2007 Martínez *et al.* 2000 Åström *et al.* 1992). Forskare kom fram till att det aktiva PARN hade en oligomer struktur genom studier gjorda på PARN extraherat från kalvtymus. Man såg då genom gelfiltreringsexperiment i sefaros att den enzymatiska aktiviteten, som förknippas med PARN utgjordes av ett enzym med en molekylvikt på 180-220kDa. Ett protein-protein crosslink experiment utfördes på 75kDa peptiden och slutsatsen kunde dras att PARN borde ha en struktur i form av en oligomer med tre subenheter. Samma grupp kunde även, genom *in vitro* studier, dra slutsatsen att PARN kräver divalenta metallkationer för funktion och är särskilt beroende av närvaron av Mg²⁺. Under denna studie gjorde de en intressant observation hos PARN, nämligen att närvaron av mRNA med en 5'-cap deadenylerades mer effektivt än mRNA, som saknade cap. Ytterligare en observation som ledde till misstanke om att PARN interagerar med cappen var att PARN interagerade kraftigt med en 7-metyl GTP matrix, som användes under reningen, då denna matrix brukar användas till att rena fram capbindande proteiner (Martínez *et al.* 2000). Det har senare konstaterats att PARN faktiskt interagerar med 5'-capen och att denna interaktion förstärker PARNs nukleasaktivitet.

Samma år, som Martínez studie blev publicerad, kom ytterligare en studie som återigen kunde visa genom studier utförda *in vitro* att deadenyleringen via PARN påverkades negativt om icke cappade mRNA var närvarande. Ytterligare experiment lade fram mer bevis för att PARN interagerar med cappen genom att tillsatser av capbindande proteiner, ex eIF4E påverkade deadenyleringen negativt. Om man blockerade åtkomsten av cappen exempelvis genom att introducera en öglestruktur i 5'-UTR påverkades PARNs aktivitet negativt. Allt detta tillsammans blev en väldigt stor indikation på att 5'-cappen och PARN interagerar (Gao *et al.* 2000). Den 5' bindande egenskapen hos PARN blev senare bekräftad och att bindning av cappen troligtvis inducerar en konformationsförändring hos PARN, som stimulerar dess aktivitet via en så kallad allosterisk effekt (Nilsson *et al.* 2007 Martínez *et al.* 2001). En intressant möjlighet, som reste sig ur detta, är att olika subenheter av PARN utför olika

arbeten. Att en subenhet skulle vara ansvarig för att binda till cappen medan en annan subenhet binder till mRNA då man har visat att PARN har egenskapen att både binda cappen och poly(A) via en RNA recognition motif (RRM) (Nilsson *et al.* 2007). Man har visat genom att lösa kristallstrukturen för PARN bundet till cappen vid en upplösning på 3 Å att PARN binder cappen genom både sin nukleasdomän och via en RRM (Nilsson 2008). Denna egenskap hos PARN att inte bara interagera med och degradera poly(A) utan att även interagera med 5'-cappen gör PARN till ett oerhört intressant och unikt enzym bland de deadenylaser, som har beskrivits. PARN har hittats i däggdjur såväl som i växter och vissa arter av insekter, men man har inte funnit något liknande enzym i *Drosophila melanogaster* och *S.cerevisiae* (Garneau *et al.* 2007). Se tabell 1 för sammanfattning.

Tabell 1. Sammanfattning av de enzym, som är inblandade i deadenyleringen av eukaryota mRNA.

Komplex	Komponent	Aktivitet	Funktion
PAN2/PAN3	PAN2 PAN3	3'-5' exonukleas	Inblandade i första fasen av deadenyleringen, behöver PABPI för funktion.
Ccr4-Not	Ccr4 Caf1 (Pop2) Caf40 Caf130 Not1 Not2 Not3 Not4 Not5	3'-5' exonukleas 3'-5' exonukleas	Inblandad i andra fasen av deadenyleringen, inhiberas av PABPI.
PARN	PARN	3'-5' exonukleas	Deadenylas, inhiberas av cap-bindande proteiner, stimuleras av 5'-m ⁷ GpppG.

Efter att ett mRNA har blivit deadenylet initieras nedbrytningen av mRNA via en av de två huvudsakliga degraderingsvägarna. Nämligen antingen via den så kallade decapping-beroende 5'→3' nedbrytningen, som kräver hydrolys av 7-metylguanodin cappen för initiering, eller via en decapping-oberoende 3'→5' nedbrytningsmekanism, som avslutas med att cappen bryts ned (Garneau *et al.* 2007).

