

# Katalitičke RNA - molekulske fosili RNA-svijeta

---

**Mrnjavac, Natalia**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2012**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/um:nbn:hr:217:387061>

*Rights / Prava:* [In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-04-29**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



**SVEU ILIŠTE U ZAGREBU**  
**PRIRODOSLOVNO-MATEMATI KI FAKULTET**  
**BIOLOŠKI ODSJEK**

Kataliti ke RNA – molekulski fosili RNA-svijeta

Catalytic RNAs – molecular fossils of the RNA world

Natalia Mrnjavac  
Preddiplomski studij molekularne biologije  
(Undergraduate study of Molecular Biology)  
Mentor: doc.dr.sc. Ita Grui -Sovulj

Zagreb, 2012.

# SADRŽAJ

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1.    | UVOD .....   | 3  |
| 2.    | BIOLOŠKI KATALIZATORI.....                           | 5  |
| 2.1.  | Važnost i uloga u živom svijetu .....                | 5  |
| 2.2.  | Op a na eli biološke katalize.....                   | 6  |
| 2.3.  | Strukturna ograni enja za RNA katalizu .....         | 7  |
| 2.4.  | Pregled poznatih skupina ribozima.....               | 8  |
| 2.4.1 | Mali ribozimi.....                                   | 9  |
| 2.4.2 | Veliki ribozimi .....                                | 13 |
| 2.4.3 | Ribonukleoproteinski kompleksi.....                  | 15 |
| 3.    | KAKO RNA KATALIZIRA KEMIJSKE REAKCIJE?.....          | 21 |
| 3.1.  | Kiselinsko-bazna kataliza .....                      | 21 |
| 3.2.  | Kataliza metalnim ionima.....                        | 24 |
| 3.3.  | Elektrostatska kataliza .....                        | 27 |
| 3.4.  | Vezna energija u katalizi .....                      | 28 |
| 3.5.  | Ostali mehanizmi katalize .....                      | 29 |
| 4.    | IZREZIVANJE INTRONA IZ PRIMARNIH TRANSKRIPATA .....  | 33 |
| 4.1.  | Introni grupe I – po eci istraživanja .....          | 34 |
| 4.2.  | Introni grupe I – struktura.....                     | 34 |
| 4.3.  | Introni grupe I – odabir mesta cijepanja .....       | 38 |
| 4.4.  | Introni grupe I – rezultati kineti kih analiza ..... | 40 |
| 5.    | Zaklju ci .....                                      | 42 |
| 6.    | Literatura .....                                     | 43 |
| 7.    | Sažetak .....  | 45 |
| 8.    | Summary .....  | 46 |

## 1. UVOD

Pred to no trideset godina, u jednom od laboratorijskog odjela Sveuilišta Colorado, skupina znanstvenika pod vodstvom Thomasa Cecha je došla do krajnje neočekivanog otkrića koje će rezultirati revolucijom u dotadašnjim poimanjima biološke katalize, te otvoriti mnoga pitanja za biokemijske i strukturne biologe diljem svijeta, a pružiti će i ključni argument u žuštrim raspravama molekularnih evolucionista o porijeklu života na Zemlji (Kruger i sur. 1982; Cech 2002). Otkriveni katalitičkih RNA objavljeni su 1982. godine u časopisu *Cell* (Kruger i sur. 1982). Znanstvenici su istraživali izrezivanje introna i ligaciju eksona pre-rRNA kod jedne vrste trepetljikaša, *Tetrahymena thermophila* (Kruger i sur. 1982). S obzirom da su do tada poznati katalizatori u biološkim sustavima bili isključivo proteinske prirode (Lilley 2003), znanstvenici su dugo pokušavali izolirati protein koji bi katalizirao spomenute reakcije (Cech 2002). No, uspjeli su izolirati aktivni oblik pre-rRNA kod kojeg su se spomenute reakcije odvijale bez dodatka proteina. Štoviše, nakon ekstrakcije SDS-fenolom, zagrijavanja u prisustvu SDS-a, te tretmana proteazama, aktivnost je bila očuvana. Hipoteza da RNA sama katalizira izrezivanje svojih introna je bila sve izglednija. Ona je i dokazana pomoći u *in vitro* transkribiranih pre-rRNA s plazmida u kontroliranim uvjetima; izrezivanje i ligacija transkriptata se događala bez dodatka proteina (Kruger i sur. 1982). Ipak, ova se molekula nije smatrала pravim enzimom zato što nema obrtaj, odnosno ne može katalizirati ekskiziju i ligaciju na drugim molekulama pre-rRNA kada se jednom intron izreže (Kruger i sur. 1982). Iduće godine je suradnja između laboratorijskih Altmana i Pacea rezultirala otkrićem da je RNaza P koja procesira 5' krajeve tRNA u svim organizmima također ribozim (Cech 2002). RNaza P je bila prvi otkriveni ribozim sa sposobnošću višestrukog obrta, poput proteinskih enzima (Narlikar i Herschlag 1997; Doudna i Cech 2002). 1989. godine su Sidney Altman i Thomas R. Cech dobili Nobelovu nagradu za kemiju za otkriveni katalitičkih svojstava RNA ([www.nobelprize.org](http://www.nobelprize.org)).

Otkriveni RNA katalizator ili ribozima (Kruger i sur. 1982) je stalo na kraj raspravama o tome je li prvo bila „kokoš ili jaje“, odnosno genetička informacija ili katalitička molekula (poznato pod nazivom „Orgelov paradoks“). Danas vlada konsenzus da su DNA genomima prethodili RNA genomi (što potvrđuje i sama kemija tih molekula) (Forterre 2005), i da je u to doba RNA bila i informacijska i katalitička molekula (Doudna i Cech 2002; Lilley 2003; Doudna i Lorsch 2005). Molekula RNA je u potpunosti trebala biti sposobna katalizirati mnogo širok spektar reakcija nego što to je danas, a *in vitro* selekcijom je dokazano da ona ima sve

preduvjet je za to i da se, uz odgovarajuće selekcijske uvjete, mogu dobiti molekule RNA koje kataliziraju reakcije poput polimerizacija ovisnih o kalupu, aminoacilacija, alkilacija, stvaranja amidne veze, glikozidne veze, redoks reakcija i dr. (Fedor 1998; Lilley 2003; Alberts i sur. 2008). *In vitro* je dokazano i da kataliti ka RNA iz *Tetrahymena thermophila* može mjesno-specifično cijepati DNA supstrat (Herschlag i Cech 1990a). Ovo je otkriće sugeriralo da su RNA katalizatori mogli djelovati na DNA prije nastanka mašinerije za sintezu proteina. Brzina reakcije se smanjila samo 10 puta u odnosu na RNA supstrat zato što je korak koji ograničava brzinu reakcije za RNA supstrat vezanje supstrata u aktivno mjesto, a za DNA supstrat ograničava i korak postaje sam kemijski korak (Herschlag i Cech 1990a).

RNA-svijet je pojam kojeg je uveo Gilbert kako bi opisao svijet slobodnih molekula RNA u međusobnoj kompeticiji pred oko 3,6 milijardi godina (Lilley 2003; Forterre 2005). No, malo je vjerojatno da bi se rani metabolizam mogao razviti i evoluirati bez postojanja neke vrste prastanica odijeljenih od okoliša. Stoga danas sve više znanstvenika opisuje RNA-svijet kao svijet stanica s RNA genomima (Forterre 2005). U tom svijetu se s vremenom povećala potreba za vjernošću prijenosa genetičke informacije, te za stabilnost u genoma, a sve je manja bila korist od visoke stope mutacija, te DNA stanice počinju prevladavati, a na kraju i odnose pobjedu u borbi za opstanak (Forterre 2005). Evolucija metabolizma je, s druge strane, postavljala sve veće katalitičke zahtjeve (potreba za većom vjernošću, procesivnošću, brzinom, raznolikošću u katalizatora) što je potaklo postupni prijelaz na proteinsku katalizu (Doudna i Lorsch 2005; Strobel i Cochrane 2007). Prema takvom shvalu, ranog života na Zemlji današnji ribozimi predstavljaju ostatke tog za molekulu RNA zlatnog doba, žive fosile RNA-svijeta (Lilley 2003). Nemoguće je reći zašto se RNA kataliza održala do danas, i to u vrlo uskom spektru reakcija (ribozimi imaju isključivo fosforil-transferaznu i peptidil-transferaznu aktivnost) (DeRose 2002). No, očito je injenica da su se za većinu metaboličkih reakcija proteinski katalizatori pokazali efikasnijima, te stoga i evolucijski uspješnijima.

Cilj ovoga rada je prikazati specifičnosti RNA kao katalitičke molekule, usporediti načine katalize enzima i ribozima, te dati prikaz glavnih skupina do danas otkrivenih ribozima i njihovih katalitičkih mehanizama, uz poseban osvrт na neke strukturne i kinetičke značajke introna grupe I, u koje se ubraja i prvi otkriveni RNA katalizator iz vrste *Tetrahymena thermophila*.

## **2. BIOLOŠKI KATALIZATORI**

Pojam biokatalizatora uključuje sve molekule koje kataliziraju (ubrzavaju) biološki važne reakcije u stanicama i tkivima. Biološka kataliza je prvi put primijeđena i opisana u 18. st. na fenomenu probave mesa u želucu (Nelson i Cox 2008). Krajem 19. st. je Eduard Buchner otkrio molekule koje potiču alkoholno vrenje u kvazu. One su kasnije nazvane enzimima (Nelson i Cox 2008). 1926. godine je James Sumner uvidio da se kristali ureaze sastoje isključivo od proteina, što ga je nagnalo da zaključi kako su svi enzimi proteini (Nelson i Cox 2008). U nedostatku suprotnih dokaza, ta se teza nije osporavala mnogo desetljeća. Otkriće katalitičkih RNA je opovrgnulo Sumnerov postulat, otvorilo vrata novom području RNA enzymologije i uvrstilo jednu novu, potpuno drugu iju molekulu u skupinu biokatalizatora.

### **2.1. Važnost i uloga u životu svijetu**

Biološki katalizatori, primarno enzimi, se razlikuju od anorganskih kemijskih katalizatora po nekoliko bitnih značajki. Za početak, stopa ubrzanja kemijske reakcije je za nekoliko reda veliki nego viša u odnosu na anorganske katalizatore, tako da je u prisutnosti enzima reakcija ubrzana za faktor  $10^6$ - $10^{12}$  u odnosu na nekataliziranu reakciju u otopini. Neki ribozimi, među kojima RNaza P i pre-rRNA iz *Tetrahymena*, takođe ubrzavaju reakcije do ogromnih razmjera ( $10^{11}$  puta u odnosu na nekataliziranu reakciju) (Narlikar i Herschlag 1997). Drugo, biološki katalizatori moraju djelovati u blagim uvjetima koji pogoduju odvijanju života, dakle u fiziološkom rasponu pH, pod atmosferskim tlakom i temperaturama nižim od  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Treće, biološki katalizatori imaju puno veću specifičnost za substrate i produkte od anorganskih katalizatora. Četvrto, aktivnost mnogih bioloških katalizatora, a ovdje se misli na enzime, može se kontrolirati alosterijom, kovalentnom modifikacijom i sl. (Voet i Voet 2011). Navedena svojstva su rezultat nekoliko milijardi godina evolucije katalize u živim sustavima koja je omogućila optimizaciju katalitičkih funkcija za uvjete koji vladaju u stanici.

Zašto su biološki katalizatori toliko važni? Odgovor je jednostavan – zato što bez njih ne bi bilo života. Biološke molekule su u pravilu stabilne pri blagim uvjetima stanice (Nelson i Cox 2008). To znači da reagiraju vrlo sporo, unatoč tome što razlika standardne Gibbsove slobodne energije supstrata i produkata ( $G^\circ$ ) za mnoge reakcije ide u prilog nastajanju produkta (termodinamski povoljne reakcije). Razlog je visoka energija aktivacije reakcija, odnosno energija potrebna za usmjeravanje kemijskih skupina koje ulaze u reakciju, nastanak

kratkotrajnog naboja, reorganizaciju kemijskih veza i drugih promjena koje vode od supstrata do prijelaznog stanja (Nelson i Cox 2008). Funkcija katalizatora je ubrzavanje kemijskih reakcija snižavanjem energije aktivacije. Da bi to bilo moguće reakcija mora biti termodinamski povoljna jer katalizatori ne utje u na kemijsku ravnotežu.

S obzirom da se sva svojstva koja biolozi navode kao osnovne značajke živoga (metabolizam, razmnožavanje, podražljivost, rast, homeostaza, ...) na molekulskoj razini temelje na kemijskim reakcijama koje ne mogu napredovati bez katalizatora, jasno je da su te molekule jedan od osnovnih preduvjeta za život.

## 2.2. Opća načela biološke katalize

Osnovni cilj katalize je stabilizirati prijelazno stanje u odnosu na osnovno stanje ili destabilizirati kompleks enzim-supstrat (Doudna i Lorsch 2005). Oba ovina rezultiraju smanjenjem energije aktivacije, odnosno energetskog raskoraka između osnovnog i prijelaznog stanja. Bez obzira na to je li biokatalizator u pitanju protein ili RNA, ograničen je broj mehanizama kojima se to može postići. Opisani su ukratko mehanizmi koji su otkriveni i proučavani na enzimima, a u nastavku teksta će biti objašnjeno koje od tih mehanizama molekula RNA koristi u katalizi, zašto i na koji način.

Kiselinsko-bazna kataliza je mehanizam koji omogućava stvaranje boljeg nukleofila otpuštanjem protona kojeg prima opća baza, odnosno stabilizaciju izlazne skupine i prijelaznog stanja protonacijom supstrata od strane opće kiseline. Kod enzima skupine s kiselinsko-baznim svojstvima mogu stvoriti put za kretanje protona u i iz aktivnog mesta (Doudna i Lorsch 2005).

Kataliza metalnim ionima uključuje metalne kofaktore. Oni pomažu u orientaciji supstrata i stabilizaciji naboja u prijelaznom stanju, a sudjeluju i u oksidacijsko-reduksijskim reakcijama (Nelson i Cox 2008).

Kod kovalentne katalize dolazi do stvaranja kovalentne veze između katalizatora i supstrata. Ako je takva promjena puta reakcije energetski opravdana, odnosno ako rezultira smanjenjem energije aktivacije reakcije, dolazi do katalize (Narlikar i Herschlag 1997; Nelson i Cox 2005).

O elektrostatskoj katalizi se govori kada su naboji oko aktivnog mesta raspoređeni na način da stabiliziraju prijelazno stanje i/ili pozicioniraju supstrat(e) (Voet i Voet 2011). Za ovaku katalizu je bitna sposobnost katalizatora da kontrolira mikrookolinu aktivnog mesta

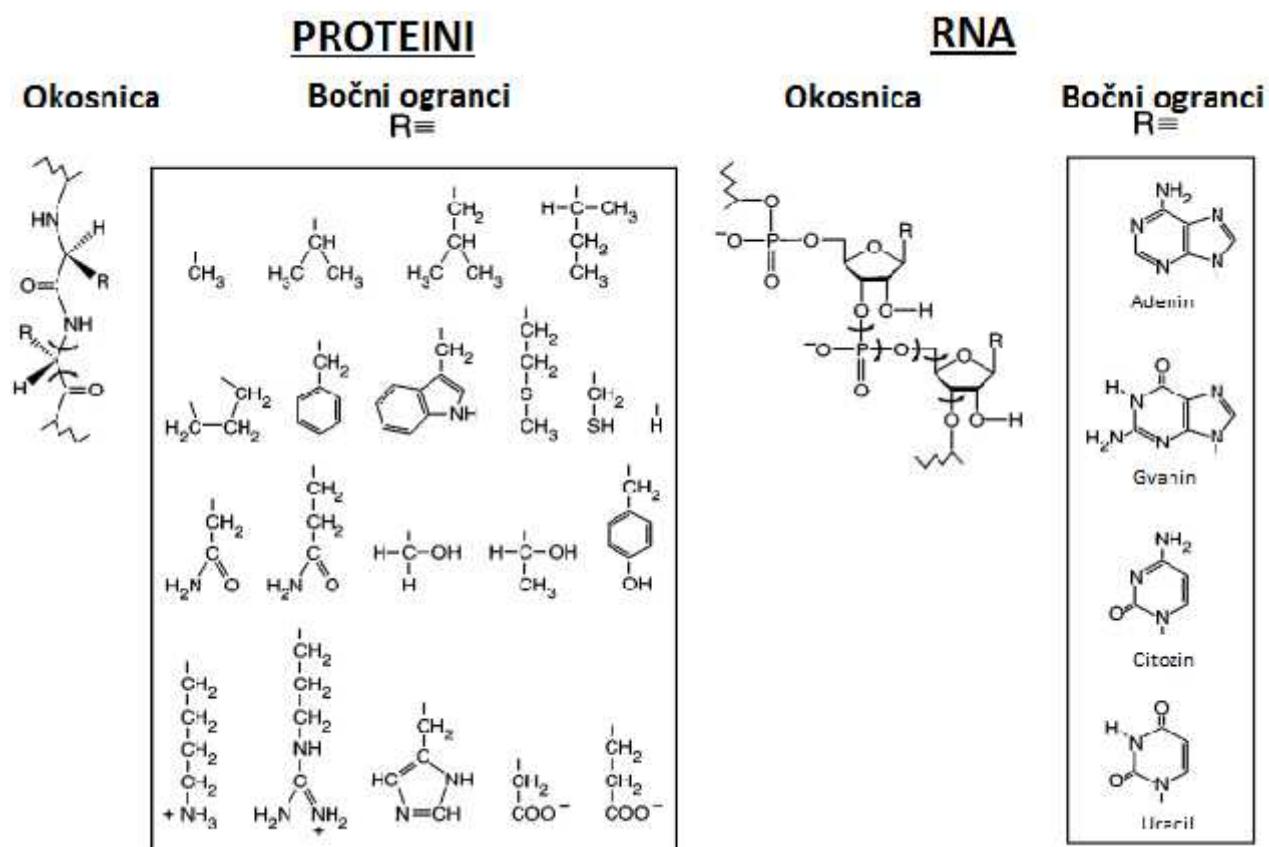
kako bi stvorio uvjete niže dielektrične konstante od vode, što će pojačati efekt elektrostatskih interakcija (Narlikar i Herschlag 1997).

