Spelen met RNA

Het is tactisch bijzonder dom om in deze tijd toe te geven dat in wetenschappelijk onderzoek vaak een spel-element zit. De roep om maatschappelijke relevantie wordt al luider en sommige van onze politici beginnen er brood in te zien deze kreet over te nemen. Dat, wat vandaag nog zonder practisch nut lijkt, morgen uitermate belangrijk zou kunnen zijn, spreekt momenteel niet erg aan. Helaas is er een ontstellend gebrek aan mensen met visie op de toekomst en zijn de meesten van ons ondanks heftige ontkenning aanhangers van het verfoeide profijt-beginsel 1).
H. Bloemendal

Hobbyisme. Veel medisch-biologisch, moleculair-biologisch of biochemisch onderzoek heeft geen direct nut en zal in een groot aantal gevallen nooit in een practische toepassing resulteren. Het onderzoek dat in het Nijmeegse Biochemisch Laboratorium wordt verricht onderscheidt zich dan ook in totstandkoming en motivatie nauwelijks van allerlei moleculair logische researchactiviteiten op andere universitaire laboratoria. Want hoe ging dat ook weer in het verleden? Een hoogleraar werd benoemd op grond van reële of imaginaire research-capaciteiten; hij bracht vrijwel altijd iets van zijn vroegere activiteit over naar zijn nieuwe standplaats en leidde geleidelijk een generatie nieuwe onderzoekers op, goed getraind in hun vak. We weten nu dat dit een volkomen verkeerde voorstelling van zaken is. In de gangbare terminologie moet het aldus luiden: een hobbyist krijgt de ongecontroleerde beschikking over een kleinere of grotere hoeveelheid gemeenschapsgeld en gaat zijn gang. Hij zal geleidelijk een stel andere hobbyisten afleveren, meer of minder redelijk getraind in meestal nutteloze zaken. Hij steekt zelf al gauw geen poot meer uit en strijkt met de eer die rechtens slechts zijn medewerkers toekomt. Toegespitst op mij zelf is het dan als volgt. Ik bracht zeven jaar geleden als hobby bij mijn komst naar Nijmegen het idee mee om onderzoek aan de eierlijke ooglens te verrichten. Het was niet bijzonder origineel want ik had elders reeds op bescheiden schaal enig research op dit gebied verricht.

Ooglens. Nu wil het onberekenbare toeval dat de lens niet alleen een ideaal orgaan bleek te zijn voor de bestudering van fundamentele processen als celdifferentiatie, eiwitbiosynthese en veroudering. Je kunt er ook de thans zo zeer gewenste maatschappelijke relevantie aan ontlenen. Bij allen zal immers zo ongeveer na het 25ste levensjaar diezelfde lens minder doorzichtig worden en voor een vrij groot aantal mensen zal hij zelfs zo troebel worden dat er een ouderdomsziekte ontstaat die we staar of cataract noemen. Degenen die onderzoek aan de lens verrichten kunnen zich dus nu opwerpen als weldoeners-in-spé van de mensheid die op een goede dag diezelfde mensheid weer een heldere kijk op het leven zullen geven. Lensweefsel gehoorzaamt aan de stringente spelregels van alle levende cellen. Voornaamste en alom bekende spelregel:

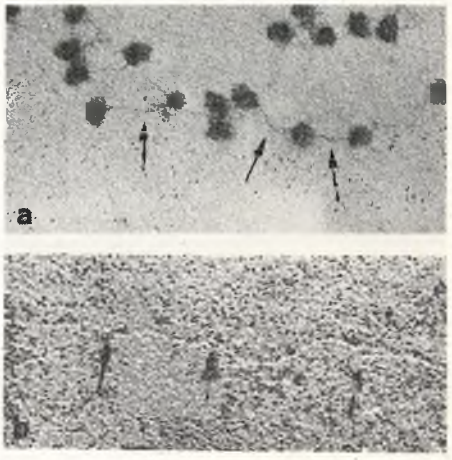
$$\text{DNA} \xrightarrow{\text{transcriptie}} \text{RNA} \xrightarrow{\text{translatie}} \text{eiwit}$$

of in woorden: een stuk erfsubstantie wordt overgeschreven in een intermediair dat de code voor de vertaling in een eiwit bevat.