Decapping-beroende 5'→3' nedbrytning

I den decapping-beroende 5'→3' nedbrytningen initieras själva nedbrytningen av mRNA molekylerna via en viktig decappingmekanism, vars uppgift är att hydrolysera 7-metylguanosisin cappen och på det sättet göra mRNA tillgängligt för exoribonukleaser, som i sin tur bryter ned molekylerna. Vad är det som ansvarar för hydrolysen av cappen? I eukaryota celler har man identifierat ett enzymkomplex, som är huvudaktören i att hydrolysera capstrukturen. Komplexet utgörs av två komponenter i *S.cerevisiae* och tre komponenter i högre eukaryoter (Garneau *et al.* 2007). I jäst består komplexet av produkterna från generna *DCP1* samt *DCP2* och tillsammans utgör de det katalytiskt aktiva komplexet Dcp1/Dcp2. Hos högre eukaryoter, inklusive människor, finns ett tredje protein som är väsentligt för ett funktionellt komplex nämligen det så kallade Hedls proteinet (She *et al.* 2008). Forskare har visat att Dcp2 är den komponent, som bär aktiviteten att hydrolysera cappen. Aktiviteten av Dcp2 genererar m⁷-GDP, som biprodukt och resulterar i en 5'-ände, på mRNA, med en fri fosfatgrupp (Wang *et al.* 2002). I försök att ytterligare karaktärisera Dcp2 hos däggdjur har man visat att Dcp2 kräver divalenta metallkationer för aktivitet och Mn²⁺ har demonstrerats att stimulera aktiviteten av Dcp2 effektivast i jämförelse med exempelvis Mg²⁺. Man såg även i samma studie att Dcp2 bär en evolutionärt konserverad 168 aminosyror stor Nudix domän, som har 7-metylguanosisin cap hydrolysyaktivitet. Under denna studie kunde forskarna observera en intressant egenskap hos Dcp2, nämligen att Dcp2 inte kan hydrolysera en cap, som inte är associerad till ett mRNA. Detta lade fram bevis för att Dcp2 kan vara ett RNA bindande protein, som kräver RNA för att kunna hydrolysera cappen (Piccirillo *et al.* 2003).

Dcp2 RNA bindande egenskaper bekräftades så sent som för ett år sedan genom strukturella studier av Dcp1/Dcp2 i *Schizosaccharomyces pombe* utförda av She med medarbetare. De kunde se att Dcp2 binder till RNA via en del av sin Nudix domän (betecknas Box B), som är en del av det katalytiska centrat. De såg även tecken på att Dcp2 borde existera i två strukturellt olika former. Där den första formen är ett öppet komplex och den andra formen är ett stängt komplex. De kunde visa att det stängda komplexet är en mer katalytiskt aktiv struktur (She *et al.* 2008). Om nu Dcp2 både innehar den katalytiska egenskapen och den RNA bindande egenskapen, vad har då Dcp1 och Hedls protein för funktion? Man har tidigare sett att Dcp1 krävs för hydrolys av cappen *in vivo* och att Dcp1 tros stimulera aktiviteten hos Dcp2 *in vitro*. Varför krävs Dcp1 och hur kan Dcp1 stimulera aktiviteten hos Dcp2? Följande information är grundad på upptäckter av She med medarbetare, som publicerades 2008. De kunde se att Dcp1 huvudsakliga funktion var att binda till Dcp2 och genom denna interaktion stimulera dess aktivitet. Dcp1-Dcp2 interaktionen utgörs av en 1016Å stor yta där Dcp1 binder till en aminoterminal (N-terminal) lokaliserad α-helix domän på Dcp2. Det finns två möjliga konsekvenser av denna interaktion, som diskuteras av She. Där den första är att Dcp1 skulle förstärka komplexets affinitet för RNA, men detta tycks inte stämma då studier som har gjorts visar att Dcp1/Dcp2 komplexet binder RNA med lika hög affinitet, som enbart Dcp2. Den andra möjligheten är att Dcp1 på något sätt skulle göra kemin hos reaktionen annorlunda. Man tror att Dcp1 interaktion med Dcp2 stimulerar bildandet av det stängda komplexet hos Dcp2, vilket i sin tur skulle leda till en effektivare hydrolys av cappen. Detaljerna hur detta skulle gå till på molekylär nivå är ännu inte fullt utredda.

Funktionen hos Hedls protein i högre eukaryoter tros vara att binda ihop Dcp1 och Dcp2. Eftersom att She med medarbetare kunde se att Dcp1-Dcp2 interaktionen involverar vissa aminosyror, som hos högre eukaryoter är mer variabla vilket skulle leda till en svagare interaktion mellan de båda. Detta pekar på ett möjligt behov av proteiner för att stabilisera interaktionen (She *et al.* 2008).

Bortsett från att Dcp1/Dcp2 spelar huvudrollen i att hydrolysera capstrukturen har man identifierat ett antal proteiner, som stimulerar processen som är beskriven ovan. Dessa proteiner går under namnet sm-lika (Lsm) proteiner. Lsm är ett heptameriskt komplex bestående av sju subenheter Lsm1-7 vars huvudsakliga uppgift tros vara att associera med den deadenylerade 3' änden och antingen direkt eller indirekt förstärka interaktionen mellan RNA och Dcp1/Dcp2, vilket stimulerar borttagningen av 7-metylguanosen cappen (Tharun och Parker 2001).

Efter att cappen har hydrolyserats av Dcp1/Dcp2 är mRNA mottaglig för 5'→3' nedbrytning via exoribonukleas 1, Xrn1 (Garneau *et al.* 2007).

Decapping-oberoende 3'→5' nedbrytning

Den andra vägen ett mRNA kan gå efter deadenylering för degradering är via en decapping-oberoende 3'→5'. Det, som menas med decapping-oberoende är att den inte kräver hydrolys av 7-metylguanoscappen för initiering.

Denna nedbrytningsväg involverar ett 400kDa stort cytoplasmiskt proteinkomplex med 3'→5' exonukleas aktivitet, som kallas för Exosomen. Den eukaryota exosomen är ett stort komplex bestående av flera delar och finns i alla eukaryoter, men som för väldigt många proteiner har förståelsen för dess funktion kommit från studier gjorda på *S.cerevisiae*.

