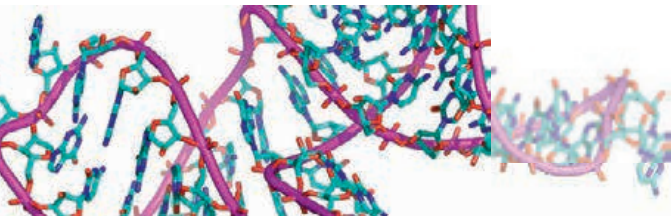
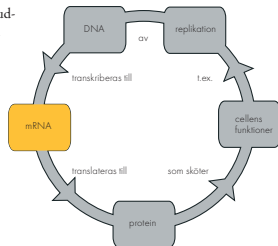


[8]

RNA-MOLEKYLERNAS SYNTES
OCH FUNKTION

Den ena av DNA-molekylens två funktioner är att föra arvsmassan vidare till kommande generationer. Den andra – minst lika viktiga funktionen – är att vara mall till de proteiner som direkt eller indirekt styr cellens och organismens funktioner. Detta gör DNA-molekylen genom att först transkriberas (skrivs om) till mRNA (*messenger* RNA, budbärar-RNA) och sedan translateras (översätts) till protein.

Transkriptionen sker naturligtvis där DNA-molekylen befinner sig (i cytoplasman hos prokaryota organismer eller i cellkärnan hos eukaryota organismer). Hos de prokaryota organismerna finns också ribosomerna, som sköter hela translationen, fritt i cytoplasman. Translationen sker alltså i direkt anslutning till transkriptionen. Hos eukaryota organismer måste mRNA-molekylen först transporteras ut till det endoplasmatiska nätverket, där ribosomerna sitter.



► 8.1 I detta kapitel ska vi titta närmare på de olika RNA-molekylerna.

TRANSKRIPTION

Transkription (eller RNA-syntes) är den process, vid vilken information i DNA skrivs om till RNA-form. Hela denna process sköts av ett proteinkomplex som kallas RNA-polymeras.

Precis som vid DNA-syntes (replikation) kan RNA-syntes endast ske i 5'→3'-riktning. De flesta RNA-polymeraserna kräver, liksom DNA-polymeraserna, en mall. Mallen består hos de flesta organismer av DNA, men hos vissa virus kan även RNA fungera som mall. Vid RNA-syntesen behövs ingens primer (DNA-polymeraserna kräver detta).

En annan skillnad mellan RNA- och DNA-syntes är att hela genomet kopieras vid replikation; vid transkription är det enbart en liten del som skrivs om till RNA. Allt RNA, med undantag för RNA hos vissa virus, härstammar från information som lagrats i DNA-molekylen.

OLIKA SORTERS RNA

Det finns tre stora grupper av RNA:

- mRNA (eng. *messenger RNA*, budbärar-RNA). Detta RNA översätts så småningom till protein under translationen.
- tRNA (eng. *transfer RNA*, överförar-RNA). Denna sorts RNA bär med sig en aminosyra, som under translationen överförs till det växande proteinet. Detta sker genom att en triplett av kvävebaser i tRNA-molekylen basparar med motsvarande triplett i RNA-molekylen, varvid ribosomen häftar på tRNA-molekylens aminosyra på det växande proteinet.
- rRNA (ribosomal RNA). Detta RNA ingår som en viktig del i ribosomerna, som styr hela translationen (översättningen av mRNA till protein).

Dessutom finns det en mängd andra RNA-typer, vilket huvudsakligen består av förstadier till de tre huvudgrupperna.

När det talas om RNA i detta kapitel är det (om inte annat anges) alltid mRNA som underförstås. Vi återkommer till tRNA och rRNA i nästa kapitel.

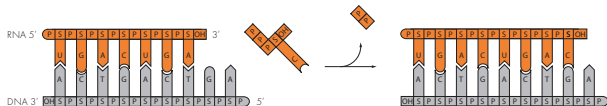
• siRNA (eng. *small interfering RNA* eller *silencing RNA*, 'ystar-RNA'). Detta RNA har en rad olika funktioner, bl.a. deltar den i s.k. RNA-interferens (RNAi), där den motverkar att specifika gener uttrycks.

Under transkriptionen läser RNA-polymeraset av den ena DNA-strängen. Denna sträng kallas mallsträng, men har även andra namn (tabell 8.1). Den DNA-sträng som inte läses av kallas oftast för icke-mallsträngen. Icke-mallsträngen har exakt samma kvävebassekvens som RNA-molekylen som bildas (med skillnaden att tymin i DNA ersätts med uracil i RNA).

Namn	Alternativt namn
Mallsträng	Minussträng {-}sträng Icke-kodande sträng
Icke-mallsträng	Plussträng {+}sträng Kodande sträng

Tabell 8.1 Alternativa namn på de två DNA-stängarna under transkriptionen.

Till höger om reaktionspilen har förlängd RNA, (NMP)_{n+1}, och en pyrofosfatmolekyl bildats.



► **8.4** Elongering av RNA-strängen. En trifosfatribonukleosid basparar med kvävebasen i DNA-mallen. En pyrofosfatmolekyl (PPi) spjälkas av från trifosfatribonukleosiden, vars 5'-fosfatgrupp adderas till den växande oligoribonukleotidens 3'-OH-grupp.

S = sockerrest (pentos), P - fosfatgrupp, A - adenin, C - cytosin, T - tymin, G - guanin, U - uracil, OH - hydroxylgrupp.

REGLERING AV TRANSKRIPTIONEN

Det vore slöseri med energi för cellen om alla gener ständigt uttrycktes och det skapades proteiner som inte behövdes för tillfället. Därför regleras transkriptionen mycket strängt.

