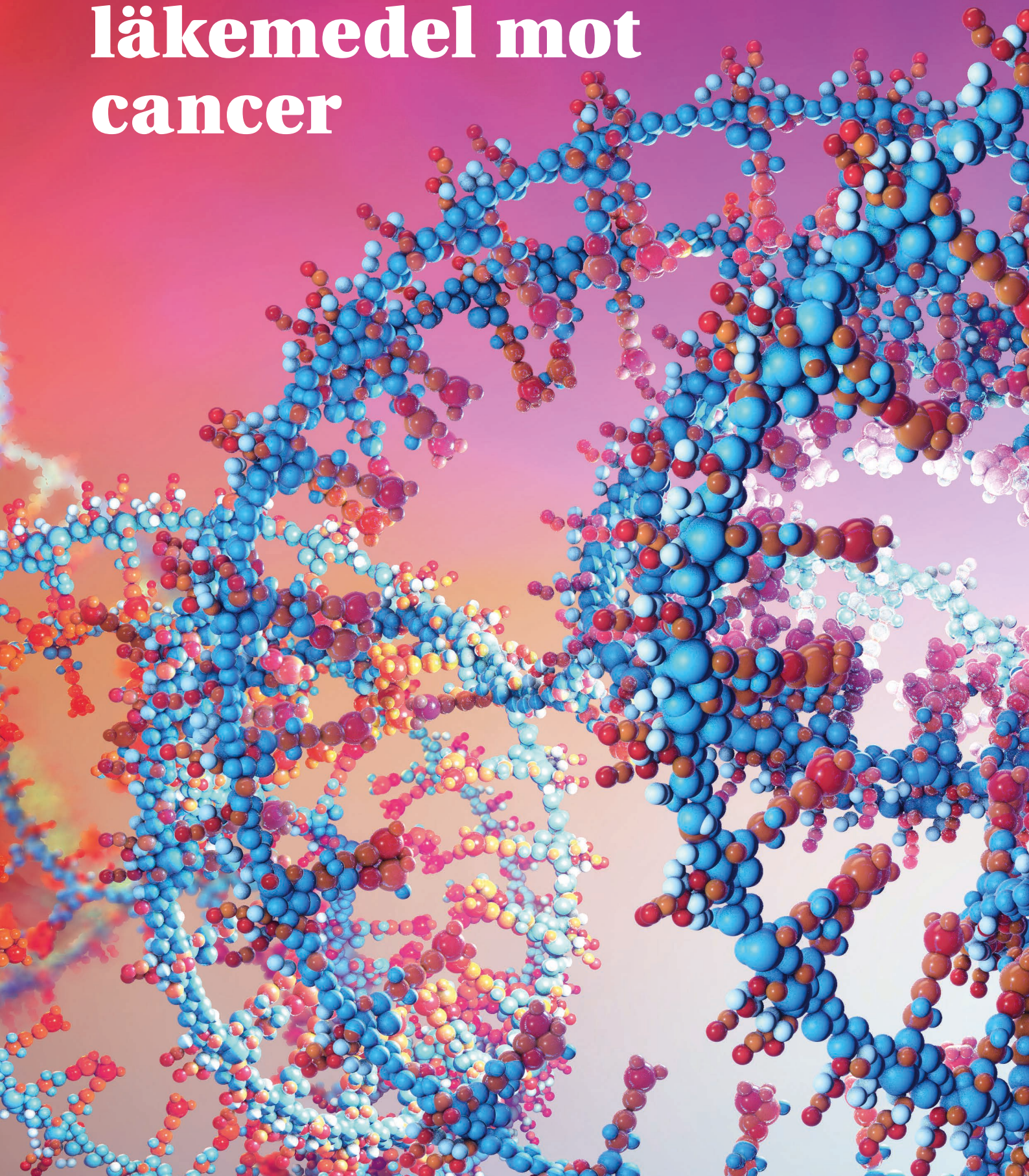