Exosomen består delvis av en kärna, som utgörs av sex polypeptider: Rrp41, Rrp41, Rrp43, Rrp45, Rrp46 och Mtr3p. Dessa sex peptider utgör tillsammans en ringstruktur (Lorentzen och Conti 2005). Ovanpå ringstrukturen finns ytterligare tre peptider lokaliserade: Rrp4, Rrp40 och Csl4, som utgör exosomens cap, vars egenskap troligtvis är att binda samman kärnan och/eller att binda de co-faktorer exosomen kräver för sin funktion. En intressant egenskap hos exosomen är att trots att alla sex kärnproteiner innehåller RNAs PH-domäner, som är besläktade med exonukleaser, så som det bakteriella nukleaset PNPas, är det inte kärnproteinerna, som är ansvariga för den exosomförknippade 3'→5' exonukleasaktiviteten. Utan det finns en tionde subenhet, som är homolog med den bakteriella RNAs familjen RNAs II. Denna brukar betecknas Rrp44 och innehar 3'→5' exonukleasaktivitet (Schaeffer *et al.* 2009). Exosomen har, som huvudsakliga funktion inom mRNA degradering att bryta ned hela mRNA 3'→5' fram till den 5' lokaliserade 7-metylguanosen cappen, vilken den inte kan arbeta på. För att undvika en ansamling av cappade oligoribonukleotider behövs ett protein, som kan ta hand om och bryta ned cappen. Proteinet, som har identifierats med denna egenskap är en 40kDa stor polypeptid och går under namnet scavenger decapping enzyme (DcpS). DcpS tillhör histidin triad superfamiljen av pyrofosfatas (HIT). Det som karakteriserar HIT fosfatasen är att de är nukleotidbindande proteiner med en väldigt konserverad HIT del. Denna del utgörs av sex aminosyror med tre stycken histidiner, som skiljs åt genom hydrofoba aminosyror (Liu *et al.* 2002). DcpS har identifierats, som en homodimer, där båda subenheterna besitter ett katalytiskt aktivt säte, med två strukturellt skilda former. En symmetrisk form där cappen inte är bunden och en asymmetrisk form med en bunden capstruktur. Dessa konformationer förklaras med att när DcpS binder cappen skapas en konformationsförändring hos enzymet från en öppen symmetrisk konformation till en stängd asymmetrisk konformation. Forskare har visat genom kinetikstudier att den stängda konformationen är essentiell för att katalysera hydrolysen av cappen. En modell för hydrolys via DcpS har tagits fram och den beskriver mekanismen enligt följande:

1. DcpS binder m^7GpppN (N = oligoribonukleotid)
2. Denna bindning genererar en konformationsförändring hos DcpS från öppen till stängd form.
3. DcpS katalyserar hydrolys av m^7GpppN till $m^7GMP+ppN$
4. Produkterna frigörs och DcpS återgår till den öppna formen (Liu *et al.* 2008).

DcpS är, intressant nog, inte enbart inblandad i 3'→5' nedbrytningen av mRNA. Upptäckter gjorda av bland annat Van Dijk med medarbetare kunde peka på att DcpS är inblandad i ytterligare hydrolys av den biprodukt, som bildas via Dcp1/Dcp2 i 5'→3' nedbrytningen. Man såg att biprodukten m⁷-GDP, som genereras av Dcp1/Dcp2, hydrolyseras till m⁷-GMP med hjälp av DcpS, vilket visar att DcpS kan katalysera hydrolysen av flera olika substrat. Den biologiska relevansen till varför DcpS kan hydrolysera både m⁷-GpppN och m⁷-GDP till m⁷-GMP har diskuterats och man tror att omvandlingen till m⁷-GMP är nödvändig för att undvika att exempelvis m⁷-GDP inkorporeras tillbaka in i RNA (Van Dijk *et al.* 2003).

Det faktum, som tidigare har tagits upp, att nivån av mRNA molekyler till en väldigt stor del är reglerad av dess degradering väcker en intressant fråga (Fan *et al.* 2002). Hur kan cellen reglera nedbrytningen av mRNA?

Reglering av mRNA degradering: mRNA stabilitet

Tidigare i texten har det nämnts att mRNA molekyler nästan aldrig förekommer, som nakna molekyler, utan är bundna till en hel arsenal av olika RNA bindande proteiner, som binder till specifika sekvenser på mRNA och bygger upp mRNP. Det har även nämnts att interaktionerna mellan de RNA bindande proteinerna och mRNA kan påverka stabiliteten hos mRNA molekylen och på det sättet påverka hur snabbt mRNA bryts ned. En konsekvens av det blir att cellen kan reglera genuttrycket på ett enkelt och smidigt sätt (Glisovic *et al.* 2008).

Där olika celler exempelvis kan dirigera om sitt genuttryck till följd av externa stimuli genom olika signalvägar. Ett exempel på en sådan signalväg är regleringen för en transportör av de essentiella aminosyrorna arginin och lysin, Cat-1, som innehar ett regulatoriskt sekvenser på sitt mRNA i 3'-UTR. Forskare har sett att om man begränsar nivån av aminosyror får man en ökad stabilitet av Cat-1-mRNA genom bindning av en stabiliserande faktor. Några konsekvenser av denna stabilisering är att livslängden hos mRNA ökar då det inte bryts ned lika fort och att nivån av Cat-1 transportören ökar, vilket resulterar i ett effektivare upptag av arginin och lysin. Detta är ett bra exempel på hur cellen genom svar på yttre signaler kan modulera stabiliteten hos mRNA, som i sin tur påverkar genuttrycket, så att cellen kan anpassa sig till nya förhållanden (Bevilacqua *et al.* 2003).

