

## RIBOZIMAS: RESABIOS DEL MUNDO PRIMITIVO

Silvia Billi

Depto. de Química Biológica - FCEyN - UBA

Recibido:

**Recibido en:** 30/10/2002

| Aceptado:

**Aceptado en:** 29/11/2002

Contacto: Silvia Billi - quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

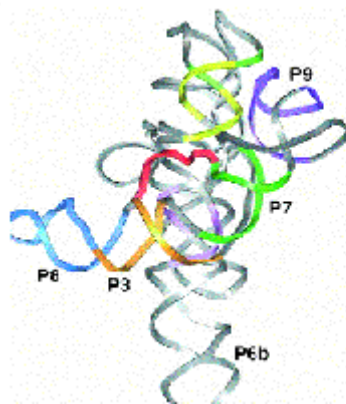
El estudio de catalizadores biológicos se intensificó a mediados de 1800 cuando Louis Pasteur llamó fermentos a los agentes presentes en las levaduras que convertían azúcar en alcohol. En 1926 se purificó la primer enzima, la "ureasa", a partir de plantas, encontrando que estaba compuesta por material proteico. Los cientos de enzimas purificadas y analizadas desde entonces resultaron ser de naturaleza proteica, por lo que se concluyó que todas las enzimas eran proteínas.

Este dogma pareció cambiar cuando en 1982, en el laboratorio de Thomas Cech, (1) estudiando el procesamiento de RNA en el protozoo ciliado *Tetrahymena thermophila* se observó que el corte y empalme (splice) de un intrón del pre-rRNA era autocatalítico. ¡El RNA se escindía por sí mismo sin ayuda de un catalizador proteico!. Paralelamente, en el laboratorio de Sidney Altman (2) se investigaban las propiedades de la enzima ribonucleasa P, que se encuentra en todos los organismos. Los sustratos de esta enzima son una serie de moléculas precursoras de tRNA inactivo que son transformadas en tRNA funcional. La ribonucleasa P consta de una subunidad proteica y un RNA de 377 nucleótidos enlazados en una sola cadena. Al separar los componentes, la subunidad RNA fue capaz de catalizar la hidrólisis de tRNA precursor en ausencia completa de la parte proteica. Como la característica prominente de estas moléculas de RNA era clivar otras cadenas de RNA se les llamó ribozimas. En 1989 se les otorgó a Cech y a Altman el premio Nobel por el descubrimiento de estos catalizares biológicos no proteicos. El descubrimiento de las ribozimas fortaleció la teoría del "mundo de RNA" que intenta develar el misterio del origen de la vida. La hipótesis del "mundo de RNA" propone que la evolución basada en la replicación del RNA precedió a la aparición de la síntesis proteica (3,4,5,6). En algún momento de la evolución de la vida la continuidad genética fue asegurada por la replicación del RNA, sin involucrar como catalizadores a las proteínas codificadas genéticamente, siendo el apareamiento de bases descubierto por Watson y Crick la clave para la replicación (3). Las evidencias(5,6) que sustentan esta teoría están basadas en las múltiples funciones que pueden cumplir el RNA o los ribonucleótidos: 1) el RNA es capaz de almacenar información genética, 2) puede servir de templado para la síntesis de cadenas complementarias de polinucleótidos, 3) puede actuar como catalizador, 4) nucleótidos de RNA actúan como coenzimas en muchas reacciones biológicas, 5) los deoxirribonucleótidos precursores del DNA son sintetizados a partir de ribonucleótidos, 6) la presencia de pequeñas ribonucleoproteínas ayudan en la expresión genética y en el mantenimiento del genoma, 7) las moléculas de RNA guía participan en la edición del RNA, y 8) numerosos virus llevan como

único material genético RNA de simple o doble cadena.

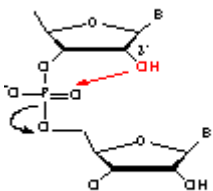
Durante la evolución, a medida que el metabolismo celular se fue sofisticando el requerimiento de biocatalizadores con distinta especificidad hizo que las proteínas, con mayor versatilidad que el RNA (20 aminoácidos en comparación con cuatro bases) asumieran el rol de biocatalizadores, mientras que el DNA presumiblemente adquirió la función de guardar y transmitir la información genética, dada su mayor estabilidad. Los descendientes de la era dominada por el RNA habitan hoy en el mundo en forma de ribozimas presentes en organismos que van desde las bacterias al hombre.

