

Ribonukleové kyseliny jako katalyzátory biochemických reakcí

Tento článek je zaměřen na vlastnosti RNA, jejíž objev zásadně změnil pohled na evoluci molekulárně biologických základů života a také odstartoval nový směr ve vývoji terapeutických látek na bázi oligoribonukleotidů. V r. 1989 získali Sidney Altman a Thomas R. Cech Nobelovu cenu za objev katalytických vlastností RNA. Tito vědci totiž zjistili, že RNA může vykonávat i funkci, která byla do té doby připisována pouze specializovaným proteinům – enzymům, tj. katalyzovat biochemické reakce. Katalyzátor je látka, která chemickou reakci urychluje, ale sama vychází z reakce nezměněna. RNA s katalytickou funkcí byly nazvány ribozymy.

Ribonukleová kyselina (RNA) byla, co do funkce, v minulosti velmi podceňovaná molekulou. RNA byly vnímány pouze jako poslové zprávy od deoxyribonukleové kyseliny (DNA) k proteinům, jako pasivní součásti proteosyntézy, ze kterých jsou čteny zprávy a překládány do proteinů. S postupujícím zkoumáním se ukázalo, že molekuly RNA se mohou uplatňovat v mnoha dalších procesech. Fungují např. jako primery (oligonukleotidová očka) při replikaci DNA, transferové RNA přináší do ribozomů aminokyseliny pro syntézu proteinů (Živa 2007, 5: 195–198). U mnoha virů je RNA nositelem genetické informace a je tedy virovým genomem. U ostatních forem života plní tuto funkci DNA.

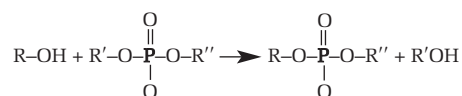
RNA se chemicky liší od DNA jen málo, ale na rozdíl od ní se vyznačuje výraznou konformační flexibilitou. Navíc, její cukerná složka – ribóza je reaktivnější než deoxyribóza díky přítomnosti volné -OH skupiny na uhlíku v pozici 2'. S objevováním nových uplatnění v regulacích biologických procesů rok od roku prestiž RNA roste. V r. 2007 byl výzkum struktury a funkce RNA oceněn dvěma Nobelovými

vými cenami za chemii a také za fyziologii a medicínu (Živa 2007, 3: XLIII).

Objev a podstata katalytické RNA

Většina dnešních RNA je kódována DNA. RNA prochází po své syntéze (transkripci podle matrice DNA) řadou úprav. Jednou z nich je tzv. sestřih (splicing). V genech eukaryot jsou totiž sekvence nukleotidů překládány do proteinu přerušovány nekódujícími úseky (introny), které se v konečné matrici mRNA, podle níž se syntetizují na ribozomech proteiny, nevyskytují. Tyto nekódující sekvence jsou krátce po transkripci vyštěpovány a kódující úseky (exony) jsou spojovány do biologicky aktivních molekul RNA. Je to proces podobný stříhu u filmu. Sestřih primárního transkriptu RNA zahrnuje přinejmenším dvě reakce: endonukleolytické štěpení v místech spojí intronů a exonů a spojení k sobě patřících konců exonů kovalentní fosfodiesterovou vazbou (ligace). Introny většiny primárních RNA syntetizovaných v buněčném jádře jsou vyštěpovány za účasti komplexních struktur (spliceozomy) obsahujících malé RNA a řadu proteinů.

