

Áður óþekktar hvarfstöðvar í hamarshaussríbósíminu fundnar með aðstoð tvígildra sinkjóna

Snorri Þór Sigurðsson

Raunvísindastofnun Háskólans

Vefútgáfa: 16. ágúst 2004

Ágrip Hamarshaussríbósímið er RNA-sameind sem hvatar rof á annarri RNA-sameind. Við höfum uppgötvað tvo staði á ríbósíminu sjálfu þar sem RNA-sameindin rofnar í lausn sem inniheldur tvígildar sink-málmjónir, við fosfódíestera 5'-megin við A9 og U4. Lógaritmi hvarfhraðans við A9-hvarfstöðina sem fall af sýrustigi sýnir beina línu upp að pH 8,3, sem er í samræmi við hvarfgang þar sem sinkhýdroxíð hvatar rofið með því að taka prótónu frá 2'-hýdroxýlhópnum á G8. Samband hvarfhraða og sýrustigs fyrir U4-hvarfstöðina er mjög ólíkt A9-hvarfstöðinni og bendir til þess að lögun ríbósímsins breytist fyrir ofan pH 8,0. Ólíkt A9-hvarfstöðinni þar sem ýmsar tvígildar málmjónir hvötuðu RNA rofið, þá var sink eina málmjónin sem hvataði hvarfið við U4-hvarfstöðina. Þetta er fyrsta dæmi um RNA rof, hvatað af tvígildum málmjónum, sem á sér einungis stað í návist einnar tegundar málmjóna.

Inngangur

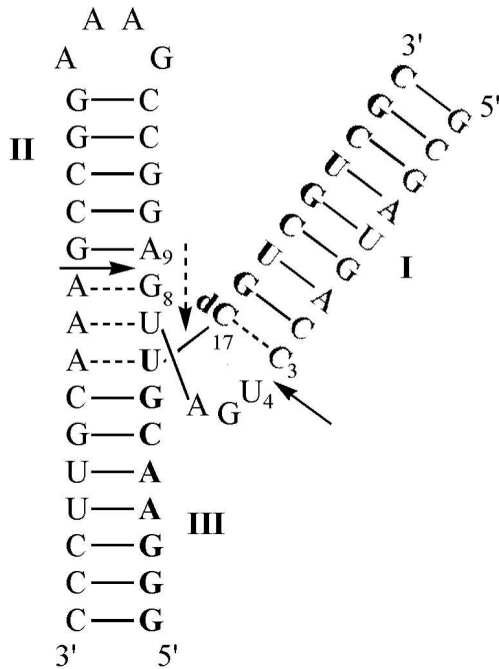
Árið 1989 fengu Dr. Thomas Cech og Dr. Sidney Altman Nóbelsverðlaunin í efnafræði fyrir uppgötvun sem þeir gerðu samtímis sjö árum áður. Þeir sýndu svo ekki varð um villst að RNA getur hvatað efnahvörf án aðstoðar próteina og sönnuðu þar með að prótein eru ekki einu sameindirnar sem hvata efnahvörf í lífverum [1,2]. Á sl. 20 árum hefur fjöldi slíkra RNA-hvata, sem kallaðir eru ríbósím, fundist víða í náttúrunni og uppi hafa verið getgátur um að mikilvæg hvörf innan heilkjörnungsfruma séu hvötuð af ríbósímunum. Til dæmis hefur verið deilt um það lengi hvort hvort RNA- eða prótein-hluti ríbósómsins, sem er stór komplex RNA og próteina sem sér um smíði próteina, hvati myndun peptíðtengja í próteinsmíðinni. Þegar kristalbygging stærri hluta ríbósómsins var leyst fyrir um fjórum árum kom í ljós að engin prótein-sameind var nálægt hvarfstöðinni og sýndi því greinilega að ríbósímið er ríbósím [3].

