



„Świat RNA”

Zofia Szweykowska-Kulińska

Zakład Ekspresji Genów, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii,
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań

„RNA World”

Summary

Experimental data suggest that four billion years ago amino acids, purines and pyrimidines could be present in prebiotic soup. Non-enzymatic synthesis of peptides and RNA is possible. RNA can act as replicators and catalysts. Ribonucleic acids are very likely to be recognized as the molecules that gave rise to life. Riboorganisms used amino acids for the synthesis of purine and pyrimidine rings. They developed genetic code and translation. First proteins were used to create channels across phospholipid membranes and to stabilize ribozymes. Ribonucleoproteins containing catalytic RNA can be regarded as relicts from RNA World.

Key words:

RNA World, ribozymes, riboorganisms, ribonucleoproteins, SELEX.

Adres do korespondencji

Zofia
Szweykowska-Kulińska,
Zakład Ekspresji Genów,
Instytut Biologii
Molekularnej
i Biotechnologii,
Uniwersytet
im. Adama Mickiewicza,
ul. Międzychodzka 5,
60-371 Poznań.

1. Wprowadzenie

Od samego zarania dziejów ludzie byli zafascynowani problemem powstania życia. W mitologiach wielu kultur można spotkać przeróżne wyjaśnienia tego zagadnienia. Naukowe podejście do tematu powstania życia również zaowocowało wykreowaniem wielu scenariuszy – od niemal fantastycznych po koncepcje oparte na doświadczeniach symulujących warunki panujące na prebiotycznej Ziemi i „śledzeniu” skamielin molekularnych w metabolizmie komórkowym.

2. Abiotyczna synteza związków organicznych ważnych biologicznie

Badaczy biopoezy można „z grubsza” podzielić na zwolenników dwóch różnych podejść do problemu pojawienia się życia. Są to zwolennicy teorii „Białka pierwsze” (*Protein First Theory*) (1) i zwolennicy teorii „Świata RNA” (*RNA World*) (2-5). Analizując oba te podejścia, należy zadać sobie pytanie, czy cząsteczki, będące budulcem białek i RNA, były obecne w tzw. „praoceanie” pokrywającym połacie abiotycznej Ziemi. Otóż w eksperymentach symulujących warunki panujące na Ziemi przed około czterema miliardami lat, prowadzonych głównie przez S. L. Millera, H. C. Ureya i L. E. Orgela (przeгляд dokonań w (6)) wykazano, że możemy w tych eksperymentach zsyntetyzować, i to w dużych ilościach, prawie wszystkie aminokwasy (będące składnikami białek) z wyjątkiem aminokwasów zasadowych, których braku w mieszaninach poreakcyjnych nie potrafimy sobie wytłumaczyć. Można zatem stwierdzić, że składniki wyjściowe, służące do syntezy białek, były najprawdopodobniej obecne na abiotycznej Ziemi. Z kolei jeśli chodzi o cząsteczki RNA – ich podstawowym składnikiem są rybonukleotydy. Nie potrafimy w eksperymentach symulujących warunki na prebiotycznej Ziemi uzyskać rybonukleotydów. Rybonukleotyd składa się z zasady azotowej, rybozy i przyłączonych do rybozy fosforanów. W mieszaninach poreakcyjnych można zidentyfikować obecność czterech podstawowych zasad azotowych wchodzących w skład rybonukleotydów (adeniny, guaniny, cytozyny i uracylu), ale są duże kłopoty z uzyskaniem pięciowęglowego cukru – rybozy. Powstaje ona w pewnych eksperymentach, ale w niewielkich ilościach i w obecności przynajmniej kilkudziesięciu innych cukrów prostych. Nie potrafimy również wydajnie zsyntetyzować rybonukleozydu, czyli związku powstałego w wyniku połączenia zasady azotowej i rybozy wiązaniem N-glikozydowym. Jeśli abstrahować od problemu abiotycznej syntezy rybozy i rybonukleozydu, to odpowiednia fosforylacja tego ostatniego, prowadząca do powstania rybonukleotydu, jest abiotycznie prosta i wydajna. Czy eksperymenty, symulujące warunki panujące na prebiotycznej Ziemi mogą odzwierciedlać rzeczywiste procesy zachodzące kilka miliardów lat temu? Jako argument potwierdzający tę tezę, badacze przytaczają wyniki badań składu chemicznego meteorytu z Murchison w Australii. Otóż wykryto w nim obecność szeregu aminokwasów i innych, istotnych z punktu widzenia syntezy związków biologicznie czynnych, związków chemicznych (7). Oznaczać to może, że synteza związków organicznych biologicznie czynnych może być powszechna we Wszechświecie. Czy potrafimy, w eksperymentach symulujących warunki panujące na abiotycznej Ziemi, uzyskać z aminokwasów i rybonukleotydów, odpowiednio białka i RNA? Otóż można w takich warunkach uzyskać nawet około trzydziestoaminokwasowe polimery białek, z tym, że ich budowa, nie wchodząc w szczegóły, odbiega od budowy białek syntetyzowanych w komórce (8,9). Potrafimy również w warunkach abiotycznych (bez udziału żadnych katalizatorów) zsyntetyzować RNA na matrycy cząsteczki RNA, na zasadzie komplementarności zasad (10).