Denna sektion kommer att fokusera på hur cellen genom olika RNA bindande faktorer, som binder till regulatoriska sekvenser på mRNA, kan modulera stabiliteten hos mRNA, som i sin tur påverkar hur fort ett mRNA bryts ned.

De flesta sekvenser, som har till uppgift att interagera med RNA bindande proteiner och modulera stabiliteten hos mRNA finns lokaliserade till 3'-UTR. Fördelen med att ha regulatoriska element i 3'-UTR och inte i den öppna läsramen (ORF) är att regleringen kan ske effektivt utan att behöva tävla med translaterande ribosomer om att binda till mRNA. De flesta RNA bindande proteinerna, som känner igen och binder till dessa element har som huvudsakliga funktion att attrahera degraderingsapparaten (Garneau *et al.* 2007). Det viktigaste och kanske det mest välstuderade exemplet på regulatoriska sekvenser är de så kallade AU-rika elementen.

AU-rika element

AU-rika element (ARE) är belägna till 3'-UTR och byggs upp runt en sekvens, som karaktäriseras av fem nukleotider, AUUUA (Lagnado *et al.* 1994). AU-rika element kan delas upp i tre olika grupper. Den första gruppen involverar AREs med upp till tre stycken utspridda AUUUA sekvenser, som omgivs av U-rika sekvenser. Den andra gruppen av AREs

innefattar element med överlappande AUUUA sekvenser. Dessa är inte så vanliga och återfinns exklusivt hos cytokin-mRNA. Den tredje och sista gruppen omfattar element med U-rika sekvenser, men som saknar den karaktäristiska AUUUA pentanukleotiden. Funktionen hos AREs har visats sig vara att agera, som plattformar för bindning av olika ARE-bindande proteiner och dessa proteiner har i sin tur visats sig kunna attrahera degraderingsapparaten och därigenom skynda på nedbrytningsprocessen. ARE är därigenom ett destabiliserings element och mRNA innehållandes ARE ses i regel som instabila.

Ett av dessa proteiner, som har visats sig binda ARE är KH splitsnings regulator proteinet (KSRP). KSRP binder till RNA genom sin KH domän, som är RNA-bindande. Forskning har visat att KH domänen hos KSRP både binder ARE och interagerar med PARN samt exosomen. Efter interaktion med KSRP deadenylerar respektive degraderar PARN och exosomen molekylerna genom 3'→5' nedbrytning. Studier har även indikerat att KSRP binder PARN och exosomen vid samma tidpunkt eller med en smärre tidsförskjutning, men exosomen kan inte börja degradera molekylerna förrän PARN har deadenylerat 3'-poly(A) (Gherzi *et al.* 2004). Ett annat exempel på ARE bindande proteiner, som har visats kunna rekrytera delar av degraderingsmaskineriet så som PARN hos däggdjur är tristetraprolin (TTP). TTP binder till RNA genom två stycken zinkfinger domäner. Bevis har uppkommit genom studier gjorda av Lai med medarbetare, som pekar på att inbindningen av TTP till ARE destabiliserar molekylerna samt stimulerar deadenylering via PARN och detta tros ske utan någon fysisk interaktion mellan TTP och PARN (Lai *et al.* 2003).

Ytterligare ett protein, som kan binda till ARE och stimulera deadenylering via PARN och degradering via exosomen, genom att binda dessa, är RNA helikas associerat med AU-rika element (RHAU). Det har man visat genom studier gjorda i däggdjursceller på mRNA för urokinas plasminogen aktivatorn (uPA), som spelar en viktig roll i olika cellulära processer. De kunde se genom över- och underuttryck av RHAU att det hade en stimulerande påverkan på nedbrytningen av uPA-mRNA innehållandes ARE. En modell, som beskriver en spännande egenskap hos RHAU är att det tros besitta förmågan att dissociera ARE-stabiliserande faktorer, som går igenom nedan, från mRNA och därigenom göra mRNA molekylerna mottagliga för destabilisering följt av deadenylering och nedbrytning. RHAU tros göra detta genom sin helikas aktivitet (Tran *et al.* 2004). Vilka faktorer kan då stabilisera ARE innehållande mRNA?

Ett välstuderat protein, som har som egenskap att stabilisera ARE innehållande mRNA, där ett exempel är Cat-1, är det humana proteinet HuR. HuR stabiliserar mRNA genom att binda till ARE och bromsa ned 3'→5' degraderingen av molekylerna. Det har dock ingen påvisad effekt på deadenyleringen, vilket kunde ses genom experiment där man överuttryckte HuR (Peng *et al.* 1998). Man har även hittat ett annat protein vars funktion tjänar till att stabilisera mRNA genom att binda till ARE i 3'-UTR. Proteinets i fråga betecknas NF90. NF90 är till största delen lokaliserad till kärnan genom en kärnlokaliseringssignal (NLS), men som svar på yttre signaler kan den transporteras ut ur kärnan genom att NF90 även har en kärnexport signal (NES). Väl i cytoplasman tror forskare att NF90 bland annat tävlar om att binda till ARE med TTP och KSRP och att bindning till NF90 stabiliserar molekylerna. En alternativ modell säger att NF90 skulle vara bundet till 3'-UTR redan när mRNA transporteras till cytoplasman, vilket skulle kunna stabilisera molekylerna och skydda dem från destabilisering av KSRP och TTP. Dessa stabiliserande egenskaper hos NF90 såg man genom studier gjorda på IL-2 mRNA i T-celler hos däggdjur (Shim *et al.* 2002). Bortsett från att proteiner kan modulera stabiliteten hos andra mRNA har bevis framkommit att proteinet som translateras från ett specifikt mRNA kan reglera stabiliteten hos sitt eget mRNA via ARE. Ett exempel är

