

Rybozomy – perspektywy i ostatnie osiągnięcia w badaniach i zastosowaniach

Rybozomy czyli odcinki RNA mające zdolność enzymatycznego przecinania i samoskładania łańcucha RNA wciąż są przedmiotem poważnego zainteresowania i badań. Istnienie ich przewidywano już 20 lat temu. Teraz znamy ich nazwy: introny grupy I, „głowa młotka”, „szpilka do włosów”, „głowa topora” i RNaza P czyli „magnezowa pięść”.

Obok łańcuchów *antysens* uważa się je za najważniejsze odkrycie ostatniej dekady, a ich odkrywcy są honorowani i nagradzani. Na przeprowadzanie tych badań przeznaczona jest w świecie dziesiątki milionów dolarów. Rybozomy stanowią klucz do odkrycia pochodzenia życia na ziemi i ludzkiego istnienia na tej planecie. Pojawiające się nowe technologie obiecują nie tylko zmianę sposobu działania technik biologii molekularnej, ale kreowanie nowych generacji roślin, zwierząt i terapeutyków, które pomogą w zwalczaniu HIV, zredukują poziom cholesterolu i ochronią przed rakiem.

Pierwsza fala nowości wynikała dla biotechnologii z technik klonowania, a drugą było odkrycie *antysens* RNA. Duże przedsiębiorstwa farmaceutyczne liczyły na leki typu *antysens*. Jednak w tej dziedzinie napotkano na pewne trudności. Regulatory muszą podlegać kontroli, a badacze i klinicyści muszą znać możliwości tej regulacji. Wszystkie stosowane preparaty typu *antysens* działają na tej zasadzie, że DNA może wiązać się do mRNA przez tradycyjne parowanie zasad według modelu Watsona-Cricka. Wiązanie DNA z mRNA hamuje translację mRNA do białek. Parowanie zasad sekwencji o długościach 15–16 nukleotydów mogłoby teoretycznie dać w wyniku unikatową specyficzność rozpoznawania w przypadku genomu ludzkiego i stąd powstała myśl, że krótkie, jednoniciowe DNA komplementarne do nici RNA (tego, który „ma sens”) i który jest zdolny do translacji białek mogłoby chronić przed syntezą białek, np. wywołujących choroby. Uważano, że chociaż hybrydy DNA-RNA mogą dynamicznie asocjować i dysocjować, to jeśli wprowadzimy do komórki wystarczającą ilość takich kopii, uchroni to przed translacją nieporządkanych białek. Sprawa jest jednak bardziej złożona. Problem dotyczy nie hybrydyzacji, ale działania RNazy H.

Według Robertsona RNaza H, która rozpoznaje hybrydy DNA-RNA i je przecina, wymaga 4–6 sparowanych zasad. Tak zatem reakcja typu *antysens* jest o wiele mniej specyficzna niż się spodziewano.

Na początku lat osiemdziesiątych Tomasz Cech odkrył samoskładającą się grupę I intronów u pierwotniaka *Tetrahymena thermophila* i Sidnej Altman wykazał, że RNaza P przecina prekursor tRNA tak, że otrzymuje się dojrzały tRNA. Dowiedzieliśmy się wówczas, że RNA może działać enzymatycznie. Odkrycia te stały się dla badaczy RNA podwaliną do dalszych odkryć i zrozumienia różnorodności struktur rybozymów, a w ostatnich latach nastąpiła eksplozja ich potencjalnych zastosowań. Większość z nich stała się możliwa dzięki adaptacji już istniejących technologii do wymagań RNA.

Dwie przełomowe technologie wprowadzono do badań RNA na początku lat dziewięćdziesiątych. Zaadaptowano syntetyzatory DNA do otrzymywania RNA o długości 3–20 zasad i udoskonalono transkrypcję RNA przy użyciu polimerazy T7.

Nad strukturalnymi odmianami rybozemu typu „głowa młotka” pracują Pardi i Uhlenbeck z zastosowaniem techniki NMR. Badania te dotyczą również większych i bardziej złożonych RNA, takich jak introny grupy I.

Badania Cecha i wsp. z zastosowaniem NMR do ustalenia struktury rybozemu z *Tetrahymena* potwierdziły przewidywane modele struktury uzyskane przez badaczy francuskich (Mitchela i Westhofa) uzyskane drogą analizy komputerowej. Cały model – okazał się prawdziwy, a błędne okazały się jedynie detale. Opracowanie dotyczyło ponad 100 przykładów rybozymów grupy I. Porównano dane dotyczące sekwencji i struktury, a także przewidziano reguły i organizację rządzącą drugo- i trzeciorzędową strukturą RNA.

Wyniki pochodzące z laboratorium Cecha potwierdziły wiele tych przewidywań. Są to badania, które sam Cech określa jako wprowadzenie „bomby” do substratu i „borowanie dziury” w centrum aktywnym rybozemu. Cech zapożyczył tę „terrorystyczną” taktykę z prac nad DNA. Daje to nadzieję na uzyskanie szybkich efektów. Badania te w dniu dzisiejszym nie są tak precyzyjne jak np. w analizie struktur białkowych, w których ma miejsce korelacja z wynikami uzyskanymi przy zastosowaniu promieni rentgenowskich.

W przypadku prac nad rybozymbami istnieją rozbieżności co do metodyki badań. Grupa Geralda Joyce'a z Kalifornii preferuje selekcję wśród dużej populacji mutantów, z której wyłoni się zwycięzca, czyli mutant zawierający rybozymb działający najefektywniej.