Pracovníci Cechovy skupiny studovali mechanismus sestřihu a snažili se nalézt enzymy sestřihového aparátu. Ke zkoumání použili primární transkript ribozomální RNA (rRNA), kódovaný v jaderných genech prvoka *Tetrahymena thermophila*. Tento primární transkript obsahuje jeden dlouhý intron. Při inkubaci prekurzoru rRNA s jadernými proteinovými extrakty *in vitro* zjistili, že k sestřihu dochází i v negativních kontrolách (ke kterým nebyl proteinový extrakt přidán). Samozřejmě usoudili, že jejich preparát RNA je kontaminován proteiny sestřihového komplexu. Aby vyloučili možnou proteinovou kontaminaci, připravili si čistou molekulu primární rRNA uměle ve zkumavce metodami genového inženýrství tak, aby tato RNA nepřišla do styku s buněčnými proteiny. K velkému překvapení zjistili, že při inkubaci izolované prekurzorové rRNA bez přítomnosti jakéhokoli proteinu i bez dodání energie prošla tato RNA sestřihem. V reakčním pufru byly pouze kationty kovů a guanosinový faktor (guanosin monofosfát – GMP s volnou -OH skupinou ve 3' poloze ribózy). Že reakce proběhla bez účasti proteinu i bez spotřeby energie (ATP nebo jiné makroergické vazby), bylo velmi překvapivé. Chemismus těchto reakcí bylo možno vysvětlit sérií tzv. transesterifikačních reakcí, které zahrnují vždy spřažené rozrušení fosfodiesterové vazby (štěpení) a vytvoření nové (ligace). Energie při štěpení není hydrolyzou „ztracena“, ale je použita na vznik nové fosfodiesterové vazby.

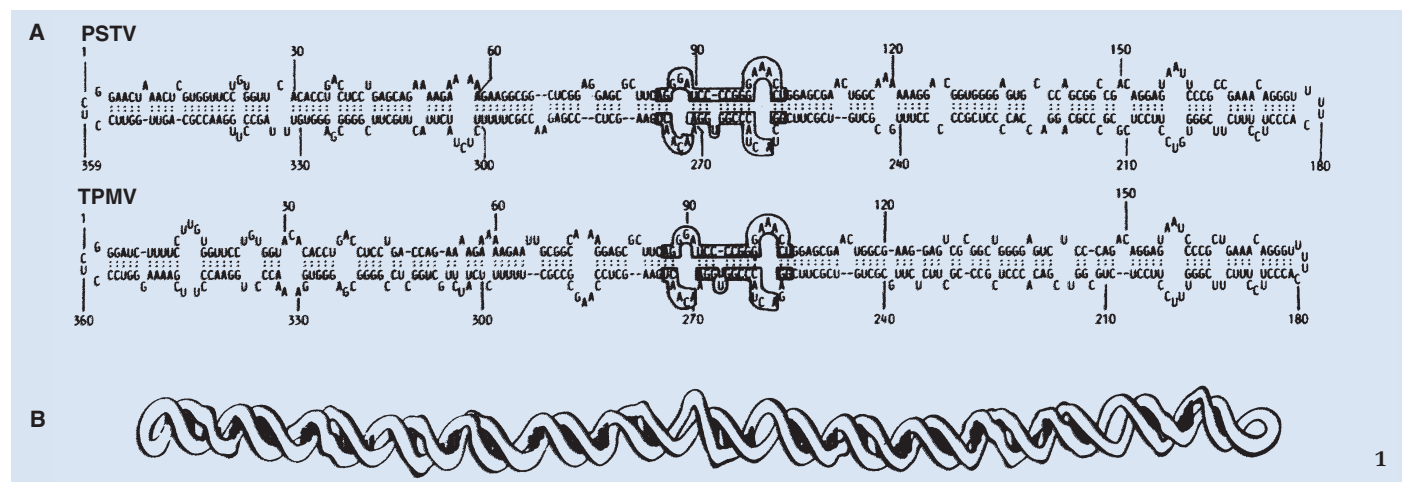


R = guanosin monofosfát;

R' = 5' exon; R'' = intron + 3' exon

Aby mohla být taková série vazebných výměn zahájena, je nutná přítomnost volné OH skupiny v 3' poloze nukleosidu. Tu zde zprostředkovává guanosinový kofaktor,