Još jedna bitna sastavnica biološke katalize je približavanje i pravilna orijentacija supstrata u aktivnom mjestu (Voet i Voet 2011). Da bi se to ostvarilo nastaje mnoštvo nekovalentnih interakcija između supstrata i katalizatora. Ipak, važno je da se optimalne interakcije između katalizatora i supstrata stvaraju u prijelaznom stanju, a ne u osnovnom. To znači da dobar katalizator nije savršeno komplementaran supstratu (prema Fischerovom modelu ključ-brava iz 1894. god.), već u prijelaznom stanju (prema novom modelu Planija, Haldanea i Paulinga) (Nelson i Cox 2008). Slobodna energija potrebna za dostizanje prijelaznog stanja se djelomično namiruje kada se u prijelaznom stanju stvore nove energetski povoljne interakcije koje nisu postojale u osnovnom stanju, a neke nepovoljne interakcije se prekidaju (takve interakcije mogu biti i udaljene od aktivnog mjesta). Ovakvo smanjenje energetskog raskoraka između osnovnog i prijelaznog stanja definiramo kao upotrebu vezne energije u katalizi (Nelson i Cox 2008).

### **2.3. Strukturalni elementi za RNA katalizu**

Otkriće katalitičkih molekula RNA je bilo posebno iznenađujuće zato što se nukleinske kiseline kemijski vrlo razlikuju od proteina, pa se mislio da molekuli RNA nedostaju većina značajki koje od enzima imaju dobre katalizatore. Za početak, molekula RNA nema funkcionalne skupine analogne onima koje najčešće imaju katalitičku ulogu kod enzima: imidazol histidina, karboksilat aspartata i glutamata, alkilamin lizina, te sulfhidril cisteina (Narlikar i Herschlag 1997; Fedor 1998). Umjesto toga RNA ima četiri slične heterociklične dušne baze (Slika 1.). Kao tome, dok su kod enzima funkcionalne skupine aminokiselina orijentirane prema vanjskom, stršeći iz uzvojnica i plavo, kod RNA su nukleobaze orijentirane prema unutrašnjosti RNA dupleksa, dok su monotoni šere i fosfati okrenuti prema vanjskoj strani (Doherty i Doudna 2001; Cech 2002). To otežava stvaranje tercijarnih interakcija koje su važne za formiranje stabilnih struktura i dovoljno rigidnih aktivnih mesta za pozicioniranje supstrata (Narlikar i Herschlag 1997). Tercijarne interakcije su dodatno destabilizirane zbog visoke negativne naboja na fosfatima molekule RNA, te velike fleksibilnosti okosnice - dok kod proteina samo 2 veze u okosnici mogu slobodno rotirati, kod RNA ukupno 5 veza slobodno rotira (Narlikar i Herschlag 1997) (Slika 1.). Uza sve te strukturne nedostatke molekule RNA koji ju na prvi pogled mogu potpuno nepodobnom za katalizu, ona

se ipak do danas održala kao katalizator nekoliko biološki vrlo važnih reakcija, a sve upu uje na to da je nekada bila glavni katalizator ranog metabolizma.



**Slika 1.** Usporedba slobodno rotiraju ih veza okosnice i raznolikosti bo nih ogrankaka kod proteina i RNA.

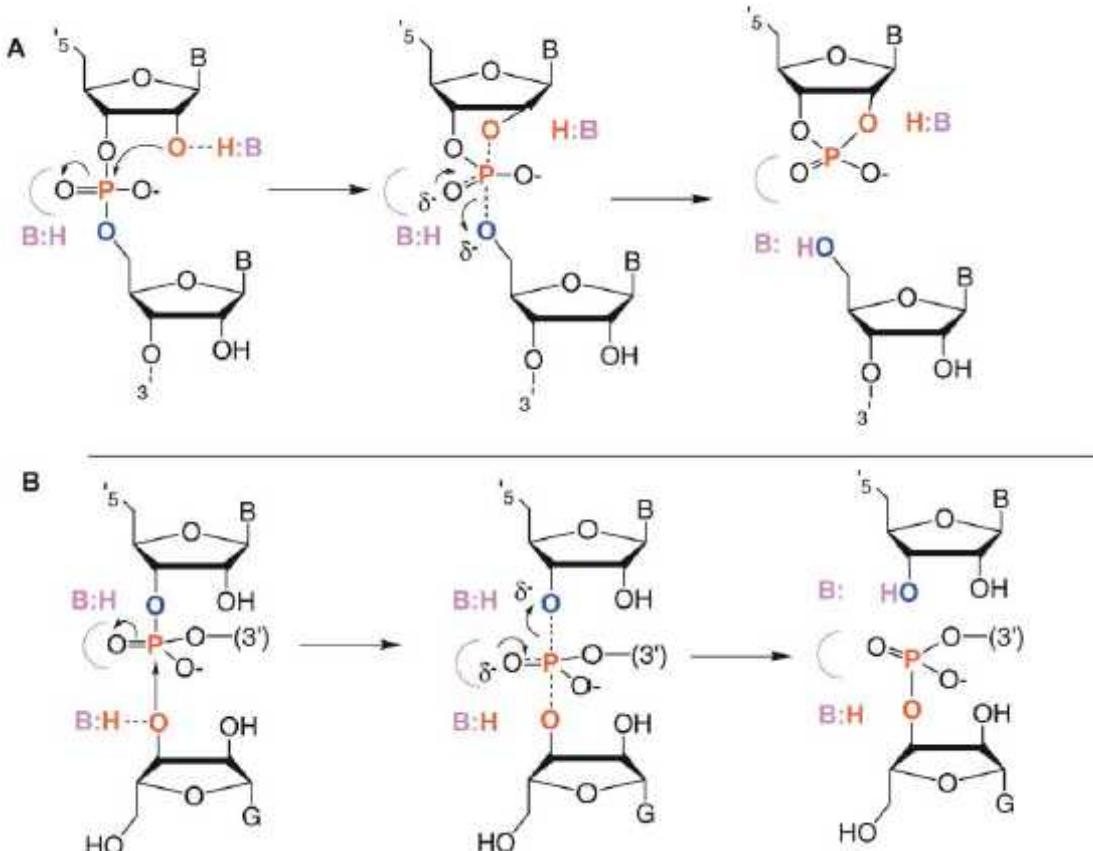
(Preuzeto iz Narlikar i Herschlag 1997)

## 2.4. Pregled poznatih skupina ribozima

Autokataliti ki ribozimi kataliziraju cijepanje vlastite molekule RNA, a mogu se svrstati u dvije skupine. U reakcijama kataliziranim malim ribozimima 2'-OH nukleofilna skupina napada vlastiti 3' fosfodiester (Lilley 2003) (Slika 2.A). U ovu skupinu spadaju *hammerhead*, *hairpin* i HDV (DeRose 2002; Doudna i Lorsch 2005). Veliki ribozimi, s druge strane, kataliziraju reakcije u kojima 2'-OH skupina vanjskog nukleotida ili nukleotida s udaljenog dijela RNA lanca ima ulogu nukleofila (Slika 2.B). U ovu skupinu spadaju introni grupe I i II (DeRose 2002, Lilley 2003).

Osim navedenih, u kataliti ke RNA se ubrajaju i neki ribonukleoproteinski kompleksi kao što su RNaza P, ribosom i *spliceosome*. Reakcija katalizirana RNA podjedinicom RNaze P je sli na reakciji malih ribozima (DeRose 2002), a *spliceosome* djeluje sli no intronima

grupe II (Doudna i Cech 2002). Ribosom ima specifičan mehanizam s obzirom da katalizira reakciju prijenosa peptidila.



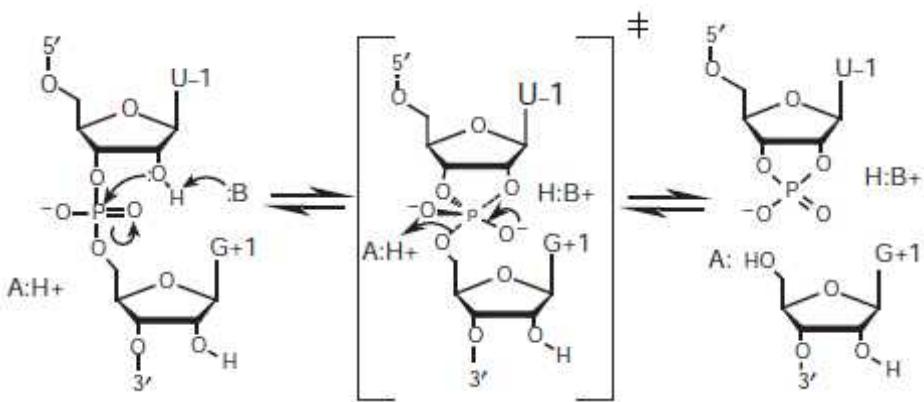
**Slika 2.** Mehanizam katalize reakcije prijenosa fosforila kod malih ribozima (A) i velikih ribozima (B).

B označava skupinu koja sudjeluje u kiselinsko-baznoj katalizi, a lukovi upućuju na mesta stabilizacije negativnog naboja.

(Preuzeto iz DeRose 2002)

#### 2.4.1 Mali ribozimi

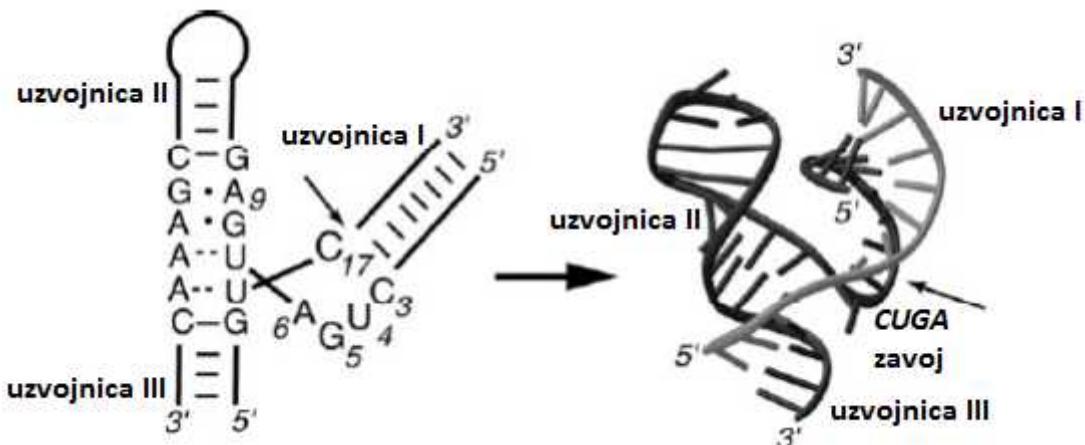
U slučaju malih ribozima cijepanje je mjesno-specifično zahvaljujući Watson-Crickovim i drugim interakcijama koje se stvaraju između aktivnog mesta i supstrata (Doudna i Lorsch 2005). Reakcija rezultira stvaranjem 2',3'-cikličkog fosfata i slobodne 5'-OH skupine, te inverzijom konfiguracije na fosfatu ( $S_N2$  reakcija) (Lilley 2003) (Slika 3.). Radi se o kratkim molekulama RNA duljine 50-150 nukleotida, a moguće ih je naći u genomima virusa, virusoida i satelitnih RNA (Doherty i Doudna 2001). Funkcija im je cijepanje produkta koji nastaje replikacijom kontrolirajućeg kruga u genome odgovarajuće duljine (Doherty i Doudna 2001).



**Slika 3.** Opis i mehanizam malih samoizrežujućih ribozima. Opis a baza (:B) aktivira 2'-OH za nukleofilni napad na susjedni fosfat oduzimanjem protiona. Opis a kiselina (A:H) stabilizira negativni naboja na kisiku izlazne skupine donacijom protiona.

(Preuzeto iz Doudna i Cech 2002)

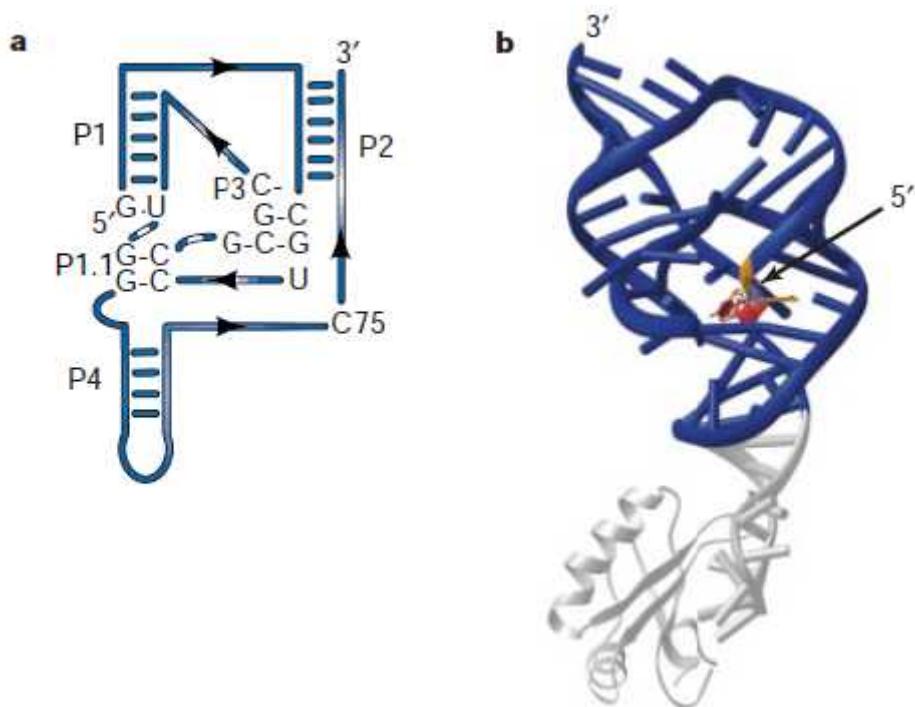
*Hammerhead* ribozim je bio prvi kristalizirani ribozim, a injenica da su njegovi RNA lanci uspješno razdvojeni na katalizator i supstrat je omoguila podrobnija istraživanja (DeRose 2002; Doudna i Lorsch 2005). Najmanja funkcionalna regija *hammerhead* ribozima se sastoji od tri uzvojnica (I, II i III) između kojih se nalazi očuvani vezni nukleotidni sljed (Doherty i Doudna 2001; DeRose 2002) (Slika 4.). Dodatni neobični sljedovi služe za stabilizaciju aktivne konformacije kod prirodnog *hammerhead* ribozima (Doudna i Lorsch 2005). Konformacijska promjena koja se sastoji od distorzije okosnice između uzvojnica II i III potiče pozicioniranje nukleotida C17 u aktivno mjesto na dodiru triju uzvojnica; 3' od C17 se nalazi veza koja podliježe cijepanju (Doherty i Doudna 2001; DeRose 2002) (Slika 4.). Struktura aktivnog mesta omogućava pristup otapala (Doherty i Doudna 2001). Još 1997. god. su Narlikar i Herschlag pisali o upotrebi vezne energije u katalizi *hammerhead* ribozima, a noviji podaci ukazuju i na mogućnost katalize nukleobazama: naime, dva krita na G su locirana u aktivnom mjestu (Strobel i Cochrane 2007). Osim toga, za aktivnost *hammerhead* ribozima su potrebni dvovalentni metalni ioni, a u njihovom odsustvu aktivnost se zadržava uz dodatak visoke koncentracije monovalentnih iona (DeRose 2002). Od samog otkrića ove katalitičke molekule RNA traju debate vezane uz ulogu metalnih iona u mehanizmu reakcije. Teško je objasniti i povezati podatke dobivene iz različitih kristalnih struktura sa informacijama dobivenim pomoću supstitucija određenih atoma, NMR-om i kinetičkim istraživanjima. Dok stariji izvori navode katalitičku ulogu metala u mehanizmu (Narlikar i Herschlag 1997), noviji radovi spominju i mogućnost strukturne uloge kationa (Doudna i Lorsch 2005). Ovoj problematice će biti više riječi u poglavljju 3.2.



**Slika 4.** Sekundarna i tercijarna struktura *hammerhead* ribozima. Baze označene slovima su univerzalno označene. To je i crtica među bazama označavaju ne-Watson-Crickova sparivanja. Strjelicom je označeno mjesto cijepanja.