proteinet Bcl-2 där forskare har visat att närvaron av Bcl-2 är essentiell för att reglera nedbrytningen av Bcl-2-mRNA. Bcl-2 tros interagera med sitt eget mRNA och rekrytera destabiliserande faktorer till sitt ARE, vilket i sin tur skulle rekrytera degraderingsapparaten och snabba på nedbrytningen av mRNA. Detta skulle kunna indikera att nedbrytningen av mRNA kan stimuleras genom någon form av feedback mekanism där nivån av genprodukten reglerar sitt eget uttryck post-transkriptionellt (Bevilacqua *et al.* 2003).

Likt många processer i den eukaryota cellen finns det möjlighet att på ett elegant sätt finjustera dessa typer av moduleringar av stabilitet medierad via ARE bindande proteiner. Forskning har nämligen funnit att om vissa av dessa proteiner, exempelvis KSRP, fosforyleras av kinaser kan dess affinitet för RNA minska och i sin tur göra att KSRP inte kan binda till ARE (Briata *et al.* 2005). Dessa exempel, som har presenterats här är tecken på att den huvudsakliga degraderingsvägen, som kan regleras via AREs är 3'→5' degradering.

På senare år har forskare upptäckt något oerhört spännande. Nämligen att vissa komponenter, som utgör mRNA degraderingsmaskineriet skulle vara lokaliserade till specifika granulära strukturer i cytoplasman. Detta grundade begreppet om processing bodies (P-bodies).

P-bodies

P-bodies är, som sagt, granulära strukturer i cytoplasman där vissa komponenter av degraderingsmaskineriet har återfunnits, vilket skulle kunna visa på en intracellulär organisation av degraderingsprocessen. I P-bodies har man funnit alla komponenter, som är involverade i 5'→3' nedbrytningen det vill säga Dcp1/Dcp2 decapping komplexet, Ccr4-Not deadenylerings komplexet och 5'→3' exoribonukleaset Xrn1. Det har visats att dessa komponenter inte helt exklusivt finns lokaliserade till P-bodies, men hur stor del som skulle vara fördelat till cytoplasman vs P-bodies är oklart (Garneau *et al.* 2007). Sheth och Parker kunde genom studier utförda i jäst, där de märkte komponenter involverade i olika degraderingsmekanismer med GFP, visa att det fanns aktiv degradering i dessa strukturer och de fann även att translationellt tysta RNA dömda till nedbrytning kunde lokaliseras till dessa strukturer (Sheth och Parker 2003). Den stora frågan för forskarna har varit inriktad på hur dessa strukturer kan bildas i cytoplasman och vad, som krävs för bildning. Det finns inte ett enkelt svar på den frågan, som med alla andra frågor inom biologin utan det har identifierats en rad olika processer, som leder till formationen av P-bodies. Nivån och storleken av P-bodies har en tendens att öka när komponenter hos 5'→3' degraderingen har slagits ut eller när systemet innehåller en stor mängd med RNA som skall degraderas (Sheth och Parker 2003). Ytterligare studier gjorda av Teixeira med medarbetare på jäst, som utfördes för att reda ut P-body formation kunde visa att nivån av P-bodies ökar under stressiga förhållanden så som osmotisk stress, UV-strålning och svält. De kunde under samma studie visa att formationen av P-bodies krävde närvaro av icke-translaterande mRNA. Det kunde man se genom att låsa mRNA i den translaterande fasen, vilket reducerade nivån av P-bodies (även under stressiga förhållanden). Detta bevis stärker konceptet om att translationellt tysta mRNA skulle associera till P-bodies. De såg även att närvaro av RNA var essentiellt genom att om proverna, som hade en hög halt av P-bodies behandlades med RNAs A såg man en reducerad nivå av P-bodies (Teixeira *et al.* 2005). Forskare har nyligen sett att formationen av P-bodies hos däggdjur kräver deadenylerade mRNA (Zheng *et al.* 2008). Allt detta tillsammans tycks tyda på att P-bodies verkligen är en struktur där mRNA nedbrytning tar plats. En annan intressant aspekt är att mRNA i P-bodies kan skifta mellan att vara i inaktiva P-bodies och aktiva i cytoplasman. Detta pekar på att P-bodies inte enbart är strukturer där nedbrytning av mRNA är det viktiga utan att de även kan bidra med regulatoriska funktioner när det kommer till att strukturera och inaktivera mRNA i cytoplasman (Brenques *et al.* 2005).