1 Struktura viroidů. A: Sekvence PSTV (Potato Spindle Tuber Viroid) a TPMV (Tomato Planta Macho Viroid). Rámečky označují společnou doménu odpovědnou za autokatalytické štěpení. B: Interakcí komplementárních bází tvoří viroidová RNA tyčkovou dvoušroubovicovou strukturu. Podle R. Hull (2004), P. Keese a R. H. Symons (1985), upraveno



který se připojuje během vyštěpení intronu na jeho 5' konec. Důležité je, že aktivační energii pro tuto reakci poskytuje RNA samotná, její sekundární a terciální struktura, která autokatalyzuje svou vlastní přeměnu. Sekvence intronu totiž umožňuje vznik takové konformace (prostorového uspořádání), která snižuje aktivační energii pro specifické štěpení a znovuvytváření fosfodiesterových vazeb. Aktivita katalytické RNA tedy závisí na jejím prostorovém uspořádání (je-li toto prostorové uspořádání zrušeno, např. rozrušením vodíkových vazeb při vyšší teplotě nebo v přítomnosti denaturačních činidel, RNA své katalytické schopnosti ztrácí). Čech a jeho spolupracovníci nazvali RNA s katalytickými vlastnostmi podobnými enzymům ribozymy. Intron primárního transkriptu rRNA prvoka *Tetrahymena* je nyní znám jako člen velké skupiny v přírodě se vyskytujících samovyštěpících intronů.

V přírodě se vyskytuje katalytická RNA různých strukturálních typů

Brzy po prvních objevech katalytické RNA se začaly ve vědeckých časopisech objevovat údaje o dalších přírodních izolátech RNA s katalytickými účinky. Ukázalo se, že katalytické domény různých izolátů nejsou všechny založeny na jediné příbuzné sekvenci a že vznikly v přírodě patrně mnohokrát nezávisle. Jeden typ ribozymů byl původně objeven v RNA rostlinných viroidů a některých virusoidů (viz níže) a později byly identifikovány i v genomech živočichů – např. čolka *Notophthalmus viridescens*, krevničky (*Schistosoma*) nebo koníkovitých z rodu *Dolichopoda*.

Viroidy jsou malé kruhové infekční RNA, dlouhé 250–400 nukleotidů, které se replikují v buňkách vyšších rostlin a nekódují žádné proteiny. Viroidy se v rostlinách

šíří do buněk všech tkání a u některých rostlinných druhů vyvolávají onemocnění podobné virózám (zakrslost, žluté skvrny na listech, včetně novitá malformace hlíz aj.). Kruhová RNA viroidů má za fyziologické teploty tvar tyček. Mezi bázemi komplementárních nukleotidů se totiž vytvoří vodíkové můstky (A–T a G–C) a protože viroidová RNA má vysoký stupeň komplementarity bází, vznikne prakticky dvoušroubovicová tyčkovitá struktura (obr. 1).

