

Ribonukleové kyseliny

Věčně „druhé“ mezi nukleovými kyselinami

Stanislav Zadražil

V tradičním období udělování Nobelových cen obsadila molekulární biologie na konci r. 2006 opět dva oceňované obory — chemii a fyziologii s medicínou (Roger Kornberg za chemii a Andrew Fire a Craig Mello za fyziologii a medicínu, blíže na str. XLIII kuléru). Není to poprvé a nebylo by na tom nic zvláštního, kdyby výhradním předmětem zájmu nových nositelů nebyl jen „výzkum syntézy, struktury, funkce a významu RNA“. Zatímco dříve zůstávala ribonukleová kyselina spíše ve stínu DNA, která se stala hlavní nositelkou genetické informace, dnes se dostává stále více do popředí zájmu. Vzrůstající význam malých nekódujících RNA je zřejmý nejen z oceňování dříve učiněných objevů.

Zatím nejbizarnější, ale jistě velmi perspektivní úloha nekódujících RNA genů byla zveřejněna v časopise *Nature* (2006, 7092: 167–172). Gen *HARIE*, pocházející z konzervované nekódující genomové oblasti a exprimovaný (ve formě RNA) v době intenzivního embryonálního vývoje mozku, zůstával u 11 amniotických organismů (blaných — plazů, ptáků a savců) téměř nezměněn až do doby evolučního oddělení šimpanze a člověka. Pak došlo ke zrychlené evoluci (18 sekvenčních změn proti jedné náhodně možné záměně nukleotidu — substituci) jen u člověka. Takové RNA geny a oblasti v lidském genomu (zatím je jich sledováno asi 50) by mohly hrát významnou úlohu v jedinečné evoluci člověka.

Rádi bychom proto přiblížili čtenářům *Živy* tuto „druhou“ nukleovou kyselinu a poukázali na určitá období, kdy právě prioritní výzkum RNA, ve vztahu k DNA a proteinům, výrazně rozšířil naše znalosti a posunul tak molekulární biologii a genetiku na úroveň současné genomiky a proteomiky. Úvodní příspěvek předpokládané série článků věnujeme historizujícímu připomenutí hlavních poznatků o struktuře a vlastnostech RNA.

Struktura nukleových kyselin a zvláštnosti RNA

Primární struktura

Od objevu nukleinu, který byl nutně směsí obou nukleových kyselin, jako hlavní složky buněčných jader v r. 1868 J. Miescherem (švýcarský lékař analyzující složení hnisu) bylo následující dlouhé období věnováno podrobné analýze složek a molekulární struktury obou polymerů, izolovaných v různé čistotě. Přitom prošly DNA a RNA období, kdy byly považovány za thymovou (živočišnou), resp. kvasničnou (rostlinnou) nukleovou kyselinu (dále jen NK), než bylo definitivně zjištěno, že obě jsou součástí všech buněk živých objektů.

Tehdejší virologové potvrdili jako první již ve 30. letech 20. stol., že viry, na rozdíl od buněk, mohou obsazovat jen jednu NK, buď DNA (např. bakteriofágy T2 a T4) nebo RNA (virus tabákové mozaiky). Když pak byla jednoznačně potvrzena genetická funkce DNA (O. T. Avery 1944, A. D. Hershey a M. Chase 1952), muselo již tehdy být zřejmé, že stejnou funkci může plnit i RNA. Přesto byla DNA jako experimentální předmět preferována.

Zdánlivě nepatrné chemické rozdíly mezi DNA a RNA se omezují, při zachování stejného způsobu stavby polymeru (obsahujícího čtyři základní heterocyklické báze napojené N–C glykosidickou vazbou na cukr–fosfátovou páteř molekuly s 5'–3'–fosfodiesterovou internukleotidovou vazbou), jen na odlišnost v cukerné složce (ribóza v RNA obsahuje oproti deoxyribóze v DNA navíc 2' hydroxylovou skupinu) a v uracilu

RNA, který tu nahrazuje svůj metylovaný analog — thymin, vyskytující se v DNA. Tyto rozdíly však znamenají důležité změny ve vlastnostech obou nukleových kyselin, projevující se především zvýšenou reaktivitou RNA, její labilitou v alkalickém prostředí či citlivostí k mnoha nukleolytickým enzymům. Připomeňme si, že vyšší reaktivita RNA, závislá na sousedních hydroxylech ribózy (2'–OH a 3'–OH), souvisí i s jejími katalytickými (ribozymovými) funkcemi. Funkční výjimečnost RNA spočívá v tom, že mohou plnit informační úlohu (jako genom) i úlohu výkonnou (jako fenotyp). Jejich katalytické funkce byly poprvé objeveny v souvislosti s posttranskripční úpravou primárních transkriptů rRNA a tRNA a později se sestřihem mRNA (Živa 2003, 1: 4–8).