3. Cząsteczki RNA są katalitycznie aktywne

Badacze biopoezy wskazali na trzy główne właściwości cząsteczek, które muszą być spełnione aby dane cząsteczki mogły dać początek życiu:

- 1) pamięć molekularna,
- 2) zdolność do katalizy,
- 3) zmienność.

ad. 1 – pamięć molekularna oznacza, że cząsteczka może się odtworzyć. Jest to niezwykle istotna cecha z punktu widzenia powstania życia, gdyż tylko powielające się cząsteczki, o korzystnych właściwościach katalitycznych, mają szansę na przetrwanie i utrwalenie. Cząsteczki o wspaniałych właściwościach katalitycznych, ale bez możliwości syntezy własnych kopii, po pewnym czasie ulegną rozpadowi i odejdą w niebyt;

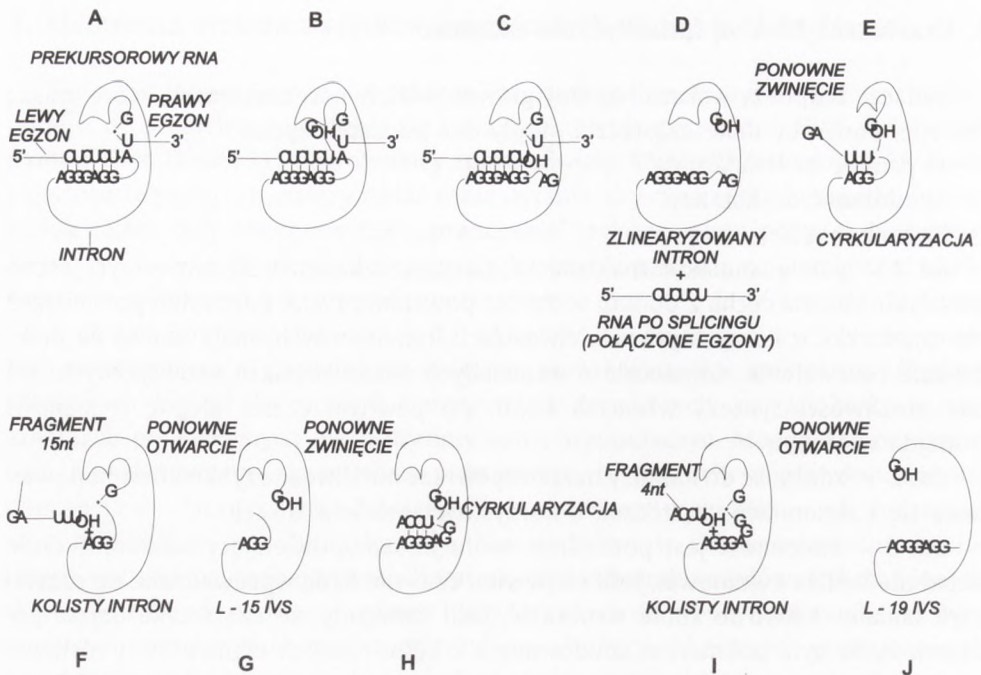
ad. 2 – zdolność do katalizy może zapewniać możliwość szybkiego samopowielania się i akumulacji cząsteczek o korzystnych właściwościach;

ad. 3 – zmienność jest podwaliną ewolucji: samopowielający się katalitycznie układ nie będzie ewoluował, jeśli co pewien czas nie będą wprowadzane do cząsteczek zmiany. Łatwo to sobie wyobrazić, jeśli założymy, że cząsteczka dająca początek życiu była polimerem zbudowanym z kilku różnych elementów podstawowych. Jeśli przy samoodtwarzaniu dojdzie co pewien czas do wbudowania innego, niż dotychczas elementu podstawowego w określone miejsce polimeru, to może się zdarzyć, że taki polimer będzie sprawniejszym replikatorem. Takie zdarzenia spowodują, że populacja dotychczasowych cząsteczek samopowielających się zostanie w określonym czasie zdominowana przez nową generację replikatorów. Należy sobie uzmysłwić, że opisane zdarzenia ekstrapolują darwinowską koncepcję „przeżycia najlepiej dostosowanego” na świat nieożywiony.

O ile teoria „Białka pierwsze” spełnia warunek, że cząsteczki są zdolne do katalizowania reakcji chemicznych, o tyle problem pojawia się w przypadku replikacji białek: nie ma dotąd przekonujących eksperymentów, w których wykazano by, że białka mogą się replikować. Olbrzymia większość białek powstaje w procesie translacji komórkowej, gdzie informacja zawarta w RNA zostaje przetłumaczona na język aminokwasów, a proces odbywa się na cząstkach komórkowych zwanych rybosomami. Istnieją co prawda przykłady krótkich białek syntetyzowanych nie na rybosomach, ale enzymatycznie, przy udziale kilku przynajmniej enzymów. Te ostatnie jednak powstają na rybosomach, a informacja co do ich budowy zawarta jest w RNA. Z kolei teoria „Świata RNA” od początku rozwiązywała problem powielania się cząsteczek, na zasadzie komplementarności zasad zawartych w RNA, ale długi czas nie potrafiono sobie poradzić z problemem zdolności katalitycznych RNA.

Obie teorie, powstałe w latach sześćdziesiątych ubiegłego stulecia, współegzystowały przez szereg lat, mając tyleż samo zwolenników co przeciwników.