(Preuzeto iz Doherty i Doudna 2001)

*Hepatitis delta virus* (HDV) se nalazi u genomu satelitne RNA koja pojava efekt virusa hepatitis B (DeRose 2002). Ubrzava reakciju 100 puta više od *hammerhead* ribozima ( $10^8$  u odnosu na nekataliziranu reakciju) (Doherty i Doudna 2001; Doudna i Lorsch 2005), približavajući se vrijednosti proteinskih enzima. Neobičan je po tome što je izrazito stabilan, s optimalnom temperaturom za katalizu oko 65 °C, a zadržava aktivnost i pri 80 °C u puferu s 5 M ureom (Doherty i Doudna 2001). Regija supstrata 5' od veze koja se cijepa nije sparena s ribozimom, osim prvog nukleotida uzvodno od mesta cijepanja koji je stoga jedini relevantan za reakciju. HDV duguje stabilnost kompaktnoj strukturi građenoj od dvostrukog pseudo vora kojeg čini pet uzvojnica (P1, P1.1, P2, P3 i P4) koje interagiraju na različite načine (Doherty i Doudna 2001) (Slika 5.). Za razliku od *hammerhead* ribozima, aktivno mjesto je duboko ukopano u strukturu i zaštićeno od utjecaja otapala, što dodatno pospješuje katalitičku djelotvornost (Doherty i Doudna 2001). Na ovom ribozimu je prvo predložena mogućnost upotrebe kiselinsko-bazne katalize od strane RNA katalizatora (Doudna i Lorsch 2005). Kritičan je nukleotid C75, i njegova uloga biti detaljnije objašnjena u idućem poglavljju (3.1.). Osim toga, prisutnost dvovalentnih metalnih iona je potrebna za reakciju, iako u nižim koncentracijama nego kod drugih malih ribozima koji kataliziraju istu reakciju (Doherty i Doudna 2001; DeRose 2002). Uloga nije razjašnjena, ali je moguće da metalni hidroksidi služe kao drugi element u kiselinsko-baznoj katalizi (ako je C75 baza, on djeluje kao opača kiselina, i obrnuto) (DeRose 2002).

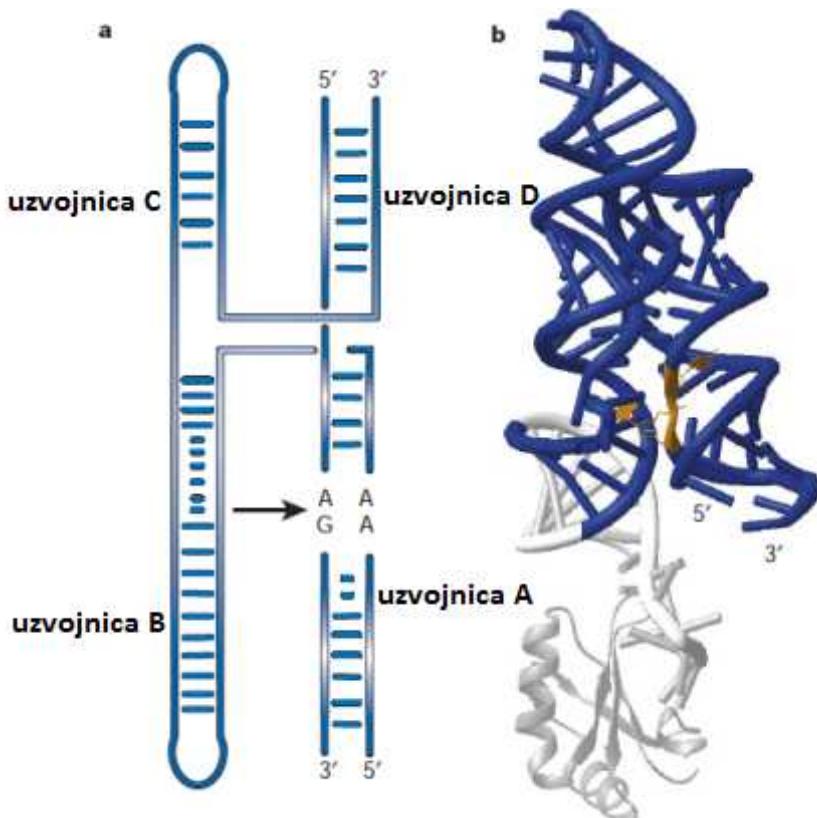


**Slika 5.** a) Sekundarna struktura HDV-a koju čini pet uzvojnica (P1, P1.1, P2, P3 i P4). Nukleotid C75 je bitan za katalizu. Veza koja se cijepa se nalazi kraj oznake za 5' kraj lanca. b) Tercijarna struktura HDV-a. C75 je označen crveno, a 5' nukleotid koji jedini stvara interakciju s katalitičkim dijelom molekule je označen zlatnim.

Strjelica označava mjesto cijepanja.

(Preuzeto iz Doudna i Cech 2002)

Hairpin ribozim tvore četiri uzvojnica koje povezuje središnje spojno mjesto. U dvjema susjednim uzvojnicama se nalazi po jedan mjeđuhop nesparenih baza. Reakcija se događa između nukleotida u mjeđuhopu uzvojnici A (Slika 6.). Baza G+1 koja se nalazi tik uz vezu koja se cijepa u uzvojnici A se u tercijarnoj strukturi sparuje s bazom C25 koja se nalazi u mjeđuhopu nesparenih baza uzvojnice B. Takva konformacija potiče pravilno pozicioniranje nukleofila (Lilley 2003). Osim toga, neki rezultati upućuju na moguću ulogu baze G8 u kiselinsko-baznoj katalizi (DeRose 2002; Lilley 2003). U prisustvu  $Mg^{2+}$  iona ribozim stvara funkcionalno aktivno mjesto (Lilley 2003). Unatoč tome, injenica da divalentni kationi nisu potrebni tijekom reakcije cijepanja upućuje na mehanizam neovisan o metalnim ionima (Doudna i Cech 2002).



**Slika 6.** a) Sekundarna struktura *hairpin* ribozima. O uvane baze su ozna ene slovima, a nekanonski bazni parovi kra im linijama. Regije kod kojih nije mogu e Watson-Crickovo sparivanje baza tvore mjejhure u A i B uzvojnicama. Strjelica ozna ava mjesto cijepanja. b) Tercijarna struktura *hairpin* ribozima. Nukleotidi koji okružuju vezu koja podliježe cijepanju su obojani zlatno.

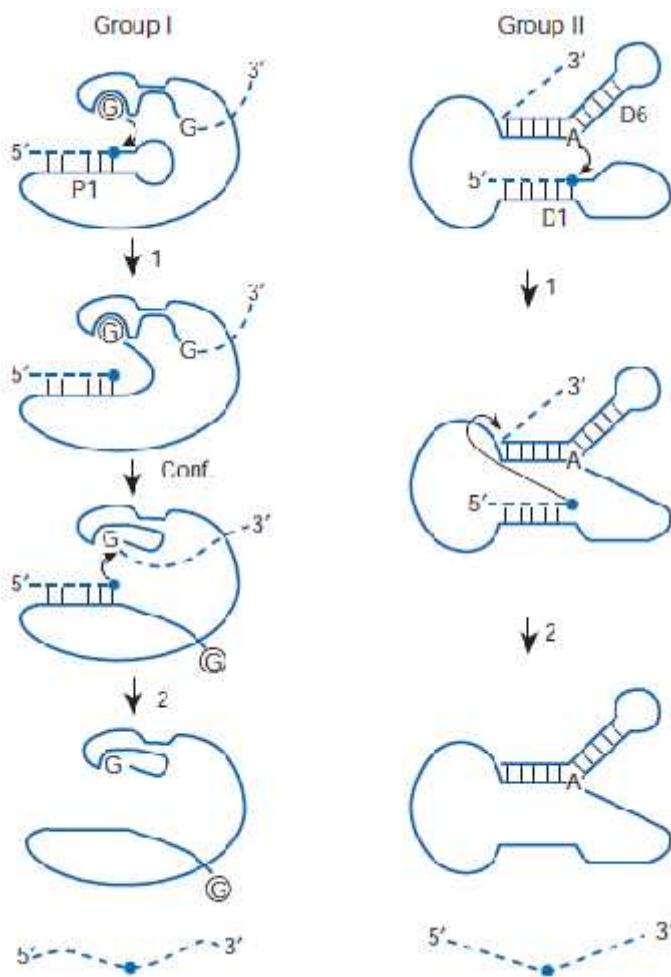
(Preuzeto iz Doudna i Cech 2002)

#### 2.4.2 Veliki ribozimi

Nalaze se u jezgri, mitochondrijima i kloroplastima različitim eukariota (ali ne kralješnjaka), te nekih bakterija i faga (Doudna i Cech 2002; Voet i Voet 2011). Kataliziraju vlastitu eksciziju i ligaciju eksona, a aktivno mjesto se nalazi na intronu. Nukleotidni slijed introna je kritičan za katalizu jer omoguava sklapanje specifične trodimenzionalne strukture introna koja je približiti 5' i 3' mesta cijepanja i pozicionirati reaktivne i katalitičke važne skupine (Alberts i sur. 2008). Za razliku od malih ribozima, kod ove skupine se različiti supstrati koriste za svaki reakcijski korak, stoga katalitičko središte ovih RNA katalizatora mora biti dovoljno fleksibilno da otpusti jedan, te pozicionira i veže visokim afinitetom novi supstrat. U tome pomažu periferni ogranci prisutni kod ove skupine katalizatora (Doherty i Doudna 2001). Podijeljeni su u dvije grupe prema prirodi nukleofila.

Kod introna grupe I vanjski gvanin nukleozid ili nukleotid kofaktor vezan na G-veznom mjestu introna kreće u nukleofilni napad svojom 3'-OH skupinom. Dolazi do cijepanja fosfodiesterske veze, a vanjski G ostaje vezan za 5' kraj introna (Doudna i Cech 2002; Nelson i Cox 2008). Prije drugog koraka dolazi do konformacijske promjene zahvaljujući kojoj o uvani G na 3' kraju introna zamjenjuje vanjski G u G-veznom mjestu. Slobodni -OH 5' eksona nukleofilno napada 3' kraj introna u drugom koraku reakcije, te dolazi do izrezivanja introna i spajanja eksona (Doudna i Cech 2002) (Slika 7. lijevo). Neke značajke ovih introna će biti detaljno obrađene u 4. poglavljtu.

Kod introna grupe II ulogu nukleofila ima adenozin unutar primarnog nukleotidnog slijeda introna. 2'-OH adenozina iz domene D6 nukleofilno napada spoj 5' eksona i introna koji je pozicioniran zahvaljujući interakcijama s domenom D1 introna; rezultat je razgranati intermedijer koji osim tipične 3',5' fosfodiesterske veze sadrži i novostvorenu neobičnu 2',5' fosfodiestersku vezu (Doudna i Cech 2002). Drugi korak je jednak kao u intronima grupe I. Izrezani intron ima cirkulariziranu regiju zahvaljujući rasporedu veza na nukleofilnom adeninu (Slika 7. desno).



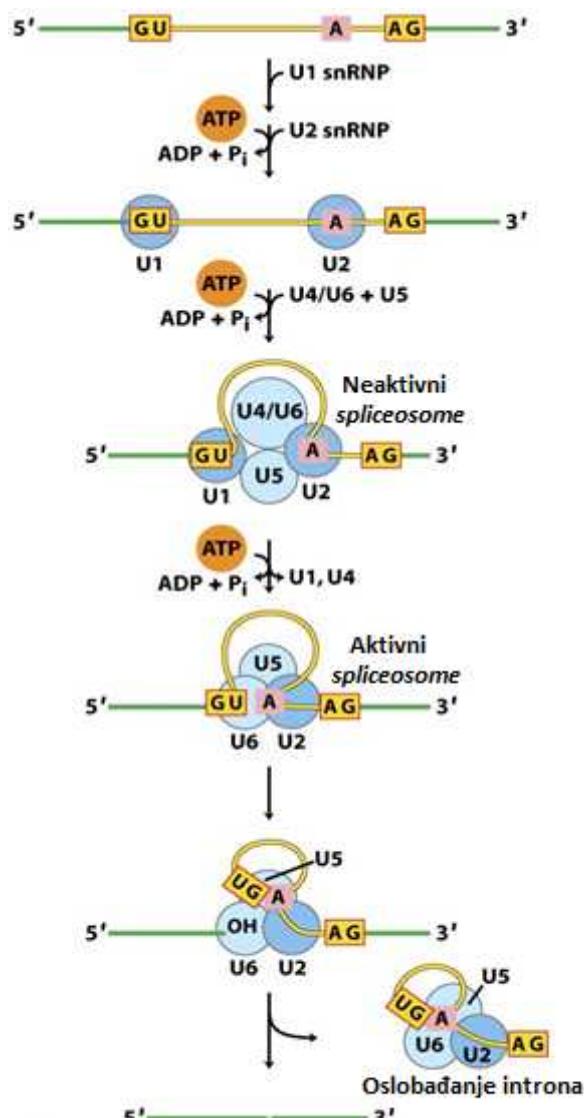
**Slika 7.** Mehanizam samoizrezivanja introna grupe I (lijevo) i II (desno).

(Preuzeto iz Doudna i Cech 2002)

### 2.4.3 Ribonukleoproteinski kompleksi

*Spliceosome* ima vrlo sličan mehanizam reakcije intronima grupe II, pa se smatra da je i evoluirao iz ove skupine samoizrežujućih introna (Alberts i sur. 2008). Danas većina introna nije samoizrežujuća, uključujući i introne svih jezgrinih pre-mRNA. *Spliceosome* tvore snRNP (*small nuclear ribonucleoproteins*) koji se sastoje od proteina i snRNA (*small nuclear RNAs*) – U1, U2, U4, U5 i U6 (Nelson i Cox 2008). Dio nukleotidnog slijeda U1 snRNA je komplementaran 5' mjestu cijepanja, pa se U1 snRNP veže na to mjesto i označava ga za cijepanje (Slika 8.). Adenozin u unutrašnjosti introna koji ima ulogu nukleofila u reakciji (kao u intronima grupe II) je prvo prepoznat od strane dva proteina (BBP i U2AF), koji su potom zamijenjeni s U2 snRNP; on aktivira nukleofil (Alberts i sur. 2008; Nelson i Cox 2008). Kompleks s vezanim svim snRNP-ovima je inaktiviran. Tek izbacivanjem U1 i U4 je omogućeno vezanje U6 za 5' mjesto cijepanja i za U2, što dovodi do približavanja nukleofila

mjestu napada (Nelson i Cox 2008) (Slika 8.). U6 i U2 snRNA tvore trodimenzionalnu strukturu koja sudjeluje u katalizi prve transesterifikacijske reakcije. U ligaciji eksona sudjeluje U5 snRNA (Alberts i sur. 2008). Za izrezivanje introna *spliceosomom* su potrebni rearanžmani unutar kompleksa, konformacijske promjene, te kidanje i stvaranje interakcija tijekom reakcije. Treba uočiti i potrebu za proteinima za prepoznavanje unutarnjeg A nukleofila, iako oni imaju sporednu ulogu. ATP je potreban za slaganje kompleksa, ali ne i za reakciju (Nelson i Cox 2008).



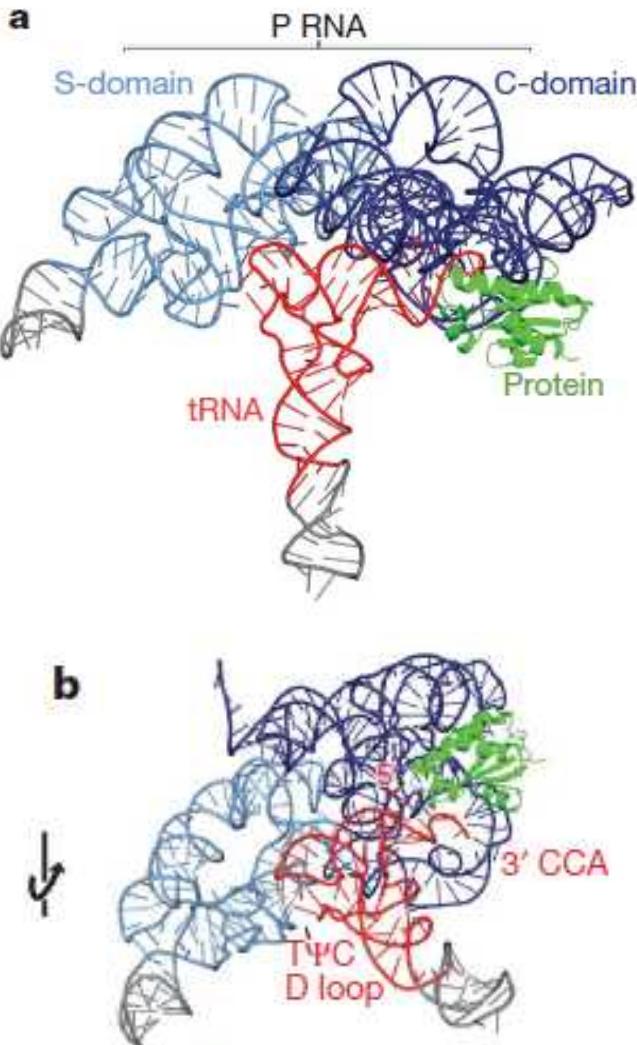
**Figure 26-17b**  
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
© 2008 W.H. Freeman and Company

**Slika 8.** Uloga snRNP *spliceosoma* u izrezivanju introna iz pre-RNA.

(Preuzeto iz Nelson i Cox 2008)

RNaza P katalizira endonukleoliti ko cijepanje fosfodiesterske veze na 5' kraju pre-tRNA, što rezultira zrelom molekulom tRNA. Na bakterijskom obliku ovog katalizatora je Altmann sa suradnicima otkrio kataliti ka svojstva RNA (istovremeno je laboratorij T. Cecha radio na *Tetrahymena*) (McClain i sur. 2010). Uo eno je da izolirana RNA domena, koja je trebala služiti isklju ivo kao negativna kontrola u istraživanju, katalizira reakciju cijepanja vode e regije pre-tRNA (McClain i sur. 2010). Holoenzim RNaza P ima RNA komponentu koja je sli na po nukleotidnom slijedu i strukturi u svim domenama života (izuzetak su mitohondrijske RNaze P koje su proteinski katalizatori [Holzmann i sur. 2008]), dok su proteinske komponente mnogo varijabilnije (McClain i sur. 2010). Sama ta injenica ukazuje na važnu ulogu RNA.