Las ribozimas aumentan sustancialmente la velocidad de reacción (3,4,5,6). Así las constantes cinéticas son comparables a las de enzimas proteicas. Pueden usar cofactores como imidazol y presentar regulación alostérica. Su estructura molecular a semejanza de los catalizadores proteicos presenta pliegues dando origen a estructuras tridimensionales que forman sitios activos como hendiduras profundas, protegidas, e inaccesibles a solventes. Mediante esta estructura terciaria se facilita la catálisis orientando los sustratos al sitio catalítico.



**Fig. 1** Ribozima grupo I intrón Diagrama de cintas de la estructura terciaria. El sitio catalítico está formado por dos dominios P4-P6 y P3-P9. Ref (3)

El 2'-OH del RNA (Fig 2) actúa como nucleófilo catalítico tanto para el autoprocesamiento de intrones como para el procesamiento catalizado por "spliceosomes". Actúa también como ligando de metales, de hecho, algunas ribozimas se comportan como metaloenzimas (7).



**Fig.2** Reacción catalizada por la ribozima hammerhead (ver más abajo) y otras ribozimas pequeñas.

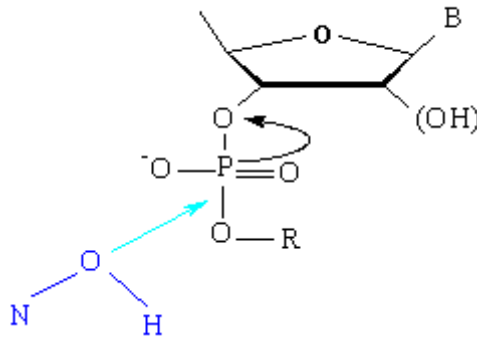
## Ribozimas naturales

Las ribozimas que están presentes en la naturaleza son de distinto tipo, se conocen:

Grupo I intrón (3,4,5,6): Remueven intrones mediante dos transesterificaciones produciendo uniones 3'-5'y un 3'-OH. El mecanismo de acción involucra el sitio de unión al nucleótido, ataque nucleofílico (3'-OH de una guanosina exógena) y catálisis mediada por metales (Fig 3). Se encontraron en los núcleos de

protozoos, mitocondrias de hongos, cloroplastos de algas, bacterias y sus fagos.

Grupo II intrón (3,4,5): Producen el autoclivaje de intrones vía dos transesterificaciones, produciendo una unión inicial 2'-5' y un 3'-OH. El mecanismo involucra ataque nucleofílico por un 2' OH de una adenosina especial dentro del intron que produce un cambio en la estructura del RNA (formación de un lazo). Se cree que los iones  $Mg^{++}$  están dentro del intrón participando de la catálisis. Esta clase se encontró en bacterias y genes de organelas de levaduras de células eucariotas.



**Fig 3** Reacciones catalizadas por las ribozimas: grupo I intrón (NOH: 3'-OH de una guanosina), grupo II intrón (NOH: 2'-OH de una adenosina dentro del intrón) y RNasaP (NOH:  $H_2O$ ).

Ribonucleasa (Rnasa) P (3,4,5): Cataliza la hidrólisis sitio-específica de precursores de RNA incluyendo tRNA, RNA5S y la partícula de reconocimiento de RNA (SRP). Estos sustratos comparten probablemente características estructurales que permiten el reconocimiento específico por RnasaP posicionando los fosfatos reactivos en el sitio de unión para el ataque nucleofílico por una molécula de agua. Actúa como una endoribonucleasa hidrolítica que cliva el extremo 5' de RNA para producir 5'-fosfato y 3'-OH. RnasaP es un complejo RNA-proteína cuya actividad catalítica en bacterias reside en el componente RNA, en humanos no es activa sin el componente proteico. Es un verdadero catalizador en el sentido que cada ribozima cataliza el clivaje de múltiples sustratos. Tiene 300 a 400 nucleótidos de largo, forma dos dominios uno de los cuales tiene el sitio de reconocimiento del sustrato y el otro el sitio activo.

Cabeza de martillo (hammerhead) (3,4,8): Es la ribozima más pequeña, consiste en un RNA de 40 nucleótidos que se autocliva, contiene un motivo altamente conservado que ha sido encontrado en varios viroides y virus satélites de RNA que se autorepican a través de un mecanismo de círculo rodante ("rolling-circle"). Su estructura involucra tres ramas cortas I, II, y III, tiene una conformación en 'Y', las ramas están conectadas en una secuencia altamente conservada, donde se encuentran los nucleótidos esenciales para la catálisis. La rama I contiene el residuo citosina 17 que contiene la unión que se cliva. Cataliza el clivaje sitio específico de sus propias uniones fosfodiéster por un ataque nucleofílico del 2'-OH al fosfato a ser escindido. Se cree que hay iones divalentes que participan en el mantenimiento de la estructura.