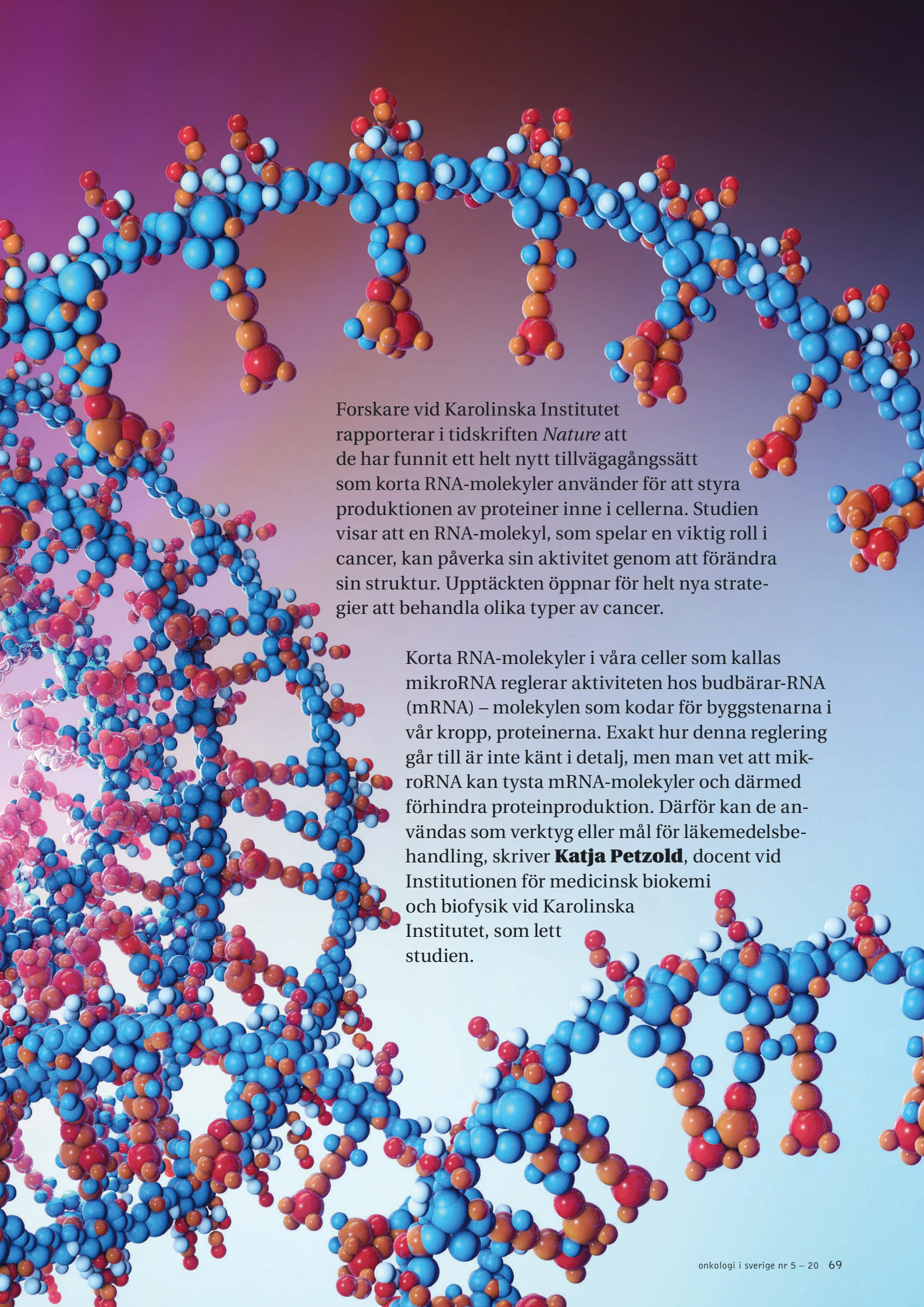