Uo ene su dvije neovisne domene unutar molekule RNA ovog kompleksa: domena kojom se ostvaruje specifi na interakcija sa supstratom pomo u o uvanog slijeda i strukture prepoznaje T C i D om e pre-tRNA (*stacking* interakcije baza), te pojedine nukleobaze intermolekulskim sparivanjem baza, a kataliti ka domena sadrži aktivno mjesto (Reiter i sur. 2010) (Slika 9.). Kristalna struktura upu uje na mehanizam reakcije pomo u dva metalna iona: prvi pozicionira vezu koja podlježe cijepanju, a drugi ima ulogu u stabilizaciji prijelaznog stanja i prijenosu protona prilikom otpuštanja produkta (Reiter i sur. 2010). Ovaj je mehanizam est u svijetu kataliti kih RNA. Glavna uloga proteinske komponente RNaze P je interakcija i pozicioniranje vode eg 5' nukleotidnog slijeda pre-tRNA u kompleks (Reiter i sur. 2010).



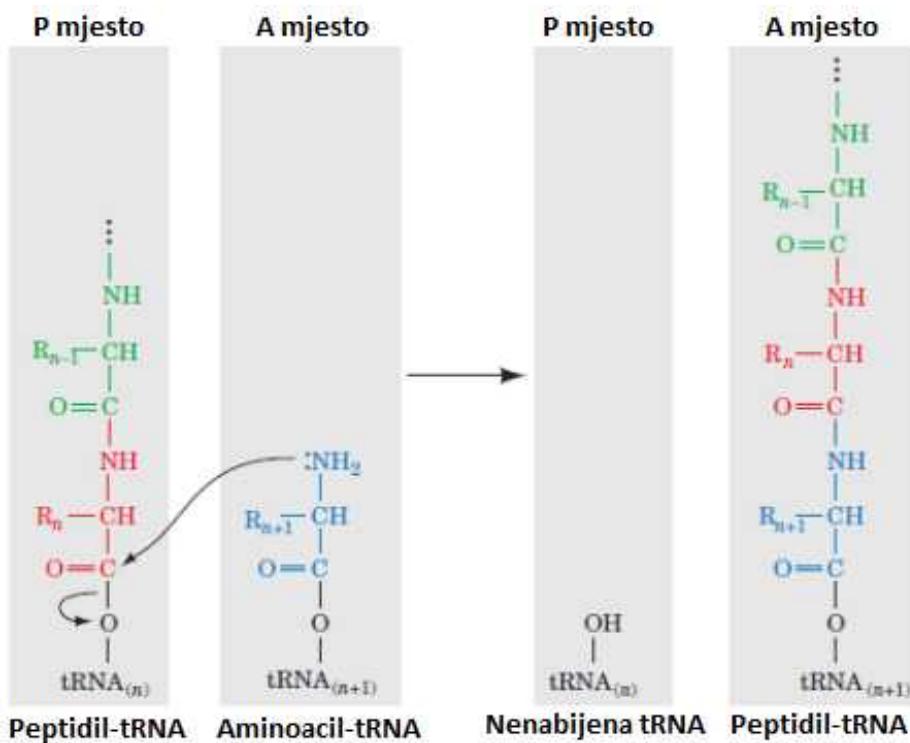
**Slika 9.** Kristalna struktura RNaza P holoenzima u kompleksu s tRNA iz organizma *T. maritima*. a) Vidljiva je RNA podjedinica od 110 kDa (plavo) s kataliti kom domenom (C) i domenom kojom se ostvaruje specifi na interakcija sa supstratom (S), proteinska podjedinica od 14,3 kDa (zeleno) koja veže 5' vode u regiju pre-tRNA, te sama tRNA (crveno). b) Prikaz mjesta prepoznavanja tRNA i ribozima: 5' vode a regija tRNA, 3'CCA kraj, te o uvane T C i D om e.

(Preuzeto iz Reiter i sur. 2010)

Ribosom je veliki ribonukleoproteinski kompleks koji katalizira reakciju prijenosa peptidila: -amino skupina aminokiseline na A mjestu napada  $sp^2$ -hibridiziran ugljikov atom karbonilne skupine aminokiseline na P mjestu, što rezultira nastankom amida i alkohola (Lilley 2003, Doudna i Lorsch 2005) (Slika 10.). Sa injavaju ga molekule RNA (dvije tre ine mase) i proteini (jedna tre ina mase). Molekule rRNA imaju centralnu poziciju u strukturi, a proteini se nalaze na površini kompleksa, okružuju RNA jezgru i popunjavaju šupljine izme u molekula RNA, dok samo neki pružaju dio polipeptidnog lanca prema jezgri (Slika

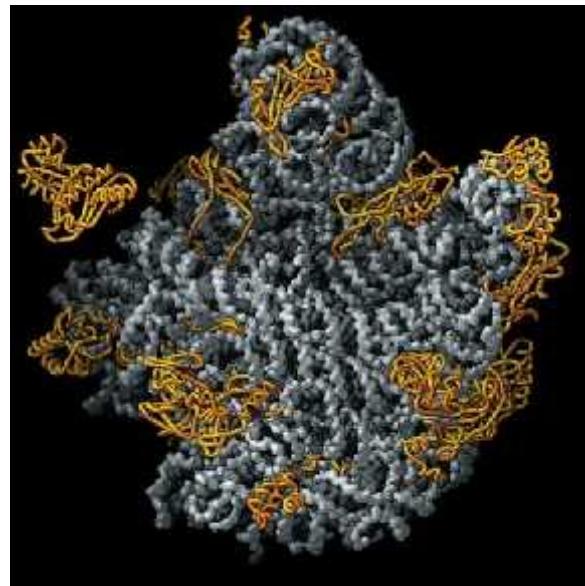
11.). Smatra se da proteini stabiliziraju RNA jezgru omogu uju i konformacijske promjene rRNA tijekom reakcije (Alberts i sur. 2008).

Dugo vremena se ribosom smatrao prevelikim za strukturne analize visoke rezolucije. Iako je još 1980. dobiven stabilni kristal 50S podjedinice ribosoma, tek 20 godina kasnije, 2000. godine su Ban i suradnici u asopisu *Science* objavili prvu kristalnu strukturu velike ribosomske podjedinice arheje *Haloarcula marismortui* u rezoluciji od 2,4 Å (opisano u preglednom radu Ramakrishnan 2002). Ova rezolucija je omogu ila da se lociraju molekule vode, metalni ioni i eventualne promjene baza, te je zna ila veliki uspjeh u strukturnoj biologiji i krajnji dokaz da kataliti ku aktivnost u sintezi proteina vrši molekula RNA (Ramakrishnan 2002, Lilley 2003). Naime, ribosom je kristaliziran s analogom prijelaznog stanja, tzv. „Yarus“ inhibitorom (C-C-dA-fosforamid-puromicin) koji ukazuje na aktivno mjesto, odnosno peptidil-transferazni centar. Jasno je vidljiva odsutnost proteinskih podjedinica u krugu od 18 Å od tog mesta, te analog okružen molekulom 23S rRNA (Ramakrishnan 2002, Lilley 2003). Grupa znanstvenika koja je riješila kristalnu strukturu 50S podjedinice je iste godine objavila i drugi rad kojim objašnjava mehanisti ke implikacije otkrivene kristalne strukture (Nissen i sur. 2000). Ribosom ubrzava reakciju za faktor  $10^7$  u odnosu na reakciju u otopini, što je rezultat kombinacije više razli itih kataliti kih strategija (Lilley 2003, Doudna i Lorsch 2005). Znanstvenici su ukazali na važnost pozicioniranja supstrata, odnosno tRNA na A i P mjestu pomo u 23S rRNA. Kao druga strategija predložena je stabilizacija prijelaznog stanja, na što direktno ukazuje struktura s „Yarus“ inhibitorom. Kao posljednji mehanizam predložena je uporaba kiselinsko-bazne katalize pomo u nukleobaze A2451 koja se nalazi dovoljno blizu analoga prijelaznog stanja da postoji mogu nost interakcije vodikovim vezama s prijelaznim stanjem. Da bi vršila tu funkciju, ova nukleobaza bi trebala biti protonirana na N3 i imati povišeni  $pK_a$ , što su dokazali pokusi pH-ovisne modifikacije dimetilsulfatom (Ramakrishnan 2002). Ipak, mutogeneza na ovoj poziciji je slabo utjecala na aktivnost, što je dovelo u pitanje ulogu ove baze u kiselinsko-baznoj katalizi (DeRose 2002, Strobel i Cochrane 2007). Metalni ioni nisu na eni u blizini aktivnog mesta; iako su  $Mg^{2+}$  ioni potrebni za peptidil-transferaznu aktivnost, oni ne sudjeluju direktno u mehanizmu reakcije (De Rose 2002, Strobel i Cochrane 2007). Ostalo je stoga otvoreno pitanje koji su preostali mehanizmi katalize koji pomažu ribosomu da dostigne izmjereni faktor ubrzanja reakcije. Nedavno je predložen model katalize pomo u supstrata koji je detaljnije opisan u poglavlju 3.5.



**Slika 10.** Reakcija prijenosa peptidila koju katalizira 23S rRNA velike podjedinice ribosoma.

(Preuzeto iz Voet i Voet 2011)



**Slika 11.** Lokalizacija proteinskih komponenata (zlatno) i rRNA (5S i 23S; sivo) u velikoj podjedinici bakterijskog ribosoma. Prikazana je strana koja stvara interakciju s malom podjedinicom.

(Preuzeto iz Alberts i sur. 2008)

### **3. KAKO RNA KATALIZIRA KEMIJSKE REAKCIJE?**

Uzimajući u obzir strukturna i kemijska ograničenja molekule RNA objašnjena u poglavlju 2.3., nameće se pitanje: kako molekula RNA uspijeva postići i ubrzati reakciju u rasponu  $10^5$ - $10^{11}$  u odnosu na reakcije u otopini (u nekim slučajevima skoro kao proteinski enzimi) (Doherty i Doudna 2001)?

Za početak, pokazano je da RNA može koristiti opću kiselinsko-baznu katalizu duši i bazama u slučajevima kada je okolina takva da omogućava znatnu promjenu u  $pK_a$  neke funkcionalne skupine baze (Doudna i Cech 2002; Doudna i Lorsch 2005). RNA je, u usporedbi s enzimima, puno manje pogodna za kovalentnu katalizu, jer najčešće stvara nekovalentne interakcije, mahom vodikove veze između lanaca nukleinskih kiselina. S druge strane, nije se dobiti da katalitičke RNA mogu i uspješno koristiti katalizu metalnim ionima. Osim toga RNA može, kao i proteini, vezati neke organske kofaktore i koristiti ih u katalizi (Strobel i Cochrane 2007). Zbog svoje kemijske prirode puno teže od proteinskih enzima kontrolira mikrookolinu aktivnog mesta, ali, na drugu stranu, uspješno koristi veznu energiju u katalizi, uključujući i interakcije udaljene od aktivnog mesta (Narlikar i Herschlag 1997). Stvaranjem nekovalentnih interakcija, RNA orijentira i pozicionira supstrate (supstrat može biti i dio iste molekule RNA) (Lilley 2003).

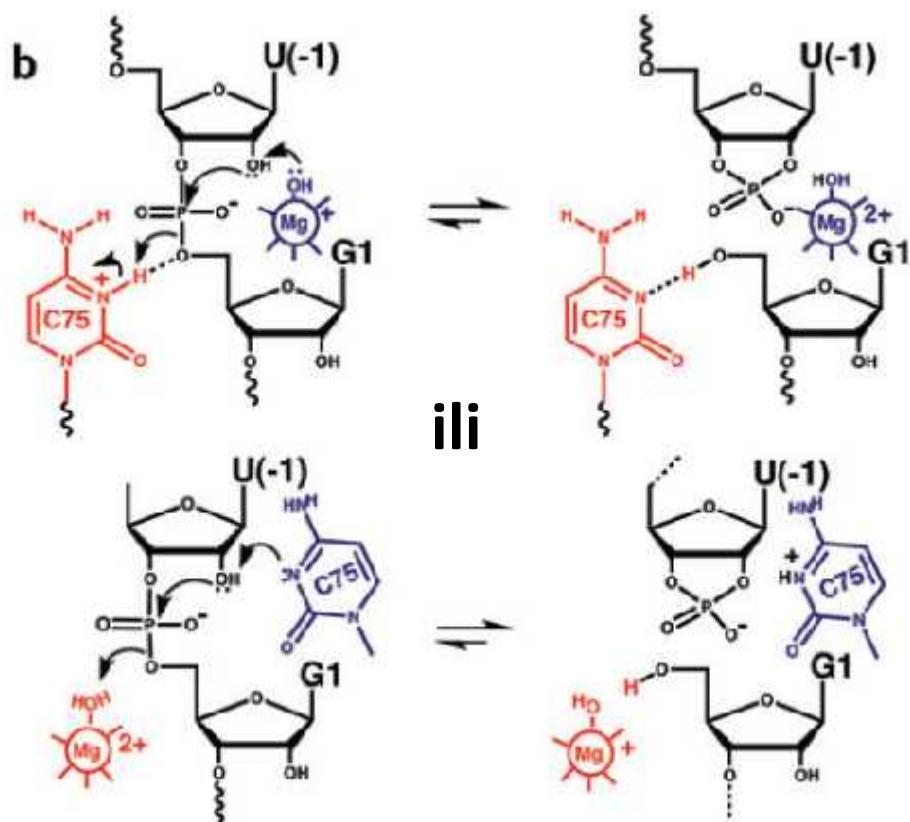
#### **3.1. Kiselinsko-bazna kataliza**

Molekula RNA ne raspolaže funkcionalnim grupama sa  $pK_a$  bliskim fiziološkoj pH vrijednosti koje bi mogle služiti kao dobri proton-donori i akceptorji u kiselinsko-baznoj katalizi (Narlikar i Herschlag 1997; Doudna i Lorsch 2005; Strobel i Cochrane 2007). Adenin i citozin mogu protonirati N1, odnosno N3 prstena, ali su  $pK_a$  vrijednosti 3,5 za adenin, odnosno 4,2 za citozin. To znači da su pri pH 7 ove duši ne baze već inom u disociiranom obliku. One su jake kiseline, ali pri fiziološkom pH je velik udio molekula u obliku konjugirane slabe baze koja ne može služiti u kiselinsko-baznoj katalizi. S druge strane, uracil i gvanin imaju previsoke  $pK_a$  vrijednosti – 9,8 za gvanin i 10,5 za uracil (Doudna i Cech 2002; Lilley 2003; Strobel i Cochrane 2007). Pri fiziološkom pH su ove baze mahom protonirane, ali sa slabim proton-donorskim svojstvima. Da bi RNA koristila kiselinsko-baznu katalizu  $pK_a$

vrijednosti nukleobaza bi trebale biti znatno pomaknute prema fiziološkoj pH vrijednosti. Znatne promjene u  $pK_a$  vrijednosti koje upu uju na mogunost kiselinsko-bazne katalize su pokazane NMR-om (Doudna i Cech 2002; Lilley 2003).

