



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Mechanisms controlling mRNA processing and translation: decoding the regulatory layers defining gene expression through RNA sequencing

Klerk, E. de

Citation

Klerk, E. de. (2015, September 30). *Mechanisms controlling mRNA processing and translation: decoding the regulatory layers defining gene expression through RNA sequencing*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/35768>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/35768>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/35768> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Klerk, Eleonora de

Title: Mechanisms controlling mRNA processing and translation: decoding the regulatory layers defining gene expression through RNA sequencing

Issue Date: 2015-09-30

SAMENVATTING

In 1941 formuleerden de genetici G.W. Beadle en E.L. Tatum de volgende revolutionaire hypothese: “één gen correspondeert met één enzym”. Hiervoor ontvingen zij in 1958 de Nobelprijs voor de Fysiologie of Geneeskunde. Hedendaagse onderzoekers herformuleerden de hypothese van Beadle en Tatum, omdat het verband tussen DNA en eiwitten een stuk ingewikkelder is gebleken dan aanvankelijk werd aangenomen: hoewel het humane genoom minder dan 20.000 genen bevat, coderen deze voor meer dan 80.000 boodschapper-RNA's of messenger-RNA's (mRNA's, intermediairs tussen DNA en eiwit). Deze mRNA's worden op hun beurt vertaald in honderdduizenden verschillende eiwitten. Een belangrijke nog openstaande uitdaging in de cellulaire biologie is om de mechanismen te begrijpen die zorgen dat een grote verscheidenheid aan mRNA's en eiwitten geproduceerd kan worden uit één enkel gen.

Het in dit proefschrift beschreven onderzoek richt zich op de mechanismen die ten grondslag liggen aan de vorming van alternatieve mRNAs en hun vertaling in verschillende eiwitten. Elk van de uitgevoerde onderzoeken is gebaseerd op een specifieke set van high-throughput RNA sequencing-technologieën. Gezamenlijk geven deze technieken een gedetailleerd beeld van de diversiteit aan geproduceerde mRNA's en eiwitten. Een overzicht van de beschikbare RNA sequencing-methoden en een introductie tot de verschillende niveaus waarop de genexpressie wordt gereguleerd, worden gegeven in Hoofdstuk 1. Dit hoofdstuk beschrijft de volgende processen: alternatieve transcriptie, alternatieve mRNA-verwerking en alternatieve translatie. De nadruk ligt op wat we hebben geleerd uit studies van RNA-sequencing.

In de studies beschreven in Hoofdstuk 2 en Hoofdstuk 3 is het proces van polyadenylering onderzocht, een van de stappen in de verwerking van mRNA. Alternatieve polyadenylering leidt tot de opname of uitsluiting van bepaalde sequenties in het mRNA die de stabiliteit van het mRNA of de aard van het gevormde eiwit beïnvloeden.

Hoofdstuk 2 beschrijft de rol van alternatieve polyadenylering in relatie tot oculopharyngeale spierdystrofie (OPMD), een autosomaal dominante en progressieve spierziekte veroorzaakt door mutatie van het PABPN1 gen. In deze studie hebben wij de polyadenyleringsplaatsen in kaart gebracht en het gebruik van deze plaatsen gekwantificeerd in zieke en gezonde spieren. Hierbij hebben wij een nieuwe high-throughput technologie gebruikt die polyadenyleringsplaatsen kan sequencen op het niveau van individuele moleculen. We hebben laten zien dat er een transcriptoombrede verkorting van mRNA's plaatsvindt in OPMD. We stellen een nieuwe rol voor PABPN1 in de selectie van polyadenyleringsplaatsen voor.

Hoofdstuk 3 beschrijft genetische varianten die geassocieerd zijn met alternatieve polyadenylering. In deze studie hebben wij gebruik gemaakt van RNAseq en DeepSAGE technologieën om de genetische varianten die het gebruik van alternatieve polyadenyleringsplaatsen beïnvloeden te identificeren. Deze genetische varianten verstoren of vormen een signaalsequentie die van belang is voor polyadenylering. We hebben een bekend effect in het IRF5 gen, dat genetisch in verband gebracht wordt met de ziekte systemic lupus erythematosus, bevestigd en daarnaast zeven vergelijkbare genetische varianten geïdentificeerd die eveneens in verband gebracht worden met ziekten.

Hoofdstuk 4 gaat in op de mechanismen die de eiwitsynthese (translatie) gedurende skeletspierdifferentiatie reguleren en besteedt speciale aandacht aan het gebruik van alternatieve translatie-initiatieplaatsen. In dit hoofdstuk tonen we aan dat skeletspierdifferentiatie niet alleen gereguleerd wordt op het niveau van transcriptie en mRNA-verwerking, maar dat hierbij ook de mRNA-translatie strak wordt gereguleerd. Dit is het meest duidelijk te zien in specifieke, functioneel

coherente genen die betrokken zijn bij het translatieproces. Regulering op het niveau van translatie draagt ook in belangrijke mate bij aan de vorming van de diversiteit aan eiwitten die nodig is voor het correct functioneren van de spier.

In hoofdstuk 5 hebben we de afhankelijkheid tussen verschillende regelmechanismen onderzocht. In deze studie, gebaseerd op de sequencing van individuele, intacte mRNA-moleculen, hebben we aangetoond dat er coördinatie en onderlinge afhankelijkheid is tussen alternatieve transcriptie-initiatie, alternatieve splicing en alternatieve polyadenylering. Dit treedt op in tenminste de helft van alle gedetecteerde genen. De resultaten van deze studie suggereren een rol voor RNA-bindende eiwitten uit de muscle blind (MBNL) familie in de coördinatie van splicing en polyadenylering.

De alternatieve regelmechanismen beschreven in Hoofdstuk 1 en bestudeerd in dit proefschrift bestrijken slechts een gedeelte van alle mechanismen die de gen- en eiwitexpressie beïnvloeden. De overige regelmechanismen worden kort bediscussieerd in Hoofdstuk 6, om zo een completer beeld te schetsen van de complexiteit van het proces van genexpressie. Tenslotte verbindt Hoofdstuk 6 fundamenteel onderzoek in het RNA-veld met klinische zorg en gaat in op nieuwe diagnostische en therapeutische toepassingen die gebaseerd zijn op de alternatieve mechanismen die de genexpressie reguleren op het niveau van transcriptie, mRNA-verwerking en translatie.