Dlouholeté úsilí vedoucí k průkazu základních charakteristik a vlastností struktury RNA bylo doplněno nálezy neobvyklých typů vazeb v některých strukturách — 5'–2' internukleotidové vazby v jednom typu intronové RNA (v tzv. lasovitém meziprojektu nekódující sekvence genu — intronu) a v buněčné substanci 5'–2'–oligoA, hrající úlohu v odpovědi organismu při protivirovém působení interferonu. Ještě méně obvyklou vazbou je přítomnost 5'–5' trifosfátové internukleotidové vazby v tzv. 5' čepičce eukaryotické mRNA. Ta je syntetizována při posttranskripční úpravě připojením 7–metylguanidinového zbytku k původnímu 5' konci polynukleotidu, což je doprovázeno i případnou metylací 2'–OH skupiny ribózy okolních nukleotidů. Tato modifikace nejen chrání mRNA před možnou degradací, ale především umožňuje

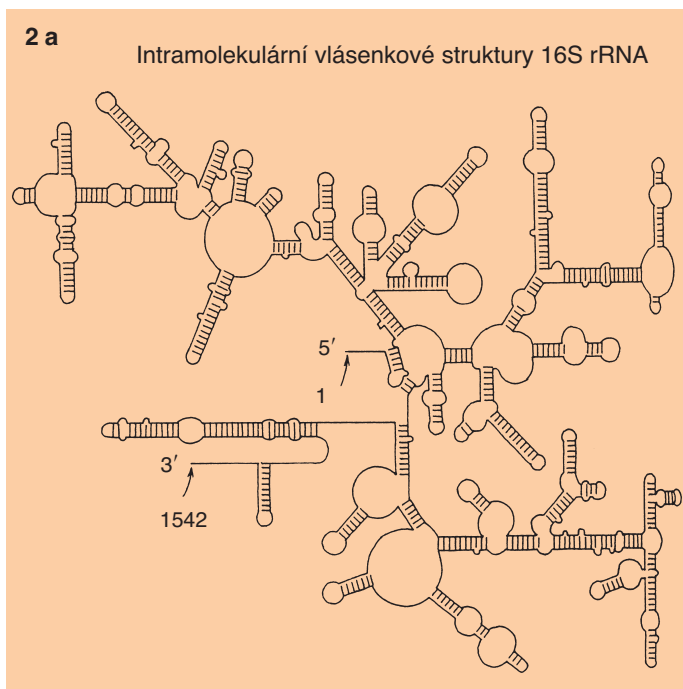
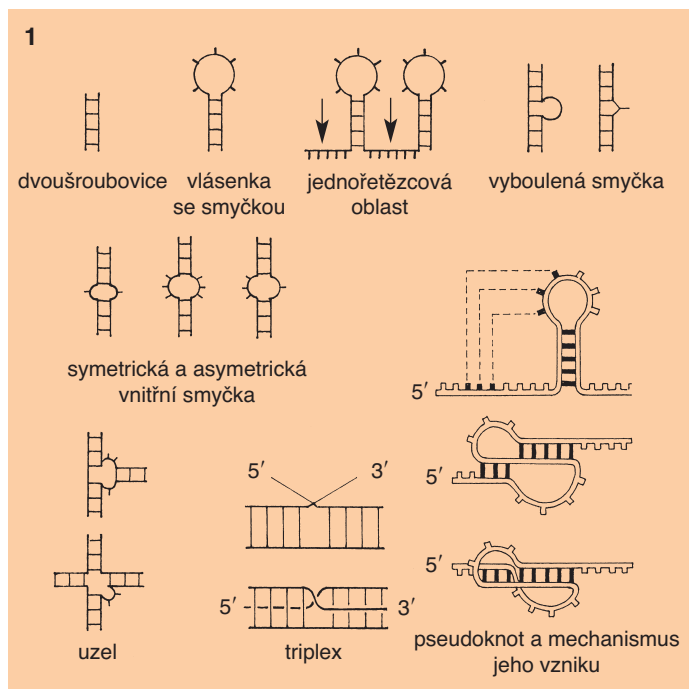
sestavení ribonukleoproteinového komplexu pro přesné určení iniciačního kodonu AUG při její translaci v eukaryotických organelech.