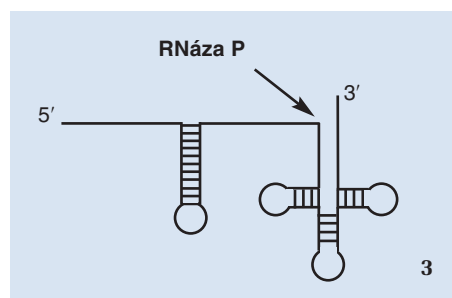
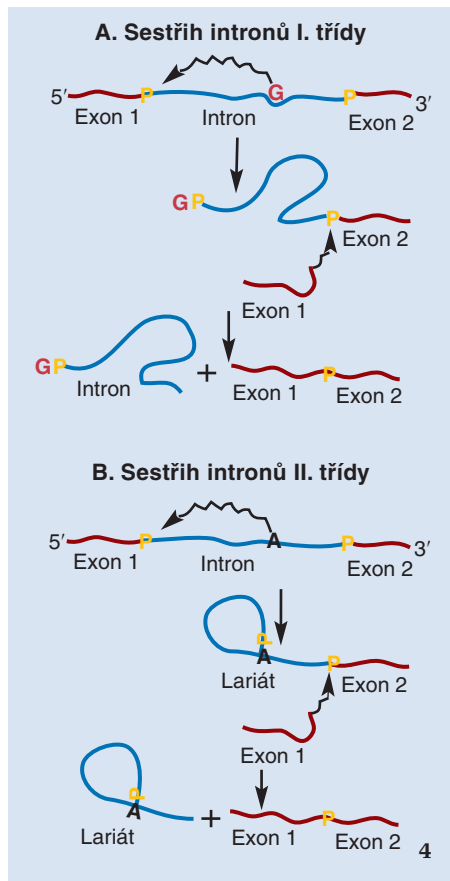
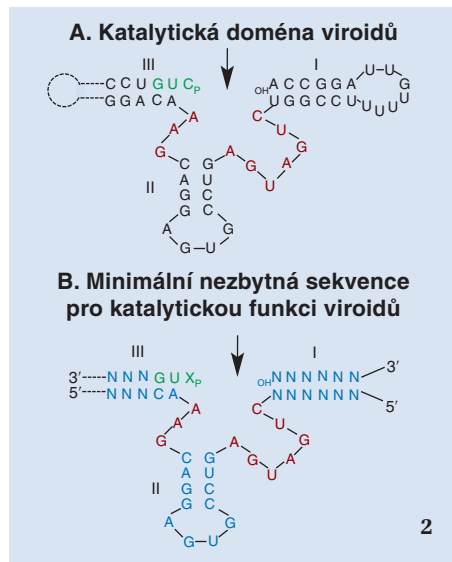
Viroidy se v rostlinných buňkách replikují hostitelskými polymerázami. Opakovaným přepisem cyklického viroidu vzniká jedna dlouhá molekula RNA, která je mnohonásobkem původní viroidové sekvence. Ta se pak autokatalyticky rozštěpí a kovalentně spojí do nových kroužků, které jsou k původní předloze komplementární. Podle těchto komplementárních RNA jsou podobně syntetizovány nové viroidy. Reakce štěpení dlouhé molekuly RNA a spojování do kruhových viroidových struktur je katalyzována středovou konzervativní viroidovou doménou (obr. 1A, 2A). Pokusy s delečními mutanty viroidových cDNA (viroidové RNA přepsané do DNA sekvencí) umožnily vymezení sekvence nezbytnou pro katalytickou funkci viroidové domény (obr. 2B). Pro tvar jejího prostorového uspořádání připomínající kladivou ji objevitelé nazvali struktura hammerhead. Motiv hammerhead (asi 40 nukleotidů) je nejmenší v přírodě se vyskytující ribozym, je také nejefektivnější v katalýze autoštěpení.

Virusoidy – kruhové RNA s katalytickými účinky – které se viroidům podobají svou sekundární strukturou, mechanismem replikace i tím, že většinou nekódují žádné proteiny, jsou na rozdíl od viroidů přenášeny do rostlin kapsidami virů jako jejich satelity. Jeden virusoid byl objeven

i v lidském organismu, v játrech některých pacientů infikovaných virem hepatitidy B. Ukázalo se, že tato autokatalytická RNA (HDV – Hepatitis Delta Virus) cestuje v částicích viru žloutenky typu B. Katalytická doména HDV má jiný typ sekundární struktury než „hammerhead“. Další odlišný typ katalytické RNA byl nalezen např. v mitochondriích některých hub.

Velkou skupinu katalytických RNA v přírodě tvoří některé introny. Ačkoli řada jaderných intronů nemá katalytické účinky, existují dvě skupiny intronů, které katalyzují svoje vlastní vyštěpení. Třída I byla nalezena v genech pro rRNA prvoků (např. *Tetrahymena*), dále v mitochondriích a chloroplastech mnoha nižších eukaryot a také v mitochondriích vyšších rostlin. Třída II, která se liší jak prostorovým uspořádáním, tak i mechanismem průběhu sestřihu (viz obr. 4), byla nalezena v mitochondriích rostlin a hub a v chloroplastech. Mechanismus sestřihu intronů třídy II velmi připomíná mechanismus, jakým je upravována většina primárních transkriptů jaderných genů vyšších eukaryot. Jejich introny nejsou schopny se vyštěpovat autokatalyticky. K jejich vyštěpování dnes slouží velké komplexy složené z proteinů a malých jaderných RNA (spliceozomy). Je možné, že tento „moderní“ způsob sestřihu je odvozen z evolučně starších intronů třídy II. Během evoluce eukaryot mohlo dojít k fragmentaci a separaci katalytické domény do dnes přítomných malých RNA a ke vzniku proteinů, které doladily a zčásti převzaly jejich katalytické funkce.

