

# En modell för translokation av korta adenosinsubstrat i det aktiva sätet av poly(A)-specifikt ribonukleas

Jens Berndtsson

Budbärar RNA (mRNA) är den intermediära molekylerna som förflyttar information från DNA till ribosomerna där enzymer tillverkas. Reglering av mRNA är därför en viktig del i vilka gener som uttrycks till proteiner. mRNA skyddas från degradering av en grupp enzymer som heter exonukleas, genom att ha ett skydd av en bakvänd nukleotid framtill ( $m^7G$ -kåpa), och ha en omkring 200 nukleotider lång svans av nukleotiden adenosin kallad poly(A)-svans baktill.

Poly(A)-specifikt ribonukleas (PARN) är en typ av exonukleas som reglerar mRNA genom att klippa av poly(A) svansen en nukleotid i taget bakifrån, och därmed exponera den kodande delen av mRNA för vidare degradering. PARN skiljer sig från andra ribonukleas genom att den kan interagera med  $m^7G$ -kåpan framtill hos mRNA och därmed öka degraderings-hastigheten av poly(A)-svansen. Det aktiva sätet i PARN är av typen DEDDh och består utav fem aminosyror; tre stycken asparaginsyror (D), en glutaminsyra (E), en histidin (H). Den innefattar även två stycken divalenta metalljoner. Tillsammans så skapar dessa en struktur som möjliggör hydrolys av fosfodiesterbindningen mellan nukleotider i poly(A)-svansen av mRNA.

I det här projektet undersöker vi hur degraderingen av adenosinsubstrat som bara är två eller tre nukleotider långa fungerar med två olika typer av divalenta metalljoner i det aktiva sätet (magnesiumjoner eller manganjoner). Vi undersöker även hur degraderingen fungerar när vi testar att byta ut aminosyror i det aktiva sätet. Eftersom korta substrat inte kan "knuffas" in i det aktiva sätet av andra delar av PARN så hoppas vi att kunna mäta hur snabb translokationen det vill säga förflyttningen av substratet i det aktiva sätet är.

Vi fann att av ett substrat som är tre nukleotider långt kunde en nukleotid klippas av lika bra när vi använde magnesiumjoner som manganjoner i det aktiva sätet. Däremot såg vi en markant skillnad när den andra nukleotiden skulle klippas av. Med manganjoner i det aktiva sätet kunde den klippas av relativt snabbt medan den blev oerhört mycket långsammare när magnesiumjoner var den närvarande i stället. I substratet med bara två nukleotider observerade vi samma sak. Alla mutanter vi gjorde var mycket långsammare än vanligt PARN, även om mutationerna gjordes för att efterlikna det aktiva sätet hos likartade enzym.

Utifrån våra resultat har vi skapat en hypotetisk modell för hur korta adenosinsubstrat degraderas. Eftersom tri-nukleotiden kunde degraderas till en di-nukleotid lika snabbt oavsett vilken metalljon som användes medan den efterföljande reaktionen var olika snabba, så tror vi att translokationen blir långsammare när den första och sista nukleotiden inte kan interagera med varandra. Modellen innefattar därför ytterligare en divalent metalljon utöver de två som redan finns i DEDDh strukturen. Vi menar att den tredje metalljonen sitter mellan nukleotiderna i substratet och koordinerar translokationsmomentet.

Att närvaron av manganjoner degraderar substratet snabbare än närvaron av magnesiumjoner tror vi har att göra med att den är mer flexibel i sin struktur och inte binder lika starkt som magnesiumjoner. Det är dock mer troligt att magnesiumjoner används *in vivo* eftersom den kan se skillnad mellan olika nukleotider i substrat och därmed vara specifik för poly(A)-svansen hos mRNA.

Populärvetenskaplig sammanfattning

Examensarbete i biologi 45hp till masterexamen, 2014

EBC och ICM, Uppsala Universitet

Handledare: Prof. Anders Virtanen och Mikael Nissbeck