Uvedené modifikace nukleotidů v RNA jsou jen malým příkladem rozsáhlých posttranskripčních modifikací a úprav, kterým RNA syntetizovaná jako primární transkript na DNA podléhá. Všechny typy RNA (ribosomální, messengerová a transferová) provázejí takovéto specifické enzymové úpravy, i když rekordmankou je nesporně tRNA (1–2 % celkového obsahu nukleotidů je modifikováno). Je známo několik desítek tzv. minoritních bází a nukleosidů, z nichž jsou nejznámější různě metylované puriny, méně častěji pyrimidiny (mezi nimiž nechybí ani 5–metylcytosin známý spíše z DNA, kde je velmi často rozhodujícím faktorem při regulaci genové exprese a při ochraně genomu před restriktivními enzymy), ale i např. ribothymidin, thiouracil a pseudouridin (u něhož se uplatňuje C–C glykosidická vazba místo N–C vazby běžné v nukleosidech). Patří sem samozřejmě i již zmíněná metylace 2'–OH ribózy, přičemž se v mechanismu obou posledně jmenovaných modifikací uplatňuje sekvenční komplementarita tzv. malých jadérekových snoRNA (small nucleolar RNA) ze skupiny malých nekódujících RNA.

Sekundární a vyšší typy struktury

Přes zmíněné rozdíly v chemickém složení a struktuře NK je schopnost tvorby sekundární dvoušroubovicové struktury u RNA a DNA analogická. Na základě specifické komplementarity bází adenin–thymin nebo uracil (A–T; A–U) a guanin–cytosin (G–C) dochází k tvorbě nukleotidových párů (pomocí vodíkových vazeb a stabilizačních vertikálních interakcí planárních heterocyklů v polymeru), což většinou není výrazně ovlivněno uvedenými modifikacemi bází v RNA. Obě nukleové kyseliny tak mají schopnost vytvářet Watsonovu a Crickovu dvoušroubovici s antiparalelním uspořádáním komplementárních řetězců (double-stranded — dsDNA a dsRNA). Zatímco u DNA je tato sekundární struktura téměř jedinou strukturou nacházející uplatnění v úplném dvoušroubovicovém uspořádání DNA genomů s různými konformačními oblastmi závislými na sekvenci nukleotidů (nejznámější konformace jsou B, A, Z, ale i H, G, P apod.), je intramolekulární uspořádání RNA většinou jen částečně dvoušroubovicové (kromě některých virů s úplným dsRNA genomem), tedy jednořetězcové s určitým množstvím vlásenkových struktur s různě dlouhou dvouvláknovou částí a jednovláknovou smyčkou, v závislosti na výskytu antiparalelních komplementárních sekvencí polynukleotidu v řetězci (obr. 1). Konformací RNA dvoušroubovice je vždy forma A; do jiné konformační formy známé u DNA se nevejde 2'–OH skupina ribózy.

K již dříve zmíněné vyšší reaktivitě RNA v porovnání s DNA se tak přiřazuje, v závislosti na střídání a vzájemné interakci neuspořádaných úseků a úseků se sekundární strukturou, i značná flexibilita všech molekul RNA, označovaná jako ornamentální schopnost přirovnávaná k japonským papírovým skládačkám origami. Tyto sekundární a od nich odvozené terciární struktury jsou všudypřítomné, především u rRNA a tRNA, a staly se i modelovými strukturami, např. struktura jetelového listu a obráceného písme L u tRNA (obr. 2c).