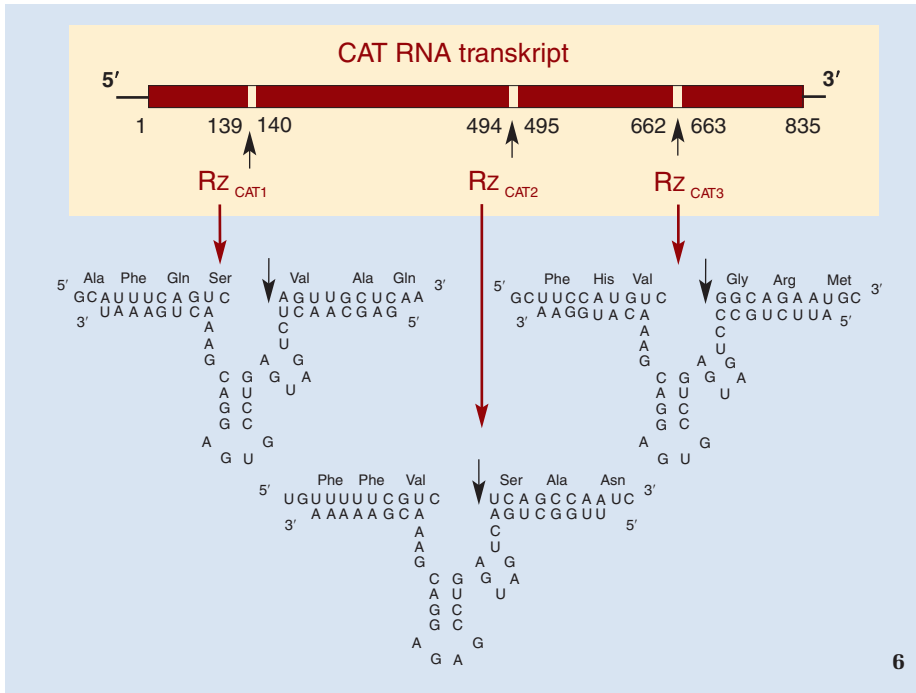
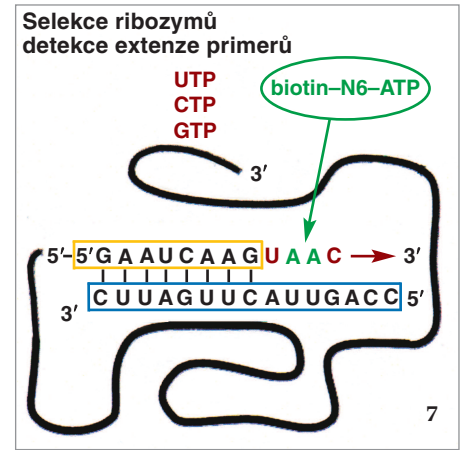
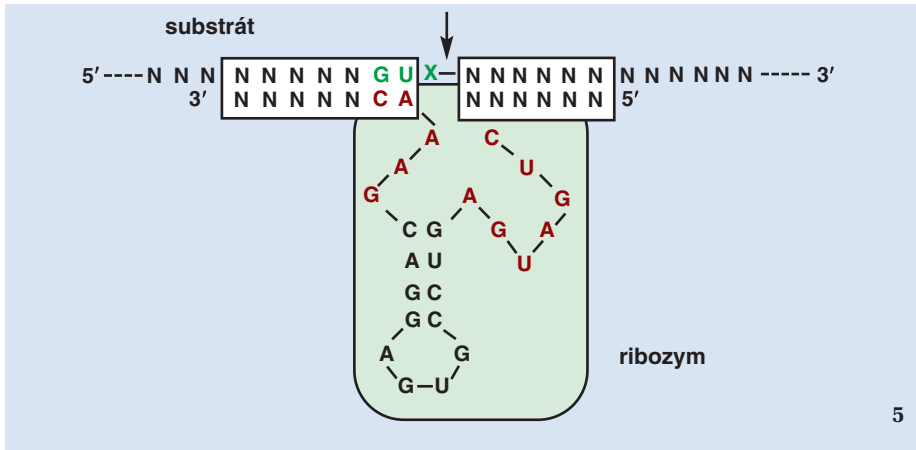
Je třeba si všimnout skutečnosti, že samovyštěpitelné introny nejsou pravými katalyzátory, které by reakci prošly nezměněny. Nicméně v přírodě se vyskytují i pravé katalyzátory se strukturou RNA. Jeden