Ny kunskap om hur **RNA** rör sig kan bidra till nya **läkemedel mot** **cancer**





Forskare vid Karolinska Institutet rapporterar i tidskriften *Nature* att de har funnit ett helt nytt tillvägagångssätt som korta RNA-molekyler använder för att styra produktionen av proteiner inne i cellerna. Studien visar att en RNA-molekyl, som spelar en viktig roll i cancer, kan påverka sin aktivitet genom att förändra sin struktur. Upptäckten öppnar för helt nya strategier att behandla olika typer av cancer.

Korta RNA-molekyler i våra celler som kallas mikroRNA reglerar aktiviteten hos budbärar-RNA (mRNA) – molekylen som kodar för byggstenarna i vår kropp, proteinerna. Exakt hur denna reglering går till är inte känt i detalj, men man vet att mikroRNA kan tysta mRNA-molekyler och därmed förhindra proteinproduktion. Därför kan de användas som verktyg eller mål för läkemedelsbehandling, skriver **Katja Petzold**, docent vid Institutionen för medicinsk biokemi och biofysik vid Karolinska Institutet, som lett studien.

P53, proteinet som är känt som genomets portvakt och en viktig cancerregulator, aktiverar transkription av mikroRNA 34a (miR-34a) och är i en återkopplings-slinga reglerad av miR-34a, riktad mot Sirt1, som inaktiverar p53. MiR-34a tillhör den klass av mikroRNA som reglerar proteinuttryck via RNA-induced silencing complex – RISC. RISC består av proteinet Argonaute (här hAgo2) som är laddat med en guide-RNA (en miRNA). Guiden kodar information för målet, som behöver regleras, i de första åtta baserna, så kallade seed-sequence. Om seed består av de åtta Watson-Crick-basparen regleras miRNA mest effektivt, och tills nu har man inget annat medel för att förutsäga miRNA-effektiviteten annat än genom sekvensen av seed – åtta av 22 nukleotider av hela mikroRNA.

KÄRNMAGNETISK RESONANS

Vi utforskade därför hur hela miRNA-sekvensen, dess struktur och även strukturändring förklarar regleringseffektiviteten av miRNA med exemplet miR-34a. Vi studerade strukturen av mikroRNA och dess förändringar, för vi vet att en struktur i sig själv inte kan förklara funktionen. Man kan tänka sig det som att en bild av en stängd sax som ser ut som en dolk, bara om den öppnar sig får den funktionen att skära. Tidigare har man sagt att en struktur relateras till en funktion, men nu måste vi utveckla det mer: en RNA-molekyl behöver ändra sin struktur för att uppfylla sina funktioner. En RNA-molekyl kan även ha flera olika strukturer som kan relatera till olika funktioner eller växla mellan att sätta på och stänga av funktionen.

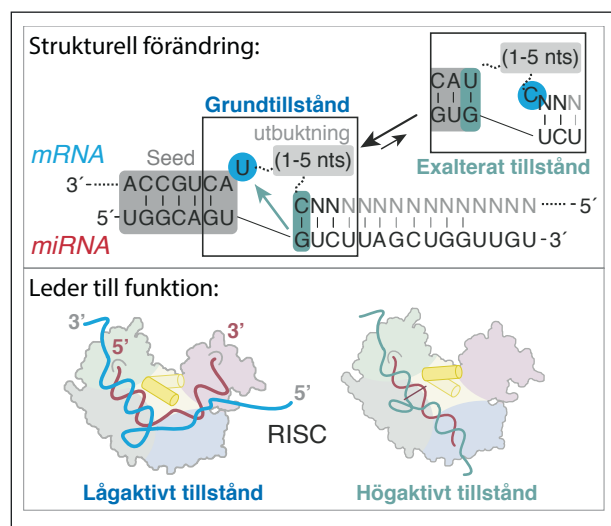


Bild: på övre delen ser man hur en miR-34a (röd) binder till en av många olika mRNA (blå). Minst 500 olika mRNA som regleras av miR-34a har en utbuktning som gör det möjligt för dem att ändra sin struktur. Vi har mätt strukturen som är dominerande (kallad grundtillstånd) och sedan upptäckt att det finns en till struktur som RNA kan anta (kallad exalterat tillstånd). För att hinna byta från grundtillstånd till exalterat tillstånd måste ett baspar ordna om sig (här en CG till en UG) och det leder till en förlängd seed-region. På den undre delen kan man förstå vad som händer om seed-regionen blir förlängd i RISC-komplexet en stor strukturell ändring leder till bättre bindning av hela mRNA och därför till en mer effektiv nedreglering.

I vår studie använde vi kärnmagnetisk resonans (NMR, magnetröntgens atom-upplösta syskon) för att avslöja att miR-34a ändrar sin struktur via en ändring i basparning (bild, övre del). Vi använde ett avancerat NMR-experiment som heter R_{ρ} relaxation dispersion, som kan mäta rörelse av en atom och olika tillstånd/strukturer av denna atom, därtill olika tillstånd som hela miRNA kan befinna sig i. Dessa tillstånd kallar vi exalterade tillstånd, för att de har lite mer energi, motsvarande en vätebindning, än grundtillståndet. Grundtillståndet är strukturen man kan avbilda med experiment som Kryo-EM eller röntgenkristallografi och är RNA:s mest stabila tillstånd, som molekylen spenderar mest tid i. Exalterade tillstånd är i kemisk jämvikt med grundtillståndet och finns bara under ett ögonblick, till och med kortare än en blinkning. Vi har upptäckt att miR-34a, som formar ett komplex med budbärar-RNA (mRNA) av Sirt 1 (silent information regulator 1: mSirt1), existerar i två olika tillstånd (bilden). Grundtillståndet, som finns 99 % av tiden, och det exalterade tillståndet, som finns 1 % av tiden och har en livslängd på ungefär en millisekund. De två tillstånden är ganska lika och i grundtillståndet är seed bara 6.5 baspar långt (övre del i bilden), vilket förklarar varför den inte nedreglerar så bra. Med ett byte av detta baspar från en Watson-Crick GC till en wobble GU baspar förlängs seed till åtta baspar och gör komplexen maximalt aktiva. Seed-förlängning möjliggör också att resten av miR-34a kan binda mSirt1 (undre del i bilden) och därför intensifieras hela aktiviteten av RISCen vidare.