Diskussion

I den här uppsatsen har jag gjort ett försök till att beskriva hur mRNA degradering i den eukaryota cellen kan gå till och gett några exempel på hur cellen på ett smidigt och elegant sätt kan reglera denna process via regulatoriska sekvenser i 3'-UTR. En uppenbar insikt, som ges är att processerna bakom mRNA degradering från deadenylering av 3'-Poly(A) svansen till total nedbrytning är oerhört komplexa och involverar en kolossal mängd av olika enzymer och faktorer. Det faktum att det är så komplext ger stora möjligheter till att reglera denna process vid de olika stegen. En fråga, som har hamnat lite i skymundan bakom alla reaktionsvägar, enzymkomplex och regleringsmekanismer är: Vilka möjligheter till genreglering kan potentiellt finnas med dessa fakta i bakhuvudet? Jag har berört en aspekt där existensen av en eventuell feedback mekanism där nivån av en genprodukt skulle kunna märka ett mRNA för nedbrytning. Det är en ganska intressant tanke eftersom att feedback mekanismer är väldigt vanliga i cellulära system och det återspeglar proteinnivån på ett smart sätt. Man skulle kunna tänka sig att ett protein behövs av cellen för en viss funktion, men att det bara behövs till en viss mängd. Om då proteinet hade en sådan affinitet för RNA att det kan binda till sitt eget mRNA vid en bestämd koncentration, rekrytera destabiliserande faktorer, som därefter hjälper till att stimulera nedbrytningen av sitt eget mRNA. Det skulle medföra att cellen kan hålla den önskade nivån av proteinet genom att påverka genuttrycket post-transkriptionellt. Jag tror att den responsen skulle vara betydligt snabbare än om proteinet var tvungen att starta en signalkaskad, som resulterar i att transkriptionen av genen bromsas upp. Vad finns det för potentiella möjligheter för cellen att reglera genuttrycket av exempelvis enzymkomplex, som kräver flera olika komponenter? En potentiell förklaring har givits och den säger att cellen har en möjlighet att synkronisera nedbrytningen av mRNA, som kodar för proteiner involverade i samma process. Denna synkronisering tros fungera genom att de mRNA, som ska brytas ned samtidigt bär likartade regulatoriska sekvenser och deras nedbrytning stimuleras av samma RNA-bindande faktorer (Wilusz och Wilusz 2004).

En lockande tanke skulle kunna vara att de proteiner, som på ett synkroniserat sätt ska brytas ned känns igen av faktorer, som inte direkt stimulerar nedbrytningen utan stänger av translationen och transporterar mRNA molekylerna till P-bodies för nedbrytning. Vad kan då vara den viktiga biologiska funktionen hos P-bodies? Idén tycks vara att P-bodies ger cellen ett verktyg för att kunna strukturera de mRNA, som är dömda för nedbrytning och på så sätt försäkra sig om att mRNA molekylerna inte återgår till sin translationellt aktiva form, vilket skulle kunna generera en oönskad proteinprodukt (Garneau *et al.* 2007). Eftersom att man inte vet så oerhört mycket om P-bodies skulle ett sånt fynd, som indikerar en inblandning i synkroniseringen av mRNA degradering ytterligare peka på betydelsen av P-bodies, som organisatörer för cytoplasmatisk mRNA degradering.

Väldigt mycket är idag utrett inom området eukaryot mRNA degradering och post-transkriptionell genreglering, men mycket jobb kvarstår då en hel del frågetecken om molekylära mekanismer och dess betydelse återstår att besvaras.

Tack

Jag vill först och främst börja med att tacka mina medstudenter Ken Andersson och Therese Gustafsson för värdefulla kommentarer och synpunkter, som har varit en stor hjälp vid omarbetandet av uppsatsen. Jag vill även tacka min handledare Lage Cerenius för alla kommentarer han givit på uppsatsen och för alla snabba svar på mina e-mail.

Referenslista

- Adamson TE. 2005. Functional Coupling of Cleavage and Polyadenylation with Transcription of mRNA. *Journal of Biological Chemistry* **280**:32262-32271.
- Bevilacqua A, Ceriani MC, Capaccioli S, Nicolini A. 2003. Post-Transcriptional Regulation of Gene Expression by Degradation of Messenger RNAs. *Journal of Cellular Physiology* **195**:356-372.
- Brenner S, Jacob F, Meselson M. 1961. An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature* **190**: 576-580.
- Brengues M, Teixeira D, Parker R. 2005. Movement of Eukaryotic mRNAs Between Polysomes and Cytoplasmic Processing Bodies. *Science* **310**:486-489.
- Briata P, Forcales SV, Ponassi M, Corte G, Chen CY, Karin M, Puri PL, Gherzi R. 2005. p38-Dependent Phosphorylation of the mRNA Decay-Promoting Factor KSRP Controls the Stability of Select Myogenic Transcripts. *Molecular Cell*. **20**:891-903.
- Brown CE, och Sachs AB. 1998. Poly(A) Tail Length Control in *Saccharomyces cerevisiae* Occurs by Message-Specific Deadenylation. *Molecular and cellular biology* **18**:6548-6559
- Brown CE, Tarun SZ, Boeck R JR, Sachs AB. 1996. *PAN3* Encodes a Subunit of the Pab1p-Dependent Poly(A) Nuclease in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **16**:5744-5753.
- Chen J, Chiang Y, Denis CL. 2002. CCR4, a 3'-5' poly(A) RNA and ssDNA exonuclease, is the catalytic component of the cytoplasmic deadenylase. *EMBO journal* **21**: 1414-1426.
- Cho E, Takagi T, Moore CR. *et al.* 1997. mRNA capping enzyme is recruited to the transcription complex by phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes and development* **11**:3319-3326.
- Crick F. 1970. The Central Dogma of Molecular Biology. *Nature* **227**: 561-563.
- Daugeron M, Mauxion F, Séraphin B. 2001. The yeast POP2 gene encodes a nuclease involved in mRNA deadenylation. *Nucleic Acids Research* **29**:2448-2455
- Decker CJ, Parker R. 1993. A turnover pathway for both stable and unstable mRNAs in yeast: evidence for a requirement for deadenylation. *Genes and development* **7**:1632-1643.
- Edmonds M, Vaughan MH JR, Nakazato H. 1971. Polyadenylic acid sequences in the Heterogeneous Nuclear RNA and Rapidly-Labeled Polyribosomal RNA of HeLa Cells: Possible Evidence for a Precursor Relationship Proceedings of the National Academy of science **68**:1336-1340.
- Fan J, Yang X, Wang W, Wood III, WH, Becker KG, Gorospe M. 2002. Global analysis of stress-regulated mRNA turnover by using cDNA arrays. *Proceedings of the National Academy of science* **99**:10611-10616.
- Gao M, Fritz DT, Ford LP, Wilusz J. 2000. Interaction between a Poly(A)-Specific Ribonuclease and the 5' Cap Influences mRNA Deadenylation Rates In Vitro. *Molecular Cell* **5**:479-488.
- Garneau NL, Wilusz J, Wilusz CJ. 2007. The highways and byways of mRNA decay *Nature* **8**:113-126.
- Gherzi R, Lee KY, Briata P, Wegmüller D, Moroni C, Karin M, Chen CY. (2004). A KH Domain RNA Binding Protein, KSRP, Promotes ARE-Directed mRNA Turnover by Recruiting the Degradation Machinery. *Molecular Cell* **14**:571-583.
- Glisovic T, Bachorik JL, Yong J, Dreyfuss G. 2008. RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation *FEBS Letters* **582**:1977-1986
- Hamm J, Mattaj IW. 1990. Monomethylated cap structures facilitate RNA export from the nucleus. *Cell*. **63**:109-118.
- Itoh N, Yamada H, Kaziro Y, Mizumoto K. 1987. Messenger RNA Guanylyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae* *Journal of Biological Chemistry* **262**: 1989-1995.