Tilvist ríbósíma hefur m.a. varpað nýju ljósi á kenningar um upphaf lífsins og aðhyllast nú margir þá kenningu að RNA hafi gegnt lykilhlutverki í þróun lífsins. Kenningin um RNA-heim vísar til þeirrar tilgátu að samspil DNA, RNA og próteina eins og við þekkjum í dag hafi þróast frá heimi þar sem RNA réði ríkjum [4]. Í þeim heimi hafa RNA-sameindirnar getað gegnt hlutverki bæði DNA

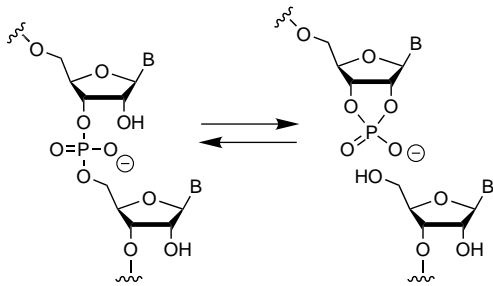
og próteina þar sem RNA inniheldur erfðafræðilegar upplýsingar og getur einnig hvatað efnahvörf. Á seinni hluta þessa tímaskeiðs lífsins komu fram peptíð og prótein sem myndað gátu starfhæfa komplexa með RNA, eins og t.d. ríbósímið. Síðan hafa prótein smám saman tekið að sér hlutverk hvata, enda eru þau betur til þess fallin en RNA vegna fjölda virknihöpa. Að lokum kom DNA fram á sjónarsviðið sem hent hefur betur til geymslu erfðaupp lýsinga [5].

Hamarshaussríbósímið (mynd 1) er RNA-sameind sem leikur lykilhlutverk í afritunarferli genamengis margra plöntuvírusa [6]. Nafn sitt dregur ríbósímið af tvívíddarlögun sinni eins hún var lengi vel teiknuð, en mynd 1 er tvívíddarbygging sem lýsir þrívíddarlögun ríbósímsins skv. kristalgreiningu. Við afritun á hringlaga genum vírusanna myndast langur RNA-þáttur sem síðan er klipptur í smærri búta fyrir tilstilli hamarshaussríbósímsins sem er hluti af basaröð genamengisins. Hvarfið sem ríbósímið hvatar hefur mikið verið rannsakað og hefur verið sýnt fram á að hvarfgangurinn byggist á árás hýdroxýlhópsins í 2'-stöðunni á aðlægt fosfódíestertengi (mynd 2). Afleiðing þessarrar fosfómestrunar er rof RNA-sameindarinnar og myndun 2',3'-hringlaga fosfódíesters á öðrum endanum og 5'-hýdroxýlhóps á hinum endanum.

Sýnt hefur verið fram á mikilvægi tvígildra málmjóna í hvarfgangi hamarshaussríbósímsins, sér



Mynd 1. Tvívíddarbygging HH16 hamarshaussríbósímsins tengdu hvarfefni (feitletrað) sem ekki getur hvarfast vegna tilvistar 2'-deoxykernis í stöðu 17. Heilu örvarnar sýna sinkhvarfstöðvannar tvær sem lýst er í þessari grein. Brotna örin sýnir hvar hvarfefnið er rofið þegar ríbókirni er í stöðu 17. Rómverskar tölur tilgreina arma ríbósímsins.



Mynd 2. Hvarfgangur fyrir rof RNA-hvarfefnis hvötudu af hamarshaussríbósíminu. Sink-hvötuduðum hvörfum í stöðu U4 og A9 á ríbósíminu er einnig unnt að lýsa með þessum hvarfgangi.

í lagi magnesíumjóna [7]. Þó að nokkrar tvígildar málmjónir hafi fundist í kristalbyggingu ríbósímsins er ekki enn fyllilega ljóst hvert hlutverk þeirra er [8]. Sú málmbindistöð sem er best þekkt í hamarshaussríbósíminu er við A9/G10.1, þar sem málmjónin binst N7 atómi G10.1 og *pro-R_P* súrefni A9 fosfatsins. Við sýnum hér að þegar sinkmálmjón binst í þessa stöðu, þá hvatar hún rof á fosfódíestertenginu sem er á milli G8 og A9 [9]. Meðan rannsóknir

á eiginleikum þessarar hvarfstöðvar stóðu yfir, upp-götvuðum við sink-hvatað rof á fosfódíesternum á milli C3 og U4 [10]. U4-hvarfstöðin hefur mjög óvenjulega eiginleika. Til dæmis er þetta er eina þekkt RNA-hvarfstöðin þar sem rof á sér einungis stað í viðurvist sinkjóna.