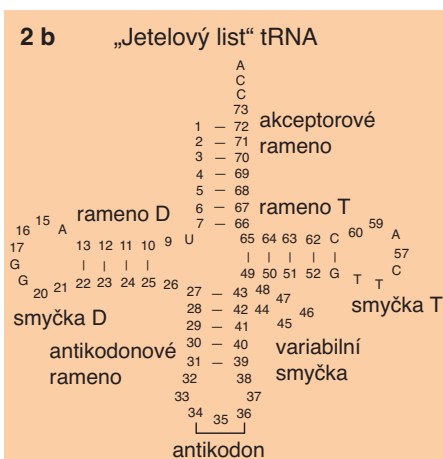
Obr. 1 Schematické znázornění hlavních typů struktur vyskytujících se v molekulách RNA — základ strukturního polymorfismu RNA

Později se ukázalo, že kromě Watsonových a Crickových nukleotidových párů může sekundární struktura RNA obsahovat až 27 různých neobvyklých párů se dvěma vodíkovými vazbami (např. G-U, A-C, A-A, G-G, A-G, U-U, U-C) a s různým využitím syn- a anti-konformace bázi v okolí glykosidické vazby v antiparalelním a paralelním uspořádání odpovídajících řetězců. Takové struktury jsou známy např. u tRNA v terciárním uspořádání a podílejí se na přesnosti „nabití“ tRNA odpovídající aminokyselinou, při vytváření vlásenek v mRNA signalizujících odchylky od univerzálního čtení tzv. STOP kodonů (UGA, resp. UAG) a zejména při kolísavém párování (Crickově wobble párování) nukleotidu v 1. poloze antikodonu tRNA s nukleotidem ve 3. poloze kodonu mRNA. Přechodně se takové neobvyklé párování uplatňuje i v některých mechanismech sestřihu při dočasném propojení 5' a 3' konců intronů (G-G a A-C) před jejich úplným odstraněním.

Je tedy zřejmé, že molekuly RNA mohou vytvářet jak relativně stabilní struktury připomínající DNA a plnit odpovídající genetickou funkci, tak vysoce flexibilní i složité konformace připomínající struktury proteinů, zřejmě i s některými jejich vlastnostmi. Strukturní a konformační polymorfismus molekul RNA se již osvědčil na různých úrovních genové exprese a lze očekávat, že bude i základem pro jejich další, dosud neznámé funkce v evoluci (stále se rozrůstající rodiny RNA genů).

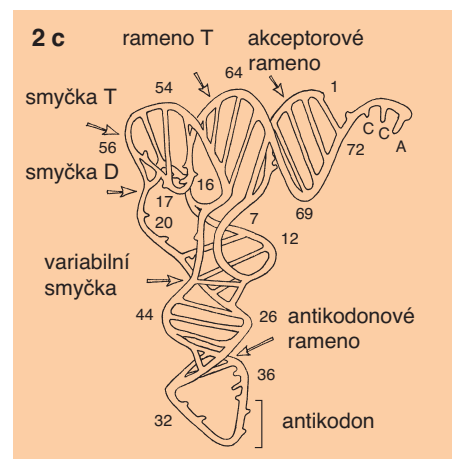
RNA a ústřední dogma molekulární biologie

Vytvoření a zveřejnění modelu dvoušroubovice DNA (v r. 1953), popisujícího strukturu základního genetického materiálu se schopností vertikálního přenosu (replikace) a horizontálního využití (transkripce, odpovídající hypotéze vlivu genu na všechny procesy v buňce) genetické informace, završilo období poznání NK jako lineárních polymerů se čtyřmi nukleotidovými staveb-



ními kameny. V té době bylo jednoznačně přijato, že proteiny jsou rovněž lineární makromolekuly složené z aminokyselin (asi 20 různých z mnoha přítomných v buňce, což předpokládali i F. Crick a J. Watson). Bylo to potvrzeno již první stanovenou primární strukturou polypeptidu — sekvence aminokyselin v řetězci inzulínu, kterou zjistil F. Sanger (1951). Na základě studií strukturního významu vodíkových vazeb pro prostorové uspořádání proteinů i jiných makromolekul (L. Pauling 1951) bylo rovněž zřejmé, že funkční konformace proteinů bude takovými slabými vazbami stabilizována a její vytvoření bude vlastností samotné molekuly proteinu, bez přímého uplatnění či vlivu nějaké další vnější informace (tedy ani genetické informace z DNA).