Pierwsze dowody, że cząsteczki RNA mogą mieć aktywność katalityczną zostały opublikowane na początku lat osiemdziesiątych XX w. Thomas Cech, nagrodzony za



Rys. 1. Reakcje autokatalicznego splicingu pre-rRNA dużej podjednostki rybosomowej u *Tetrahymena thermophila*. A – hybrydyzacja 3' końca lewego egzonu z sekwencją naprowadzającą, znajdującą się w intronie. B – przyłączenie kofaktora – guanozyny do pre-rRNA. C – atak nukleofilowy grupy 3'OH guanozyny na wiązanie fosfodiestrowe między lewym egzonom a intronem. W efekcie uwolniony zostaje lewy egzon, a guanozyna zostaje przyłączona do 5' końca intronu. D – grupa 3'OH lewego egzonu atakuje wiązanie fosfodiestrowe na granicy intron – prawy egzon. Powstaje dojrzały rRNA i liniowa forma intronu. Warto zauważyć, że w reakcjach tych nie powstaje netto żadne nowe wiązanie fosfodiestrowe: są to reakcje transestryfikacji, w wyniku których (1) wiązanie między lewym egzonom a intronem zostaje zastąpione wiązaniem fosfodiestrowym guanozyna – intron oraz (2) wiązanie fosfodiestrowe między intronem i prawym egzonom zostaje zastąpione wiązaniem lewy egzon – prawy egzon. Intron, po wycięciu, podlega jeszcze dwuetapowemu skróceniu w wyniku wewnątrzcząsteczkowych reakcji transestryfikacji (E – J). Rysunek wykonany na podstawie pracy (11), zmodyfikowany.

swoje odkrycia Nagrodą Nobla, odkrył, że introny z pewnych prekursorowych RNA wycinają się same, co oznacza, że proces jest autokatalityczny i przebiega bez udziału białek. Na rysunku 1 przedstawiono przebieg autokatalitycznego wycinania, czyli splicingu intronu grupy I z jądrowego pre-rRNA *Tetrahymena* (11).

Oto najważniejsze cechy reakcji autokatalitycznego splicingu pre-RNA.

1) autokatalityczny splicing intronów przebiega poprzez dwie reakcje transestryfikacji,

2) reakcje te nie wymagają nakładu energii,

3) reakcje te wymagają obecności kofaktora (może to być nukleotyd guanozynowy lub guanozyna).

Katalitycznie aktywne cząsteczki RNA nazwano rybozymami. Dokonajmy porównania między autokatalitycznie wycinającym się intronem z pre-rRNA a białkowymi enzymami. Na początku przyjrzyjmy się podobieństwom enzymów i rybozymów:

- 1) RNA i białka mogą być katalizatorami,
- 2) zarówno w przypadku rybozymów jak i enzymów ważna jest orientacja przestrzenna substratów,
- 3) jedne i drugie wykorzystują kofaktory,
- 4) wpływ czynników denaturujących na aktywność obu rodzajów katalizatorów jest podobny,
- 5) przyspieszenie reakcji katalizowanej przez rybozym wynosiło 10^9 razy; niektóre enzymy charakteryzują się przyspieszeniem reakcji 10-100 krotnie większym.

Zauważmy jednak pewną istotną różnicę między autokatalitycznie wycinającym się intronem grupy I a enzymami: otóż introny działają w układzie cis i tylko na same siebie, po wycięciu są w zasadzie nieaktywne i ulegają degradacji, natomiast enzymy działają w układzie trans i przeprowadzają wielokrotnie tę samą reakcję: wiążą substrat(y), przekształcają je w produkt(y), uwalniają produkt(y) i są gotowe do wiązania kolejnych substratów.

Zaczęto poszukiwać cząsteczek RNA, które spełniałyby warunek wielokrotnego przekształcania substratu w produkt. Wyniki dostarczone z laboratorium Sidneya Altmana przyniosły oczekiwane rezultaty. Badania dotyczyły RNazy P z *Escherichia coli*, która jest rybonukleoproteiną (a zatem jest zbudowana z RNA i białka), odpowiedzialną za procesy dojrzewania końców 5' cząsteczek tRNA. Rozfrakcjonowano składniki RNazy P i stwierdzono, że część białkowa nie ma aktywności enzymatycznej, natomiast reakcję katalizuje RNA (12). Ten RNA zachowuje się jak klasyczny enzym: działa w układzie trans, rozpoznaje i wiąże substrat, katalizuje reakcję, uwalnia produkty i jest gotowy do wiązania kolejnego substratu. Za swoje odkrycia S. Altman został uhonorowany Nagrodą Nobla, wspólnie z T. Cechem.

Czy w przyrodzie jest więcej przykładów aktywności rybozymowych, tudzież „nietypowych” funkcji RNA (czyli abstrahujemy od klasycznych funkcji RNA związanych z translacją białka)?

Tabela

Zebrane przykłady rybozymowych aktywności RNA i nietypowych funkcji RNA

Nazwa cząstki/cząsteczki 1	Rodzaj aktywności 2
rybosomy	rybonukleoproteiny odpowiedzialne za translację. Istnieją dowody doświadczalne na to, że to RNA rybosomów są odpowiedzialne za syntezę wiązań peptydowych
snRNP	małe jądrowe rybonukleoproteiny, podstawowe w procesie splicingu pre-mRNA. Na podstawie pośrednich dowodów wskazuje się na to, że to cząsteczki RNA katalizują splicing