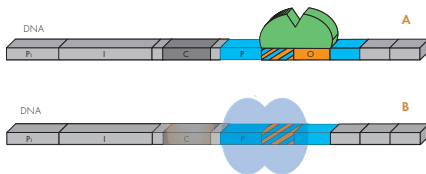
Promotorer kan, som vi redan nämnt, vara mer eller mindre attraktiva för RNA-polymeraset, vilket gör att det mer eller mindre enkelt bildas ett stängt komplex. Vissa gener (ett fåtal) är inte reglerade på annat sätt än att de just har olika effektiva promotorer. Dessa gener uttrycks då *konstitutivt* (hela tiden), vanligen i ganska blygsam omfattning. Gener som uttrycks konstitutivt kallas ibland *hushållsgener*, eftersom de hela tiden behövs för att sköta grundläggande funktioner i cellen.

Andra gener (de allra flesta) uttrycks bara när de faktiskt behövs. Regleringen av detta sker framför allt i initieringen av transkriptionen. Om en gen redan har börjat transkriberas, resulterar det med mycket stor sannolikhet i minst ett färdigt protein. Det innebär att om cellen kan stoppa transkriptionen redan innan den börjar, blir regleringen som mest effektiv.

Repressorer och aktivatorer

Initieringen av transkriptionen påverkas alltså av promotorns DNA-sekvens och hur pass väl RNA-polymeraset binder in till promotorn. Initieringen kan också påverkas av *repressorer* och *aktivatorer*.

En repressor är ett protein, som binder till en specifik sekvens i promotorn.



► **8.5** (a) Repressor binder till operatorn (O) och hindrar RNA-polymeraset att binda till promotorn (P). (b) Aktivator binder till DNA intill promotorn, och hjälper RNA-polymeraset att binda till promotorn.

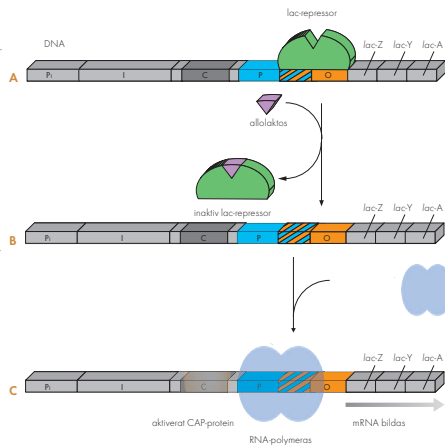
► **8.6** Negativ och positiv reglering av lac-operonet.

"I" är genen som kodar för lac-repressorn, och "P_i" är dess promotor. "C" är bindningsplatsen för aktivatorn [CAP-proteinet], och "P" och "O" är promotor och operatorn. "Z", "Y" och "A" är lacZ, lacY, respektive lacA-generna.

(a) I frånvaro av laktos är lac-repressorn aktiv och binder in till operatorn. Därmed förhindras transkription av lacZ, -Y och -A.

(b) Vid närvaro av allolaktos [en variant av laktos] inaktiveras repressorn, som därmed släpper från operatorn.

(c) För att genen ska börja transkriberas krävs det att RNA-polymeraset binder till promotorn, något den endast kan göra med hjälp av det aktiverade CAP-proteinet. Nu kan lacZ, -Y och -A transkriberas och mRNA bildas.



Den specifika sekvens som repressorn binder till kallas för operatorn. Genom att fysiskt ligga i vägen *förhindrar* (eng. *repress* = undertrycka, förhindra) repressorn RNA-polymeraset att börja transkribera genen (bild 8.5). Repressorer utövar därmed en *negativ reglering*.

En aktivator, å andra sidan, binder intill eller nära promotorn och *underlättar* för RNA-polymeraset att börja transkriptionen. Promotorn är ofta utformad så att RNA-polymeraset binder mycket dåligt till den utan hjälp av en aktivator. (fig 8.5b) Utan aktivator transkriberas alltså inte genen (eller endast mycket lite). Aktivatorer utövar alltså en *positiv reglering*.

Operon

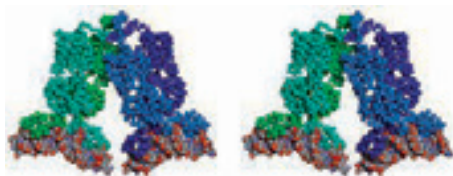
Enzymer består ofta av flera proteiner, s.k. subenheter, som samverkar. I många fall samverkar också olika proteiner eller enzymer i en reaktionskedja för att nå ett gemensamt mål. Om inte alla subenheterna finns med fungerar inte enzymet. På samma sätt gäller att om inte alla enzymerna är med i en reaktionskedja kan inte slutprodukten framställas.

Det vore väldigt oekonomiskt för cellen om t.ex. tre av fyra subenheter transkriberades, men inte den fjärde. Ett "smart" sätt att lösa detta på, är att

gener som samverkar ofta sitter omedelbart efter varandra i genomet och delar på en och samma promotor. Tillsammans bildar promotorn och de gener som sitter därefter ett *operon* (bild 8.6).



Ett operon kan definieras som en sträcka DNA med en eller flera besläktade gener samt de operator- och promotorsckensver som reglerar deras transkription.



Lac-operonet

Hos *E. coli* är *lac*-operonet ett exempel på ett operon som regleras både positivt och negativt. I operonet ingår tre gener som hjälper bakterien att leva på laktos (mjölksocker) som enda kol- och energikälla: genen för β -galaktosidas, för galaktosid-permeas och för tiogalaktosid-transacetylas.