Není proto žádným překvapením, že hlavním problémem té doby se stal vztah DNA (jako nositele neznámého genetického kódu, tj. pravidel převodu čtyřpísmenné nukleotidové abecedy na abecedu 20 aminokyselin) a proteinů (jako produktu uplatnění kódu v translačním stupni genové exprese). Tento vztah musel být nepřímý (bez vzájemného kontaktu řídicího polydeoxynukleotidu DNA a vznikajícího peptidického řetězce) a úlohu zprostředkovatele mohla hrát jen RNA. Nastalo tak období hledání podstaty genetického kódu (1953–1962), které se stalo příkladem kolektivního (asi 12 pracovišť především z USA, Velké Britá-



Obr. 2 Sekundární struktura: a) 16S rRNA, b) „jetelového listu“ tRNA a její c) prostorové uspořádání ve formě „obráceného písmene L“. Podle materiálů autora kreslil S. Holeček

nie a Francie), ale vysoce kompetitivního mezinárodního badatelského úsilí. A bylo tu opět místo pro geniálního teoretika-myslitel F. Cricka, který nepatřil mezi laboratorní experimentátory, ale byl spíše přesným učitelem, vysvětlivatelem a arbitrem, který dovedl nenapodobitelně třídit a uspořádat vědecké myšlenky, názory a výsledky jiných a rozpoznat základní principy, zobecnit je a jasně formulovat.

Měl k tomu příležitost i tentokrát, když teoretický fyzik G. Gamow založil v r. 1954 RNA klub, který měl sdružovat omezený počet vybraných „přátel RNA“ zajímavících se o úlohu RNA v mechanismu genetického kódu. Sám zakladatel klubu v té době paradoxně uvažoval o nepřijatelném modelu přímého řazení aminokyselin (syntézy peptidů) na povrchu dsDNA (1 nukleotid-1 aminokyselina na základě podobné vzdálenosti sousedních aminokyselin v peptidickém řetězci a nukleotidů v B konformaci DNA), který později rovněž neúspěšně upravoval podle navrženého tripletového kódu (64 nukleotidových tripletů pro 20 aminokyselin) jako překrývající se kód se dvěma nukleotidy vždy společnými pro sousední aminokyselinu. Přesto velký význam Gamowova úsilí

spočíval v jasném nastolení a prosazování problému genetického kódu a rychlá výměna informací zprostředkovaná RNA klubem vedla k jeho nejdůležitějšímu počínání — Crickovu příspěvku *On Degenerate Template and the Adaptor Hypothesis* (1955), kde formuloval podstatu mechanismu čtení a interpretace tripletového kódu v genech. Podle Cricka různé typy RNA vystupují v procesu proteosyntézy jednak v úloze intermediárních kopií genů, jednak jako přenašeči aminokyselin (adaptory).

To vše bylo v krátké době experimentálně potvrzeno (do r. 1965) objevem mRNA, množiny molekul tRNA (specifických pro jednotlivé aminokyseliny) a úplným objasněním nepřekrývajících se tripletového, degenerativního (více tripletů pro jednu aminokyselinu) a univerzálního genetického kódu za přispění Cricka, Watsona, Brennera, Jacoba, Monoda, Grosse, Halla, Spiegelmana, Zamecnika, Holleyho, Khorany, Nirenberga (často pozdějších nositelů Nobelových cen) a mnoha dalších.

V průběhu tohoto plodného období pro rozvoj molekulární biologie formuloval a na přelomu let 1958–9 vyslovil Crick své „ústřední dogma molekulární biologie“ charakterizující vzájemný vztah a podíl všech informačních biopolymerů na zajišťování a řízení toku genetické informace. Podle tohoto dogmatu může být sekvencí informace přenášena pouze mezi nukleovými kyselinami navzájem a z nich do proteinů, ale nikdy jen mezi proteiny a zpětně z proteinů do nukleových kyselin. Následující schéma:



tak znázorňuje vyjádření obsahu dogmatu v procesech replikace (syntéza DNA závislá na DNA a syntéza RNA závislá na RNA), transkripce (syntéza RNA závislá na DNA), reverzní transkripce (syntéza DNA závislá na RNA) a translace (syntéza proteinů závislá na RNA). Jinými slovy, jakmile se informace dostane až do proteinové sekvence aminokyselin, nemůže být zpětně využita. Do tohoto obsahu se samozřejmě hodí i reverzní transkripce, i když se v důsledku jejího objevu dlouho diskutovalo o nutnosti reformulace dogmatu či o jeho potřebnosti vůbec. Je v něm však dobře zachycena právě intermediární úloha RNA v přenosu informace, ale i ve funkčním vztahu jak k DNA, tak k proteinům.