2 Ribozym se strukturou zvanou hammerhead. A: Schématická struktura viroidu s vyznačenou sekvencí středové konzervativní katalytické domény „hammerhead“. Zbylé viroidové sekvence jsou naznačeny plnou černou čarou (levá smyčka); B: Minimální sekvence potřebné pro katalytickou funkci;

I, II, III: ramena komplementárních sekvencí; N: jakékoli komplementární nukleotidy mezi substrátem a ribozymem. Červené báze jsou nezbytné pro katalytické účinky ribozymu. Šipka označuje místo štěpení (vždy za nukleotidy GUX, kde X = C nebo T). Podle V. Walbot a G. Bruening (Nature 1988), upraveno

3 RNáza P vyštěpuje 5' konec tRNA z primárního transkriptu
 4 Mechanismus sestřihu intronů třídy I a II: A – Reakce sestřihu intronů třídy I zahrnuje přesné vyštěpení intronu, připojení guanosinového (G) faktoru k 5' konci intronu. B – Při sestřihu intronů třídy II se adeninový zbytek poblíž 3' konce vyštěpeného intronu spojí s 5' koncem intronu. Vznikne tak lasovitá struktura (lariát) intronu větvená na adeninovém zbytku (A). P (žluté) jsou fosfatové skupiny vázané na nukleosidy RNA. Upraveno podle T. D. Pollard, W. C. Earnshaw (Cell Biology 2008)



byl popsán současně s objevem autokatalytický se vyštěpujícího intronu jako složka enzymu bakteriální RNázy P.

RNáza P se nachází ve všech buňkách, kde katalyzuje specifické štěpení prekurzorů transferové (tRNA) a malé ribozomální 5S rRNA (obr. 3). Tyto substráty zřejmě sdílejí strukturální rysy, rozpoznávané vazebným místem RNázy P. Enzym RNáza P bakterií je nukleoproteinový komplex složený z proteinové podjednotky a RNA podjednotky. Bylo dokázáno, že katalytickou podjednotkou tohoto enzymu je právě RNA. Tato katalytická RNA je přes 300 nukleotidů velká a sestává ze dvou domén, z nichž jedna obsahuje rozpoznávací sekvenci pro substrátovou RNA a druhá obsahuje aktivní místo ribozymu. Proteinová složka nemá v tomto případě enzymovou funkci, ale pomáhá stabilizovat prostorovou strukturu RNA a zlepšuje tak afinitu RNA k substrátu.

Již dlouho se vědělo, že ribozomy, tělíska pro syntézu proteinů podle matrice mRNA, se skládají z různých ribozomálních RNA a řady proteinů. Při detailním studiu prostorové struktury ribozomů se s velkým překvapením zjistilo, že se RNA složka ribozomů účastní všech funkcí potřebných pro proteinovou syntézu a že aktivní centrum ve velké ribozomální podjednotce, kde se odehrává vytváření

peptidových vazeb mezi aminokyselinami, je zcela obklopeno RNA. Rovněž vazebné místo pro substrát je dáno interakcemi ribozomální RNA. Jinými slovy, ribozom je vlastně ribozym. Ribozomální RNA není, jak se dříve myslelo, pouze lešením pro katalytické proteiny, nýbrž právě naopak, proteiny se zdají být složkami, udržujícími katalytickou RNA v její aktivní konformaci. Objev, že katalytickou složkou ribozomů je RNA, podporuje hypotézu, že proteiny byly k ribozomům přidány později v jejich evoluci.