Strukturen och dynamiska ändringar av strukturen är mätt i en *in vitro*-miljö, som betyder att den är i en minimalistisk omgivning med bara vatten och salt i små glastror. Därför behövde vi visa att denna ändring verkligen händer i en naturlig miljö, i humancellerna. Vi använde en ljusbaserad cellanalys baserad på ett protein som kallas Luciferase, som producerar lika mycket ljus som det finns luciferase-proteinmolekyler. Vi testade detta i HEK-celler och det visade sig att det exalterade tillståndet verkligen var mer aktivt. Grundtillståndet har en förmåga att nedreglera mSirt1 till 50 % av mängden och det exalterade tillståndet kan nedreglera mSirt1 dubbelt så mycket. Dock är det inte lika mycket som man hade förväntat sig från *in vitro* NMR-experimenten, där skillnaden mellan tillstånden är 100 gånger. Troligt är att jämvikten mellan tillstånden i cellerna inte är densamma som i *in vitro*-experimentet, till exempel kan grundtillståndet i cellerna bara bli 66 % och det exalterade tillståndet 33% (och därför får vi bara dubbelt så mycket nedreglering), då vi inte vet hur cellernas miljö påverkar jämvikten som vi har studerat. En intressant detalj är att energiskillnaden mellan det två tillstånden är pytteliten, om man bara ändrar lite pH, salt, proteinkoncentration eller någonting annat, kan jämvikten ändra sig helt och snabbt. Därför tror vi att det kan bli en snabb regleringsmekanism i cellerna.

VISAR PÅ GENERELL PRINCIP

Slutligen har vi också testat om principen gäller bara för miR-34a i komplex med mSirt1 och vi har hittat samma



mRNAs som är reglerade av miR-34a (och då har vi inte testat andra miRNA-system), varav fem slumpmässigt utvalda visade samma ändring i aktivitet i nedreglering av proteinmängden. Detta visade att det är en mer generell princip som också kan användas för att beräkningsmässigt förutse miRNA-aktivitet.

Vårt projekt är ett första steg för att förstå betydelsen av strukturens och strukturens ändringar i mikroRNA-reglering och detta är viktigt för att kunna beräkna denna struktur och manipulera detta med läkemedel. För närvarande kan man bara förutsäga aktiviteten av en mikroRNA lite mer än på ett slumpmässigt plan. Man förstår inte alla biverkningar det har på hela systemet, för man känner inte till hur hela molekylen fungerar, eftersom man ju bara använder de första åtta nukleotiderna som tillhör seed-regionen, för att förutsäga funktionen. Vi har därför visat att man 1) kan studera hela molekylen, 2) hela molekylen är relevant för reglering, 3) strukturen är viktig att förstå

och 4) även strukturändringar måste tas hänsyn till. Det är ett väldigt komplext system, men vi tror att man kan mäta, förstå och därför förutsäga detta snart. Eftersom miR-34a är en viktig komponent i cancerutveckling, och är felreglerad i många olika cancerformer, är det jätteviktigt att förstå systemet om man vill manipulera det med antingen RNA-baserade läkemedel eller små molekylobaserade läkemedel. Man vill undvika vad som redan har hänt: en första test i kliniken har visat att det inte räcker att bara ge mer miR-34a för att bota cancer.

Ytterligare en betydelse av resultaten från våra studier finner man också i andra RNA-baserade områden, som till exempel i Crispr/Cas-användning kan man ha dynamiska strukturer eller man kan tänka sig RNA nanorobots, baserade på DNA nanoteknologin. Området av RNA-dynamik är bara i sin linda och framtiden ser strålande ut.

KATJA PETZOLD, DOCENT VID INSTITUTIONEN FÖR MEDICINSK
BIOKEMI OCH BIOFYSIK VID KAROLINSKA INSTITUTET,
KATJA.PETZOLD@KI.SE