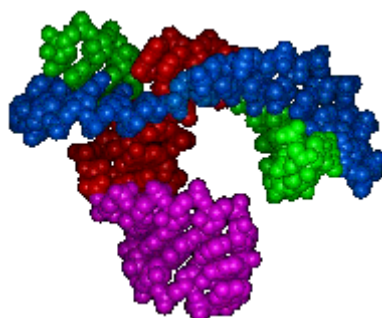


Fig.4 Estructura de la ribozima cabeza de martillo. En azul se indica un DNA inhibidor de la ribozima. El sitio catalítico está en color rojo. La rama I y III en verde y la II en púrpura. Ref (8)

Virus de hepatitis delta (HDV) y Horquilla (Hairpin): Catalizan la misma reacción que la ribozima tipo cabeza de martillo, y son los responsables de clivar intermediarios generados durante la replicación de HDV y de virus satélites de RNA de las plantas.

"Spliceosome" (U2+U6) (3,4,5,6,7): El núcleo de eucariotas contiene numerosas copias de varios RNA de 60 a 250 nucleótidos de longitud denominados pequeños RNA nucleares (snRNA), los cuales forman complejos con proteínas o sea ribonucleoproteínas (RNP). Los snRNP U1....U6 son miembros de una subfamilia de snRNA rica en uracilo que intervienen en el procesamiento del pre-mRNA. Los snRNP U1, U2, U5 y U4-U6 se ensamblan en los sitios de corte y empalme formando un gran complejo o "spliceosome". Los U2 y U6 producen el corte de sustratos de RNA via transesterificación. Se ensamblan con pre-mRNA y escinden los intrones (no es autoclivaje). El producto de la reacción es un fosfo-triester a diferencia de los obtenidos con otros "spliceosomes".

### Ribozimas sintéticas

Los científicos han sintetizado ribozimas in vitro, (6,8,9) parten de secuencias de RNA seleccionadas al azar (más de 10<sup>15</sup>), luego separan a las moléculas en base a su habilidad para realizar funciones bioquímicas (unión a ligandos, catálisis), el material seleccionado es amplificado y el ciclo de selección y amplificación es repetido hasta que las secuencias activas dominan el conjunto. Por último se pueden introducir mutaciones para ampliar la diversidad de secuencias, incorporando de esta manera las características más relevantes de la evolución. Mediante esta técnica lograron sintetizar catalizadores de RNA más eficientes que pueden intervenir en otro tipo de reacciones, tal como formar nucleótidos a partir de un azúcar y una base, o sintetizar uniones amida. Se diseñan ribozimas para cortar determinados RNA con fines terapéuticos (6), remediando la estructura y la actividad catalítica de las ribozimas naturales conocidas. Se ha pensado que la función que cumplen estas ribozimas puede ser aplicada para varios problemas médicos, como el cáncer y el sida, teniendo en cuenta que si la molécula de RNA es clivada antes de llegar al ribosoma, la codificación que encierra esa cadena nunca se expresará completamente.

### Bibliografía

- 1-Kruger,K., Grabowski, P.J., Zaug, A.J. Sands, J., Gottschling, D.E., Cech, T.R. (1982) Cell 31,147-157.
- 2-Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Mardh, T. Altman, S. (1983) Cell 35, 849-857.
- 3-The RNA World. Gesteland, R. F, Cech, T y Atkins J.F. Ed Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 4- Doudna, J.A. Cech, T.R. (2002), Nature 418, 222-228.
- 5-<http://walden.mvp.net/~sklib/ribozyme.html> Ribozymes: Structure, function and application.
- 6-<http://www.aibs.org/biosciencelibrary/vol48/feb.98.html> Landweber L.F., Simon P.J., Wagner, T.A. (1998) Bioscience 48, 94.
- 7- <http://www.chembio.uoguelph.ca/educmat/chm730/k730.htm> Chem\* 730 Proteins and Nucleic acids. Ribosomes and Ribozymes folding and function of RNA.
8. <http://attila.stevens-tech.edu/chembio/rsamuel/index.html> The structure and function of the Hammer Head ribozyme.
- 9-<http://web.mit.edu/newsoffice/tt/1995/Sep13/40700.html> Nicholson E.K. Scientists produce ribozymes in study molecules evolution.
- 10-Bartel, D.P. , Szostk J.W. (1993) Science 261, 1411-1418.