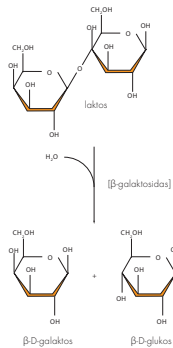
β -galaktosidas är ett enzym som spjälkar laktos till β -D-galaktos och β -D-glukos (bild 8.9). Dessa enkla sockerarter kan sedan brytas ned av bakterien för att utvinna energi. Galaktosid-permeas är ett protein som bildar en por i cellmembranet som släpper in laktosmolekylen. Proteinet tiogalaktosid-transacetylas fysiologiska funktion är ännu okänd. Promotorn och operatortingår också i operonet, liksom aktivatorns bindingsställe. En repressoren (I) och dess promotor (P_r) ingår också i operonet.

När en *E. coli*-kultur odlas på rikt eller glukosinnehållande medium, behöver bakterien inte bryta ned laktos. Då ska *lac*-operonet vara avstängt – cellen behöver alltså en negativ reglering. I-genen i *lac*-operonet uttrycks konstitutivt (hela tiden), och när mRNA från denna gen translateras bildas ett protein, *lac*-repressorn (bild 8.5).

I och med att det uttrycks konstitutivt, finns proteinet alltid närvarande. *Lac*-repressorn binder in till O-platsen (operatorting) på *lac*-operonet och hindrar på så sätt transkription av *lacZ*, -Y och -A (bild 8.5a). Operonet är alltså avstängt så snart *lac*-repressorn binder till operatorting.

► **8.7** Schematisk bild av ett operon. En operon är en uppsättning gener som samverkar. I detta operon transkriberas generna A, B och C när repressorn inte hindrar RNA-polymeraset att binda till promotorn, samtidigt som aktivatorn bundit till sitt bindingsställe.

► **8.8** Stereoskopisk bild av lac-repressorn bunden till delar av operatortingregionerna i *lac*-operonet. Man tror att DNA-strängen slingrar sig ett helt varv runt repressorn, men man har ännu inte kunnat bevisa det. Lägga märke till hur väl repressorn passar in i DNA-molekylen – nästan som nyckeln i ett lås. I repressorn visas bara kolatomerna som ingår i proteinet ryggrad, de s.k. α -kolatomerna. PDB-id: 1lbg.



► **8.9** Laktoshydrolys. Enzymet β -galaktosidas katalyserar spjälkningen av laktos (mjölksocker) till galaktos och glukos. Dessa kan sedan användas som kol- och energikälla i cellen.

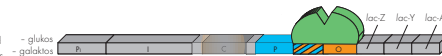
Positiv och negativ reglering

Allolaktos är en variant av laktos som finns i mycket låga koncentrationer om cellen får växa på laktosinnehållande medium. När allolaktosen binder till *lac*-repressorn förändras dess struktur. *Lac*-repressorn inaktiveras och släpper från DNA. Nu är det i princip fritt att börja transkribera DNA till mRNA (bild 8.5b). Allolaktos sägs fungera som *induktor* i detta fall, eftersom det gör att mRNA (och i slutändan de olika proteinerna) kan bildas.

Här finns dock en hake: Om bakterien får växa på ett medium som innehåller både glukos och laktos, vad gör den då? Glukos är definitivt den kolkälla bakterien föredrar, så det är onödigt (och slöseri med energi) för bakterien att försöka bryta ned laktos om det finns glukos i överskott. Cellen behöver alltså en positiv reglering av *lac*-operonet, som gör att det transkriberas endast när laktos är den enda energi- och kolkällan.

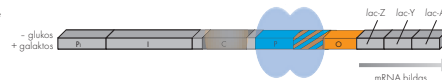
När glukoshalten i cellen börjar sjunka, aktiveras proteinet CAP (eng. *cat*-*tab*olite activator of proteins). Det aktiva CAP-proteinet binder in till C-platsen i *lac*-operonet (bild 8.5c), där det fungerar som aktivator och reglerar *lac*-operonet positivt. CAP-proteinet underlättar alltså för RNA-polymeraset att binda till promotorn. Först därefter kan DNA börja transkriberas och mRNA kan bildas.

Det är alltså endast när laktoshalten är hög, samtidigt som glukoshalten är låg, som *lac*-operonet är påslaget och generna *lacZ*, -Y och -A börjar transkriberas (bild 8.10). På så sätt behåller *E. coli* med sina resurser och tillverkar inte några protein i onödan.



► **8.10** *Lac*-operonets tillstånd vid närvaro (+) eller frånvaro (–) av glukos och laktos.

Enbart närvaron av glukos eller närvaron av laktos räcker inte för att slå på *lac*-operonet. Båda tillstånden måste inträffa samtidigt för att *lac*-generna ska börja transkriberas.



TERMINERING

Hur RNA-polymeraset "bestämmer sig" för att avsluta transkriptionen är en relativt komplicerad historia, och riktigt hur det går till i eukaryota celler är inte fullt klart. I favoritorganismen *E. coli* vet man att det finns två sätt som transkriptionen kan avslutas på. Till det ena sättet behövs ett protein kallat ρ (grek. *rho*). Det sättet kallas därför ρ -beroende terminering. Det andra sättet kräver inte ρ och kallas följaktligen ρ -oberoende terminering.

En gen som termineras utan hjälp av ρ -proteinet, avslutas med ett långt palindrom. Palindromet följs av en lång sträcka med adenin (i DNA-mallen), vilket alltså translateras till uracil i RNA-molekylen. Man tror att det långa palindromet bildar en hämåsöglä som får RNA-polymeraset att stanna upp en kort stund. I detta läge antas att hämåsöglan drar isär RNA-DNA-hybriderna, som endast hålls samman med de svagare vätebindningarna mellan A och U. Därmed avslutas transkriptionen.