Využití katalytických vlastností RNA v medicíně

Brzy poté, co byla určena minimální potřebná struktura (consensus sekvence) pro strukturu viroidových domén, O. C. Uhlenbeck a spolupracovníci zkusili připravit umělé ribozomy (obr. 5), ve kterých fyzicky oddělili část řetězce substrátového (v němž probíhá štěpení) od ribozymového (vlastní katalytické domény). Připravili dva oligonuklotidy a po hybridizaci (vzájemné interakci vodíkovými můstky) jejich komplementárních částí byl delší z nich (substrát) rozštěpen za sekvencí GUC menším katalytickým řetězcem. Jak je vidět z obr. 5, jediným sekvencním požadavkem na substrátový řetězec je sekvence GUX (X = C nebo T), za níž dochází ke štěpení,

5 Oddělený substrátový (štěpený) a ribozymový (katalytický) řetězec. Požadavek komplementarity substrátového a enzymového řetězce (bílé rámečky), katalytický motiv struktury hammerhead (zelený rámeček). N: jakékoli komplementární nukleotidy mezi substrátem a ribozymem. Pro katalytické účinky ribozymu jsou nezbytné červeně označené báze. Šipka ukazuje místo štěpení

6 Tři ribozomy navržené pro štěpení modelové mRNA kódující enzym chloramfenikol transferázu (CAT). V této mRNA se nachází sekvence GUC ve třech místech. Obr. 5 a 6 podle J. Haseloff a W. L. Gerlach (Nature 1988), upraveno

7 *In vitro* evoluce ribozymu s polymerázovou aktivitou, katalyzujícího syntézu RNA podle RNA templátu. Sekvence ribozymů vložené do reakce na počátku procesu obsahovaly populaci mutovaných verzí ligázového ribozymu (černé vlákno). 5' konec ligázové domény ribozymu byl kovalentně připojen k 5' konci RNA primeru (ve žlutém rámečku). Zároveň byl přidán do reakce řetězec RNA-templátu (předloha pro syntézu; v modrém rámečku), jehož 3' koncová část vytvořila s primerem vodíkové můstky. Ty mutované verze molekul původního ribozymu, které byly schopné méně či více účinně katalyzovat prodloužení primeru (žlutý rámeček) podle templátu (modrý rámeček), byly selektovány právě na základě této schopnosti: do reakce byl přidán biotinem modifikovaný substrát (adenosin trifosfát s navázaným biotinem, zeleně). Pokud ribozym katalyzoval syntézu RNA podle templátu, modifikované nukleotidy se připojily fosfodiesterovou vazbou k primeru, a tedy i k příslušnému ribozymu. Poté byly do reakce přidány magnetické kuličky s navázaným streptavidinem (který váže biotin). Magnetem pak byly z celé populace ribozymových molekul vybrány právě jen ty molekuly, které katalyzovaly polymerázovou reakci (protože jen ty měly připojenou biotinovou značku, za kterou je bylo možno zachytit). Následně byly zachycené molekuly ribozymů z kuliček uvolněny, zmnoženy (s opětovým zavedením nahodilých mutací) a vráceny do reakce. Nukleotidy připojené k primeru polymerázovou reakcí katalyzovanou ribozymem – červeně a zeleně. Červená šipka ukazuje směr syntézy. Upraveno podle W. K. Johnston a kol. (Science 2001)

obklopená z obou stran libovolnými nukleotidy, které párují (vodíkovými můstky) se sekvencemi obklopujícími jádro katalytického řetězce.

Tyto pokusy otevřely nový směr návrhů terapeutických látek: umělých ribozymů pro zablokování tvorby škodlivých proteinů štěpením mRNA, podle kterých jsou syntetizovány – např. štěpením molekul mRNA kódujících patologicky pozměněné proteiny při nádorovém bujení nebo štěpením virových RNA. Při znalosti sekvence cílové RNA stačí vyhledat sekvenci GUX v příslušné RNA a „ušít“ na míru ribozym, jehož okrajové sekvence (bílé rámečky v obr. 5) budou komplementární k sekvencím obklopujícím GUX cílové RNA a zachytí se k nim vodíkovými můstky. Takto připojený ribozym rozštěpí substrátovou RNA za sekvencí GUX (obr. 6). Uměle syntetizovaný ribozym funguje jako pravý katalyzátor, protože po rozštěpení substrátové RNA může nezměněn katalyzovat štěpení dalších molekul cílové RNA. Velkou výhodou ribozymů, kromě toho, že k účinkům stačí malá katalytická množství, je nevratné zničení cílové RNA. Aplikace ribozymů k štěpení mRNA bylo vyzkoušeno s výbornými výsledky *in vitro*. V současnosti již probíhají klinické studie, které zkoumají účinek ribozymů *in vivo* pro léčbu pacientů s infekčním či nádorovým onemocněním.