Niðurstöður og umræða

Staðsetning sink-hvarfstöðva

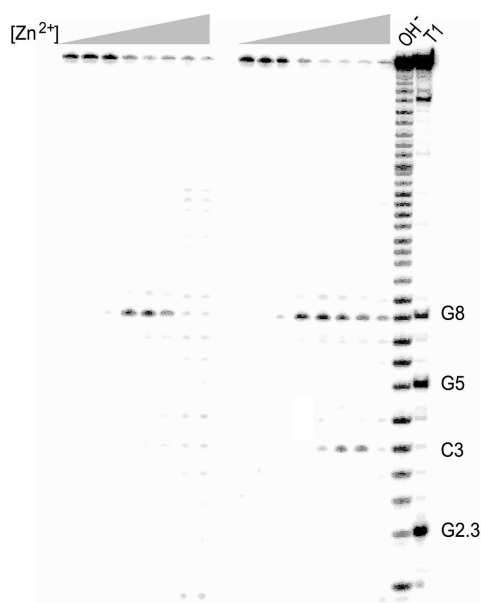
Notað var þekkt hamarshaussríbósím sem nefnt er HH16 [11] vegna þess að armar I og III sem myndast við tengingu RNA-hvarfefnisins við ríbósímið eru samanlagt 16 basapara langir (mynd 1). RNA-hvarfefnið sem notað var innihélt 2'-deoxykerni í stöðu 17 svo að RNA-hvarfefnið mundi ekki rofna í athugunum okkar á hvarfstöðvum í ríbósíminu sjálfu. Hamarshaussríbósímið var leyst upp í hvarflausnum sem innihéldu mismunandi styrk sinkjóna. Mynd 3 sýnir eðlissviptandi pólýakrylamíðhlaup eftir rafdrátt sýnanna. Tvö meginmyndefni sjást greinilega. Staðsetning hvarfstöðvanna var ákvörðuð með samanburði við RNA "stigann", sem fæst með því að hita hamarshaussríbósímið um stutta stund í basískri lausn, og sýni sem hvörfuð voru við RNasa T1 sem klýfur RNA-sameindir við G kirmi. Önnur hvarfstöðin er á milli G8 og A9 og hin er á milli C3 og U4. Við 50 μ M sinkstyrk myndast einungis A9-myndefnið og mest myndast af U4-myndefninu við 500 μ M sinkstyrk. Við hærri styrk sinkjóna minnka heimtur U4- og A9-myndefnanna vegna þess að allir fosfódíesterar ríbósímsins taka að rofna.

Til þess að fá nánari vitneskju um áhrif þrívíddarbyggingar ríbósímsins á sinkhvatað rof þess var ofangreind tilraun framkvæmd í viðurvist (mynd 3, hægri hluti) eða án (mynd 3, vinstri hluti) RNA-hvarfefnisins. Ljóst er að hvarf milli C3 og U4 á sér ekki stað nema ríbósímið sé tengt RNA-hvarfefninu. Aftur á móti hefur RNA-hvarfefnið ekki áhrif á myndun A9.

Myndun A9- og U4-hvarfefna sem fall af tíma

A9-myndefnið var alltaf til staðar þegar hvarf varð við U4 og því var mögulegt að U4-myndefnið myndaðist einungist eftir rof við A9. Til þess að rannsaka þetta nánar var ríbósím-hvarfefniskomplexinn hvarfaður í viðurvist sinkjóna og heimtur U4- og A9-myndefnanna ákvarðaður sem fall af tíma (mynd 4) Athyglisvert var að U4-myndefnið jókst jafnt og þétt en A9-myndefnið náði hámarki eftir 10 klst. og minnkaði síðan eftir því sem á hvarfið leið. Einnig er ljóst að U4-myndefnið