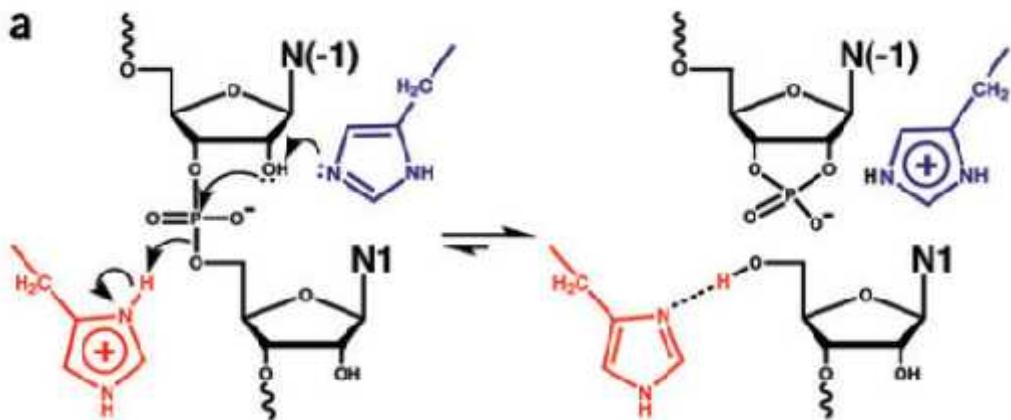
Riješena struktura ribozima iz HDV-a je otkrila da je katalitički esencijalan citidin C75 pozicioniran u blizini 5' hidroksila izlazeće skupine (Doudna i Lorsch 2005). Uz to, uočena je mreža vodikovih veza koje bi mogle stabilizirati protonirani oblik C75 i omogućiti ovoj bazi ulogu proton-donora ili proton-akceptora u reakciji (Doudna i Cech 2002) (Slika 12.). Daljnji pokušaji su potvrdili tu ulogu. Mutacijom C75 se brzina reakcije smanjuje za faktor  $10^5$ , približno jednako kao kod mutacije jednog histidina u ribonukleazi A, enzima koji katalizira istu reakciju kao HDV koristeći kiselinsko-baznu katalizu pomoći u dva histidina (Doudna i Lorsch 2005) (Slika 13.). Aktivnost ovako mutiranih ribozima se mogla djelomično povratiti dodatkom egzogenog imidazola koji može djelovati kao proton-donor ili proton-akceptor (Doudna i Cech 2002). Kinetički efekti izmjereni izotopima, uspoređivanje reakcijske  $pK_a$  sa  $pK_a$  raznih analoga imidazola ili baza kojima je zamijenjen C75 upu uju na to da C75 ima direktnu ulogu u prijenosu protona tijekom reakcije (Doudna i Cech 2002; Doudna i Lorsch 2005). Zaključeno je da se  $pK_a$  C75 mijenja tijekom reakcije, zato što nije uočena žadna promjena u  $pK_a$  u osnovnom stanju ni u produktu (Doudna i Cech 2002; Doudna i Lorsch 2005). Još su u tijeku istraživanja i debate o točnoj ulozi C75 u katalizi. Lilley u svom radu iz 2003. godine branii hipotezu da C75 djeluje kao optička kiselina sa  $pK_a$  blizu 6 (Lilley 2003; Stan Tsai 2006). S druge strane, Bevilacqua i Yajima nekoliko godina kasnije pišu o vjerojatnoj ulozi C75 kao optičke baze, uz hidratizirani magnezij koji služi kao optička kiselina (Bevilacqua i Yajima 2006).

RNA ima puno slabije sposobnosti kontroliranja mikrookoline aktivnog mjesta od proteina. Smatra se da bi RNA mogla postići takve promjene u  $pK_a$  svojih šest era ili baza na način da ih pozicionira u blizinu negativno nabijenog fosforilnog kisika ili pozitivno nabijenog metalnog iona.



**Slika 12.** Prikaz dva moguća mehanizma kiselinsko-bazne katalize kod HDV ribozima pomoću nukleobaze C75. U gornjoj slici C75 djeluje kao operatna kiselina (crveno), a dolje kao operatna baza (plavo). Reakcija uključuje nukleofilni napad 2'-OH skupine na susjedni atom fosfora uz nastajanje 2',3'-cikliskog fosfata.

(Preuzeto iz Doudna i Lorsch 2005)



**Slika 13.** Mehanizam ribonukleaze A u kojem dva histidina djeluju kao operatna kiselina (crveno) i operatna baza (plavo). Reakcija je analogna reakciji HDV ribozima prikazanoj na slici 12.

(Preuzeto iz Doudna i Lorsch 2005)

### **3.2. Kataliza metalnim ionima**

Svi poznati ribozimi su osjetljivi na ionsku jakost otopine u kojoj se nalaze, a razlog tome je esto potreba za stabilizacijom negativno nabijenih skupina molekule RNA metalnim kationima. Sklapanje sekundarnih i tercijarnih struktura RNA stvaranjem nekovalentnih interakcija esto rezultira približavanjem višestruko negativno nabijenih fosfata; bez njihove stabilizacije sklapanje viših razina strukture RNA ne bi bilo mogu e (DeRose 2002). Istraživanja kataliti ke uloge metalnih iona su otežana utoliko što je teško mjerenjima razlikovati strukturu od kataliti ke uloge metala (Narlikar i Herschlag 1997).

Dok proteini sadrže ograni en broj veznih mjesta za metale, RNA obiluje metalnim protuionima koordiniranim s okosnicom. Iako ta injenica otežava posao istraživa u, ona pove ava vjerojatnost da se neki od tih iona pravilno pozicionira za katalizu. Stvara se mnogo lokalnih veznih mjesta i potencijalnih aktivnih mjesta. Metalni ioni ne koordiniraju samo nabijene fosfate; mogu vezati i 2' hidroksilnu skupinu riboze, te kisike i dušike purinskih i pirimidinskih baza (Narlikar i Herschlag 1997).

Ve ina enzima koji kataliziraju reakcije prijenosa fosforilne skupine koriste metalne ione u katalizi (npr. sve poznate RNA- i DNA-polimeraze) (Narlikar i Herschlag 1997; Strobel i Cochrane 2007). O ito je takav mehanizam katalize pogodan za ovaj tip reakcije. S obzirom da ve ina danas postoje ih i otkrivenih ribozima katalizira prijenos fosforila, kataliza metalnim ionima je proširena me u ribozimima, a molekula RNA je efikasna u provo enju ovakvog tipa katalize. Možda se RNA zadržala kao katalizator nekih reakcija prijenosa fosforila zato što efikasno može provoditi katalizu metalnim ionima koja je podobna za takve reakcije.

Divalentni kationi metala teoretski mogu imati više uloga u katalizi. Mogu koordinirati molekule vode koje sudjeluju u kiselinsko-baznoj katalizi (Lilley 2003). U po etnom dijelu reakcije mogu aktivirati nukleofil deprotonacijom, ili koordinirati nukleofil kako bi on postao podložniji deprotonaciji nekim drugim spojem (Doherty i Doudna 2001). U ve uznapredovaloj reakciji metalni kationi mogu elektrostatski stabilizirati prijelazno stanje (Lilley 2003). Mogu imati ulogu i u stabilizaciji nabijene izlazne skupine protonacijom ili direktnom koordinacijom kisika (Doherty i Doudna 2001).

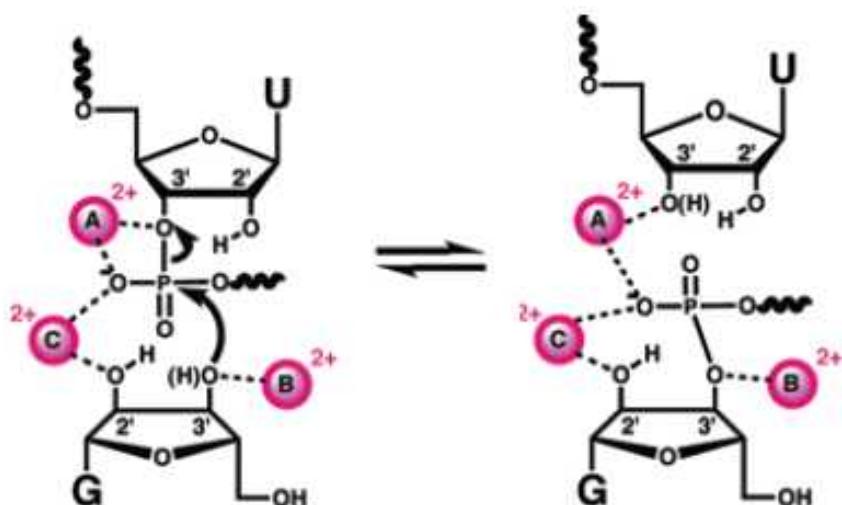
Kristalne strukture mogu dati uvid u položaj metalnih iona u reakcijskom stanju koje je kristalizirano. Na temelju blizine odre enih skupina katalizatora ili supstrata i metalnog iona se može spekulirati o eventualnoj kataliti koj ulazi metala. Egzaktnije informacije se dobivaju pokusima supstitucije kisika fosfatne skupine ili riboze sumporom ili amino skupinom, te

analiziranjem eventualnih promjena u efikasnosti reakcije zbog promijenjene specifičnosti vezanja metalnog iona (Doudna i Cech 2002). Najčešći su pokušaji fosforotioatne supstitucije i „spašavanja“ tiofilnim metalnim ionom. Jedan od kisika fosfatne skupine okosnice RNA za koji se smatra da je koordiniran metalnim ionom se supstituirala sumporom, tzv. elektronski „mekanim“ elementom (Strobel i Cochrane 2007).  $Mg^{2+}$  ion ima slabi afinitet za koordinaciju sumpora, pa se katalitička aktivnost bitno umanjuje ili inaktivira ako je supstituirana pozicija ina je koordinirana s metalom koji ima ulogu u katalizi (Strobel i Cochrane 2007). Krajnji dokaz je mogućnost „spašavanja“, odnosno varjanja aktivnosti RNA uz dodatak tiofilnog „mekog“ metala poput kadmija ili mangana koji koordiniraju sumpor s visokim afinitetom (Lilley 2003). Ipak, važno je oprezno interpretirati rezultate dobivene na ovaj način. Naime, supstitucija kisika većim atomom sumpora može uzrokovati redistribuciju naboja i lokalne konformacijske promjene molekule RNA, a dodani metali mogu kompenzirati nastalu konformacijsku promjenu (Narlikar i Herschlag 1997; DeRose 2002). Iako bi rezultati upućivali na metalni ion koji sudjeluje u katalizi, u ovom slučaju metalni ioni sudjeluju samo kao stabilizatori strukturnih nestabilnosti.

Jedna od situacija u kojima su rezultati fosforotioatnih supstitucija pružili varljive rezultate je slučaj *hammerhead* ribozima. Naime, kada se slobodni kisik fosfatne skupine na mjestu cijepanja RNA zamjeni sumporom, brzina reakcije ovisna o  $Mg^{2+}$  se smanjuje za faktor  $10^3\text{-}10^5$ . Aktivnost se može povratiti s  $Mn^{2+}$  i  $Cd^{2+}$  (DeRose 2002). Ovakvi rezultati su sugerirali znanstvenicima da metalni ioni direktno interagiraju s fosfodiesterom na mjestu cijepanja (Narlikar i Herschlag 1997). U *hammerhead* ribozimu postoji još jedno mjesto osjetljivo na fosforotioatne supstitucije, ali je ono daleko od aktivnog mesta u kristalnoj strukturi osnovnog stanja.  $^{31}P$  NMR je pokazao da kadmij koordinira supstituirani sumpor na tom mjestu udaljenom 20 Å od mesta cijepanja (DeRose 2002). Istim NMR pokušom je bilo vrlo teško, gotovo nemoguće detektirati interakciju kadmija sa sumporom supstituiranim na mjestu cijepanja (DeRose 2002). Nakon toga je predloženo da u prijelaznom stanju dolazi do značajne konformacijske promjene koja udaljenu regiju RNA s koordiniranim metalom približava mjestu cijepanja, no molekularno modeliranje i kinetičke analize podržavaju hipotezu da metalni ioni u slučaju ovog ribozima nemaju katalitičku, već strukturnu ulogu (Doudna i Lorsch 2005).

Ribozimi za koje je na više načina potvrđeno da koriste metalne ione u katalizi su introni grupe I. Steiz i Steiz su postavili model katalize pomoću dva metalna iona, u skladu s proteinskim enzimima koji kataliziraju reakcije prijenosa fosforilne skupine; prema ovom modelu jedan metal je trebao aktivirati nukleofil, a drugi stabilizirati izlaznu skupinu (Strobel

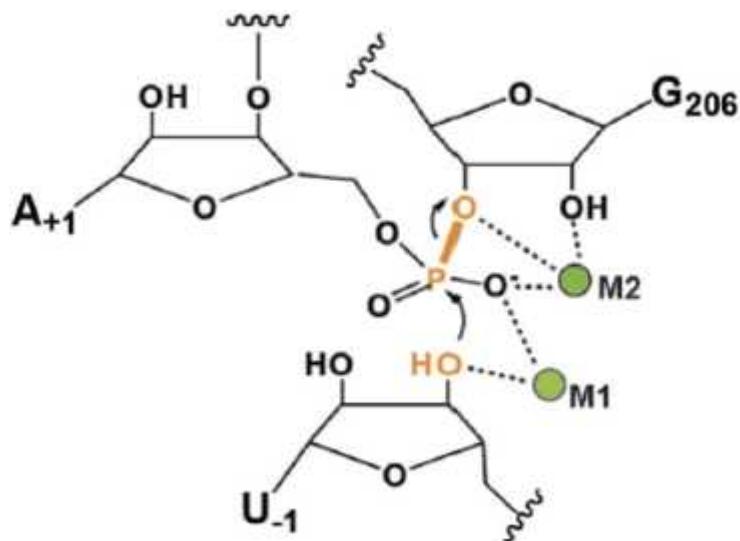
i Cochrane 2007). Fosforotioatne supstitucije su ovaj put pružile vrijedne informacije o položaju metalnih iona, te je predloženo da oni koordiniraju nukleofil, izlaznu skupinu, slobodni kisik na fosfatu koji se cijepa u reakciji, te 2'-OH skupinu susjednu izlaznoj skupini (Strobel i Cochrane 2007). Smatralo se da vjerojatno više od dva iona sudjeluju u koordinaciji tolikog broja skupina. Predložen je stoga mehanizam katalize s tri metalna iona (Slika 14.).



**Slika 14.** Mehanizam katalize reakcije introna grupe I pomoću tri metalna iona (A, B i C) predložen na temelju supstitucija kisika u aktivnom mjestu sumporom i amino skupinom.

(Preuzeto iz Doudna i Lorsch 2005)

Nakon što je dobiveno i analizirano više kristalnih struktura različitih stadija reakcije detektirana su ipak samo dva metalna iona koji koordiniraju sve četiri gore navedene skupine (Slika 15.) (Stahley i sur. 2007; Strobel i Cochrane 2007). Osim aktivacije nukleofila i stabilizacije, metali pomažu i u pozicioniranju supstrata (Doudna i Lorsch 2005). Uočljiva je analogija katalize dvama metalnim ionima kod introna grupe I i enzima koji kataliziraju reakcije prijenosa fosforilne skupine (DNA- i RNA-polimeraze) (Strobel i Cochrane 2007). Može se zaključiti da je ovakva struktura aktivnog mjesta i logika katalize nastala konvergentnom evolucijom barem dva puta neovisno, kod RNA i proteinskih katalizatora (Strobel i Cochrane 2007). Ovaj mehanizam katalize je priroda više od jednom došla do istog rješenja za ubrzavanje reakcija prijenosa fosforila, što govori o izrazitoj efikasnosti takvog mehanizma za ovaj tip reakcija.



**Slika 15.** Uloga dva metalna iona (M1 i M2 obojani zeleno) u katalizi reakcije introna grupe I. Reaktivne skupine i labilne veze su obojane naran asto.

(Preuzeto iz Strobel i Cochrane 2007)

### 3.3. Elektrostatska kataliza

Elektrostatska kataliza je mehanizam kojeg ribozimi primjenjuju u stabilizaciji nabijenog prijelaznog stanja (Lilley 2003). Kristalne strukture *hairpin* ribozima su ukazale na nekoliko purinskih baza koje bi mogle biti uklju ene u kiselinsko-baznu ili elektrostatsku katalizu (Doudna i Lorsch 2005; Bevilacqua i Yajima 2006). Strukture u kojima je kataliti ki kriti an G8 supstituiran razli itim analozima nisu uspjele pokazati u kojoj od navedenih dviju vrsta katalize on sudjeluje, ali su pokusi „spašavanja“ nukleobazama sugerirali da vjerojatno nije uklju en u kiselinsko-baznu katalizu (Doudna i Lorsch 2005; Bevilacqua i Yajima 2006). Na temelju mjeranja ovisnosti reakcije o pH je ustavljeno da dobiveni profil ovisnosti može biti rezultat korištenja protonirane baze u elektrostatskoj stabilizaciji naboja prijelaznog stanja, a ne prijenosa protona (Doudna i Lorsch 2005). Osim eventualne uloge u elektrostatskoj katalizi, G8 pomaže u pozicioniranju za katalizu i onemoguava neproduktivne konformacije osnovnog stanja (Bevilacqua i Yajima 2006).

Prema Coulombovom zakonu elektrostatske interakcije su to ja e što je niža dielektri na konstanta okoline. Hidrofobno središte i hidrofobni bo ni ogranci proteina, te pakiranje nabijenih i polarnih skupina u formirane trodimenzionalne strukture s ograni enom mogu noš u gibanja su faktori koji omogu avaju proteinima stvaranje i održavanje okoline niske dielektri ne konstante u aktivnom mjestu (Narlikar i Herschlag 1997). S obzirom da

RNA nema potpuno hidrofobne bo ne ogranke, ona ne može stvoriti okruženje dielektri ne konstante koja je usporediva s onom koju proteini mogu posti i u svom hidrofobnom središtu. K tome, slaba kemijska raznolikost raspoloživih reaktivnih skupina RNA i nabijena okosnica spre avaju dovoljno zbijeno pakiranje molekule, što omogu ava razli ite rearanžmane i pristup molekula vode koje pove avaju dielektri nu konstantu (Narlikar i Herschlag 1997). Velik broj veza okosnice koje dozvoljavaju slobodnu rotaciju omogu avaju kretanje polarnih i nabijenih skupina, što e tako er pove avati dielektri nu konstantu (Narlikar i Herschlag 1997). Zbog svih tih razloga je elektrostatska kataliza mnogo slabije zastupljena kod kataliti kih RNA nego što je to slu aj me u enzimima.