Cristalline. In de lens heet dit eiwit crystalline. Het bepaalt de structuur van het orgaan en heeft, althans voor zover wij weten, geen enzymatische of hormonale functie. Er zijn drie groepen crystallines, aangeduid met de letters α, β en γ. Hiervan is α-crystalline uit biosynthetisch oogpunt het belangrijkste. Het onderzoek over α-crystalline is ruim 70 jaar aan de gang en insiders zijn dan ook geneigd om te beweren dat onze kennis van dit eiwit zeer groot is. Desondanks lukt het zonder al te veel moeite die kennis, voornamelijk vergaard gedurende de laatste tien jaar, in één tabel samen te vatten (zie tabel 1). Tot zover de resultaten van het spel met α-crystalline. Je zou het een voorspel kunnen noemen, want zinvol spelen met lens-RNA werd feitelijk alleen maar mogelijk na het uitgebreide voorspel met het eiwit.

Alle cellen bevatten drie, functioneel verschillende, RNA's en men kan er op verschillende manieren mee spelen. De drie types RNA zijn langzamerhand genoegzaam bekend: (1) Het rRNA dat de ribosomen, de eiwitproductiecentra, opbouwt, (2) het mRNA dat de boodschap bevat voor de synthese van een specifiek eiwit en (3) het tRNA dat de aminozuren (eiwitbouwstenen) naar de ribosomen transporteert. In Nijmegen is inmiddels met al deze RNA-soorten gespeeld en het spel gaat door zolang spelers en speelgoed betaald kunnen worden.

Het begin. Het spel begon met het isoleren van de lens-ribosomen. Ongeveer 1000 kalfslenzen zijn nodig voor een opbrengst van 5 mg lens-rRNA. De ribosomen worden als sediment verkregen na differentiële centrifugering van een lens-homogenaat door een discontinue suikergradiënt. Deze celdeeltjes kunnen met behulp van de electronenmicroscoop zichtbaar worden gemaakt (fig. 1). Op de foto is duidelijk te zien dat ze aan een draad hangen. Die draad is het mRNA dat de genetische boodschap bevat voor de aanmaak van crystalline. Heeft men de ribosomen eenmaal dan is het niet zo moeilijk om ook de draden in handen te krijgen. Na dissociatie van de ribosomen in een oplossing van laurylsulfaat (dodecylsulfaat, SDS) volgt een centrifugeringsstap in een zonale rotor. Deze methode levert twee boodschapperfracties met karakteristieke sedimentatiewaarden op n.l. 10S en 14S (fig. 2). Er zijn tal van aanwijzingen te verkrijgen dat een bepaalde RNA-fractie messenger-eigenschappen heeft. Het beste bewijs echter is het aantonen dat de veronderstelde messenger de synthese bewerkstelligt van een specifiek eiwit. Ook hiervoor is de proefopstelling eenvoudig. Men behoeft feitelijk niets anders te doen dan de te testen boodschapper in een systeem te brengen dat ribosomen bevat die het te verwachten specifieke eiwit normalerwijze niet kunnen produceren. In ons geval betekent dit: de incubatie van lens mRNA met ribosomen van rode bloedcellen die normalerwijze verantwoordelijk zijn voor de synthese van globine, het eiwitgedeelte van de rode bloedkleurstof. Fig. 3 laat duidelijk zien



Figuur 1. Electronenmicroscopische opname van (a) ooglens-polyribosomen. De pijl wijst naar de messenger-draden. Deze draden verdwijnen na behandeling van het preparaat met ribonuclease maar blijven intact na trypsine-behandeling, (b) de geïsoleerde messenger.

