



Snorri Þór Sigurðsson

RNA ensím:

Ríbósím

Snorri Þór Sigurðsson er fæddur 14. nóvember 1963. Hann kláraði B.S. próf í efnafræði frá HÍ 1987 og doktorspróf í lífrænni efnafræði árið 1993 frá University of Washington í Seattle. Árin 1994-1996 starfaði hann við rannsóknir við Max-Planck Stofnunina í Þýskalandi. Frá 1996 hefur hann gegnt stöðu „Research Assistant Professor“ við University of Washington.

Þegar saga vísindanna er skoðuð, kemur í ljós að stöku sinnum eru gerðar uppgötvanir sem valda breytingum á kenningarkerfi vísindanna.

Árið 1989 fengu Dr. Thomas Cech og Dr. Sidney Altman Nóbelsverðlaunin í efnafræði fyrir eina slíka uppgötvun, sem þeir gerðu samtímis sjö árum áður. Þeir sýndu að RNA getur hvatað efnahvörf án aðstoðar próteina og sönnuðu þar með að prótein væru ekki einu sameindirnar sem hvötuðu efnahvörf í lífverum. Hefur þessi uppgötvun m.a. varpað nýju ljósi á kenningar um upphaf lífsins og aðhyllast nú margir þá kenningu að RNA hafi gegnt lykilhlutverki í þróun lífsins. RNA-sameindir innihalda erfðafræðilegar upplýsingar og þar sem þær geta einnig hvatað efnahvörf er ekki ólíklegt að samspil DNA, RNA og próteina í lífverum hafi þróast frá "RNA-heimi".¹

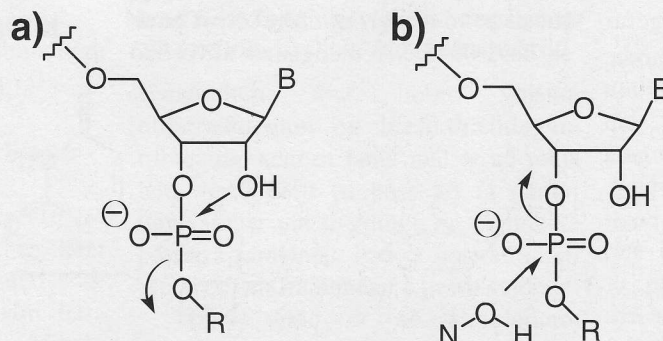
Uppgötvun ríbósíma hefur breytt hugmyndum okkar um upphaf lífsins og uppgötvun þeirra hefur einnig hagnýtt gildi. Þar sem ríbósím geta klofið og tengt saman RNA sameindir, eins

og nánar verður komið að á eftir, hefur opnast sá möguleiki að nota ríbósím í genalækningum (gene therapy).² Til dæmis er hægt að nota ríbósím til þess að kljúfa mRNA sem annars myndi leiða til framleiðslu próteins sem skaðlegt væri viðkomandi frumu. Enn vænlegri kostur er að nota ríbósím til þess að lagfæra mRNA: Sá hluti mRNA-sameindarinnar sem er "skaddaður" er klipptur af og æskilegum hluta skeytt við í staðinn.³ Einnig er unnt að nota ríbósím til þess að kljúfa genamengi RNA-vírusa, t.d. genamengi HIV veirunnar.⁴ Þrátt fyrir að ríbósím séu nú í klínískum prófunum, standa enn nokkrir steinar í vegi fyrir viðtækri notkun ríbósíma í genalækningum. Sem dæmi má nefna að ekki er auðvelt að koma ríbósímum inn í frumur, auk þess sem RNA er ekki mjög stöðugt í frumunni vegna RNA-niðurbrotsferla sem þar eru fyrir hendi. Þrátt fyrir þessi vandkvæði þykir notkun ríbósíma í genalækningum álitlegur kostur og er miklu fé varið til þeirra rannsókna, bæði af opinberum stofnunum og líftæknifyrirtækjum.