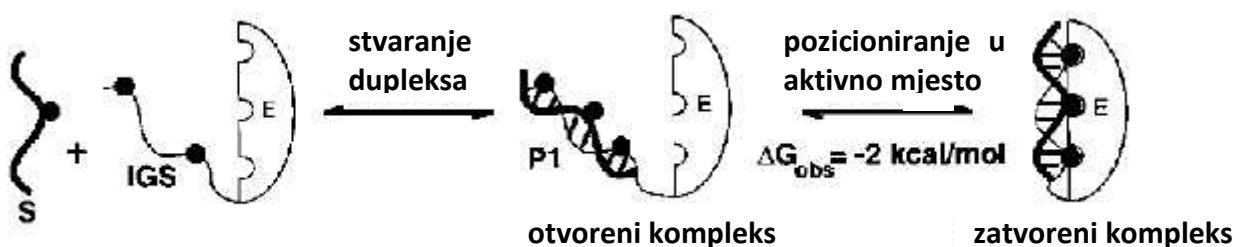
### **3.4. Vezna energija u katalizi**

Upotreba vezne energije u katalizi je op a zna ajka bioloških katalizatora. Rigidnost strukture omogu ava postizanje maksimalne specifi nosti interakcija s prijelaznim stanjem u odnosu na osnovno stanje (Narlikar i Herschlag 1997). Proteini su po tom pitanju u znatnoj prednosti zbog ve navedenih razloga koji ine molekulu RNA labilnije pakiranom i op enito fleksibilnjom. Predloženo je da zbog tog razloga molekule RNA moraju biti ve e, što omogu ava stvaranje ve eg broja interakcija, da bi postigle isti stupanj rigidnosti aktivnog mesta kao mnogo manje molekule proteina (Narlikar i Herschlag 1997). To bi mogao biti i jedan od razloga zašto su veliki ribozimi (introni grupe I, RNaza P, ...) kataliti ki djelotvorniji od malih (*hammerhead*, HDV, ...); faktor ubrzanja katalizirane reakcije u odnosu na nekataliziranu dostiže  $10^{11}$  za velike ribozime, a samo  $10^6$  za male (Narlikar i Herschlag 1997).

Dobar primjer korištenja vezne energije u katalizi u svijetu kataliti kih RNA je intron grupe I iz *Tetrahymena*. Dio RNA koji predstavlja supstrat stvara dupleks s unutarnjim vode im slijedom nukleotida (*internal guide sequence*, IGS) kataliti kog introna (Narlikar i Herschlag 1997). Nastala P1 uzvojnica ulazi u tercijarne interakcije s drugim dijelovima ribozima stvaraju i rigidniju kataliti ki aktivnu strukturu. No, energetski doprinos tercijarne stabilizacije je mnogo manji nego što bi se zaklju ilo zbrajanjem doprinsa pojedina nih interakcija (Slika 16.). Pretpostavlja se da postoji energetska barijera za pozicioniranje P1 uzvojnica u aktivno mjesto, i ona se kompenzira veznom energijom tercijarnih interakcija (Narlikar i Herschlag 1997). U ovom slu aju vezna energija služi u pozicioniranju supstrata.

Kao što je već ranije navedeno, i metalni ioni pridonose uspješnom pozicioniranju kod ovog ribozima.

Mjerenja su pokazala i da je tercijarna stabilizacija oligonukleotida analognog supstratu vezanog u aktivnom mjestu 40 puta bolja za oligonukleotid kojemu nedostaje fosfodiesterska veza koja se cijepa u odnosu na cjeloviti supstrat. To upućuje na destabilizirano osnovno stanje u odnosu na produkt (Narlikar i Herschlag 1997). Destabilizaciji osnovnog stanja pridonosi i koordinacija iona  $Mg^{2+}$  s 3' kisikom izlazne skupine (Slika 15.); u osnovnom stanju je prisutna fosforilna skupina koja privlaže elektrone, pa je postoji a interakcija s metalom slabija i nepovoljnija od interakcije kisika izlazne skupine s vodom (Narlikar i Herschlag 1997) (interakcija s vodom se uzima za usporedbu; to znači da je interakcija koja se formirala u osnovnom stanju nepovoljnija od interakcije koja je postojala u otopini između supstrata i vode). U prijelaznom stanju 3' kisik izlazne skupine dobiva parcijalni negativni naboj, a veza s fosforilnom skupinom slabiji ili je već prekinuta, što uzrokuje znatnu stabilizaciju ove interakcije u odnosu na osnovno stanje i na interakciju s vodom. Ove i slike interakcije stabilizacije prijelaznog stanja uz destabilizaciju osnovnog stanja pridonose za faktor  $10^4$  ukupnom faktoru ubrzanja reakcije ovim ribozimom ( $10^{11}$ ) (Narlikar i Herschlag 1997).



**Slika 16.** Upotreba vezne energije za pozicioniranje supstrata i destabilizaciju osnovnog stanja. S je supstrat koji, vežući se za IGS introna, formira P1 uzvojnicu koja stvara tercijarne interakcije s drugim dijelovima ribozima. Zbroj tercijarnih interakcija bi bio  $-11,0 \text{ kcal mol}^{-1}$ , ali je u ena tercijarna stabilizacija samo  $2 \text{ kcal mol}^{-1}$ .

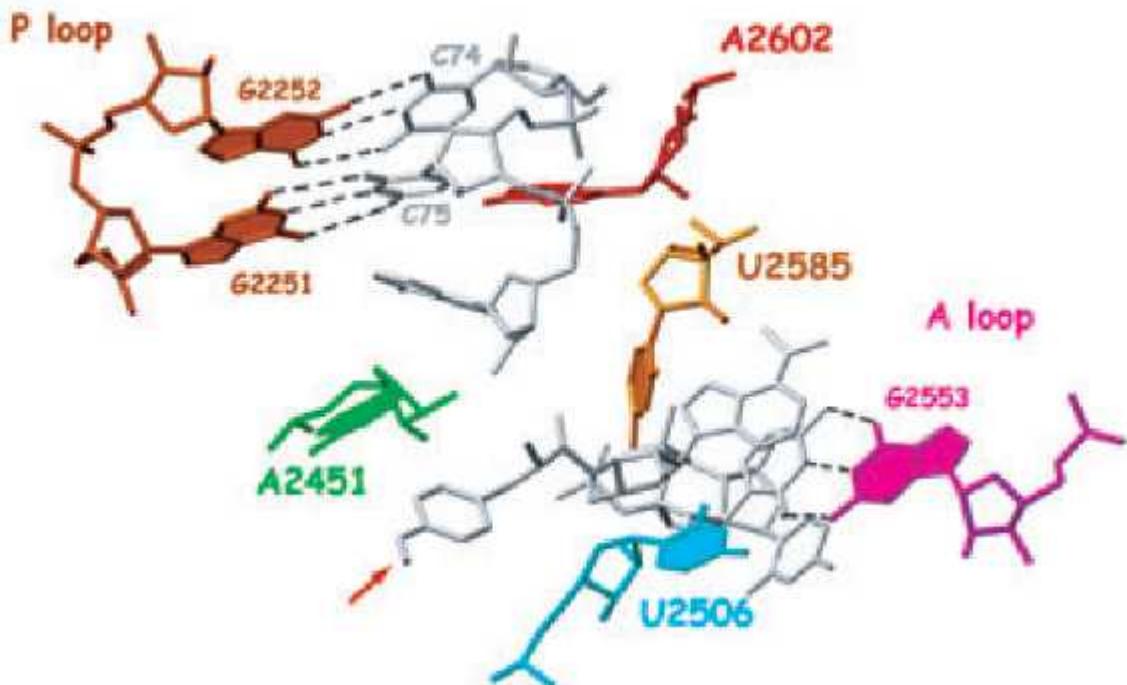
(Preuzeto iz Narlikar i Herschlag 1997)

### 3.5. Ostali mehanizmi katalize

Kovaletna kataliza kod ribozima je u ena kod introna grupe I iz *Tetrahymena* nakon što je RNA modificirana u pravi katalizator sa sposobnošću obrta. Narlikar i Herschlag u radu iz 1997. g. navode korištenje 1. razreda kovalentne katalize (nukleofil enzima je po strukturi i

reaktivnosti slijan terminalnom akceptoru). Smatraju da nukleofilni G djeluje kao intermedijarni akceptor prije nego što se potpuno prenese na oligonukleotid transesterifikacijom (Narlikar i Herschlag 1997). Ovo je jedan od rijetkih podataka u literaturi koji upu uje na upotrebu kovalentne katalize od strane ribozima. Zbog ve navedenih razloga RNA nije sklona stvaranju kovalentnih interakcija.

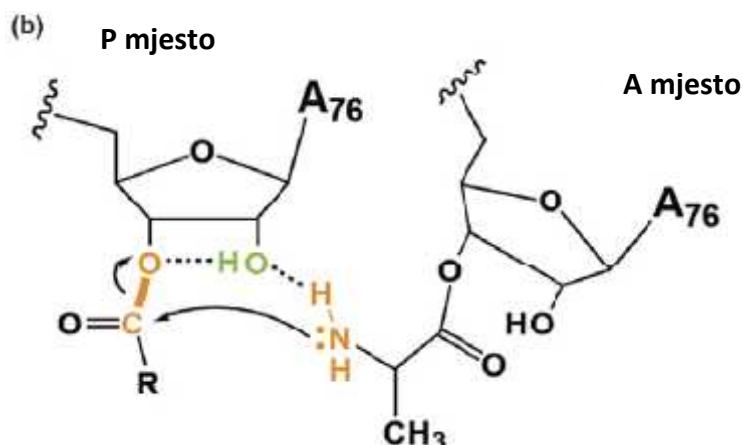
Jedan posebno zanimljiv na in katalize uo en na primjeru ribosoma je supstratom potpomognuta kataliza. Mjerenja su pokazala da zamjena ili delecija nukleotida A76 tRNA na P mjestu, odnosno posljednjeg nukleotida na 3' kraju peptidilne tRNA, rezultira potpunim gubitkom peptidil-transferazne aktivnosti (Strobel i Cochrane 2007). Doprinos ovog nukleotida u katalizi je ve i od doprinosa bilo kojeg nukleotida ribosomalne RNA (Slika 17.). 2'-OH skupina riboze A76 je pozicionirana izme u nukleofilne amino-skupine aminokiseline vezane na tRNA u A mjestu i vlastitog 3' kisika (izlazna skupina) (Strobel i Cochrane 2007) (Slika 18.). S obzirom da je  $pK_a$  2'-OH skupine vrlo visok (~12), a ništa u strukturi aktivnog mjesta ribosoma ne upu uje na mogu nost da se taj  $pK_a$  bitno smanji, u tijeku su istraživanja koja bi mogla otkriti na koji na in ova skupina sudjeluje u katalizi (Strobel i Cochrane 2007). Unato nejasnom mehanizmu, ostaje vrlo zanimljiva injenica koja je otkrivena na ovom primjeru: funkcionalna skupina supstrata (koji je tako er RNA) može zna ajno sudjelovati u katalizi.



**Slika 17.** Prikaz aktivnog mjesta ribosoma. A mjesto je obojano ljubi asto, a P mjesto sme e. Ove petlje su u interakciji s tRNA supstratima (sivo). Aminokiselina vezana za tRNA u A mjestu je ozna ena crvenom

strjelicom. Peptid u nastanku nije prikazan. U P mjestu nakon C74 i C76 slijedi A76 nukleotid za koji se predlaže uloga u katalizi. Nukleotidi A2451, U2506, U2585 i A2602, unatoč položaju u aktivnom mjestu, nemaju toliki učinak na katalizu.

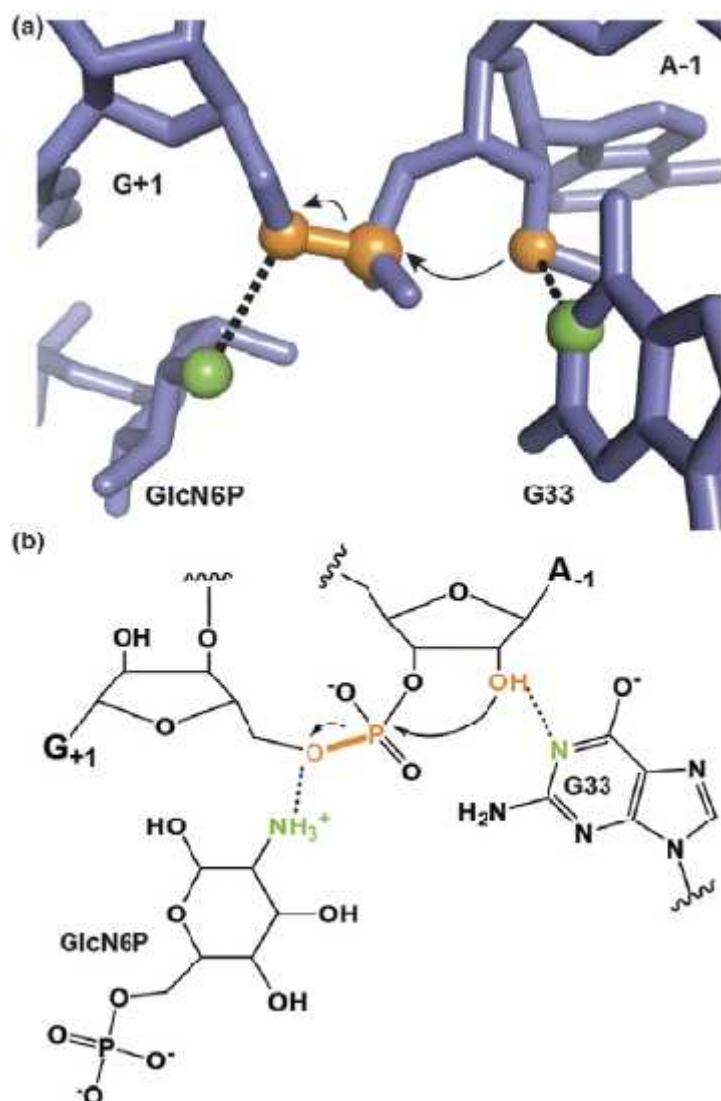
(Preuzeto iz Doudna i Lorsch 2005)



**Slika 18.** Predloženi mehanizam reakcije u aktivnom mjestu ribosoma uz sudjelovanje A76 tRNA.

(Preuzeto iz Strobel i Cochrane 2007)

Poput proteina, i kataliti ke RNA mogu koristiti kofaktore u katalizi. To je dokazano *in vitro* selekcijom (Narlikar i Herschlag 1997), a zanimljiv primjer u prirodi je *glmS riboswitch* koji se nalazi 5' od gena za glukozamin-6-fosfat sintetazu. U prisutnosti glukozamin-6-fosfata (GlcN6P) ovaj ribozim cijepa vlastitu mRNA i na taj način smanjuje ekspresiju tog proteina (Strobel i Cochrane 2007). Ova molekula nije tipični *riboswitch* koji konformacijskom promjenom u prisutnosti liganda utječe na transkripciju ili translaciju (npr. stabilizirajući aktivnu konformaciju ribozima koja cijepa vlastitu mRNA). Istraživanja su pokazala da ligand u ovom slučaju direktno sudjeluje u katalizi (Slika 19.).  $pK_a$  vrijednost amino skupine glukozamin-6-fosfata podržava tezu da glukozamin-6-fosfat sudjeluje u prijenosu protona; nije još poznato djeluje li kao baza aktivirajući nukleofil ili kao kiselina aktivirajući izlaznu skupinu (Strobel i Cochrane 2007).



**Slika 19.** Autokatalitičko cijepanje RNA *glmS* ribozima uz kemijsko sudjelovanje liganda GlcN6P.

a) Prikaz aktivnog mesta. b) Reakcijski mehanizam. G33 je važan za reakciju, ali nije potpuno jasna njegova uloga.

(Preuzeto iz Strobel i Cochrane 2007)

## **4. IZREZIVANJE INTRONA IZ PRIMARNIH TRANSKRIPATA**

Transkripcijom DNA slijeda u RNA nastaju primarni transkripti koji nisu nužno funkcionalni. Naj eš e je potrebna jedna ili više posttranskripcijskih modifikacija da bi se primarni transkript preveo u zrelu molekulu RNA. Ovakve modifikacije uklju uju endonukleoliti ko ili egzonukleoliti ko odcjepljivanje odre enog segmenta RNA, dodatak jednog ili više nukleotida na 5' ili 3' kraj RNA, ili kemijsku modifikaciju nukleozida unutar molekule RNA (Voet i Voet 2011). Primarni transkripti tRNA i rRNA su naj eš e modificirani nukleazama koje izrežuju iz njih kra e sljedove koji e postati funkcionalne RNA, ili koje ure uju krajeve RNA (npr. RNaza P ure uje 5' kraj tRNA). tRNA i rRNA esto podliježu i modifikaciji baza modificiraju im enzimima. Prokariotske mRNA naj eš e ostaju nepromijenjene, što omogu uje da translacija te e usporedno s transkripcijom. Zbog toga se dugo mislilo da su svi geni kontinuirani. 1977. je šokiralo otkri e da ve ina eukariotskih gena (i neki prokariotski) sadrže nekodiraju e nukleotidne sljedove – introne (Nelson i Cox 2008). Štoviše, u viših eukariota ve i dio genoma otpada na introne nego na eksone (kodiraju e regije gena). Eukariotske pre-mRNA, nakon dodavanja m<sup>7</sup>G kape na 5' kraju i poli-A repa na 3' kraju, moraju pro i kroz proces izrezivanja introna i ligacije eksona. Neke rRNA i tRNA koje sadrže introne tako er moraju pro i ovakvu obradu.