1	2
rybozomy typu <i>hammerhead</i> , <i>bairpin</i> , HDV	fragmenty cząsteczek wirusoidowych RNA, rozcinające konkatamery replikacyjne RNA na pojedyncze cząsteczki
introny grupy I i II	ulegające autokatalitycznemu splicingowi introny odkryte w różnych genomach Pro- i Eukaryota
RNaza P snoRNP	rybonukleoproteina będąca rybozymem generującym dojrzałe końce 5' pre-tRNA małe jąderkowe rybonukleoproteiny podstawowe w procesach dojrzewania jądrowych pre-rRNA. „Naprowadzają” odpowiednie enzymy do miejsc reakcji
<i>Guide</i> RNA telomeraza	cząsteczki RNA zaangażowane w procesy redagowania RNA rybonukleoproteina odpowiedzialna za dobudowywanie „końcówek” chromosomów, tzw. telomerów. RNA służy jako matryca do dobudowywania sekwencji telomerowych
stRNA (<i>small temporal</i> RNA)	krótkie cząsteczki RNA regulujące, na poziomie translacji, poziom syntetyzowanego białka (hybrydują z 3'-UTR mRNA blokując translację)
siRNA (<i>small interfering</i> RNA)	krótkie cząsteczki RNA regulujące ekspresję genetyczną na poziomie mRNA (hybrydują z mRNA doprowadzając do selektywnej degradacji tego ostatniego)

W tabeli przedstawiono przykłady takich aktywności i funkcji.

W ostatniej dekadzie rozwinięta została technika SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*) zwana również ewolucją *in vitro* (13), za pomocą której można generować i izolować cząsteczki RNA o aktywności specyficznego wiązania innych cząsteczek (białek, peptydów, innych związków) (14-17) i katalizowania przeróżnych reakcji chemicznych (hydrolizy, ligacji, polimeryzacji, syntezy wiązania N-glikozydowego między rybozą a uracylem, autoalkilacji, transferu reszt acylowych, aminoacylacji RNA, peptydytacji RNA itd. (18-23)).

Choć obecności takich rybozymów nie stwierdzamy w przyrodzie, to dzięki tej technice wiemy, że rybozomy potencjalnie mogą wykazywać przeróżne aktywności.

4. Świat ryboorganizmów

Ponieważ cząsteczki RNA, jak się okazało, są tymi, które spełniają wszystkie wymogi cząsteczek mogących dać początek życiu (pamięć molekularna, kataliza, zmienność), hipoteza „Świata RNA” zdobyła wielu zwolenników i od połowy lat osiemdziesiątych ubiegłego wieku lawinowo przybywa opublikowanych prac dotyczących RNA i tzw. ryboorganizmów, których cały metabolizm oparty był pierwotnie na cząsteczkach RNA.

Zakłada się, że:

- pierwsze formy życia składały się z RNA,
- ich syntezę katalizowała RNA polimeraza będąca cząsteczką RNA,
- cząsteczki RNA posiadały właściwości umożliwiające katalizę i replikację (24).

Koncepcja „Świata RNA” rozwiązuje kilka ważnych problemów dzisiejszego metabolizmu komórkowego, a mianowicie:

- co było pierwsze: białko czy DNA?

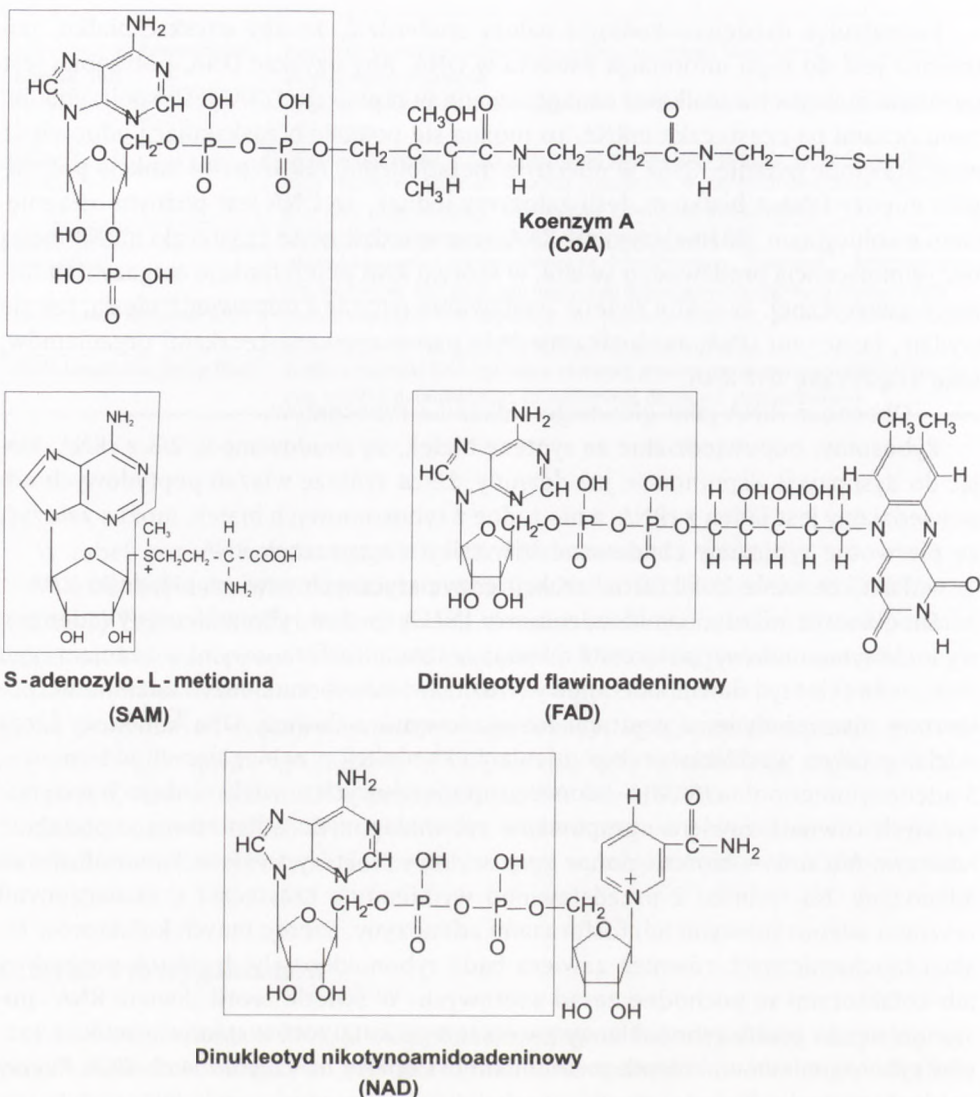
Rozpatrując dzisiejsze komórki należy stwierdzić, że aby uzyskać białko, potrzebna jest do tego informacja zawarta w DNA. Aby uzyskać DNA, potrzebna jest ogromna maszyna białkowa zaangażowana w replikację DNA. Jeśli spojrzemy innymi oczami na cząsteczkę mRNA, to można się pokusić o zaskakującą odpowiedź na postawione pytanie. Otóż w obecnym metabolizmie mRNA pełni funkcję pośrednika między DNA a białkiem. Jeśli założymy jednak, że DNA jest późnym osiągnięciem ewolucyjnym, późniejszym niż RNA, to stwierdzimy, że cząsteczki mRNA mogą być reminiscencją pradawnego świata, w którym RNA pełnił funkcje magazynu informacji genetycznej. W takim świetle postawione pytanie i odpowiedź nie są, jak się wydaje, jasne: ani DNA, ani białka nie były pierwszymi cząsteczkami organizmów, taką cząsteczką był RNA.