Prof. dr. H. Bloemendal studeerde aan de universiteit van Amsterdam; promoveerde daar in 1957; trad dat jaar toe tot de staf van het Nederlandse kankerinstituut te Amsterdam en is sinds 1965 hoogleraar biochemie aan de universiteit van Nijmegen.

dat zo'n spelletje lukt: bij toevoeging van 14S lens boodschapper-RNA aan het reticulocyten-lysaat (rode bloedcelsysteem) verschijnt er bij electroforetische analyse een eiwitband precies op de plaats waar de A_2-keten van α-crystalline wordt verwacht. Daar dit ook gebeurt in SDS-bevattende electroforesesystemen mag worden geconcludeerd dat niet slechts de lading van het nieuwe product gelijk is aan die van het natieve eiwit, maar dat er ook identiteit is in moleculair gewicht 2).

Additionele criteria. Additionele chemische criteria zijn echter vereist om te mogen stellen: de vertaling van de messenger in eiwit is op betrouwbare wijze geschied. Een van de methoden om dit bewijs te leveren is het vergelijken van de tryptische peptiden van het nieuw-gevormde product met de tryptische peptiden van het natieve eiwit. Fig. 4 laat zien dat de peptiden van de α A_2-keten die verkregen zijn na toevoeging van lens 14S messenger aan het reticulocytensysteem exact samenvallen met de tryptische peptiden van natief α A_2. De overeenkomst tussen een nieuw gesynthetiseerde keten en natief α A_2 gaat zelfs nog verder. Het NH_2-eindstandige methionine van alle α-crystalline ketens is geblokkeerd door een acetyl groep (vergelijk tabel 1). Ook de nieuwgevormde keten blijkt na analyse van het N-eindstandige peptide een acetylgroep te dragen. Aangezien acetylering niet gedirigeerd wordt door een code op de boodschapper is de conclusie voor de hand liggend dat het systeem dat de ribosomen levert, verantwoordelijk is voor deze stap.

Tenslotte het transport-RNA uit de lens. Ook dit RNA type wordt door veel wetenschappers gerekend tot de klasse van pedagogisch verantwoord speelgoed. Bekend mag worden verondersteld dat ieder aminozuur op zijn minst één eigen tRNA bezit. Deze specificiteit hangt samen met een bepaald nucleotidetriplet in het tRNA dat waterstofbruggen kan vormen met de triplet-code op de messenger. De trinucleotide-sequentie op het tRNA wordt anticodon genoemd. Beter dan met veel woorden kan dit worden toegelicht met een eenvoudig voorbeeld: Het codewoord (codon) voor het aminozuur fenylalanine is een nucleotidevolgorde bestaande uit drie moleculen uridylzuur (U-U-U). Het anticodon moet dan zijn een sequentie van drie maal adenylzuur (A-A-A). Met andere woorden het anticodon bevat steeds de complementaire basen van het codon. Een speciaal geval is het tRNA voor het aminozuur methionine. Evenals in vele andere organen worden in de lens 3 typen methionyl-tRNA gevonden. Het totale tRNA mengsel wordt met behulp van fenol uit de lens geëxtraheerd waarna chromatografische scheiding plaats vindt op een kolom gevuld met een cellulosederivaat. De verkregen RNA fracties worden na de scheiding op hun vermogen methionine te binden getoetst. Drie fracties blijken dan methionine-acceptoractiviteit te bezitten (fig. 5).

Verschillen. Het eerder beschreven experiment waarbij lens-messenger RNA en reticulocyt-ribosomen werden geïncubeerd kán ook worden gebruikt om de functionele verschillen tussen de drie tRNA's aan te tonen. Hiervoor moet slechts [^{35}S]-methionine gebonden aan de betreffende tRNA-fractie worden toegevoegd aan het genoemde incubatiemengsel en wel als enige radioactieve precursor. De structuur van het α-crystalline vergemakkelijkt de analyse in hoge mate. Dit eiwit bevat namelijk slechts twee residuen methionine per mol., waarvan één in NH_2-terminale positie voorkt en het andere intern (zie tabel 1). Peptide-analyse wijst uit dat $tRNA_I$ verantwoordelijk is voor de start van de α-crystalline-synthese (inbouw van het NH_2-terminale methionine), terwijl $tRNA_{II}$ en $tRNA_{III}$ beide donor kunnen zijn van het interne methionine.