Mogu e je razlikovati etiri skupine introna. Introni grupe I i introni grupe II su samoizrežuju i, a njihov mehanizam je ukratko bio opisan u 2. pogavlju. Hidroliza molekule s visokoenergetskim vezama (ATP, GTP) nije potrebna za njihovo izrezivanje zato što je svaki korak ligacije sparen s reakcijom cijepanja, stoga se nova veza stvara na teret kidanja stare veze, što omogu ava energetsku ravnotežu (Kruger i sur. 1982; Nelson i Cox 2008). Tre a, najve a skupina introna uklju uje introne jezgrinih pre-mRNA koji nisu samoizrežuju i, ve doradu vrši ribonukleoproteinski kompleks *spliceosome*. Posljednju, etvrtu skupinu ine introni nekih tRNA ija obrada uklju uje endonukleazu koja cijepa fosfodiesterske veze s obje strane introna i ATP koji sudjeluje u reakciji ligacije eksona (Nelson i Cox 2008).

Postojanje introna je opravdano s dva gledišta: promatrano evolucijski, postojanje takvih slijedova unutar gena omogu ava lakše nastajanje raznovrsnijih kombinacija kod postanka novih gena koji kodiraju proteine. S druge strane, oni daju i trenutnu prednost: introni mnogih

gena se mogu izrezivati na različite načine, što je često tkivno-specifično, a rezultira time da se jedan gen može translatirati u više različitih proteina, što uvelike povećava kodirajući potencijal genoma (Alberts i sur. 2008).

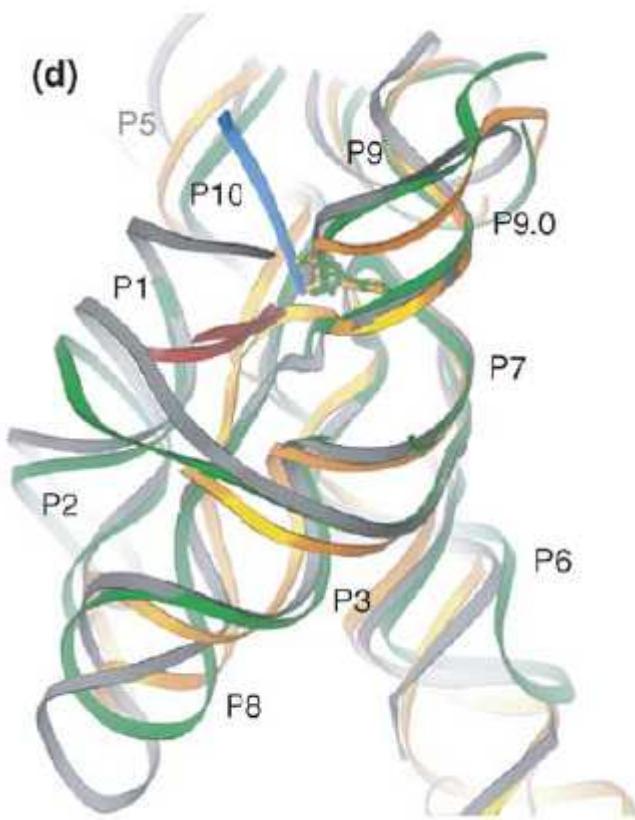
#### **4.1. Introni grupe I – počeci istraživanja**

U radu iz 1982. godine Kruger i suradnici objavljaju da je sposobnost izrezivanja introna (IVS – *intervening sequence*) i spajanja eksona u nezreloj 26S rRNA kod vrste *Tetrahymena thermophila* intrinzična struktura molekule RNA. Autori navode nekoliko svojstava ovog introna koji ga imaju sličnost enzimu. Za početak, snižava energiju aktivacije za reakcije kidanja i stvaranja veza. Osim toga, aktivnost ovisi o tome na kojoj strukturi, a gubi se pri visokim temperaturama ili koncentracijama formamida i uree. Takođe, IVS ima specifično vezno mjesto za G kofaktor. I na kraju, dvije ili više domena molekule RNA stvaraju aktivno mjesto koje ne dozvoljava pristup vodi. Ipak, jasno je naglašeno da se IVS ne može smatrati pravim enzimom zbog toga što ovaj intron izrezuje samog sebe, nakon čega nije u stanju katalizirati nove reakcije izrezivanja introna i povezivanja eksona (Kruger i sur. 1982).

Još u ranijim radovima je bilo navedeno da se IVS cirkularizira nakon što biva izrezana kao linearna molekula, a 1982. je ponovno objavljen eksperimentalni dokaz u obliku gelova na kojima je vidljiva razlika u elektroforetskoj pokretljivosti linearne i cirkularne oblike molekule. Objavljen je i eksperimentalni dokaz da se eksoni ligiraju nakon ekskizije IVS-a: nakon izlaganja uvjetima koji potiču ekskiziju, molekuli je omogućena hibridizacija s rDNA komplementarnoj po sljedu nukleotida RNA supstratu bez introna. Nakon uklanjanja jednolanih dijelova elektroforetski je bilo moguće vizualizirati veliki broj hibridiziranih dijelova – ligiranih eksona (Kruger i sur. 1982). Autori spomenutog rada idu i korak dalje nagrađujući i o postojanju drugih katalitičkih RNA. Vrlo proučljivo su navode kako pre-mRNA vjerojatno nisu samoizrežuće, ali postoje mogućnosti da u izrezivanju njihovih introna sudjeluju mali jezgrini RNP-ovi koji se mogu ubrajati u ribozime ako njihova RNA domena sudjeluje u katalizi. Na ovaj način autorи otvaraju mogućnosti postojanja ribozima koji djeluju *in trans*.

#### **4.2. Introni grupe I – struktura**

etiri različite kristalne strukture introna grupe I su poznate: struktura introna iz *Azoarcus* (pri rezoluciji od 3,1 Å i 3,4 Å) i *Tetrahymena* (3,8 Å), te struktura introna iz faga Twort (3,6 Å) (Stahley i sur. 2007). Unatoč tome što su strukture dobivene iz introna s različitim modifikacijama, a posljedica toga je i nepostojanje nekih metalnih iona u strukturi u nekim slučajevima, jasno je da svi ovi introni stvaraju slike sekundarne i trodimenzionalne strukture (Slika 20.).



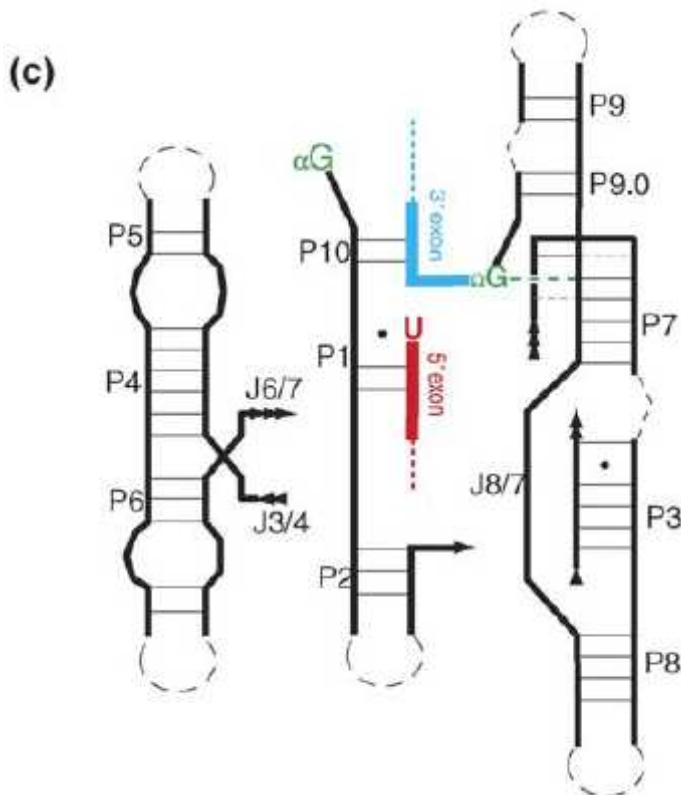
**Slika 20.** Superpozicija strukture introna grupe I iz *Azoarcus* (sivo), *Tetrahymena* (žuto) i faga Twort (zeleno).

Vanjski G je prikazan u obliku kuglica i štapića i označava aktivno mjesto. Plavo je prikazan 3'ekson iz *Azoarcus*, a crveno 5' eksoni iz *Azoarcus* i Twort.

(Preuzeto iz Stahley i Strobel 2006)

Katalitičko središte introna grupe I je velikim dijelom zaštićeno od prodiranja otapala. Sastoji se od dviju skupina zavojnica koje su vrlo održavane: P5-P4-P6 i P7-P3-P8. U utoru između njih se veže P1, odnosno uzvojnica supstrata i IGS koja ostvaruje tercijarne interakcije s regijama J6/7, J4/5 i J8/7 (J dolazi od *joiner regions* – regije koje povezuju uzvojnice) (Doherty i Doudna 2001; Stahley i sur. 2007) (Slika 21.). Većina introna grupe I ima periferne elemente i tada delecija ne inhibira samoizrezivanje, ali ga čini manje efikasnim.

To su dijelovi regija P9.0 i P9, te P2 na slici 21. (Doherty i Doudna 2001). Funkcija ovakvih elemenata je stabilizacija katalitičkih središta.

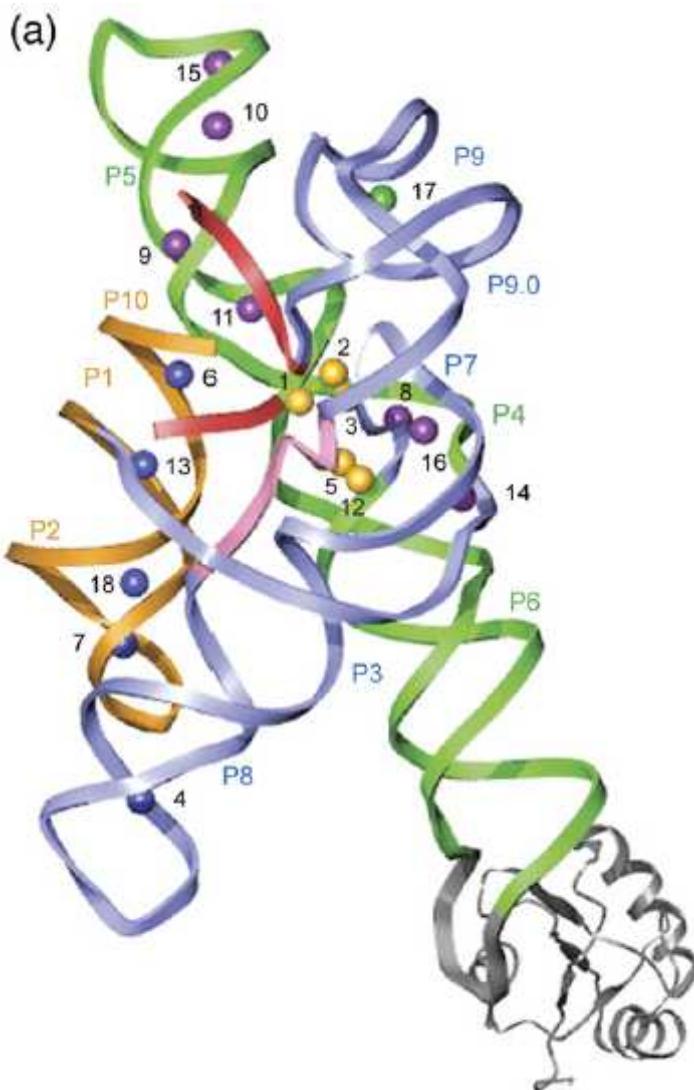


**Slika 21.** Sekundarna struktura introna grupe I. Ouvane interkacije su označene tankim crnim linijama, a varijabilne regije iscrtkanim linijama. 5' ekson je crven, a 3' ekson plavo označen. Prikazano je stanje nakon prve transesterifikacijske reakcije, kada je G s 3' eksona zamijenio vanjski G u G-veznom mjestu.

(Preuzeto iz Stahley i Strobel 2006)

Kristalna struktura introna iz *Azoarcus* je otkrila položaj 18 metalnih iona ( $Mg^{2+}$  i  $K^+$ ). S obzirom na očuvanost strukture karakteristичne za introne grupe I, otkriva se da otkrivena vezna mjesta za metale postoje i u ostalim intronima ove skupine (Stahley i sur. 2007). Pet metalnih iona se nalaze duboko u strukturi ribozima i formiraju metalnu jezgru, a svaki se nalazi na manje od 12 Å od veze koja podliježe cijepanju (Slika 22.). Stvaraju mnoge interakcije s kisicima iz fosfata i šefera, a pozicionirani su na način da zasjenjuju negativni naboj fosfata, pozicioniraju nukleotide iz različitih strukturalnih elemenata unutar aktivnog mesta i/ili sudjeluju u samom prijenosu fosforila (Stahley i sur. 2007). U ovih pet metalnih iona spadaju i M1 i M2 koji su primarno katalitički, iako pomažu i u stvaranju pogodne strukture aktivnog mesta. Aktivno mjesto se sastoji od regija J6/7, J4/5 i J8/7, te tri nukleotida supstrata koji negativni naboji fosfata stvaraju veliku koncentraciju nabaja u blizini veze koja podliježe cijepanju (Stahley i sur. 2007). Katalitički magnezijevi ioni stvaraju interakcije sa svim ovim

komponentama stvaraju i okolinu pogodnu za odvijanje reakcije. Ostali ioni metalne jezgre ne stvaraju interakcije u samom aktivnom mjestu, ali su bitni za aktivnost jer su ključni u interakcijama između pojedinih J regija i sklapanju odrvenih sekundarnih struktura (Stahley i sur. 2007). Domena P4-P6 je strukturno vrlo bitna jer se ostale dvije uzvojnice (P1 i P7-P3-P8) pozicioniraju u njezin veliki i mali utor. Četiri od pet metala jezgre, te još sedam dodatnih metala stvaraju interakcije s tom domenom (Stahley i sur. 2007) (Slika 22.).



**Slika 22.** Raspored metalnih iona u kristalnoj strukturi introna grupe I iz *Azoarcus*. Metali koji čine metalnu jezgru su narančasti (M1-M3, M5 i M12). Tu spadaju i katalitički ioni M1 i M2. Metalni ioni smješteni u regijama P10-P2 i P8 su plavi. P4-P6 uzvojnicu koordiniraju metali obojeni ljubičasto, ali i četiri od pet metala koji čine metalnu jezgru. Metali u perifernim regijama P9.0-P9 su označeni zeleno.

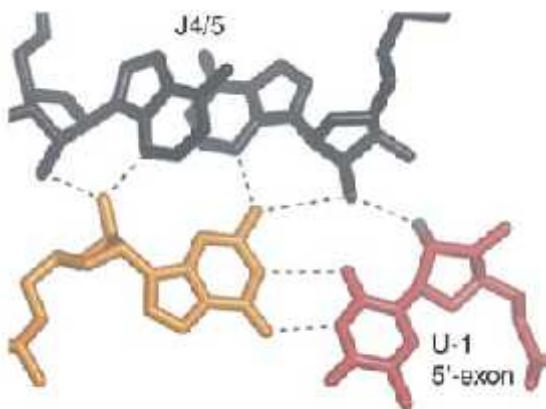
(Preuzeto iz Stahley i sur. 2007)

#### **4.3. Introni grupe I – odabir mesta cijepanja**

Irezivanje introna mora biti krajnje to no. Cijepanje fosfodiesterske veze na na in da jedan od eksona sadrži jedan nukleotid viška ili manjka e zna iti pomak okvira itanja u translaciji i nastanak nefunkcionalnog proteina. Jasno je, dakle, koliko je presudna sposobnost selektiranja to nih dviju veza koje treba cijepati izme u stotina fosfodiesterskih veza u slijedu nukleotida RNA.

5' mjesto cijepanja se prepoznaje zahvaljuju i stvaranju jednog kolebljivog baznog para izme u terminalnog nukleotida 5'eksona, U-1, i specifi nog G unutar introna. Oba nukleotida su o uvana. Uzvojnica supstrata, P1, stvara interakcije s A bogatim regijama J4/5 i J8/7 koje se smatraju važnima za selekciju mesta cijepanja. Na J4/5 se nalazi receptor kolebljivog para koji se sastoji od dva A·A bazna para, a prepoznaje egzocikli ni amin gvanina i 2'-OH še era gvanozina iz G·U-1 kolebljivog para baza (Stahley i Strobel 2006) (Slika 23.). Osim veze izme u G i U-1, ekson i intron stvaraju i druge interakcije. Ve spomenuti IGS nukleotidni slijed introna je uvijek komplementaran odre enom broju nukleotida (oko 6) na regiji 5' eksona koja prethodi intronu (Garriga i sur. 1986). Ove interakcije nisu o uvane i nukleotidni sljedovi su varijabilni kod razli itih vrsta introna.