– Obecność rRNA jako głównego składnika rybosomów.

Rybosomy, odpowiedzialne za syntezę białek, są zbudowane w 2/3 z rRNA. Mając do dyspozycji wspomniane już dowody, że za syntezę wiązań peptydowych odpowiedzialny jest jeden z rRNA, a nie żadne z rybosomowych białek, można założyć, że pierwotne rybosomy zbudowane były tylko z cząsteczek RNA.

– Fakt, że wiele kofaktorów reakcji enzymatycznych zawiera składniki RNA.

Dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (NAD) to dwa rybonukleotydy (adeninowy i nikotynoamidowy) połączone dwiema resztami fosforanowymi wiązaniem typu 5'-5', a dinukleotyd flawinoadeninowy (FAD) zawiera rybonukleozyd adeninowy, połączony również dwiema resztami fosforanowymi z flawiną. Oba kofaktory biorą udział w całym wachlarzu reakcji utleniania i redukcji przebiegających w komórce. S-adenozylometionina (SAM) – donor grup metylovych w wielu reakcjach enzymatycznych również zawiera ugrupowanie rybonukleozydu adeninowego, podobnie koenzym A (CoA) – biorca i donor grup acylovych, który zawiera 3'-monofosforan adenozy. Na rysunku 2 przedstawiono wymienione cząsteczki z zaznaczonymi resztami adenozy. Szereg innych kofaktorów reakcji biochemicznych również zawiera bądź rybonukleozydy, bądź ich pochodne, lub kofaktorami są pochodne zasad azotowych. W świetle teorii „Świata RNA” postuluje się, że reszty rybonukleozydowe szeregu kofaktorów stanowią relikty z czasów ryboorganizmów, których metabolizm był oparty na cząsteczkach RNA. Reszty te uległy niemal całkowitej atrofii, a to co dzisiaj obserwujemy w kofaktorach to pozostałości po adaptorowych cząsteczkach RNA. Ich zadaniem było przynoszenie do centrów katalitycznych istotnych z punktu widzenia metabolizmu, reszt chemicznych. Argument wspierający tę hipotezę jest następujący: w przypadku kilku kofaktorów zawierających elementy RNA, jak się wydaje, części te nie pełnią żadnej istotnej roli. Skonstruowano analogi kofaktorów, w których usunięto część RNA – podobną i zaobserwowano, że pełnią identyczne funkcje biologiczne jak cząsteczki „typu dzikiego” (25). Ponieważ w olbrzymiej większości funkcje cząsteczek RNA z tamtych czasów „przechwyciły” dzisiaj białka, to w kofaktorach nukleotydowych obserwujemy już niemal całkowity zanik części adaptorowej. Ważnym dowodem eksperymentalnym potwierdzającym te przypuszczenia jest praca z laboratorium



Rys. 2. Przykłady kofaktorów zawierających reszty adenozynowe bądź fosforany adenozyne. Części RNA kofaktorów zostały wzięte w ramki.

Yarusa pokazuje, że CoA, NAD i FAD mogą być syntetyzowane przez wyizolowane drogą selekcji *in vitro* rybozomy z ATP oraz, odpowiednio, fosfopantoteiny, NMN (mononukleotydu nikotynoamidowego) i FMN (mononukleotydu flawinowego) (26) oraz, że można wyselekcjonować również rybozomy przenoszące CoA na koniec 5' adaptorowej cząsteczki RNA (27).

– Kofaktory są zaangażowane w rodzaje szlaków metabolicznych, które uznaje się za ewolucyjnie stare i pierwotne.