Gener som termineras med hjälp av ρ -proteinet saknar den långa poly-A-sträckan i DNA-mallen, men har ibland den kvävebassekens som krävs för att det ska bildas en hämåsöglä. En modell skulle kunna vara att RNA-polymeraset stannar upp, antingen när hämåsöglan bildas eller av någon annan (ännu okänd) anledning. Därefter skulle ρ -proteinet kunna förflytta sig längs den nybildade RNA-molekylen tills det når det stoppade RNA-polymeraset och få det att släppa från DNA genom att snurra upp RNA-DNA-hybriderna. Den exakta mekanismen är dock fortfarande höjld i dunkel. Man vet inte heller varför vissa gener är beroende av ρ -proteinet för att terminera.

FÖRÄNDRINGAR EFTER TRANSKRIPTIONEN

Så gott som alla eukaryota (och många prokaryota) RNA-molekyler genomgår någon form av behandling efter att de transkriberats. Exempel på detta är kemiska reaktioner som klipper bort icke-kodande ("onödigt") RNA eller lägger till speciella kvävebassekvenser i ena änden av RNA-molekylen.

Ett intressant fenomen är att en del av de enzymer som katalyserar dessa reaktioner själva är RNA-molekyler. RNA-molekyler som kan fungera som enzymer kallas *ribozymer*. Att ribozymer kan fungera beror på att de består av enkelsträngade nukleinsyror som kan baspara med sig själva och därigenom bilda mycket komplicerade tredimensionella strukturer. Eftersom behandlingen av RNA sker efter transkriptionen kallas den *post-transkriptionell*.

Den helt nysyntetiserade RNA-molekylen kallas primärt transkript, eller omoget RNA. Allt eftersom RNA-molekylen genomgår post-transkriptionell behandling mognar det. Till slut är det helt moget och redo att utöva sin funktion, vare sig det är i form av mRNA, tRNA eller rRNA.

Exempel på förändringar efter transkriptionen

De största förändringarna efter transkriptionen hittar man i RNA från eukaryota organismer, där den omogna RNA-molekylen dels förses med en 5'-huva och dels splittas så att icke-kodande regioner, sk. introner, tas bort.

5'-huva

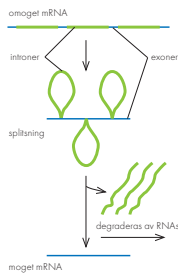
Efter transkriptionen förses den omogna RNA-molekylen med en 5'-huva i 5'-ändan. Detta sker genom att en speciell nukleosid, 7-metyl-guanosin, fästs till 5'-ändan av det omogna RNA med en ovanlig 5',5'-trifosfatbindning. Dess funktion är i stora drag okänd, men man vet att 5'-huvan binder till ett specifikt protein, som troligen kan hjälpa till vid inbindning till ribosomen och initering av translationen.

Splittning

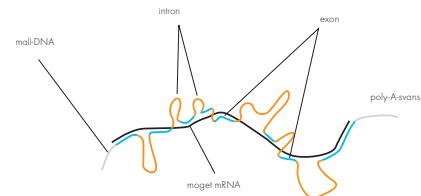
Icke-kodande regioner (introner) tas bort i en process som kallas splittning. De kodande regionerna (exoner) sätts sedan ihop till en mogen mRNA-molekyl (bild 8.11). De flesta generna hos ryggradsdjur, med undantag för de gener som kodar för histoner, innehåller introner.

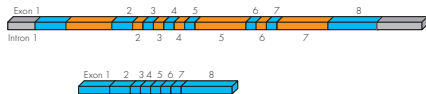
Introner upptäcktes år 1977 av Philip Sharp och Richard Roberts (oberoende av varandra). När de lät moget RNA hybridisera med fullständigt denaturerat DNA (bild 8.12), såg de att långa sträckor DNA inte kunde baspara med RNA, och drog slutsatsen att detta DNA måste ha klyvts bort när RNA mognade.

Vidare forskning har visat att själva splittningen kan ske på lite olika sätt. En grupp av introner splittas bort under inverkan av speciella proteiner i cellkärnan. Dessa proteiner kallas snRNPs ("snurps"), efter engelskans *small nuclear ribonucleoproteines*.



► **8.11** Splittning av omogot mRNA. Den omogna mRNA-molekylen delas samman, varvid intronerna (gröna) snärs av och degraderas av RNAs. Endast exoner, de sekvenser som kodar för protein (blå), blir kvar.





snRNP-proteinerna bildar ett enzymkomplex, en spliceosom (efter engelskans ord för splicing, *splicing*), vilket med hjälp av energi från ATP klipper bort introner och kopplar samman exoner.

En annan grupp av introner upptäcktes 1982 av Thomas Cech och hans medarbetare. Dessa splitts bort utan inverkan av proteiner. Det omogna RNA:t har här en egen, enzymatisk aktivitet. Detta var det första fallet där man kunde påvisa att RNA kan ha katalytisk aktivitet.

Upptäckten har gett en djupare förståelse för hur cellens biokemiska maskineri fungerar och för hur livet uppkommit på vår planet.

Addition av en poly(A)-svans

Ytterligare en post-transkriptionell behandling av mRNA är additionen av en poly(A)-svans. Poly(A)-svansen består av 80–250 adenylatgrupper som sätts till 3'-ändan på den omogna mRNA-molekylen. Detta sköts av ett enzym som heter *polyadenylatpolymeras*.