Í þessu pistilkorni fjalla ég stuttlega um hvataeiginleika RNA. Greint verður frá helstu efnahvörfum sem RNA hvatar og lýst verður slembiaðferð (combinatorial approach) sem mikið hefur verið notuð til þess að finna RNA með nýja hvataeiginleika.

2. Efnahvörf sem ríbósím hvata í náttúrunni

Þau ríbósím sem fundist hafa í



Mynd 1. Umestrun og vatnsrof RNA, hvatað af ríbósímum.

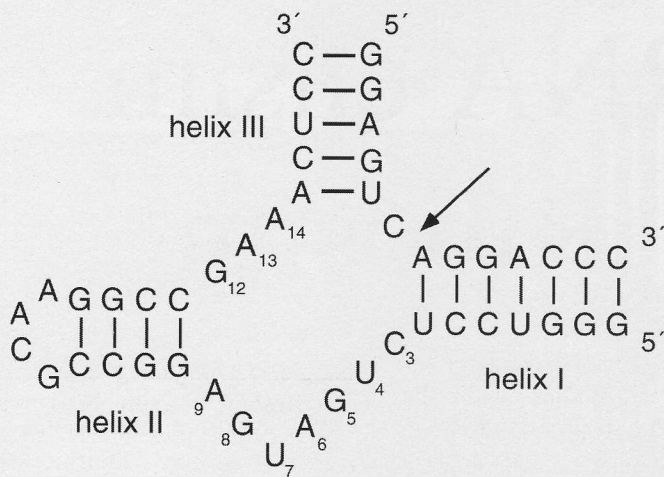
náttúrunni hvata vatnsrof eða umestrun á fosfodiester tengjum í kjarnsýrum (mynd 1). Nánar tiltekið hjálpa þau til við verkun RNA (RNA processing) og eru að finna í sumum dreifkjörnungum, heilkjörnungum og veirum. Kjarnsækni hópurinn, sem tekur þátt í rofi fosfódíester tengisins, er annað hvort tengdur RNA sameindinni sem rofin er (t.d. 2'-OH hópurinn í flokki smárra ríbósíma, mynd 1a) eða utanaðkomandi sameind (t. d. vatn eða nukleósíð hjálparþáttur (cofactor), mynd 1b).

Eitt dæmi um ríbósím er sýnt á mynd 2. Þetta er

RNA getur hvatað efnahvörf án aðstoðar próteina

h a m a r s h a u s - ríbósímið sem dregur nafnið af tvívíddarlögun sinni. Ríbósímið sjálft er einungis 34 nukleótíða langt og binst hvarfefninu, sem er hér sýnt sem 12 nukleótíða löng RNA sameind og myndar við það helixa I og III. Ríbósímið hvatar rof fosfódíester tengisins, sem örin bendir á. Hægt er að breyta lengd helixa I og III án þess að hafa áhrif á virkni ríbósímsins. Aftur á móti er nauðsynlegt að hafa stutta helixa eins og sýnt er á mynd 2 ef ríbósímið á að geta hvatað hvarfið oftar en einu sinni (multiple turnover). Ef helixar I og/ eða III eru lengri, losna myndefnin ekki og því getur ríbósímið ekki bundist annarri sameind af hvarfefninu.

Vert er að geta þess að öll náttúruleg ríbósím nota hjálparþætti, sem yfirleitt eru tvígildar málmjónir, t. d. Mg²⁺. Málmjónirnar gegna tveimur hlutverkum. Í fyrsta lagi eru þær nauðsynlegar til þess að RNA sameindin geti myndað þá þrívíddarbyggingu sem hvatar hvarfið. RNA er poly-anjón og minnka jákvæðu málmjónirnar Coulombs fráhrindikraftana, sem komið geta í veg fyrir að ríbósímið geti mótast (folding). Í öðru lagi geta málmjónirnar tekið beinan þátt í hvötn



Mynd 2. Hamarshaus ríbósímið. Örin synir hvar RNA hvarfefnið er klofið. Hvarfgangurinn er sýndur í mynd 1a).