Podobnie w pracowni Larry Gole'a z Boulder i Jacka Szostaka z Bostonu dąży się do uzyskania rybozymbu o optymalnej strukturze.

Wszystkie te wysiłki mają na celu uzyskanie rybozymbu – terapeutyku – szybko i perfekcyjnie działającego. Rybozymb z *Tetrahymena* przecinają substrat stosunkowo szybko, ale reakcja uwalniania produktu jest powolna. Natomiast ten sam rybozymb katalizuje reakcję składania z szybkością jeden substrat na minutę, a zatem jest to stosunkowo wolna reakcja.

Istnieje coś w rodzaju „wyścigów” pomiędzy poszczególnymi laboratoriami pracującymi nad przekształcaniem miejsc aktywnych rybozymbu prowadzącym do zwiększenia efektywności jego działania. W tej dziedzinie Cech opublikował pracę, w której wykazał, że możliwa jest taka interakcja między katalitycznym miejscem a substratem, która daje „doskonałość katalityczną”.

Rozwinęły się również badania mające na celu podniesienie oporności RNA rybozymbu na działanie rybonukleaz. W tym celu w pracowni Johna Rossi z Kalifornii skonstruowano rybozymb-chimery, zawierające 7 zasad z DNA. Okazało się, że taka wstawka nie tylko daje oporność na działanie rybonukleaz, ale zwiększa aktywność tego rybozymbu 8-krotnie. Działania Rossiego dotyczą manipulacji trzeciorzędową strukturą rybozymbu, a nie tylko indywidualnego parowania zasad.

Tak jak w badaniach *antysens* RNA, podobnie jak i dla rybozymbów, prowadzi się chemiczne modyfikacje pozycji 2' i 3' rybozy lub w wiązaniu fosforanu. Wprowadzanie jednak chemicznych modyfikacji do naturalnych cząsteczek rybozymbu sprawia, że stają się one toksyczne. Problemem jest również zmiana katalitycznych właściwości wskutek chemicznych modyfikacji.

W terapii RNA główną barierą jest wprowadzenie RNA do komórki. Wydaje się, że dopóki ten problem nie będzie rozwiązany, rybozymb nie będą użyteczne. Tego typu lek musi być nietoksyczny, odporny na działanie rybonukleaz i musi mieć właściwości katalityczne.

Proponuje się następującą modyfikację: zamianę tlenu na grupy metylowe w fosforanie, które sprawiają, że łańcuch staje się mniej podatny na atak RN-az i zdolny do migracji przez błony. Cząsteczki przenoszące, takie jak peptydy lub antybiotyki są alternatywnym sposobem na transport RNA do receptorów komórkowych. Z zewnątrz do komórki można dostarczać rybozymb przez liposomy. Cech uzyskał patent na metodę, w której wykorzystano liposomy do wprowadzenia 500 000 kopii rybozymbów do komórek T zainfekowanych wirusem HIV i to zarówno obecnego w cytoplazmie jak i w jądrze.

Przewiduje się krótkotrwały sukces terapii egzogennej rybozymbem. Następny etap – to terapia genowa. Planuje się przetestowanie rybozymbu jako inhibitora wirusa SIV u małp. Komórki

CD 34T, odporne na ten wirus dostaną geny kodujące te rybozomy, które specyficznie przecinają genom SIV. Następnie, komórki te przetransportuje się do organizmu małp. Test wykaże, czy dojrzałe komórki utrzymają odporność na SIV. Planuje się również wstawianie rybozymów do retrowirusowych wektorów RNA, które z kolei wprowadzą je do komórek T. Według Sarvera nie będzie już problemów w przejściu z badań nad SIV małpim do badań nad HIV u ludzi.

Badacze RNA, którzy poznali zdolności enzymatyczne RNA nie są tym w pełni usatysfakcjonowani – pragną oni kreacji świata w oparciu o RNA. Z ostatnich doświadczeń prowadzonych w laboratorium Cecha wynika, że RNA katalizuje hydrolizę estrów aminokwasowych, co sugeruje, że może być zmuszony do przecinania białek. Wykazano, że grupa I RNA wiąże się z arginina – wiązanie następuje z sekwencją, która może kodować aminokwas, a RNA nie tylko go rozpoznaje, ale może hydrolizować wiązanie estrowe.

Marzeniem badaczy RNA jest nie tylko jego udział w przecinaniu białek. Skoro drugą reakcją rybozymów jest składanie, to trzeba „nauczyć” rybozym nowych, enzymatycznych reakcji. Jeśli stworzymy RNA, które będzie replikować RNA, to będzie można uważać RNA za ewolucyjną podstawę życia.

Biotechnologie stają się przedmiotem sporów prawnych. Należy przy tym wziąć również pod uwagę współzawodnictwo autorów. Cech jest już posiadaczem dwóch patentów. Altman niebawem uzyska patent na RNazę P. Gerlach i Haselof uzyskali patent na rybozym typu „głowa młotka”.

W USA prawa autorskie są chronione przez 17 lat, natomiast w Europie i w Australii przez 20 lat. W świecie badania technologii związanych z rybozymem uzyskują kredyty od państwa. Genset np. uzyskał fundusze od rządu francuskiego, a Shears od rządu australijskiego. Natomiast prawa patentowe często przyznawane są osobom lub instytucjom prywatnym.

Maria Agnieszka Siwecka

Opracowano na podstawie: S. M. Edgington, (1992), *Biotechnology*, 10, 256–262.