Det är inte väl känt vilken fysiologisk funktion poly(A)-svansen fyller, men både den och 5'-huvan verkar ha en skyddande effekt som hindrar mRNA i eukaryota organismer från att brytas ned. Anmärkningsvärt många mRNA-molekyler från prokaryota organismer får också en poly(A)-svans, men här påskyndar det snarare degraderingen.

Hos såväl eukaryot som prokaryot mRNA händer det att vissa sekvenser klippas av från RNA-molekylens bägge ändrar. I ett fåtal fall finns det introner som splitts bort även i prokaryoter. Man har också funnit att många kvävebaser och sockerresten i tRNA-molekylen kemiskt förändras genom substitution eller addition av någon funktionell grupp.

OMVÄNT TRANSKRIPTAS

Låt oss återvända några ögonblick till molekylärgenetikens centrala dogm. Den säger oss att det är DNA-molekylen som bär på det genetiska arvet. DNA-molekylen transkriberas till mRNA, som translateras till protein. Informationsflödet går alltså från DNA via RNA till protein – aldrig från protein via RNA till DNA.

8.12 Introner i ovalbumingen hos höns.

Introner demonstrerades först genom att DNA och RNA hybridiserades.

Bilden är förtyligad och schematiserad utifrån en radiografbild gjord med radioaktivt DNA och RNA.

Den mogna RNA-molekylen (röd, underåt) har låt hybridisera med mall-DNA-strängen. De åtta violetta sträckorna på DNA-strängen är de kodande exoner som kan baspara med den mogna mRNA-molekylen. De långa, gröna slingorna är introner, som splitts bort i mogen RNA. Längst till höger på RNA-molekylen kan man se poly(A)-svansen, vilken adderas till RNA-molekylen efter transkriptionen.



► 8.13 Schematisk illustration av ett retrovirus som t.ex. HIV-1, vilket orsakar aids. Det genetiska materialet utgörs av RNA-strängar (röda).

Eftersom detta var en väletablerad dogm, är det inte svårt att föreställa sig att det närmast betraktades som kätterier eller herligrän när Howard Temin år 1962 föreslog att information även kan gå från RNA till DNA.

Det dröjde dock ända till 1970 innan Temin och David Baltimore (oberoende av varandra) lyckades visa att RNA faktiskt kan "transkriberas" till DNA. De hade studerat tumörvirus, vilkas genetiska material består av RNA. Från dessa hade de lyckats isolera ett enzym som de kallade *omvänt transkriptas*. Med RNA som mall kan *omvänt transkriptas* syntetisera DNA.

Retrovirus

Omvänt transkriptas finns huvudsakligen hos retrovirus. Som nämns i kapitel 3, vet man egentligen inte någonting om ursprunget och den efterföljande evolutionen av virus. Virusforskare vill lära sig mer om just retrovirus, för att lättare kunna förstå olika replikationsmekanismer.

Att retrovirus har varit framgångsrika i evolutionsprocessen måste innebära att de har strategier som ger dem fördelar. De kan bland annat gömma sig i värdcellens arvsmassa och invänta rätt tillfälle att reproducera sig. De kan dessutom använda både RNA och DNA i sin replikationsprocess. Kanske kan du komma på ännu fler strategier!

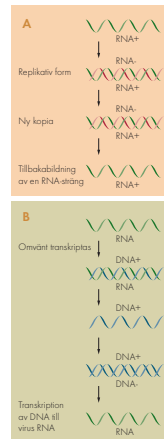
Det intressanta med retrovirus är att deras replikation skiljer sig helt från andra virus. Hos alla retrovirus består nukleinsyran av en enkelsträngad RNA-molekyl. RNA-molekylen används som mall inför de olika syntesteg som leder fram till bildningen av en enkel DNA-sträng som benämns –DNA (minus-DNA). Detta –DNA bildar i sin tur ett provirus (proviral dubbelsträngat DNA) som kan integreras med värdcellens DNA.

Steg för steg går processen till på följande sätt: (fig. 8.15b)

+RNA omvandlas med hjälp av *omvänt transkriptas* (RT) som framställs av viruspartikeln redan innan den infekterar sin värdcell. Den förs således med in i värdcellen i färdigt skick. Förloppet äger rum i värdcellens cytoplasma och det bildas:

+RNA/–DNA, en slags "hybrid"-nukleinsyra. I nästa steg ser ett annat enzym, *ribonukleas*, till att +RNA skiljs från –DNA-strängen så att en komplementär DNA-sträng kan bildas.

dsDNA (+DNA/–DNA) replikerar med –DNA som mall (äterigen med hjälp av *omvänt transkriptas*). Denna DNA-molekyl kallas för *provirus* och kan direkt integreras i värdcellens genom. Innan integrationen omvandlas dsDNA till cirkulär form.



► 8.14 Enkelsträngat RNA kan replikerar på två sätt. Det vanligaste sker enligt (a). Retrovirus, däremot, replikerar enligt förlopp (b).

Ett provirus kan styra både bildningen av nya virioner och transkriptionen av mRNA för bildning av virusproteiner i värdcellen. Lägg märke till att den genetiska informationen överförs från RNA till DNA under processen. Proviruset kan också omvandla en värdcell till en cancercell. När proviruset införlivas i värdcellens DNA innebär det att det replikeras tillsammans med värdcellens kromosomer före celledning. Det finns forskare som anser att andelen provirus i arvsmassa hos djur kan vara så stor som 5–10 %.

RETROVIRUSET HIV

Alla känner till att infektioner där virus är inblandade i regel är svåra att bota. Är det dessutom fråga om en hivinfektion (hiv = humant immunbrist virus) är läget ännu mer svårbehandlat eftersom hivs arvsmassa består av RNA. Mer om detta finner du under rubriken "Ett slarvigt virus".