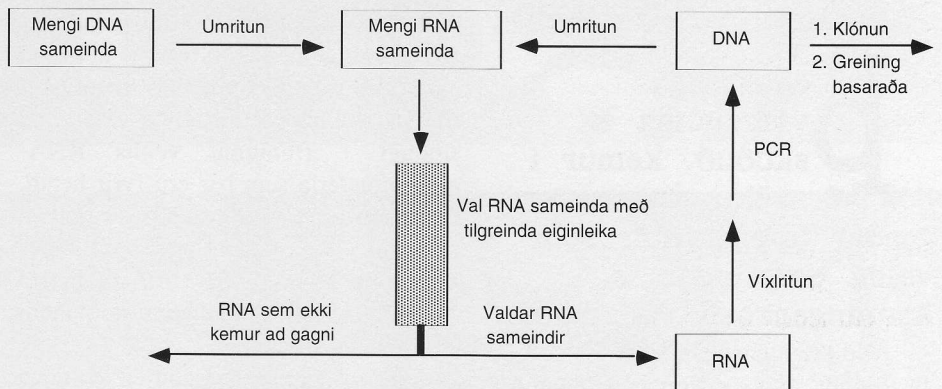
efnahvarfsins sem Lewis sýra (virkjar farhópin) eða Lewis basi (málmjóna hýdroxíðið virkjar kjarnsækna hópin).

3. Leit að nýjum ríbósímum með aðstod SELEX

Þar sem náttúrulegu ríbósímmin hvata einungis vatnsrof og umestrun á fosfódfesterum, vaknar sú spurning hvort ríbósím geti hvatað önnur hvörf. Þróaðar hafa verið aðferðir til þess að leita að RNA sameindum sem hvata önnur hvörf. Best hefur reynst slembiaðferð (combinatorial approach) sem kölluð er SELEX „Systematic Evolution of Ligands with Exponential Enrichment“, sem í hnotskurn notar stórt mengi RNA sameinda með mismunandi basaröðum.⁵ Þær sameindir sem hafa þann eiginleika sem sóst er eftir eru valdar úr og greindar. Hefur þessi aðferð stundum verið kolluð þróun í tilraunaglassi, (evolution in a test tube).

SELEX aðferðinni er lýst á mynd 3. Fyrst er mengi DNA-sameinda búið til með efnasmíði. Allar DNA sameindirnar hafa prímer svæði á endunum, stýril-svæði (promoter) fyrir RNA pólýmerasa auk handahófskenndrar basaraða. Með RNA pólýmerasa er hægt að umrita DNA sameindirnar yfir á RNA sem gefur mengi u.þ.b. 10^{14} ólíkra sameinda. Lykillinn að árangursríkri leit að nýjum hvötum liggur í næsta skrefi þar sem RNA sameindirnar, sem hvatað geta hvarfið, eru „veiddar úr“ RNA súpunni. Algengasta aferðin er að láta þessi ríbósím hvata efnahvarf á sjálfu sér, þannig að smærri sameind, sem er „merki“, er tengt ríbósíminu. Síðan eru merktu RNA sameindirnar (ríbósím) skildar frá RNA sameindunum sem ekki

geta hvatað þetta hvarf. Biotin sameindin er vinsælt merki sem auðvelt er að aðskilja með því að binda það við streptavidínsúlu. Eftir að ríbósímmin hafa verið einangruð eru þau umrituð yfir á DNA með notkun víxlrita (reverse



Mynd 3. SELEX aðferðin.

transcriptase) og síðan eru sameindirnar margfaldaðar með PCR (Polymerase Chain Reaction).