Obecný význam dogmatu spočívá ve zdůvodnění nemožnosti uplatnění lamarckovského mechanismu evoluce, tedy fixace dědičnosti získaných vloh. V tomto smyslu, např. při uvažování o účasti RNA v již zmiňovaném molekulárním mechanismu paramutace či podobných geneticky záhadných procesů, se budeme se zpochybňováním další platnosti, účelnosti a potřebnosti ústředního dogmatu setkávat i v budoucnu.

„Nové“ vlastnosti a funkce RNA během vývoje moderní biologie

Tuto závěrečnou kapitolu věnujeme jen obecnému výčtu některých procesů, případně jejich mechanismů, kterých se RNA účastní a které rozšiřují a upřesňují její hlavní funkce intermediárního nosiče genetické informace a realizátora genetického kódu. Často jsou takové funkce spojovány s objevem molekul RNA, které patří do nové,

4. skupiny typů RNA (vzhledem k jejich členění na 1. rRNA, 2. mRNA a 3. tRNA), tzv. malých nekódujících RNA vyskytujících se ve všech částech eukaryotické buňky. Mnohdy tyto RNA připomínají svou činností obecné funkce zajišťované výhradně proteinovými molekulami, funkce strukturální (stavební), katalytické (enzymové–ribozomové) a regulační (aktivační či represorové), které se staly základem pro hypotézu možné existence evolučního období RNA světa. Mechanismus těchto funkcí je většinou závislý na specifickém sekvencím uspořádání polynukleotidů a jejich jedinečné, vzájemně komplementární, konformační interakci, někdy ovlivňované vazbou nízkomolekulárních nebo proteinových molekul, které se však cílové reakce přímo nemusí účastnit.

Na úrovni rRNA, dlouhou dobu považované výhradně za molekulu se strukturální funkcí umožňující „samospřádání“ ribozomu ze směsi odpovídajících rRNA a proteinových podjednotek, byly odhaleny katalytické funkce aktivního centra enzymu peptidyltransferázy (ve 23S rRNA — realizující tvorbu peptidové vazby v syntetizovaném proteinu), ale i samovyštěpující transferifikační reakce jednoho typu intronů GI, kteréžto aktivity náležejí ribozymům (tj. již zmíněným sekvencím RNA s enzymovou aktivitou, objeveným T. R. Cechem a S. Altmanem na začátku 80. let 20. stol.).

Rozličné typy RNA se díky mimořádné konformační flexibilitě svých molekul spoluúčastní mnoha dalších buněčných reakcí, ať již jako pomocné strukturální komponenty nebo katalyzátory. Klasickým případem je ribonukleoproteinová RNáza P, která se účastní úpravy primárních transkriptů obsahujících tRNA. Vlastní katalytickou funkci zde plní RNA složka enzymu, která je zařazována do kategorie tzv. malých samoštěpících ribozymů, spolu s RNA sekvencemi, které specifickým rozštěpením vlastní molekuly iniciují její replikaci u některých RNA virů a viroidů.

Příkladem úlohy RNA jako strukturální komponenty ribonukleoproteinového enzymu je telomeráza — enzym zajišťující obnovu průměrné délky konců chromozomů, telomer (Živa 2002, 6: 245). Proteinová část enzymu tu má katalytickou funkci reverzní transkriptázy a nezbytná RNA složka slouží jako specifická matrice pro doplňující syntézu tandemově repetitivních sekvencí DNA tvořících strukturu telomer.

Převážná většina sestřihových mechanismů při konečné úpravě mRNA, zajišťující vyštěpování nekódujících sekvencí genů — intronů, je zabezpečována na úrovni interakcí RNA–RNA jejich složitými strukturami s ribozymovými aktivitami. Sestřih probíhá na ribonukleoproteinových částicích (spliceosomech), jejichž hlavními složkami jsou malé jaderné snRNA (small nuclear RNA). Ribozymová funkce odpovídajících RNA interaktantů je tu zodpovědná za úpravu primárního transkriptu, spočívající v jeho podstatném zkrácení a reorganizaci na konečnou kódující sekvenci.