- Kiong Ho C, McCracken S, Bentley D, Schwer B, Shuman S. 1998. The Guanylyltransferase Domain of Mammalian mRNA Capping Enzyme Binds to the Phosphorylated Carboxyl-terminal Domain of RNA Polymerase II *Journal of Biological Chemistry* **273**:9577-9585.
- Kornberg RD. 2001. The Eukaryotic Gene Transcription Machinery. *Journal of Biological Chemistry* **382**: 1103-1107.
- Lagnado CA, Brown CY, Goodall GJ 1994. AUUUA Is Not Sufficient To Promote Poly(A) Shortening and Degradation of an mRNA: the Functional Sequence within AU-Rich Elements May Be UUAUUUA(U/A)(U/A). *Molecular and cellular biology* **14**:7984-7995.
- Lai WS, Kennington EA, Blackshear PJ. 2003. Tristetraprolin and Its Family Members Can Promote the Cell-Free Deadenylation of AU-Rich Element-Containing mRNAs by Poly(A) Ribonuclease. *Molecular and cellular biology* **23**:3798-3812.
- Lima CD. 1999. Structure and Mechanism of Yeast RNA Triphosphatase: An Essential Component of the mRNA Capping Apparatus *Cell* **99**:533-543.
- Liu S, Rajagopal V, Patel SS, Kiledjian M. 2008. Mechanistic and Kinetic Analysis of the DcpS Scavenger Decapping Enzyme *Journal of Biological Chemistry* **283**:16427-16436.
- Liu H, Rodgers ND, Jiao X, Kiledjian M. 2002. The scavenger mRNA decapping enzyme DcpS is a member of the HIT family of pyrophosphatases *EMBO journal* **21**:4699-4708.
- Lorentzen E, Conti E. 2005. Structural Basis of 3' End RNA Recognition and Exoribonucleolytic Cleavage by an Exosome RNase PH Core. *Molecular Cell* **20**
- Mandel CR, Kaneko S, Zhang H, Gebauer D, Vethantham V, Manley JL, Tong L. 2006. Polyadenylation factor CPSF-73 is the pre-mRNA 3'-end-processing endonuclease. *Nature* **444**, doi:10.1038/nature05363.
- Marcotrigiano J, Gingras A, Sonenberg N, Burley SK. 1997. Cocystal Structure of the Messenger RNA 5' Cap-Binding Protein (eIF4E) Bound to 7-methyl-GDP *Cell* **89**: 951-961.
- Martínez J, Ren Y, Thuresson A, Hellman U, Åström J, Virtanen A. 2000. A 54-kDa Fragment of the Poly(A)-specific Ribonuclease Is an Oligomeric, Processive, and Cap-interacting Poly(A)-specific 3' Exonuclease. *Journal of Biological Chemistry* **275**:24222-24230.
- McCracken S, Fong N, Yankulov K, Barrantyne S, Pan G, Greenblatt J, Patterson SD, Wickens M, Bentley DL. 1997. The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription *Nature* **385**:357-361.
- Nilsson P. 2008. Allosteric regulation of mRNA metabolism: mechanisms of cap-dependent regulation of poly(A)-specific ribonuclease (PARN). *Doktorsavhandling, Uppsala universitet*.
- Nilsson P, Henriksson N, Niedzwiecka A, Balatsos NAA, Kokkoris K, Eriksson J, Virtanen A. 2007. A Multifunctional RNA Recognition Motif in Poly(A)-specific Ribonuclease with Cap and Poly(A) Binding Properties. *Journal of Biological Chemistry* . **282**:32902-32911.
- Peng SS, Chen AC, Xu NShyu A. 1998. RNA stabilization by the AU-rich element binding protein, HuR, an ELAV protein. *EMBO journal* **17**:3461-3470.
- Piccirillo C, Khanna R, Kiledjian M. 2003. Functional characterization of the mammalian mRNA decapping enzyme hDcp2 *RNA* **9**:1138-1147.
- Ryan K, Calvo O, Manley JL. 2004. Evidence that polyadenylation factor CPSF-73 is the mRNA 3' processing endonuclease *RNA* **10**:565-573.