Výzkum využití ribozymů pro terapeutické účely na sebe soustředil obrovský zájem i velké úsilí experimentátorů. Přes mnoho problémů, které bude ještě třeba překonat v *in vivo* podmínkách, je to velmi slibný přístup pro terapii geneticky podmíněných, infekčních nádorových a dalších chorob.

Objev ribozymů změnil pohled na evoluci prvních živých forem

Objev katalytických vlastností RNA velmi posílil hypotézu odpovídající na otázku, co bylo dříve: slepice nebo vejce, neboli existovala-li dříve DNA či proteiny. Tato hypotéza předpokládá, že dříve než DNA a proteiny existovala RNA a že před současným DNA světem byla před asi čtyřmi biliony let perioda RNA světa (termín zavedl M. Gilbert). RNA mohla totiž sloužit jednak jako nositel genetické informace, jednak jako katalyzátor reakcí, jimiž byla informace replikována i realizována. Teprve později, s nutnou účastí dvou enzymů, ribonukleotid-reduktázy (enzymu, který byl schopen přeměnit ribózu na deoxyribózu) a reverzní transkriptázy (polymerázy, která byla schopna syntetizovat řetězce DNA podle RNA templátu), byla genetická informace uložena s výhodou do méně reaktivní, stabilnější struktury DNA. Existují další alternativní teorie, z nichž jedna postuluje velmi časný vztah mezi nukleotidy a aminokyselinovými sloučeninami, tj. „smíšený“ svět na bázi nukleotidů a aminokyselin či krátkých peptidů. V tomto kontextu by koenzymy nynějších enzym-koenzymových komplexů složené z nukleotidové a proteinové části (např. koenzym A) představovaly velmi archaické připomínky časného ribonukleo-peptidového světa. Těžko kdy bude dostupný přímý důkaz potvrzující či vyvracející existenci RNA světa. Jednou z metod používaných na podpoření evolučních teorií o roli RNA v pre-DNA světě je simulování evoluce vlastností molekul RNA ve zkumavce. Tato metoda byla úspěšně použita pro získání struktur RNA s novými katalytickými vlastnostmi.

Procesem základního významu v RNA světě by byla replikace RNA podle RNA templátu katalyzovaná strukturou RNA. Ačkoli ribozym, který by katalyzoval templátem řízenou polymerizaci nukleotidů, nebyl v přírodě nalezen, byl získán evolucí ve zkumavce. Je to proces, který zahrnuje opakované výběrové pomnožení molekul RNA tak, že pomnoženy jsou pouze RNA, kterým se podaří katalyzovat určitou vyžádanou chemickou reakci. Přitom se pamatuje na zavádění nahodilých mutací, které udržují variace v populaci molekul RNA. Autoři ribozymu, který katalyzoval RNA templátem řízenou RNA polymerizaci, použili jako východzí strukturu přirozený ribozym s ligázovou aktivitou (ligáza spojuje vlákna RNA kovalentní vazbou), do kterého nahodile zaváděli mutace. Nový polymerázový ribozym byl získán z populace asi 10^{15} různě mutovaných RNA po 18 kolech reakcí následovaných vždy selekcí a namnožením vybraných RNA (obr. 7). Podobnými procesy byly získány ribozymy, které katalyzovaly např. uracil fosforibozyl transferázovou reakci (připojování aktivované ribózy k uracilu za vzniku uridin 5' fosfátu) nebo ribozymy katalyzující tvorbu peptidické vazby mezi aminokyselinami. Podařilo se též selektovat ribozymy, které štěpily specificky DNA místo RNA.

Simulace některých chemických reakcí, které mohly vést k vývoji života na Zemi, není jediným účelem *in vitro* evoluce molekul. Rozvíjející se výzkum zaměřený na selekci nových struktur s požadovanými vlastnostmi, najde bezpochyby v blízkém budoucnu významné uplatnění v medicíně i dalších oborech.

Biotechnology Explorer™

Výukové soupravy pro biologii na středních školách



Bio-Rad tel.: 241 430 532 e-mail: bio-rad@bio-rad.cz

www.bio-rad.com