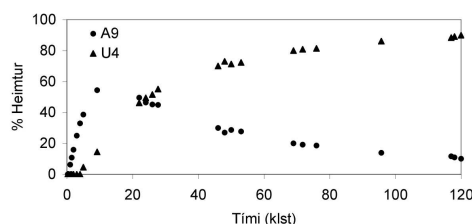
byrjar ekki að myndast fyrr en u. þ. b. 40% af ríbósíminu hafði hvarfast (eftir 5 klst. hvarftíma). Þessar niðurstöður benda til þess að U4-myndefnið myndast úr A9-hvarfefninu í stað þess að myndast úr óklofnu ríbósíminu. Einnig má nefna til frekari stuðnings að ekkert af greinanlegu U4-myndefni sást þegar ríbósím sem inniheldur 2'-OMe hóp í stað 2'-OH hóps á G8 (sem gerir það að verkum að ekkert myndast af A9-myndefninu) var hvarfað við sömu aðstæður.



Mynd 3. Greining sink-hvataðra hvarfa í hamarshaussríbósíminu með eðlissviptandi pólýakrylamíð hlaupi. Ríbósím sem inniheldur 5'-³²P-merki var leyst upp í hvarflausn sem innihélt sinkasetat og látið standa í 24 klst. við 37 °C og sýrustig 8,6 án (vinstri hluti) og með (hægri hluti) ókljúfanlegu hvarfefni. Sinkasetat styrkurinn var 0, 1, 10, 50, 100, 200, 500 og 1000 μM, frá vinstri til hægri í hvorri tilraun fyrir sig. "OH⁻" gefur til kynna takmarkað vatnsrof fyrir 5'-³²P-merkta ríbósímið (vatnsrof á einum fosfódiester í ríbósíminu á sér stað í öllum stöðum þess; hvert þrep í stiganum samsvarar einum fosfódiester). "T1" gefur til kynna samskonar stiga sem fæst með hvarfi við T1 RNasa sem klýfur við G-kirnin.

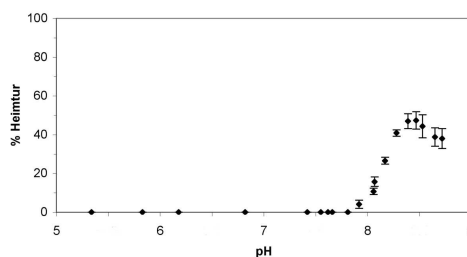
Samband hvarfhraða og sýrustigs

Sýnt hefur verið fram á línulegt samband milli lógaritma hvarfhraða hvarfefnis hamarshaussríbósímsins og sýrustigs á bilinu pH 6-8,3 [12]. Slíkt samband bendir til þess að afprótónun eigi sér stað í hraðatakmarkandi skrefi hvarfsins. Samskonar samband kom í ljós fyrir A9-hvarfstöðina [9] en aftur



Mynd 4. Heimtur sink-hvataðs hvarfs hamarshaussríbósímsins við 37 °C og sýrustig 8,6 sem fall af tíma við A9 (hringir) eða U4 (þríhyrningar).

á móti hafði U4-hvarfstöðin mjög óvenjulegt samband milli hraða hvarfsins og sýrustigs; ekkert U4-myndefni myndast ef sýrustig lausnarinnar er fyrir neðan 7,7 (mynd 5). Það er ekki fyrr en sýrustigið er orðið 7,9 að U4-myndefnið sést og síðan aukast heimtur þess ört þar til hámarki er náð við sýrustigið 8,5. Ein hugsanleg skýring á þessu óvenjulega sambandi sýrustigs og hvarfhraða er sú að ríbósímið breyti um lögun við hærra sýrustig. Þessi skýring er ekki ólíkleg þegar haft er í huga að breyting á lögun ríbósímsins hefur sést með kristalgreiningu [13]. Sú breyting átti sér einnig stað við sýrustigið 8,5. Engin tvígild málmjón hefur sést nálægt U4-hvarfstöðinni í þeim kristalmyndum sem til eru af hamarshaussríbósíminu og því er ekki ólíklegt að lögun þess þurfi að breytast til þess að geta bundið málmjón(ir). Frekari sönnun fyrir breytingu á lögun ríbósímsins er sú að fyrst verður hvarfið við A9-hvarfstöðina að eiga sér stað. Það skal samt bent á það að ekki er hægt að tengja niðurstöðurnar um breytingu á þrívíddarlögun úr kristalgreiningunni við okkar niðurstöður því að í okkar tilfelli verður A9 að hvarfast fyrst. Þrátt fyrir það er rofið við U4 tengt þrívíddarbyggingu ríbósímsins þar sem ríbósímið verður að vera bundið RNA-hvarfefninu til þess að ríbósímið klofni við U4 (mynd 3).