Zcela opačným případem je editace RNA objevená v 2. pol. 80. let. Jedním z typů editace (připomínající editiční úpravu rukopisu) nalezeným u mitochondrií některých prvků je úprava nefunkčního primárního transkriptu — kopie neúplného genu v DNA genomu (kryptogenu). Při této úpravě dochází ke vkládání značného počtu uridylových nukleotidů, takže se výrazně

prodlužuje původní produkt transkripce genu na funkční, smysluplnou mRNA. Mechanismus této inserce je závislý na komplementární interakci s průvodcovskými molekulami gRNA (guide RNA), které přesně určují sekvenční umístění vkládaných nukleotidů. Editace tu není výsledkem nějakých ribozymových aktivit RNA, i když se původně o takovém, zcela přijatelném mechanismu uvažovalo, ale intermediární ribonukleoproteinový komplex s gRNA (s funkcí spíše strukturální a regulační) zahrnuje a aktivuje enzymy, které celý průběh procesu katalyzují (ribonukleáza, terminální uridylyltransferáza, ligáza apod.).

Příkladem skutečné regulační funkce RNA, jejíž objevení spadá do nedávného období již 21. stol., může být schopnost některých mRNA vázat konečný nízkomolekulární produkt určité metabolické dráhy a vyvolanou konformační změnou (většinou v 5' nepřekládané části mRNA) buď aktivovat latentní ribozym samoštěpící mRNA (konkrétně zjištěno u regulace bakteriální syntézy glukosamin–6–fosfátu), nebo zablokovat rozhodující translační signály a tím příslušnou mRNA inaktivovat (bakteriální regulace s účastí S–adenosylmethioninu či thiaminpyrofosfátu jako aktivními ligandy). Zúčastněná mRNA přitom kóduje některý z klíčových enzymů biosyntézy metabolitu, který zmíněnou „zpětnou vazbou“, dosud připisovanou pouze proteinům, blokuje translaci. Podle nositele Nobelovy ceny za objev ribozymové aktivity T. R. Cecha dovede RNA reprimovat genovou expresi stejně účinně jako proteiny a pro buňku možná levněji.

RNA interference, již mnohokrát zmiňovaná, je jistě regulačním zásahem do specifické genové exprese, ale výsledné „umlčení genu“ štěpením mRNA ve formě dsRNA intermediátu s malou dvouvláknovou (small interfering) siRNA nebo mikrovRNA (připomínající delší siRNA s neúplnou komplementaritou k mRNA), není výsledkem působení ribozymu, ale proteinového enzymu, resp. konformační změny dsRNA.

Z několika uvedených příkladů funkčních projevů RNA jasně vyplývá, na čem je založena hypotéza světa RNA, kde RNA může sloužit jako nositel informace pro vlastní reprodukci a současně sama zajišťovat vlastní úpravu a reorganizaci pro zabezpečování různých funkcí bez účasti proteinů. Potvrzení existence tohoto období molekulární evoluce jako předchůdce současného světa proteinů a DNA však bude vyžadovat ještě značné úsilí a není záruka, že ho bude vůbec někdy dosaženo. V této souvislosti lze uvést zmínku o nedávné diskusi věnované nové obecné definici genu. Diskuse se dostala do téměř mrtvého bodu po výroku, že „genom je překvapivě plný překrývajících se transkriptů, což může znamenat, že informace je ovládána RNA“ (Nature 2006, 7092: 399–401). Značně volný a nepřesný návrh obecné definice by tak mohl znít: „gen je lokalizovaná oblast genomu odpovídající jednotce dědičnosti, která je spojována s regulačními oblastmi, transkribovanými oblastmi anebo s oblastmi jiné funkční sekvence“. Jakákoliv přesnější definice by se musela týkat již konkrétně specifikovaného genu kódujícího např. protein.

Tento závěr plně odpovídá i naší snaze postupně seznámit čtenáře s rozmanitou funkcí a úlohou RNA, o což se pokusíme v dalších příspěvcích.