Vid en primär hivinfektion utvecklas ett akut sjukdomstillstånd 2–4 veckor efter att en person smittats med hiv. Insjukandet är snabbt och liknar influensa med feber, rethosta, värk i kroppen m.fl. symptom. Hudutslag förekommer ganska ofta och ibland även sår i munhåla och på genitalier. Lymfkörtelsvullnad uppkommer först senare. Vissa har en ganska mild insjuknande bild och andra saknar helt symptom.

Efter detta stadium utvecklas i regel antikroppar mot hiv. För att kunna påvisa om en person är hivpositiv, gör man i dag kombinerade screeningtester som kan upptäcka både viruset och antikroppar mot viruset. Detta är bra, eftersom man då minskar risken att en tidig hivinfektion inte upptäcks. För testade man enbart för antikroppar.

Arvsmassan hos hiv har en mycket stor förändringsbenägenhet. Jämför man med arvsmassan hos t.ex. människa förändras arvsmassan en miljon gånger snabbare hos hiv. Detta är anledningen till att viruset utvecklar resistens mot antivirala läkemedel som är till för att hämma utvecklingen av sjukdomen aids hos hivpositiva personer. För att motverka resistensutveckling hos viruset krävs en kombinationsbehandling med minst tre hivläkemedel och att patienten är mycket noga med att följa behandlingen.

Även om den snabba genetiska variation hos hiv innebär problem när det gäller behandling och vaccinationsutveckling, ger den samtidigt möjlighet för forskare att kartlägga virusets smittvägar. Eftersom arvsmassan förändras sig så oerhört snabbt har varje patients virus ett genetiskt fingeravtryck. Virus hos patienter som smittat varandra är genetiskt mycket lika men inte identiska. Ju längre ifrån varandra två virus står i en smittkedja desto större är skillnaderna i deras arvsmassa.

Detta är intressant ur ett samhällsperspektiv, eftersom en sekvensering av hivs arvsmassa kan ge epidemiologer en unik möjlighet att kartlägga och spåra smittspridning av hiv mellan såväl individer som större grupper av människor. Forskarna har bland annat hjälpt polis och åklagarmyndigheter med rättmedicinska utredningar när det gäller misstänkt smittspridning av hiv. Samma tillvägagångssätt kan även ge information till Smittskyddsinstitutets läkare för kartläggning av hivsmitta från andra delar av Europa eller resten av världen.

Ett "slarvigt" virus

Ett retrovirus korrekturläser inte det färdiga resultatet, vilket alltid sker med DNA-kopior eller komplementära strängar till DNA. Det innebär att *omvänt transkriptions* lätt gör fel i avläsningen och att det produceras ett stort antal felaktiga kopior. Resultatet blir att det produceras många olika varianter av hiv, vilket gör det extra svårt att framställa vaccin.

Under lång tid fanns överhuvudtaget ingen medicin mot virusinfektioner. Det finns i dag antivirala mediciner som i kombination med varandra har god verkan.

Besvärande i sammanhanget är den ekonomiska faktorn. I de länder som mest av allt skulle behöva bromsmediciner mot hiv/aids har människor ingen möjlighet att betala det pris som läkemedelsbolagen begär. Dessa länder utarmas för närvarande på sin unga befolkning, vilket innebär en oerhörd katastrof.

VACCIN MOT HIV

En forskningsgrupp med representanter från Smittskyddsinstitutet, Karolinska institutet och Södersjukhuset har framställt ett helt nytt vaccin mot hiv. Gruppen har fått EU-pengar för att göra en så kallad fas-1-studie (HIVS – HIV Immunogenicity Study) i Sverige på 40 friska personer. Denna säkerhetsstudie ska fastställa att vaccinet är helt ofarligt och inte ger några allvariga biverkningar. Förutom detta är det naturligtvis meningen att vaccinet ska testas för att se om det kan framkalla ett försvar i kroppen i form av en cellförmiddad immunitet och neutraliserade antikroppar.

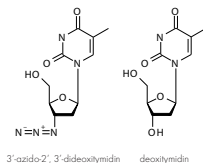
Senare görs en studie i Tanzania, mer inriktad på immunförsvaret. Vaccinet är anpassat för att fungera för de virusvarianter som är vanligast där. Enligt experterna är ett vaccin del enda som kan stoppa hivvirusets framfart i utvecklingsländerna.



Det har utvecklats nya bromsmediciner mot hiv som bygger på varianter av AZT. AZT (3'-azido-2',3'-dideoxitymidin) är en nukleosid-analog som går in istället för tymin i syntesen av DNA. När drogen väl byggts in kan det efterföljande nukleotidfosfatet inte få kontakt med AZT, vilket stoppar polymerisationen av DNA. *Omvänt transkriptas* blockeras alltså i arbetet med att replikera –DNA-strängen.

Nyligen har en annan variant av bromsmedicin utvecklats, hiv-proteas-inhibitorer. Dessa antivirala medel hämmar eller imiterar den pep-tidbindning som normalt sett attackeras av proteaser, vilket innebär att livscykeln hos det aktiva viruset kan påverkas.

Läkarna ordinerar oftast en cocktail av olika mediciner, t.ex. AZT och ett derivat av AZT samt en proteas-inhibitor. Det innebär att koncentrationen av hiv i plasma kan sänkas till nästan noll. Man har ännu inte lyckats påverka det latent liggande hiv som finns i T-lymfocyternas minnesceller.



► **8.15** AZT är en tyminanalog. Eftersom det inte sitter en OH-grupp på 3'-kollet på AZT, kan inte DNA-syntesen fortsätta efter det att AZT byggts in i den växande DNA-strängen.