Mynd 5. Samband sýrustigs og heimta U4-myndefnisins eftir 24 klst. hvarf við 37 °C.

Sérvirgni tvígilda málmjóna

Til þess að athuga hvort tvígildar málmjónir, aðrar en sink, hvötuðu rof við U4 og A9 var virkni 11 algengra tvígilda málmjóna ákvörðuð (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} og Pb^{2+}). Fyrir A9-rannsóknina voru hvörfin framkvæmd við frekar lágan styrk málmjóna ($20 \mu M$) og heimturnar ákvarðaðar eftir 24 klst. hvarftíma. Fyrir A9 var örlítill virkni í viðurvist magnesíum (2%) og aðeins meiri fyrir mangan (8%), kóbalt (11%), nikk-el (14%), kadmíum (8%) og blý (7%) en mestar heimturnar fengust í sink-hvataða hvarfinu (58%).

Fyrir U4-málmjónarannsóknina var byrjað á því að mynda A9-myndefnið við lágan sinkstyrk ($20 \mu M$) en við þessar aðstæður myndast ekkert af U4-myndefninu. Síðan voru sinkjónirnar bundnar við EDTA og lausnum sem innihéldu ofangreindar tvígildar málmjónir bætt í þannig að lokastyrkur málmjónanna var $200 \mu M$. Eftir 24 klst. voru heimtur U4-myndefnisins ákvarðaðar og kom í ljós að U4 myndast einungis í viðurvist sinkjóna (37%). Þetta er mjög óvenjulegt því að allar sambærilegar hvarfstöðvar í RNA geta nýtt fleiri en eina tvígilda málmjón. Nokkrar ástæður geta verið fyrir hárrí virkni sinkjóna. Í fyrsta lagi er sink hörð Lewis sýra og binst því vel hörðum bösum eins og N og O atómum sem eru til staðar í RNA. Í öðru lagi hefur sink frekar lítinn jónaradíus og kýs helst fjórflötungsbyggingu. Annar eða báðir þessir þættir gætu gert sinki kleift að bindast stað í ríbósíminu sem að öllu jöfnu binst ekki málmjónum. Að lokum má einnig nefna að vatnskomplex sinks hefur frekar lágt sýrustig (9,0) sem er töluvert lægra en fyrir flestar aðrar málmjónir [14] og á því auðveldara með að hvata hvarfið sem almennur basi.

Niðurlag

Við höfum sýnt fram á tilvist tveggja hvarfstöðva í hamarshaussríbósíminu þar sem RNA-þátturinn rofnar í viðurvist sinkjóna. U4-hvarfstöðin hefur óvenjulega eiginleika, sérstaklega með tilliti til sambands hvarfhræða og sýrustigs, svo og að hvarfið á sér einungis stað í viðurvist sink-jóna. Sú staðreynd að RNA-sameindin þarf að rofna við A9 áður en hvarfið við U4 á sér stað sýnir fram á tilvist náttúrulegs stýriferils hjá RNA hvötum. Þó að stýrilnæm ríbósím hafi verið hönnuð eða valin þannig að virkni þeirra stýrist af einföldum sameindum [15, 16], RNA-þáttum [17] eða próteinum [18, 19], hafa engin slík kerfi fundist í náttúrunni. Rof hamarshaussríbósímsins við A9 og U4 er að okkar vitneskju fyrsta dæmið um samhangandi röð umestrunarhrvarfa í ríbósímunum sem leiða til rofs RNA og sýn-

ir glögg að RNA gæti hafa notað slík stýrilferli í RNA-heimi, snemma á þróunarferli lífsins.