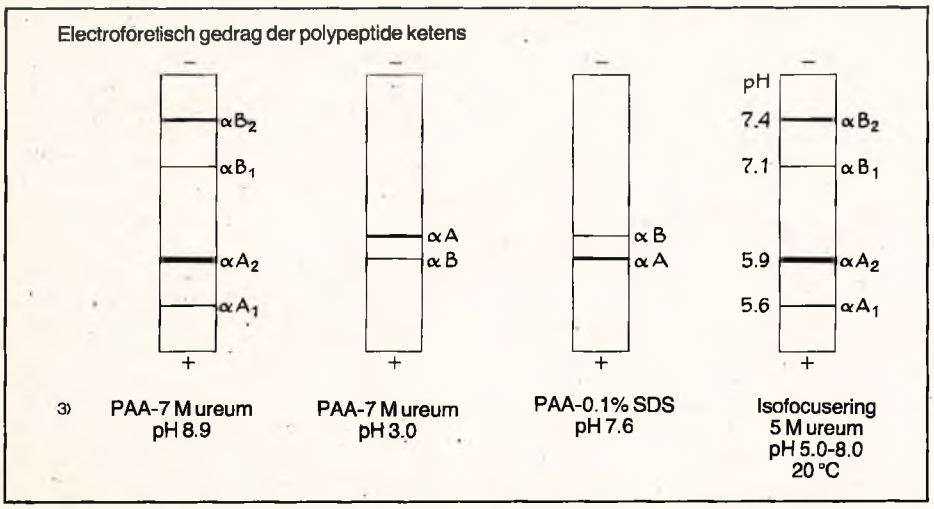
Tot zover het spel met RNA. Voor hen die weinig sympathie kunnen opbrengen voor het in hun ogen misschien infantiele gesol met de wetenschap wil ik gaarne hieronder wat meer serieuze verhalen aandragen, die de basis van bovenstaande "short story" vormden. Tot mijn spijt moet ik wel bekennen dat slechts studie van deze bloedernstige en vrij droge verhalen het anderen mogelijk zullen maken het spel over te doen en wellicht zelfs beter te spelen.

Tabel 1

α-crystalline (pH 7.4: Mol. gew. ca. 800 000)

7 M ureum
of
1 % SDS
of
5 M guanidine HCl

polypeptide ketens (Mol. gew. ca. 20 000)



Een SH-groep per A keten; geen in de B ketens

A_1 en A_2 verschillen slechts in een aminozuur

Isoëlectrische punten:

α = 5.2 (4 °C)
αA_1 = 5.6 (20 °C in 6 M ureum)
αA_2 = 5.9 (20 °C in 6 M ureum)
αB_1 = 7.1 (20 °C in 6 M ureum)
αB_2 = 7.7 (20 °C in 6 M ureum)

Tot nu toe bekende aminozuurvolgordes in de A en B ketens:

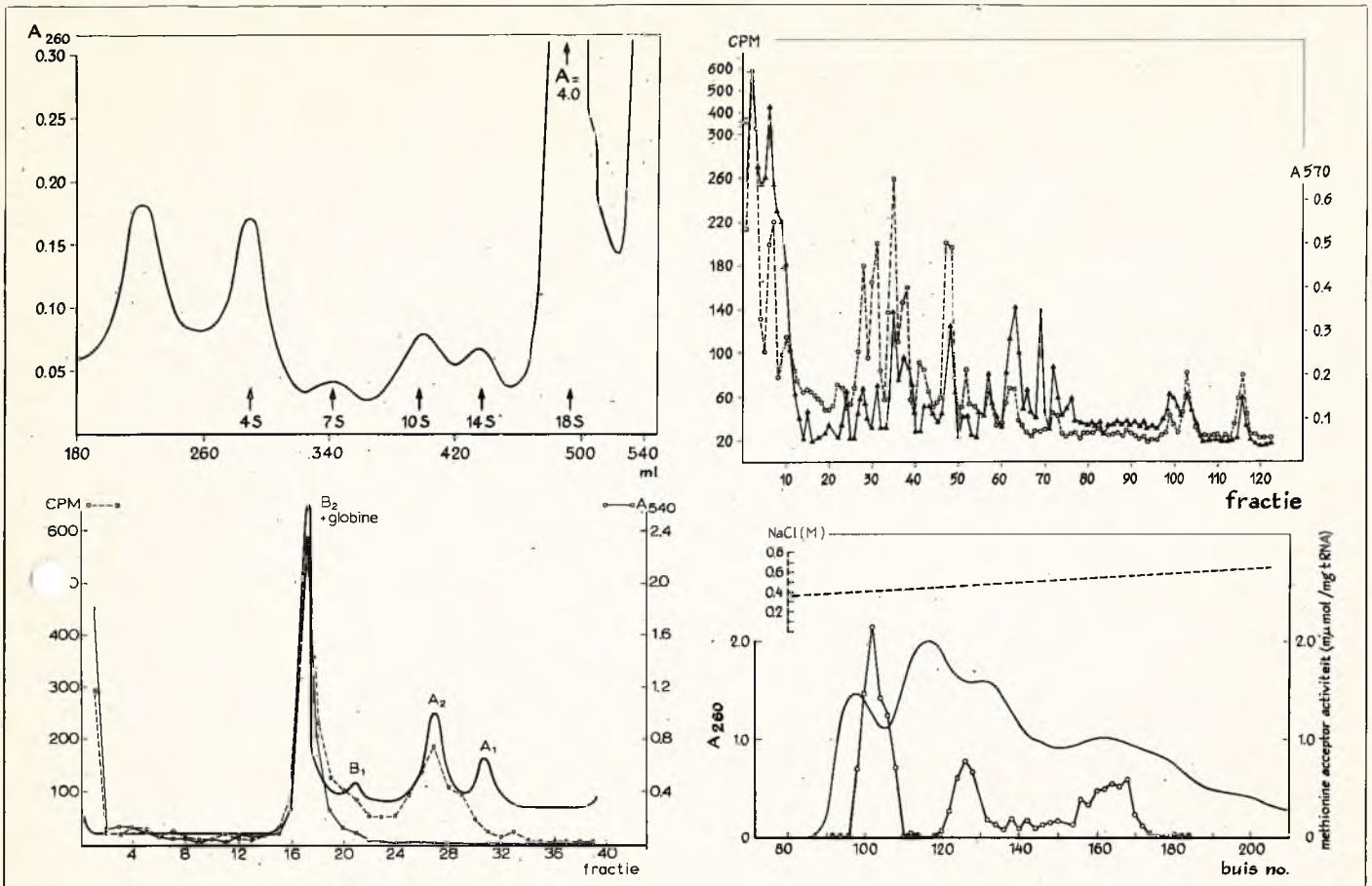
A) N-acetyl-Met-Asp-Ile-Ala-Ile-Gln-His-Pro-Trp-Phe-Lys-Arg
Tyr-Arg-Leu-Pro-Ser-Asn-Val-Asp-Gln-Ser-Ala-Leu-Ser-Cys-Ser-
-Ala-Asp-Gly-Met-Leu-Thr-Phe-Ser-Gly-Pro-Lys
Leu-Thr-Phe-Ser-Gly-Pro-Lys-Ile-Pro-Ser-Gly-Val-Asp-Ala-Gly-His-Ser-
Glu-Arg-Ala-Ile-Pro-Val-Ser-Arg-Glu-Glu-Lys-Pro-Ser-Ser-Ala-Pro-
-Ser-Ser-C

B) N-acetyl-Met-Asp-Ile-Ala-Ile-Ser-His-Pro-Trp-Ile-Arg-Pro-Ser-Phe-Phe-
-Ser-Phe-His
Met-Ser-Leu-Thr-Lys-Asp-Phe-Asp-Glu-Val-Asn-Ile-Asp-Val-Ser-His-Phe
C-terminus in αB = Lys

1) Verkorte vorm van een voordracht gehouden op 1 december 1972 te Delft ter gelenheid van het lustrum van het biologisch-chemisch dispuut.

2) SDS-gel-electroforese wordt gebruikt voor de bepaling van het mol. gewicht van een eiwit.