RNA-MOLEKYLER KAN HA KATALYTISK AKTIVITET

Allt liv på jorden är beroende av enzymer. Dessa enzymer styr själva livet och tillåter endast att vissa specifika reaktioner kan ske i cellen. "Ritningen" till alla enzymer, inklusive de som gör nytt DNA, finns i själva DNA-molekylen.

Detta har givit upphov till ett problem som närmast kan liknas vid paradoxen "hönan-eller-ägget". Vilket kom först? DNA-molekylen, som innehåller alla ritningar till hur cellen ska se ut och bete sig, eller proteinerna, som ser till att DNA-molekylen kan replikeras och leva vidare?

Liksom i fallet med hönan och ägget, måste proteinerna komma ifrån DNA-molekylen. Proteinerna kan inte existera om det inte först fanns en DNA-molekyl. DNA-molekylen kan å andra sidan inte heller finnas utan att det först funnits proteiner som skapat den! Så frågan kvarstår. Vad kom först? Hönan eller ägget? Proteinerna eller DNA-molekylen?

Det rätta svaret är – troligen ingetdera!

På 1960-talet föreslog forskarna Orgel, Woese och Crick (samma Crick som tidigare löst DNA-molekylens struktur) att RNA-molekylen skulle kunna agera *både* som informationsbärare och som katalysator. Forskningen på hur RNA bearbetas efter transkriptionen ledde så småningom till upptäckten av RNA med katalytisk aktivitet, dvs. RNA-molekyler som fungerar som enzym. En sådan RNA-molekyl kallas ett ribozym:

Precis som vid fallet med enzymatiska proteiner, förlorar ribozymerna sin aktivitet om de denatureras.



► **8.16** Vad kom först? Hönan eller ägget? Proteinerna eller DNA-molekylen?



► **8.17** Som M. C. Eschers "Drawing Hands" har livet forlirat sig självt allt mer under evolutionens lopp. © 2007 The M.C. Escher Company - Holland. All rights reserved.

Att det finns RNA-molekyler med enzymatisk aktivitet har lett fram till en högst fantasieggande hypotes – de allra tidigaste "livsformerna" skulle kunna ha varit RNA-molekyler med förmåga att replikera sig själva!

De första "livsformerna"

Jorden var i sin tidiga barndom en mycket ogästvänlig plats med många och kraftiga åskväder. Jordens ursprungliga atmosfär bestod troligen till största delen av metan (CH₄), ammoniak (NH₃), vatten (H₂O) och vätgas (H₂).

I laboratorieförsök, där dessa enkla ämnen utsatts för elektriska urladdningar, har man kunnat få mer reaktiva molekyler, t.ex. vätecyanid (HCN) och aldehyder.

Om vätecyanid och aldehyder får reagera kan både aminosyror, pyrimidiner och puriner bildas. Vid laboratorieförsök har man kunnat visa att det bildas adenin om ammoniumcyanid (NH₄CN) återloppskokas under några dagar. Ännu intressantare blir det om man betänker att de flesta kofaktorer (en slags hjälparestruktur i många enzymer) innehåller adenin! Är detta bara en slump – eller finns det ett evolutionärt samband?

En självreplikerande RNA-molekyl av det slag som diskuteras ovan, skulle snabbt göra slut på de få byggstenar som uppstått i den urtida jordens organiska soppa. Behovet av att kunna metabolisera kan alltså ha uppstått mycket tidigt i livets historia. Dagens ribozymmer har en ganska begränsad katalytisk aktivitet, men det är möjligt att dåtidens ribozymmer var betydligt mer potenta; genom olika försök vet man att ribozymmer skulle kunna ha högre katalytisk aktivitet.

Det är lätt att föreställa sig att det ganska tidigt i livets barndom dök upp "molekylära parasiter", föregångare till RNA-virusen. En RNA-molekyl med låg eller ingen förmåga till replikation, skulle på så sätt kunna utnyttja transpositionen till att föra sig själv vidare. På så sätt skulle den kunna åka snålskjuts på en RNA-molekyl med god förmåga att replikera sig själv.

Naturligt urval skulle kunna frambringa plattspecifik rekombination, eftersom parasiten inte vill förstöra sin värd! Detta skulle också ha kunnat leda fram till en symbios mellan parasit-RNA och värd-RNA – vilket i slutändan skulle kunna ge funktionell och strukturellt mer komplicerade "organismer".

När slutligen DNA började användas i stället för RNA, ökade stabiliteten den lagrade informationen – den sista grundstenen för liv på jorden lades på plats.

Detta är naturligtvis en hypotes med många och stora luckor. Det har utförts en del experiment som stöder hypotesen, men mycket forskningsarbete återstår innan den kan bekräftas eller vederläggas.



► **8.18** Hammarhuvud-ribozymet. Vissa viruspartiklar innehåller RNA-strukturer med förmågan att klyva RNA vid specifika ställen. Dessa RNA-molekyler kallas hammarhuvud-ribozym, eftersom de anses likna hammarhuvuden. PDB-id: 379d

MJUKDELAR FRÅN TYRANNOSAURUS REX

I filmen "Jurassic Park" återskapas dinosaurier från DNA funnet i myggor som sugit blod från dinosaurier och därefter fastnat i kåda och fossiliserats. Även om det vore tekniskt möjligt att åter skapa så stora mängder DNA [med PCR amplifieras vanligtvis endast en kort del av ett helt genom], så återstår problemet med att få in DNA:t i en lämplig cell och lå den att börja dela sig på lämpligt sätt.