Za taki wczesny szlak metaboliczny uznaje się metabolizm kwasów tłuszczowych. W reakcjach biochemicznych tego szlaku bierze udział wiele kofaktorów. Może to sugerować ich wyłączny udział we wczesnym metabolizmie komórkowym, zanim pojawiły się katalizatory białkowe (enzymy) wykorzystujące je do tych samych reakcji.

– Kofaktory, takie jak witaminy B₁, B₂ i B₁₂, regulują swój poziom w komórkach prokariotycznych poprzez bezpośrednie wiązanie się do niekodujących części odpowiednich mRNA, uniemożliwiając translację.

Wymienione tu witaminy biochemicznie „przypominają” RNA (witamina B₁₂ zawiera adenozyne) i uważa się, że odkryty niedawno mechanizm regulacji poziomu mRNA poprzez wiązanie metabolitu (witaminy) jest reliktem „Świata RNA”. Z pewnością wyjaśnienie to zostałoby mocno wsparte poprzez podobne obserwacje regulacji poziomu innych metabolitów, uważanych również za pierwotne i stare (28,29).

Z przedstawionych już wcześniej rozważań wynika, że teoria „Świata RNA” zakłada późne pojawienie się DNA na arenie życia, najprawdopodobniej po wprowadzeniu syntezy deoksyrybonukleotydów i procesu odwrotnej transkrypcji. Przesłanki, będące podstawą przypuszczeń o późnym ewolucyjnie pochodzeniu DNA, są następujące:

– mRNA, tRNA i rRNA biorą udział w biosyntezie białka, a obecność w tym procesie cząsteczek DNA jest niepotrzebna;

– RNA może być replikowany przez RNA polimerazę będącą cząsteczką RNA;

– replikacja RNA jest mało skomplikowana w porównaniu z replikacją DNA;

– deoksyrybonukleotydy w dzisiejszym metabolizmie komórkowym są syntetyzowane z rybonukleotydów;

– rybonukleotydy pełnią podstawową rolę w metabolizmie komórkowym (ATP – fosforylacja, kofaktor wielu reakcji enzymatycznych, magazyn energii dla różnych procesów komórkowych, GTP – m.in. udział w translacji i transdukcji sygnału, UTP – metabolizm cukrowców, CTP – metabolizm tłuszczowców) podczas gdy brak podobnych funkcji dla deoksyrybonukleotydów. Świadczyć to może o tym, że metabolizm komórkowy istniał znacznie wcześniej, zanim pojawiły się deoksyrybonukleotydy.

Nasuwa się pytanie: skoro w ryboorganizmach cząsteczki RNA pełniły funkcje katalityczne, to dlaczego białka zastąpiły je w tych funkcjach? Dlaczego metabolizm dzisiejszych komórek jest głównie oparty na enzymach białkowych, a nie na rybozymach? Postrzegając ten problem ewolucyjnie, należy znaleźć powód, do czego „Świat RNA” mógł wykorzystywać aminokwasy i pierwsze, prymitywne (ale już zapewne kodowane) peptydy? Nie należy zapominać, że najprawdopodobniej w praocenie pokrywającym połacie Ziemi kilka miliardów lat temu, znajdowały się aminokwasy. Odpowiedź przychodzi dzisiaj ze strony metabolizmu komórkowego: otóż zasady azotowe (składowe rybonukleozydów) są syntetyzowane m.in. z aminokwasów!