Þessi fyrsti hringur í SELEX ferlinu skilar DNA, sem hægt er að afrita yfir á nýtt mengi RNA sameinda, er inniheldur hlutfallslega meira af ríbósímum en upphaflega mengið. Þetta ferli er síðan endurtekið þar til a.m.k. 40-60% af RNA blöndunni sýna þá hvatavirkni sem sóst er eftir. Yfirleitt þarf að fara 6-18 hringi þar til þeim árangri er náð. Að því búnu er basaröð DNA mengisins ákvörðuð

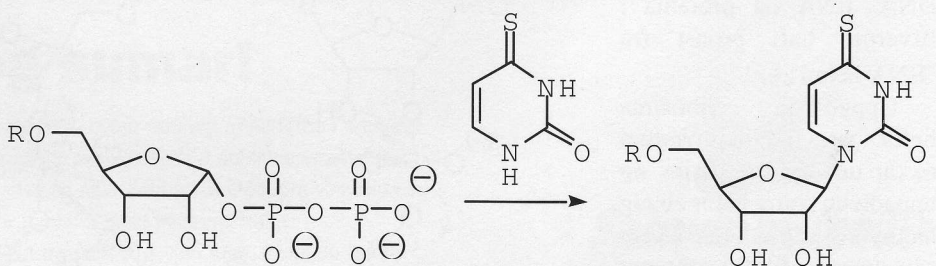
(sem þar með gefur basaröð ríbósímanna). Oft finnast ríbósím sem hafa mjög ólíka basaröð en eiga það sameiginlegt að geta hvatað sama hvarfið. Eftir að SELEX ferlinu er lokið taka við rannsóknir á byggingu og eiginleikum ríbósímanna.

4. RNA hvatar sem fundist hafa með SELEX aðferðinni

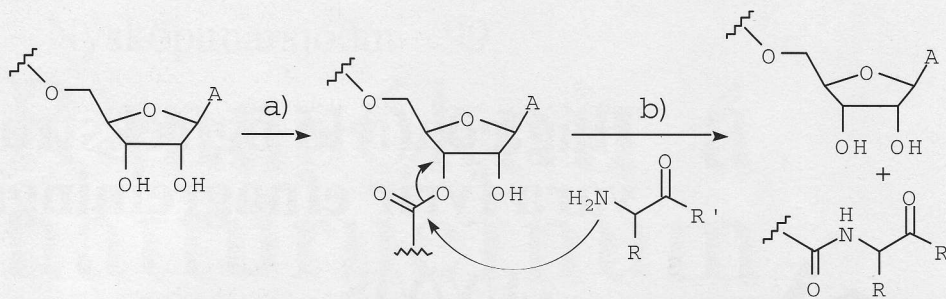
Ef sú tilgáta að lífið hafi þróast frá „RNA-heimi“ er rétt, er líklegt að RNA hafi einnig hvatað önnur hvörf en þau sem nefnd hafa verið að framan. Því hefur mikið starf verið unnið í þeim tilgangi að finna RNA hvata, sem líklegt þykir að hafi verið til í heimi án DNA og próteina. Serstaklega ber að nefna ríbósím er hvatað hafa kjarnsýruhvörf, sem nauðsynleg hafa verið fyrir afritun á RNA (replication). Einnig er ljóst að RNA hefur hvatað myndun peptíða og próteina, a.m.k. á því tímabili þegar próteinin byrjuðu að ryðja sér til rúms. Merki þess má sjá enn í dag því RNA gegnir enn sem fyrr lykilhlutverki í

framleiðslu próteina í frumum okkar. Próteinframleiðslan fer fram í stóru RNA-prótein-komplexi (ribosome), upplýsingarnar eru á formi mRNA (messenger RNA), og amínósýrurnar eru færðar til próteinsmíðar með tRNA (transfer RNA). Nokkur dæmi verða tekin um ríbósím sem fundist hafa með SELEX aðferðinni en hafa ber í huga að þetta er ekki tæmandi listi.

Ríbósím sem hvata kjarnsýruhvörf.



Mynd 4. Ríbósím-hvötuð myndun nukleotíðsins 4-thio uridín (R = fosfat).



Mynd 5. Efnasmíði próteina. a) Tenging aminosýru við RNA. b) Myndun peptíðtengis.

Auk þeirra náttúrulegu hvarfa sem RNA hvatar, hafa einnig fundist RNA hvatar sem eru lígasar (geta tengt tvo kjarnsýrustrendinga saman) eða kínasar⁷ (hvata flutning fosfats). Einnig má nefna ríbósím sem hvatar myndun núkleótíða, byggingareininga kjarnsýra (mynd 4).⁸ Síðast en ekki síst, hefur verið fundið ríbósím sem hvatar myndun stuttra kjarnsýrustrendinga og gæti því verið forveri pólýmerasa.⁹

Ríbósím til framleiðslu próteina.