Þakkaorð

Höfundur þakkar samstarfsaðilum sínum, Dr. Frederic Godde, John Markley og Emily Borda fyrir þátt þeirra í rannsóknunum, Baldri Braga Sigurdssyni fyrir haldgóðar ábendingar varðandi ritun greinarinnar og National Institutes of Health (GM56947) fyrir fjárhagslegan stuðning.

Summary: The hammerhead ribozyme is an RNA molecule that catalyzes a site-specific cleavage of an RNA substrate. We have discovered two Zn^{2+} -dependent cleavage sites in the ribozyme itself. Cleavage was observed at phosphates 5' to A9 and U4 in the ribozyme strand of the ribozyme. The Zn^{2+} -mediated cleavage at A9 shows a log-linear rate dependence up to pH 8.3, which is consistent with a cleavage mechanism that involves abstraction of a proton from the 2'-hydroxyl group of G8 by zinc hydroxide. The pH-profile of U4 cleavage is very different and suggests that a pH-dependent conformational change takes place above pH 8.0. In contrast to the metal ion dependence observed with the A9 cleavage, Zn^{2+} was the only divalent metal ion tested that was able to catalyze cleavage at U4. This is the first example of an RNA cleavage catalyzed by divalent metal ions that is specific for a single metal ion.

Heimildir

- [1] K. Kruger, P. J. Grabowski, A. J. Zaugg, J. Sands, D. E. Gottschling, and T. R. Cech, *Cell* **31** (1982) 147.
- [2] C. Guerrier-Takada, K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace, and S. Altman, *Cell* **35** (1983) 849.
- [3] N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore, and T. A. Steitz, *Science* **289** (2000) 905.
- [4] T. R. Cech, *Gene* **135** (1993) 33.
- [5] J. Stubbe, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10** (2000) 731.
- [6] S. T. Sigurdsson, J. B. Thomson, and F. Eckstein, in: *Small ribozymes*, Cold Spring Harbor, New York, 1998.
- [7] S. C. Dahm and O. C. Uhlenbeck, *Biochemistry* **30** (1991) 9464.
- [8] J. B. Murray, H. Szoke, A. Szoke, and W. G. Scott, *Mol. Cell* **5** (2000) 279.
- [9] J. C. Markley, F. Godde, and S. T. Sigurdsson, *Biochemistry* **40** (2001) 13849.
- [10] E. J. Borda, J. C. Markley, and S. T. Sigurdsson, *Nucleic Acids Res.* **31** (2003) 2595.
- [11] K. J. Hertel, D. Herschlag, and O. C. Uhlenbeck, *Biochemistry* **33** (1994) 3374.
- [12] S. C. Dahm, W. B. Derrick, and O. C. Uhlenbeck, *Biochemistry* **32** (1993) 13040.
- [13] J. B. Murray, C. M. Dunham, and W. G. Scott, *J. Mol. Biol.* **315** (2002) 121.
- [14] J. Burgess, *Metal ions in solution*, Ellis Horwood Limited, Sussex, U.K., (1978).

- [15] N. Piganeau, A. Jenne, V. Thuillier, and M. Famulok, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **39** (2000) 4369.
- [16] G. A. Soukup, G. A. M. Emilsson, and R. R. Breaker, *J. Mol. Biol.* **298** (2000) 623.
- [17] D. H. Burke, N. D. S. Ozerova, and M. Nilsen-Hamilton, *Biochemistry* **41** (2002) 6588.
- [18] N. K. Vaish, F. Dong, L. Andrews, R. E. Schweppe, N. G. Ahn, L. Blatt, and S. D. Seiwert, *Nat. Biotechnol.* **20** (2002) 810.
- [19] D. Y. Wang and D. Sen, Combinatorial Chemistry and High Throughput, *Screening* **5** (2002) 301.

Um höfundinn: Snorri Þór Sigurðsson er prófessor í lífrænni efnafræði við Háskóla Íslands.

Raunvísindastofnun Háskólans,
Dunhaga 3,
107 Reykjavík
snorrisi@hi.is
Móttékin: 3. febrúar 2004