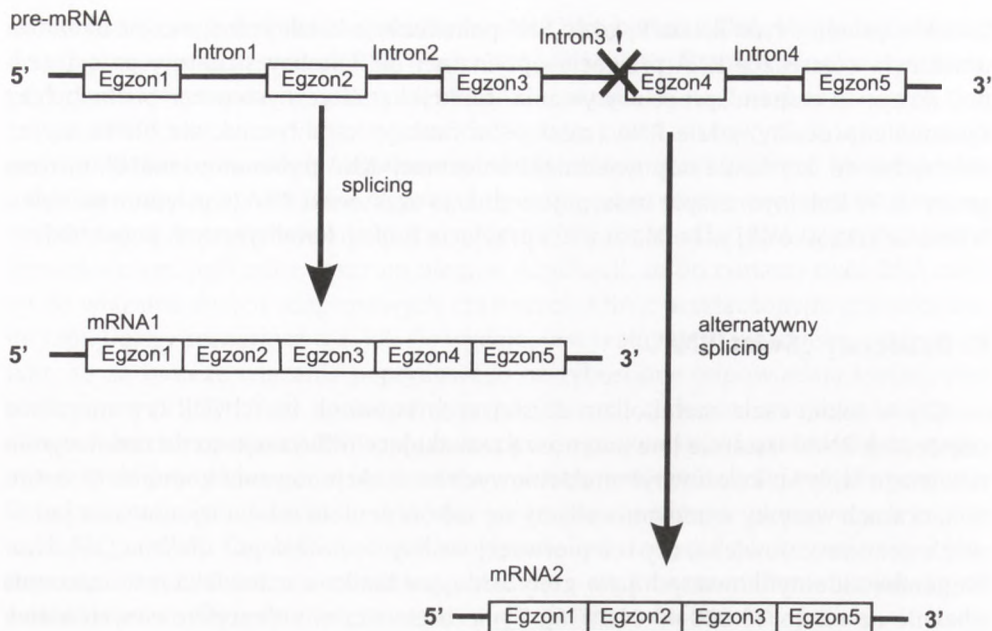
Aminokwasy mogły być zatem wykorzystywane jako budulec RNA. Mogły być wiązane do adaptorowych cząsteczek RNA (dziś tRNA wiążą specyficznie aminokwasy i transportują do rybosomów w celu syntezy białka), przenoszone do rybozymowych centrów katalitycznych i wykorzystywane do budowy zasad azotowych. Z tego pierwotnego przeznaczenia mogły rozwinąć się dalsze etapy „uzależniania” kwasów rybonukleinowych i aminokwasów. Wyobraźmy sobie rybozymowe centrum katalityczne rozpoznające specyficznie i wiążące adaptorową cząsteczkę RNA z przyłączonym aminokwasem. Jeśli takie centrum ulegnie duplikacji, to otrzymamy twór RNA zdolny do wiązania dwóch adaptorowych cząsteczek RNA z przyłączonymi aminokwasami (30). Dalszy scenariusz też, jak się wydaje, jest realny, jeśli weźmiemy pod uwagę fakt, że za syntezę wiązania peptydowego na rybosomie odpowiadają kwasy rybonukleinowe (31,32). Taki prymitywny protorybosom, z dwoma miejscami wiązania adaptorowych cząsteczek RNA połączonych z aminokwasami i zdolnością do syntezy wiązania peptydowego, mógł produkować najprawdopodobniej krótkie homopolimery peptydowe lub krótkie, składające się z naprzemiennie ułożonych aminokwasów, peptydy. Czy takie peptydy mogły mieć wartość dla ryboorganizmów? Wydaje się, że tak. Otóż nawet krótkie, składające się z naprzemiennie ułożonych aminokwasów peptydy (np. Leu-Lys) mają pewne właściwości, jakich nie mają cząsteczki RNA: mogą tworzyć kanały jonowe w poprzek błon komórkowych (33). Ostatnio ukazały się doniesienia, w których wskazuje się, że kilkucząsteczkowe kompleksy RNA mogą jednak tworzyć kanały błonowe (34)). Organizmy, których metabolizm był oparty na RNA, mogły dopiero wtedy „zamknąć się” w otoczkach fosfolipidowych. Wcześniejsze zamknięcie miało się z celem, gdyż tylko kanały błonowe umożliwiłyby wymianę „wnętrza” komórki z otoczeniem (pozbycie się produktów przemiany materii i pobranie substratów metabolicznych to warunek przetrwania komórki). Ponieważ w komórkach do syntezy dzisiejszych białek wykorzystywanych jest 20 różnych aminokwasów z różnorodnymi ugrupowaniami chemicznymi, a do syntezy RNA wykorzystywanych jest raptem cztery rodzaje nukleotydów, to potencjalnie białka otwierały możliwości w „Świecie RNA” dotąd niedostępne. Badania nad składem nukleotydowym dzisiejszych RNA, zwłaszcza tRNA wykazały, że wiele rybonukleotydów może być modyfikowanych. Oznacza to, że w „Świecie RNA” mogły one być również modyfikowane i nabywać nietypowe ugrupowania chemiczne, istotne z punktu widzenia rozszerzania wachlarza katalizowanych reakcji chemicznych. Jednak do takich modyfikacji niezbędne były kolejne rybozymy katalizujące dane reakcje. Białka oferowały bogatą gamę ugrupowań chemicznych tylko i wyłącznie dzięki zróżnicowanej budowie poszczególnych aminokwasów. Z energetycznego punktu widzenia aminokwasy okazały się bardziej korzystnym nabytkiem metabolizmu ryboorganizmów. W takim razie, jak doszło do „przechwycenia” przez białka funkcji katalitycznych w komórce? Wydaje się, że oprócz funkcji tworzenia kanałów błonowych, pierwsze peptydy (to nie mogły być przecież od razu katalizatory dorównujące w działaniu wyrafinowaniem kwasom rybonukleinowym) mogły oddziaływać z cząsteczkami RNA stabilizując je. „Reliktami” tego okresu byłyby ry-

bonukleoproteiny typu RNaza P, gdzie RNA pełni funkcje katalityczne, a część białkowa umożliwia cząsteczce RNA przyjęcie optymalnej dla katalizy struktury przestrzennej. Kolejnym etapem „przechwytywania” funkcji katalitycznych przez białka byłyby rybonukleoproteiny, gdzie RNA nadal pełni funkcje katalityczne, ale białka są już niezbędne do uzyskania odpowiedniej konformacji RNA (rybosomy, snRNP, introny grupy II). W kolejnym etapie następuje redukcja cząsteczki RNA (występuje już tylko w formie szczątkowej w kofaktorach) i przejęcie funkcji katalitycznych przez białka.