Eins og minnst var á að ofan, flytur tRNA aminosýrurnar til ríbósómsins þar sem próteinframleiðsla frumunnar fer fram. Á okkar tímum eru það ensím sem hvata tengingu aminosýranna við tRNA sameindirnar. SELEX aðferðin hefur verið notuð til þess að finna ríbósím sem hvatað getur þetta hvarf (mynd 5a).¹¹ Næsta skref í smíði próteina er myndun peptíðtengis og fundist hafa ríbósím sem hvatað geta þetta hvarf (mynd 5b).¹⁰ Þessi ríbósím geta ekki myndað peptíð sem eru lengri en tvær aminosýrur, en sýnir samt að RNA getur hvatað þetta lykilhvarf í framleiðslu próteina.

Ýmis önnur ríbósím.

Einnig hafa fundist ríbósím sem hvata ísomerun¹² og tengingu málmjóna við porfirín sameind (mynd 6a).¹³ Ensím sem hvata sambærileg hvörf gegna lykilhlutverkum í lífríki nútímans. Síðast en ekki síst má nefna ríbósím sem hvatar Diels-Alder efnahvarfið, sem mikið er notað í hefðbundnum lífrænum efnasmíðum (mynd 6b).¹⁴

5. Lokaorð og framtíðarhorfur

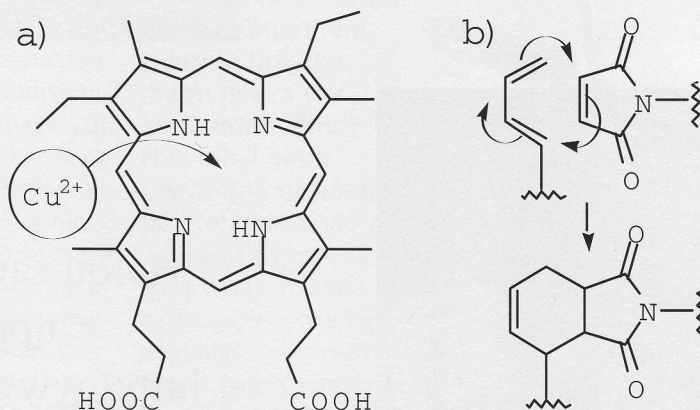
Á þeim 15 árum sem liðin eru frá uppgötvun ríbósíma hefur þekking okkar á þessum kjarnsýruhvötum aukist til muna. Fleiri náttúruleg ríbósím hafa fundist, auk þess sem SELEX aðferðin hefur hjálpað til við að finna á annan tug

mismunandi ríbósíma, sem hvatað geta hin ýmsu efnahvörf. Renna þessar rannsóknir frekari stöðum undir þá kenningu að lífið hafi þróast frá RNA-heimi. Telja verður líklegt að enn fleiri ríbósím verði uppgötvuð á komandi árum

enda er
Allt virðist benda til þess að RNA verði notað við greiningar og lækningar á sjúkdómum í framtíðinni

SELEX aðferðin mjög fljótvirk og hentug til leitar að nýjum ríbósímum.

Auk þeirra uppgötvana á nýjum ríbósímum sem ræddar hafa verið í þessari grein, hefur verið unnið ötullega að rannsóknum á því hvernig þessar sameindir virka. Mest áhersla hefur verið lögð á að ákvarða þrívíddarbyggingu ríbósímana en notkun kristallagreiningar hefur ekki reynst eins vel og í greiningu á próteinum. Erfitt er að mynda góða RNA kristalla og eru aðeins til örfáar kristalbyggingar af RNA



Mynd 6. a) Tenging tvígildrar coparjónar við porfirín. b) Diels-Alder efnahvarfið.

sameindum. Því hefur ýmsum efnafraðilegum og lífefnafraðilegum tilraunum, sem of langt mál er að rekja hér, verið beitt til þess að fá nánari upplýsingar um byggingu og eiginleika þessarra sameinda. Það er ljóst að mikil vinna er enn framundan á þessu sviði.