I Montana, USA, har man hittat organiska rester från en Tyrannosaurus rex som dog för 68 miljoner år sedan. De organiska resterna ser ut ungefär som celler och tunna blodkärl. Det spännande med detta är att organiska rester vanligtvis bryts ned mycket snabbt efter att ett djur dör. Benen, som är svårare att bryta ned, kan under gynnsamma omständigheter förstöras och bilda fossil.



Troligtvis rör det sig dock inte om de nedbrutna resterna av cellerna – det bara ser ut så. Forskarna menar att det snarare rör sig om fossilisering på molekylär nivå.

SAMMANFATTNING

- För att kunna utöva sin andra funktion – att vara mall för proteiner – måste DNA-molekylen först transkriberas till RNA. Det sker genom att ett enzym kallat RNA-polymeras syntetiserar en RNA-sträng med den ena DNA-strängen som mall. RNA-polymeraset behöver ingen primer för att kunna syntetisera nytt RNA, vilket ju DNA-polymeraserna behöver.
- Transkriptionen startar vid en specifik sekvenskallad promotor, som ligger uppströms om genen. Precis som vid DNA-replikationen byggs nya ribonukleotider på den växande RNA-strängens 3'-hydroxylgrupp.
- *Lac*-operonet, som innehåller gener som gör att bakterien *E. coli* kan leva med laktos som enda kolkälla, är både positivt och negativt reglerad. Så länge laktoshalten i odlingsmediet är låg, sitter en repressor fysiskt i vägen, så att RNA-polymeraset inte kan komma åt att transkribera generna. Om laktoshalten är hög, krävs det att glukoshalten också är låg för att generna skall börja transkriberas. När glukoshalten är låg aktiveras nämligen CAP-proteinet, som binder in till DNA-strängen och underlättar för RNA-polymeraset att binda till promotorn och därmed börja transkribera generna.
- Efter transkriptionen genomgår många RNA-molekyler ytterligare förändringar. I DNA:et hos de eukaryota organismerna finns det ofta långa sträckor RNA, som inte translateras till protein, och som måste tas bort. Det sker i en metod som kallas splittings, där intronerna tas bort för att endast lämna kvar exonen, vilka alltså utgör det mogna mRNA:t.
- En del virus, s.k. retrovirus, har arvs massa som endast består av RNA. För att dessa virus ska kunna ta sig in i cellen och replikeras, måste RNA:t först skrivas om till DNA. Den processen sköts av ett enzym som kallas omvänt transkriptas, och som bara finns naturligt hos virus. HIV (humant immunbristvirus) är ett sådant retrovirus. Det har en väldigt hög mutations-takt, vilket gör det extremt svårt att skapa ett fungerande vaccin mot det.
- Man har uppträckt att det finns en del RNA-molekyler med katalytisk aktivitet. Sådana RNA-molekyler kallas ribozym. Det finns forskningsresultat som tyder på att någon typ av ribozym skulle kunna ha varit de allra första "organismerna" som uppträdde på jorden.

G-FRÅGOR

1. Vilka huvudtyper av RNA finns det?
2. Vilken uppgift har
 - (a) mRNA
 - (b) tRNA
 - (c) rRNA
 i cellen?
3. Vad är transkription?
4. Vad är den kodande strängen?
5. Vad är mallsträngen?
6. Vad är ett RNA-polymeras?
7. Vad är en promotor?
8. I vilka tre steg kan man dela in RNA-syntesen?
9. Vad innebär
 - (a) uppströms
 - (b) nedströms
 i fråga om riktning i en DNA-molekyl?
10. Vad innebär det att en gen uttrycks konstitutivt?
11. Vad är en hushållsigen?
12. Vad är en
 - (a) repressor?
 - (b) aktivator?
 - (c) operator?
13. Vad innebär
 - (a) negativ reglering?
 - (b) positiv reglering?
14. Vad har enzymet β -galaktosidas för funktion i *E. coli*?
15. Vilka två typer av terminering har man identifierat i *E. coli*?
16. Vad är
 - (a) omogt RNA?
 - (b) primärt RNA?
 - (c) moget RNA?
 - (d) sekundärt RNA?
17. Vad innebär posttranskriptionell behandling?
18. Vad innebär splitstning?

19. Vad är
 - (a) ett intron?
 - (b) ett exon?
 - (c) en poly(A)-svans?
 - (d) en spliceosom?
20. Vad är omvänt transkriptas?
21. Vad är ett ribozym?
22. Vilken funktion har nutida ribozymers oftast?
23. Vad är ett ribozym?

VG-FRÅGOR

1. Redogör för bildningen av det stängda komplexet vid transkription hos *E. coli*.
2. Redogör för bildning av det öppna komplexet vid transkription hos *E. coli*.
3. Redogör för elongeringen av RNA-molekylen.
4. Redogör för hur transkription sker i cellen.
5. Vilka likheter och skillnader finns det mellan DNA- och RNA-syntes?
6. En sträcka DNA med följande sekvens transkriberas: 3'-TACTCACGCATCCAT-5'. Vilken blir den resulterande RNA-molekylen?
7. Förklara varför cellen måste reglera hur de flesta generna uttrycks.
8. Förklara hur transkriptionen av konstitutiv uttryckta gener regleras.
9. Förklara hur lac-operonet hos *E. coli* regleras
 - (a) negativt.
 - (b) positivt.
10. Vad har 5'-huvan och poly(A)-svansen för funktion i den mogna RNA-molekylen?
11. Redogör för något sätt, på vilket man tror att splitstning av den omogna RNA-molekylen sker.
12. Vilka likheter och skillnader mellan omvänt transkriptas och DNA-polymeras finns det?
13. Förklara varför man tänker sig att ribozymers var de första "organismerna" på jorden.