- Sachs AB, Deardorff JA. 1992. Translation initiation requires the PAB-dependent poly (A) ribonuclease in yeast *Cell* **70**:961-973.
- Schaeffer D, Tsanova B, Barbas A, Reis FP, Dastidar EG, Sanchez-Rotunno M, Arraiano CM och Van Hoof A. (2009.) The exosome contains domains with specific endoribonuclease, exoribonuclease and cytoplasmic mRNA decay activities. *Nature* **16**:56-62.
- Schroeder SC, Schwer B, Shuman S. *et al.* (2000). Dynamic association of capping enzymes with transcribing RNA polymerase II *Genes and development* **14**:2435-2440.
- Shatkin AJ, Manley JL. 2000. The ends of the affair: Capping and polyadenylation. *Nature structural biology* **7**: 838-842.
- She M, Decker, CJ, Svergun DI, Round A, Chen N, Muhlrads D, Parker R, Song H. 2008. Structural Basis of Dcp2 Recognition and Activation by Dcp1. *Molecular Cell* **29**:337-349.
- Sheth U, Parker R. 2003. Decapping and Decay of Messenger RNA Occur in Cytoplasmic Processing Bodies. *Science* **300**:805-808.
- Shibagaki Y, Itoh N, Yamada H, Nagata S, Mizumoto K. 1992. mRNA Capping Enzyme *Journal of Biological Chemistry* **267**:9521-9528.
- Shim J, Lim H, Yates III JR, Karin M. 2002. Nuclear Export of NF90 Is Required for Interleukin-2 mRNA Stabilization. *Molecular Cell* **10**:1331-1344.
- Takagi T, Moore CR, Diehn F, Buratowski S. 1997. An RNA 59-Triphosphatase Related to the Protein Tyrosine Phosphatases *Cell* **89**:867-873.
- Teixeira D, Sheth U, Valencia-Sanchez MA, Brengues M, Parker R. 2005. Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *RNA* **11**:371-382.
- Tharun S, Parker R. 2001. Targeting an mRNA for Decapping: Displacement of Translation Factors and Association of the Lsm1p-7p Complex on Deadenylated Yeast mRNAs. *Mol. Cell* **8**
- Thore S, Mauxion F, Séraphin B, Suck D. 2003. X-ray structure and activity of the yeast Pop2 protein: a nuclease subunit of the mRNA deadenylase complex. *EMBO reports* **4**:1150-1155.
- Tran H, Schilling M., Wirbelauer C, Hess D, Nagamine Y. 2004. Facilitation of mRNA Deadenylation and Decay by the Exosome-Bound, DExH Protein RHAU. *Mol. Cell* **13**:101-111.
- Tucker M, Staples RR, Valencia-Sanchez MA, Muhlrads D, Parker R. 2002. Ccr4p is the catalytic subunit of a Ccr4p/Pop2p/Notp mRNA deadenylase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO journal* **21**:1427-1436.
- Tucker M, Valencia-Sanchez MA, Staples RR, Chen J, Denis CL, Parker R. 2001. The Transcription Factor Associated Ccr4 and Caf1 Proteins Are Components of the Major Cytoplasmic mRNA Deadenylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* **104**:377-386.
- Van Dijk E, Le Hir H, Séraphin B. 2003. DcpS can act in the 5'-3' mRNA decay pathway in addition to the 3'-5' pathway. *Proceedings of the National Academy of science* **100**:12081-12086.
- Visa N, Izaurralde E, Ferreira J, Daneholt B, Mattaj IW. 1996. A Nuclear Cap-binding Complex Binds Balbiani Ring Pre-mRNA Cotranscriptionally and Accompanies the Ribonucleoprotein Particle during Nuclear Export *The Journal of Cell biology* **133**:5-14
- Wang Z, Jiao X, Carr-Schmid A, Kiledjian M. 2000. The hDcp2 protein is a mammalian mRNA decapping enzyme. *Proceedings of the National Academy of science* **99**:12663-12668.
- Wagner E, Lykke-Andersen J. 2002. mRNA surveillance: the perfect persist. *Journal of cell science* **115**:3033-3038.
- Whale E. 1990. Purification and Characterization of a Mammalian Polyadenylate Polymerase Involved in the 3' End Processing of Messenger RNA Precursors. *Journal of Biological Chemistry* **226**:3131-3139.

- Wilusz CJ, Wilusz J. 2004. Bringing the role of mRNA decay in the control of gene expression into focus. *Trends in genetics* **20**:491-497.
- Yamashita A, Chang T, Yamashita Y, Zhu W, Zhong Z, Chen CA, Shyu A. 2005. Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. *Nature* **12**: 1054-1063.
- Zheng D, Ezzeddine N, Chen CA, Zhu W, He X, Shyu A. 2008. Deadenylation is prerequisite for P-body formation and mRNA decay in mammalian cells. *The Journal of Cell biology* **182**:89-101.
- Åström J, Åström A, Virtanen A. 1992. Properties of a HeLa Cell 3' Exonuclease Specific for Degrading Poly(A) Tails of Mammalian mRNA. *Journal of Biological Chemistry* **267**:18154-18159.