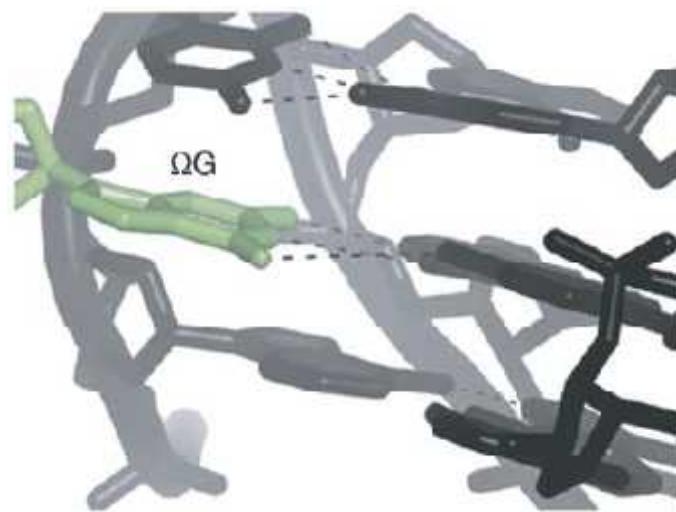
Vezno mjesto za 5' ekson mora biti dobro definirano jer njegova fiksna pozicija u odnosu na G-vezno mjesto omogu ava selekciju veze koja treba biti pocijepana. Osim toga, vezno mjesto orijentira 5' ekson na pravilan na in prema 3' mestu cijepanja na na in da se, nakon napada vanjskog G i osloba anja 3'-OH nukleofila, ligacija eksona može odvijati uz sniženu energiju aktivacije zbog blizine i me usobne orijentacije supstrata (Garriga i sur. 1986). Važno je da 5' ekson ne disocira izme u prve i druge transesterifikacijske reakcije. Kada bi bio vezan samo Watson-Crickovim interakcijama on bi napustio aktivno mjesto prije završetka kemijskog koraka, ak i bez ubrajanja vremena potrebnog za konformacijske promjene izme u dva koraka. No, smatra se da tercijarne interakcije znatno usporavaju disocijaciju 5' eksona i omogu avaju da on ostane vezan svo vrijeme potrebno za odvijanje obiju reakcija transesterifikacije (Narlikar i Herschlag 1997).



**Slika 23.** Selekcija 5' mesta cijepanja. Kolebljivi bazni par G-U-1 je prepoznat od strane A u J4/5 regiji introna.

(Preuzeto iz Stahley i Strobel 2006)

U selekciji 3' mesta cijepanja sudjeluje o uvani terminalni G introna (to je nukleotid koji se veže u G-vezno mjesto u drugoj transesterifikacijskoj reakciji). On stvara triplet s G-C parom u uzvojnici P7 (Slika 21.) (Stahley i Strobel 2006). Ovaj triplet se pozicionira između druga dva triplata P7 zavojnice koja na taj način stvara G-vezno mjesto (Slika 24.). Stoga terminalni G introna je selektiran vodikovim vezama, ali i hidrofobnim interakcijama među bazama (*stacking*) (Stahley i Strobel 2006). Še er ovog G nukleotida ostaje stršiti u katalitičko središte gdje sudjeluje u mehanizmu reakcije. Vezanje G u svoje vezno mjesto ide u dva koraka: po etno nespecifično vezanje inducira konformacijsku promjenu koja pozicionira G u aktivnu orijentaciju (Stahley i Strobel 2006).



**Slika 24.** Terminalni G introna (G) stvara triplet s G-C baznim parom u uzvojnici P7, u središtu G-veznog mesta. Ispod i iznad je nukleotid prepoznat zahvaljujući i *stacking* interakcijama.

(Preuzeto iz Stahley i Strobel 2006)

#### **4.4. Introni grupe I – rezultati kinetičkih analiza**

Analizirana je reakcija analogna prvoj transesterifikacijskoj rekaciji introna grupe I, tj. reakcija cijepanja oligonukleotida G<sub>2</sub>CCCUCUA<sub>5</sub> pomoću vanjskog G katalizirana kroz oblik IVS (L-21 *Scal* RNA). Zamjene ene vrijednost  $k_{\text{cat}}/K_m$  je bila  $(9 \pm 3) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ , što je bilo vrlo blizu izračunatoj vrijednosti (Herschlag i Cech 1990b). Zamjena G s GTP nije imala nikakav utjecaj na tu vrijednost. Kemijski korak ( $k_c = 350 \text{ min}^{-1}$ ) se pokazao mnogo bržim od disocijacije supstrata iz kompleksa s ribozimom i G kofaktorom ( $k_{\text{off}} = 0,2 \text{ min}^{-1}$ ), što znači da je supstrat reagirati praktički svaki put kada se veže za ribozim. Stoga korak koji ograničava brzinu reakcije u uvjetima nepotpune zasićenosti supstratom je vezanje supstrata (Herschlag i Cech 1990b). U uvjetima zasićenosti ribozima supstratom, ograničavajući korak se događa nakon kemijskog. To je zaključeno iz injenice da su konstante brzine za nestajanje supstrata u jednom obrtu katalizirane mnogo veće od  $k_{\text{cat}}$  (Herschlag i Cech 1990b). *Pulse-chase* pokusom dobivene vrijednosti konstante brzine disocijacije produkta (oligonukleotida koji je sparen s IGS slijedom introna) su se pokazale jednakima vrijednosti  $k_{\text{cat}}$  ( $\sim 0,1 \text{ min}^{-1}$ ) (Herschlag i Cech 1990b). To je, dakle, korak koji ograničava brzinu reakcije pri uvjetima zasićenosti ribozima supstratom. Spora disocijacija produkta prve reakcije ima bitnu ulogu u samoizrezivanju s obzirom da ona, kao što je već ranije naglašeno, onemoguće preranu disocijaciju 5' eksona.

Dokazano je i da je vezanje G i supstrata na ribozim neovisno i nasumično. Bilo koji se može prvi vezati za ribozim, a vezanje jednog ne pogoduje ni na koji način vezanje onog drugog. Nema kooperativnosti niti strukturne nužnosti za vezanjem određenim redoslijedom (Herschlag i Cech 1990b). Vezanje oligonukleotidnog supstrata za vezno mjesto za 5' ekson je bilo  $10^4$  puta jačeg nego što je bilo očekivano ( $K_d = 2 \text{nM}$ ), što dokazuje da u vezanju, osim Watson-Crickovih interakcija, sudjeluju i dodatne tercijarne interakcije (Herschlag i Cech 1990b).

Dobivene konstante asocijacije supstrata, odnosno produkata i ribozima su bile u redu velike  $10^7 - 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ , što je mnogo manje od granice difuzije malih molekula ( $10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ). I za proteinske enzime je ova konstanta niža od granice difuzije ( $10^8 - 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) zbog otežane dostupnosti veznog mesta za supstrat (Herschlag i Cech 1990b). Kod RNA katalizatora su izmjerene konstante asocijacije supstrata vrlo bliske vrijednostima za stvaranje zavojnice između dva oligonukleotida. Te su vrijednosti niže od difuzijske konstante za male molekule jer mnogi sudari oligonukleotida ne rezultiraju stvaranjem zavojnice zbog ester-

neuspješne nukleacije koja je potrebna za inicijaciju formiranja uzvojnica (Herschlag i Cech 1990b).

Efikasnost ribozima se ne može vrednovati prema kriteriju da  $K_m$  mora biti veći od koncentracije supstrata *in vivo* zbog toga što većina nema obrtaj. Prema kriterijima Alberyja i Knowlesa (1976), pak, se može reći da je analizirani ribozim (IVS iz *Tetrahymena*) dostigao evolucijsko (katalitičko) savršenstvo zato što u uvjetima nepotpune zasićenosti ribozima vezanje supstrata je faktor koji ograničava brzinu reakcije, odnosno difuzijski korak ograničava brzinu, a ubrzavanjem kemijskog koraka se ne može više povećati brzinu cijelokupne reakcije (Herschlag i Cech 1990b).  $k_{cat}/K_m$  vrijednost se približava granicnim vrijednostima proteinskih katalizatora, što govori o visokoj katalitičkoj efikasnosti ovih molekula.

## **5. Zaklju ci**

Biološki katalizatori su osnova kemije života. Ubrzavaju i termodinamski povoljne, ali kineti ki nepovoljne reakcije (s visokim energijama aktivacije) u stanici, oni omogu avaju odvijanje života. Do pred 30 godina su se u ovu skupinu ubrajali samo proteinski enzimi, ali danas tu spadaju i kataliti ke molekule RNA (ribozimi) koje koriste kataliti ke mehanizme ve poznate iz primjera proteinskih enzima, ali prilago ene njihovoj druk ijoj strukturi i funkcionalnim skupinama (što rezultira druk ijom sposobnoš u stvaranja interakcija), te ve oj fleksibilnosti i gusto i naboja. U svijetu ribozima su naj eš e kataliza metalnim ionima i kiselinsko-bazna kataliza, a ima podataka i o upotrebi vezne energije u katalizi. Rje e se nailazi na primjer upotrebe elektrostatske katalize, a ima i vrlo zanimljivih primjera katalize potpomognute supstratom ili malom organskom molekulom kao kofaktorom. Ovakva raznolikost mehanizama je bila potpuno neo ekivana od molekule kojoj na prvi pogled nedostaju mnogi preduvjeti da bi bila dobar katalizator.

Ostaje injenica da RNA u današnje doba katalizira izrazito uzak spektar reakcija; naj eš e se radi o prijenosu fosforila, te u slu aju ribosoma o prijenosu peptidila. Vrlo je intrigantno pitanje zašto se RNA održala kao katalizator uop e, s pojavom proteinskih enzima, te zbog ega u današnje doba katalizira baš ove reakcije. Mogu e je da je to zato što svojstva RNA ine ovu molekulu posebno pogodnom za katalizu metalnim ionima, koja je pak optimalno rješenje za ubrzanje spomenutih reakcija. Za sve druge reakcije u životu svijetu su se proteinski enzimi pokazali pogodnjima, te su darvinovskom selekcijom na molekulskoj razini istisnuli RNA katalizatore.

Proteini danas drže primat u savršenstvu katalize, postignutim ubrzanjima i raznovrsnosti kataliziranih reakcija. Ipak, ribozimi i dalje kataliziraju nekoliko za život centralnih reakcija poput sinteze proteina, a neke druge reakcije kataliziraju efikasnoš u koja može konkurirati katalizi proteinskim enzimima (npr. izrezivanje introna). Današnji ribozimi su živi fosili koji podsje aju na zlatno doba ove fascinantne i svestrane molekule u najranijim po ecima života na Zemlji.

## 6. Literatura

1. Alberts, B.; Johnson, Alexander; Lewis, Julian; Raff, Martin; Roberts, Keith; Walter, Peter  
*Molecular biology of the cell*; Garland Science: New York, 2008.
2. Bevilacqua, P. C.; Yajima, R. Nucleobase catalysis in ribozyme mechanism. *Current opinion in chemical biology* **2006**, *10*, 455–464.
3. Cech, Thomas R Ribozyme mechanisms and folding. *Biochemical Society Transactions* **2002**, *30*, 1162–1166.
4. DeRose, V. J. Two decades of RNA catalysis. *Chemistry & biology* **2002**, *9*, 961–969.
5. Doherty, E. A.; Doudna, J. A. Ribozyme structures and mechanisms. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **2001**, *30*, 457–475.
6. Doudna, J. A.; Cech, T. R. The chemical repertoire of natural ribozymes. *Nature* **2002**, *418*, 222–228.
7. Doudna, J. A.; Lorsch, J. R. Ribozyme catalysis: not different, just worse. *Nature Structural & Molecular Biology* **2005**, *12*, 395–402.
8. Forterre, P. The two ages of the RNA world, and the transition to the DNA world: a story of viruses and cells. *Biochimie* **2005**, *87*, 793–803.
9. Garriga, G.; Lambowitz, A. M.; Inoue, T.; Cech, T. R. Mechanism of recognition of the 5' splice site in self-splicing group I introns. , *Published online: 03 July 1986*; / doi:10.1038/322086a0 **1986**, *322*, 86–89.
10. Herschlag, D.; Cech, T. R. Catalysis of RNA cleavage by the Tetrahymena thermophila ribozyme. 1. Kinetic description of the reaction of an RNA substrate complementary to the active site. *Biochemistry* **1990b**, *29*, 10159–10171.
11. Herschlag, D.; Cech, T. R. DNA cleavage catalysed by the ribozyme from Tetrahymena. *Nature* **1990a**, *344*, 405–409.
12. Holzmann, J.; Frank, P.; Löffler, E.; Bennett, K. L.; Gerner, C.; Rossmanith, W. RNase P without RNA: Identification and Functional Reconstitution of the Human Mitochondrial tRNA Processing Enzyme. *Cell* **2008**, *135*, 462–474.
13. Kelly Kruger; Paula J Grabowski; Arthur J Zaug; Julie Sands; Daniel E Gottschling; Thomas R Cech Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. *Cell* **1982**, *31*, 147–157.

14. Lilley, D. M. J. The origins of RNA catalysis in ribozymes. *Trends in biochemical sciences* **2003**, *28*, 495–501.
  15. Martha J Fedor Ribozymes. *Current Biology* **1998**, *8*, R441–R443.
  16. Mary R Stahley; Scott A Strobel RNA splicing: group I intron crystal structures reveal the basis of splice site selection and metal ion catalysis. *Current Opinion in Structural Biology* **2006**, *16*, 319–326.
  17. McClain, W. H.; Lai, L. B.; Gopalan, V. Trials, travails and triumphs: an account of RNA catalysis in RNase P. *Journal of molecular biology* **2010**, *397*, 627–646.
  18. Narlikar, G. J.; Herschlag, D. Mechanistic aspects of enzymatic catalysis: lessons from comparison of RNA and protein enzymes. *Annual review of biochemistry* **1997**, *66*, 19–59.
  19. Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry & eBook*; Fifth ed.; W. H. Freeman, 2008.
  20. Nissen, P.; Hansen, J.; Ban, N.; Moore, P. B.; Steitz, T. A. The Structural Basis of Ribosome Activity in Peptide Bond Synthesis. *Science* **2000**, *289*, 920–930.
  21. Piccirilli, J. A.; Vyle, J. S.; Caruthers, M. H.; Cech, T. R. Metal ion catalysis in the Tetrahymena ribozyme reaction. *Nature* **1993**, *361*, 85–88.
  22. Ramakrishnan, V. Ribosome Structure and the Mechanism of Translation. *Cell* **2002**, *108*, 557–572.
  23. Reiter, N. J.; Osterman, A.; Torres-Larios, A.; Swinger, K. K.; Pan, T.; Mondragón, A. Structure of a bacterial ribonuclease P holoenzyme in complex with tRNA. *Nature* **2010**, *468*, 784–789.
  24. Stahley, M. R.; Adams, P. L.; Wang, J.; Strobel, S. A. Structural metals in the group I intron: a ribozyme with a multiple metal ion core. *Journal of molecular biology* **2007**, *372*, 89–102.
  25. Strobel, S. A.; Cochrane, J. C. RNA Catalysis: Ribozymes, Ribosomes and Riboswitches. *Current opinion in chemical biology* **2007**, *11*, 636–643.
  26. Tsai, C. S. *Biomacromolecules: introduction to structure, function, and informatics*; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, 2006.
  27. Voet, D.; Voet, J. G. *Biochemistry*; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, 2011.
- [www.nobelprize.org](http://www.nobelprize.org)

## 7. Sažetak

Kataliti ke RNA se ubrajaju u skupinu bioloških katalizatora, u koju spadaju i mnogo rašireniji, efikasniji i mla i proteinski enzimi. Okosnica molekule RNA je gusto negativno nabijena s vrlo fleksibilnim vezama, a funkcionalne skupine za katalizu su malobrojne i monotone. Ipak, RNA katalizira nekoliko centralnih stani nih reakcija koriste i najviše katalizu metalnim ionima i kiselinsko-baznu katalizu, ali i doprinos vezne energije, elektrostatsku katalizu, kovalentnu, te ponekad ak i organske kofaktore i sam supstrat kao pomo u katalizi.

Mali ribozimi (*hammerhead*, *hairpin* i HDV) cijepaju sami sebe koriste i kao nukleofil 2'-OH riboze na njem se 3' kraju nalazi veza koja podliježe cijepanju. Veliki ribozimi (introni grupe I i II) koriste hidroksilnu skupinu riboze udaljenog ili vanjskog nukleotida kao nukleofil, a sudjeluju u procesu izrezivanja introna iz pre-RNA i ligaciji eksona. U stanici postoji i nekoliko ribonukleoproteinskih kompleksa gdje RNA ima kataliti ku ulogu, me u kojima je najbitniji ribosom. Injenica da RNA može sadržavati geneti ki zapis i omogu avati njegov kontinuitet, s jedne strane, te katalizirati kemijske reakcije, s druge, ide u prilog hipotezi o RNA-svijetu prema kojoj je ova molekula, u po ecima života na Zemlji, objedinila rani metabolizam i prijenos informacije.

## 8. Summary

Catalytic RNAs are biological catalysts, a group of molecules which also comprises a much bigger number of younger and more effective catalysts – the enzymes. The RNA backbone is highly negatively charged with very flexible bonds, and the functional groups are few and monotonous. However, RNA catalyzes a few biochemical reactions that are of central importance for cells, using mostly metal ion catalysis and acid-base catalysis, as well as the contribution of binding energy, electrostatic and covalent catalysis, and even sometimes using organic cofactors and the substrate itself as a contributing factor in catalysis.

Small ribozymes (the *hammerhead*, *hairpin* and HDV) are self-cleaving; they activate the 2'-OH group of the ribose adjacent to the scissile phosphate for nucleophilic attack. In large ribozymes (group I and II introns) the nucleophile is the –OH group of the ribose of a distant or even exogenous nucleotide; they catalyze intron splicing. There are also a few ribonucleoprotein complexes in the cell in which RNA is the catalytical entity. The most important is the ribosome. The fact that RNA is a molecule that can contain genetic information and allow genetic continuity, on one hand, and can catalyze chemical reactions, on the other, is supportive of the hypothesis of an RNA world in which, during the beginnings of life on Earth, RNA combined early metabolism and information transfer.