3) PAA = polyacrylamide



Figuur 2. Sedimentatie-patroon verkregen na zonale ultracentrifugering van RNA verkregen uit ooglens-polyribosomen; 10S en 14S zijn de messenger-fracties.

Figuur 3. Analyse van het product gesynthetiseerd na toevoeging van 14S lens messenger aan een reticulocytenlysaat.

——— "scanning" van de gekleurde polyacrylamide gel (let op de vier ketens van het toegevoegde carrier-α-crystalline en de hemoglobine band die met B_2 samenvalt.

--o-o-- radioactiviteit gemeten zonder toevoeging van messenger.

--o-o-- radioactiviteit gemeten na toevoeging van de 14S messenger.
Alleen de αA_2 keten is ontstaan.

Fig 4. Chromatografische scheiding van de tryptische peptiden van de αA_2 keten op een ionen-wisselaar.
——— absorptie
- - - - - radioactiviteit

Figuur 5. Chromatografische scheiding van tRNA uit ooglenzen op een Benzoyl DEAE cellulose-kolom.
——— absorptie
- - - - - radioactiviteit (acceptor activiteit voor [^{35}S] methionine).

Alpha-crystalline – structuur

Purity of alpha-crystallin. H. Bloemendal, and W. S. Bont, J. F. Jongkind and J. H. Wisse. Nature *193*, 437 (1962).
Splitting and recombination of α-crystallin. H. Bloemendal, W. S. Bont, J. F. Jongkind and J. H. Wisse. Exp. Eye Res. *1*, 300 (1962).
The effect of urea on lens proteins. W. S. Bont, J. F. Jongkind, J. H. Wisse and H. Bloemendal. Biochim. Biophys. Acta *59*, 512 (1962).
Isolation of α-crystallin by gradient centrifugation. H. Bloemendal, W. S. Bont, J. F. Jongkind and J. H. Wisse. Biochim. Biophys. Acta *82*, 191 (1964).
On the subunits of α-crystallin. H. Bloemendal, W. S. Bont, E. L. Benedetti and J. H. Wisse. Exp. Eye Res. *4*, 319 (1965).
Further studies on the subunits of α-crystallin. J. H. Wisse, A. Zweers, J. F. Jongkind, W. S. Bont and H. Bloemendal. Biochem. J. *99*, 179 (1966).
The N-terminus of the lens protein α-crystallin. H. J. Hoenders and H. Bloemendal. Biochim. Biophys. Acta *147*, 183 (1967).
Subunits of alpha-crystallin from adult and embryonic cattle lens. J. G. G. Schoenmakers and H. Bloemendal. Nature *220*, 790 (1968).
Release of an N-terminal tetrapeptide from α-crystallin. H. J. Hoenders, T. van Tol and H. Bloemendal. Biochim. Biophys. Acta *160*, 283 (1968).
Demonstration of the subunit structure of alpha-crystallin by isoelectric focusing. H. Bloemendal and J. G. G. Schoenmakers. Science Tools, the LKB instrument journal, 15, 6 (1968).
Nonidentical subunits in α-crystallin. J. G. G. Schoenmakers and H. Bloemendal. Biochem. Biophys. Res. Comm. *31*, 257 (1968).
N-Terminus of alpha-crystallin. H. J. Hoenders, J. G. G. Schoenmakers, J. J. T. Gerding, G. I. Tesser and H. Bloemendal. Exprl. Eye Res. *7*, 291 (1968).
Investigations on the polypeptide chains of alpha-crystallin. J. G. G. Schoenmakers, H. J. Hoenders and H. Bloemendal. Exptl. Eye Res. *7*, 172 (1968).
Isolation of non-identical polypeptide chains of alpha-crystallin. J. G. G. Schoenmakers, R. Matze, M. van Poppel and H. Bloemendal. Int. J. Prot. Res. *1*, 19 (1969).
Studies on alpha-crystallin; on the nature of its subunits. H. Bloemendal, H. J. Hoenders, J. G. G. Schoenmakers, A. Zweers and J. J. T. Gerding. Biochemistry of the Eye Symp. Tutzing 1966 (ed: Karger, Basel 1968) 256.
The subunit structure of alpha-crystallin. J. G. G. Schoenmakers, J. J. T. Gerding, H. Bloemendal. European J. Biochem. 11 (1969) 472-481.
Isolation of alpha-crystallin by means of continuous flow electrophoresis in a liquid film. K. de Groot, H. J. Hoenders, A. Leon, H. Bloemendal. Eye Research 10, (1970) 71.
The structure of the acidic polypeptide chains from alpha-crystallin. Amino acid composition, peptide mapping and N-Terminus. A. E. Leon, J. J. T. Gerding, K. de Groot, H. J. Hoenders and H. Bloemendal. Int. J. Protein Research, **3**, (1971), 19-24.
One-step preparation of the polypeptide chains of alpha-crystallin. G. J. van Kamp, H. J. Hoenders and H. Bloemendal. B. B. A. **243**, 149 (1971).
The state of aggregation of alpha-crystallin detected after largescale preparation by zonal centrifugation. H. Bloemendal, T. Berns, A. Zweers, H. Hoenders and E. L. Benedetti. Eur. J. Biochem. **24**, 401 (1972).
Bovine α-crystallin: Sequence of the C-terminal cyanogen bromide fragment of the αA chain. F. van der Ouderaa, W. W. de Jong and H. Bloemendal. FEBS Letters, **28**, 77 (1972).
The moleculair weight of the A-chains of α-crystallin. H. Bloemendal, M. Rotmans-van Poppel and F. van der Ouderaa. FEBS Letters, **28**, 81 (1972).