Þegar vikið er að eiginleikum ríbósíma, vaknar sú spurning hversu góðir hvatar ríbósímín séu. Því er

fljótswarað að ríbósím eru ekki eins góðir hvatar og ensím. Hraðaukning á hvörfum, sem hvötuð eru af ríbósímum miðað við óhvötuð hvörf, er yfirleitt á bilinu 100-10¹¹, samanborið við 10⁹-10¹² fyrir sambærileg ensím. Auk þess hafa ensímín mun hærri veltu (turnover). Þetta kemur í raun ekki á óvart, því að ef RNA-heimur var til í árdaga lífsins, er eðlilegt að prótein hafi tekið að mestu við hvatahlutverki RNA vegna þess að þau voru betri hvatar. Einnig er vel skiljanlegt af hverju ensím eru í flestum tilvikum betri hvatar en ríbósím. Skýringin er sú að stafróf próteina inniheldur 20 aminosýrur (miðað við 4 núkleótíð hjá RNA) og gefur því mun meiri möguleika á því að mynda góðan hvata.

Eins og minnst var á í inngangi greinarinnar hefur opnast sá möguleiki að ríbósím komi til með að hafa hagnýtt gildi við genalækningar og í baráttu gegn RNA vírusum. Einnig má nefna að hægt er að nota SELEX aðferðina til þess að finna RNA, sem binst annað hvort litlum lífrænum sameindum, eins og til dæmis taugaboðefninu dópamín,¹⁵ eða tilteknum próteinum. Slíkar RNA sameindir er unnt að nota við greiningar (diagnostics) á svipaðan hátt og mótefni (antibodies) eru nú notuð.¹⁶ Allt virðist benda til þess að RNA verði notað við greiningar og lækningar á sjúkdómum í framtíðinni og gegni þar með enn nýju lykilhlutverki í sögu lífsins hér á jörð.

Heimildir

- (1) The RNA world; Gesteland, R. F.; Atkins, J. F., Ed.; Cold Spring Harbor: 1993; Vol. 24.
- (2) Gaughan, D. J.; Whitehead, A. S. *Biochim Biophys Acta* 1999, 1445, 1-20.
- (3) Lan, N.; Howrey, R. P.; Lee, S. W.; Smith, C. A.; Sullenger, B. A. *Science* 1998, 280, 1593-1596.
- (4) Macpherson, J. L.; Ely, J. A.; Sun, L. Q.; Symonds, G. P. *Front Biosci* 1999, 4, D497-505.
- (5) Tuerk, C.; Gold, L. *Science* 1990, 249, 505-510.
- (6) Eklund, E. H.; Szostak, J. W.; Bartel, D. P. *Science* 1995, 269, 364-370.
- (7) Lorsch, J. R.; Szostak, J. W. *Nature* 1994, 371, 31-36.
- (8) Unrau, P. J.; Bartel, D. P. *Nature* 1998, 395, 260-263.
- (9) Eklund, E. H.; Bartel, D. P. *Nature* 1996, 382, 373-376.
- (10) Zhang, B.; Cech, T. R. *Nature* 1997, 390, 96-100.
- (11) Illangasekare, M.; Sanchez, G.; Nickles, T.; Yarus, M. *Science* 1995, 267, 643-647.
- (12) Prudent, J. R.; Uno, T.; Schultz, P. G. *Science* 1994, 264, 1924-1927.
- (13) Conn, M. M.; Prudent, J. R.; Schultz, P. G. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 7012-7013.
- (14) Tarasow, T. M.; Tarasow, S. L.; Eaton, B. E. *Nature* 1997, 389, 54-57.
- (15) Mannironi, C.; Di Nardo, A.; Fruscoloni, P.; Tocchini-Valentini, G. P. *Biochemistry* 1997, 36, 9726-9734.
- (16) Jayasena, S. D. *Clin Chem* 1999, 45, 1628-1650.