Lens – ribosomen

Polyribosomes from calf lens epithelium. H. Bloemendal. J. Schoenmakers, A. Zweers, R. Matze and E. L. Bendetti. Biochim. Biophys. Acta 123, 217 (1966).
Synthesis of lens protein in virtro. I. Properties of polyribosomes. J. G. G. Schoenmakers, A. Zweers and H. Bloemendal. Biochim. Biophys. Acta **145**, 120 (1967).
Structural aspects of eye lens polyribosomes. E. L. Benedetti, A. Zweers and H. Bloemendal. Biochem. J. **108**, 765 (1968).
Synthesis of lens protein in vitro. 2. Incorporation of phenylalanine directed by poly U. H. Bloemendal, A. Zweers and J. G. G. Schoenmakers. Europ. J. Biochem. **4**, 108 (1968).
Synthesis of lens protein in vitro. IV. Further characterization of the lens cell-free system. H. Bloemendal, C. Vennegoor and R. Konings. Exptl. Eye Res., **8**, 220 (1969).

Lens messenger

Synthesis of lens protein in vitro. V. Isolation of messenger-like RNA from lens by high resolution zonal centrifugation. A. J. M. Berns, R. A. de Abreu, M. van Kraaikamp, E. L. Benedetti and H. Bloemendal. FEBS Letters 18, 159 (1971).
Translation of messenger RNAs from lens in a cell-free system from krebs II ascites cells. M. B. Mathews, M. Osborn, A. J. M. Berns and H. Bloemendal. Nature New Biology **236**, 5 (1972).
Heterologous in vitro synthesis of lens alpha-crystallin polypeptide. A. J. M. Berns, G. J. A. M. Strous and H. Bloemendal. Nature New Biology, **236**, 7 (1972).
Calf crystallin synthesis in frog cells: The translation of lenscell 14S RNA in oocytes. A. J. M. Berns, M. van Kraaikamp, H. Bloemendal and C. D. Lane. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **69**, 1606-1609 (1972).

Lens tRNA

Synthesis of lens protein in virtro. VI. Methionyl-tRNA from eye lens. G. Strous, J. van Westreenen and H. Bloemendal. FEBS Letters **19**, 33 (1971).
Synthesis of lens protein in vitro. Role of methionyl-tRNAs in the synthesis of calf lens α-crystallin. G. J. A. M. Strous, T. J. M. Berns, H. van Westreenen and H. Bloemendal. Eur. J. Biochem. **30**, 48 (1972).