5. Dzisiejszy „Świat RNA”

Czy w takim razie metabolizm dzisiejszych komórek to schyłek ery znaczenia cząsteczek RNA? Ostatnie lata przynoszą zaskakujące informacje co do nadal wyrafinowanego wpływu kwasów rybonukleinowych na funkcjonowanie komórki. W ostatnich czasach wszyscy emocjonowaliśmy się zakończeniem sekwencjonowania jądrowego genomu człowieka, czy też pierwszej rośliny – *Arabidopsis thaliana* (35). Liczba genów zidentyfikowanych jako geny kodujące białka u człowieka jest szacowana obecnie na około 30 000-40 000 (36). Tymczasem liczba zidentyfikowanych białek ludzkich wielokrotnie przekracza tę szacunkową liczbę genów. Na jakim etapie „mnożą się” białka? Jednym z nich jest właśnie etap dojrzewania transkryptów RNA. Jądrowe pre-mRNA zawierają introny – od kilku do kilkudziesięciu. Proces ich wycinania prowadzi do powstania dojrzałego RNA, mogącego ulegać translacji. Czasami zdarza się, że pewne egzony ulegną wycięciu. Jest to proces ściśle regulowany, prowadzący do powstania nieco innego, dojrzałego transkryptu, który po translacji da nieco zmienione białko. Proces różnego wycinania intronów z jednego pre-mRNA nazywany jest alternatywnym splicingiem. Na rysunku 3 przedstawiono schemat powstawania dwóch, nieco różnych, dojrzałych mRNA. Przyrównanie sekwencji EST (*Expressed Sequence Tag*) i mapowanie otrzymanych rodzin mRNA w ludzkim genomie wskazuje, że przynajmniej 35% ludzkich genów daje produkty będące wynikiem alternatywnego splicingu (37). Przykładem mogą być pewne białka wchodzące w skład kanałów potasowych w błonach komórek rzęsatych w ślimaku ucha ludzkiego. Z pre-mRNA, wskutek alternatywnego splicingu, powstaje około pięćset białek nieznacznie różniących się budową i o nieznacznie innych właściwościach decydujących o otwarciu/zamknięciu kanału. Z uwagi na te różne właściwości, każdy z kanałów reaguje na różną częstotliwość fali dźwiękowej, powodując przekazanie sygnału do komórek nerwowych. Właśnie ta różnorodność białek odpowiedzialna jest, m.in. za zakres naszej percepcji słuchowej dźwięków o różnej częstotliwości (38,39).

Ostatnio ukazuje się dużo prac na temat tzw. niekodujących RNA. Jedną z klas tych cząsteczek – tzw. stRNA (*small temporal RNA*) jest odpowiedzialna za regulację ekspresji genów na poziomie translacji. Owe stRNA hybrydują z 3'UTR komplementarnego mRNA blokując translację, co w efekcie ma przełożenie na prawidłowy



Rys. 3. Teoretyczny przykład alternatywnego splicingu pre-mRNA, w wyniku którego pojawiają się dwa różne mRNA. W konsekwencji powstaną dwa, różniące się nieco właściwościami, białka.

rozwój larwalny. Takie stRNA zaobserwowano u nicienia *Caenorhabditis elegans*, ale ich homologi zidentyfikowano nawet w genomie człowieka, co sugeruje uniwersalność opisanego mechanizmu regulacji ekspresji genetycznej (40). Częsteczki RNA są zatem generatorem olbrzymiej różnorodności białek, pochodzących z informacji zakodowanej w jednym genie, jak i regulatorami prawidłowego rozwoju. Chociaż „złoty wiek Świata RNA” minął bezpowrotnie, to cząsteczki te nadal odgrywają podstawową rolę w tworzeniu informacji genetycznej przekładanej na język białka oraz w całej plejadzie innych zjawisk obserwowanych w komórce. Należy oczekiwać, że najbliższe lata przyniosą eksplozję odkryć związanych z funkcjonowaniem niskocząsteczkowych RNA oraz ich głównym znaczeniem w regulacji podstawowych procesów komórkowych.

Literatura

1. Kaffman S. A., (1986), *J. Theor. Biol.*, 119, 1-28.
2. Crick F. H. C., (1968), *J. Mol. Biol.*, 38, 367-379.
3. Orgel L. E., (1968), *J. Mol. Biol.*, 38, 381-393.
4. Woese C. R., (1967), *The genetic code: The molecular basis for genetic expression*, Ed. M. Harper and H. Row, New York.
5. Gilbert W., (1986), *Nature*, 319, 618.
6. Miller S. L., (1987), *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, vol. LII, Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, 1987, 17-27.

7. Kevenvolden K., Lawless J. G., Pering K., Peterson E., Flores J., Ponnampereuma C., Kaplan I. R., Moore C., (1970), *Nature*, 228, 923-926.
8. Fox S. W., Dose K., (1977), *Molecular evolution and the origin of life*, Ed. Marcel Dekker, New York.
9. Brack A., (1987), *Orig. Life Evol. Biosph.*, 17, 367-79.
10. Ninio J., Orgel L. E., (1978), *J. Mol. Evol.*, 12, 91-99.
11. Cech T., Zaug A. J., Grabowski P. J., (1981), *Cell*, 27, 487-496.
12. Guerrier-Takada C., Gardiner K., Marsh T., Pace N., Altman S., (1983), *Cell*, 35, 849-857.
13. Green R., Ellington A. D., Szostak J. W., (1990), *Methods*, 2, 75-86.
14. Sassanfar M., Szostak J. W., (1993), *Nature*, 364, 550-553.
15. Nieuwland D., Wecker M., Gold L., (1995), *Biochemistry*, 34, 5651-5659.
16. Lorsch J. R., Szostak J. W., (1994), *Biochemistry*, 34, 973-982.
17. Binkley J., Allen P., Brown D. M., Green L., Tuerk C., Gold L., (1995), *Nucl. Acids Res.*, 23, 3198-3205.
18. Eklund E. H., Szostak J. W., Bartel D. P., (1995), *Science*, 269, 364-370.
19. Eklund E. H., Bartel D. P., (1996), *Nature*, 382, 373-376.
20. Unrau P. J., Bartel D. P., (1998), *Nature*, 395, 260-263.
21. Wilson C., Szostak J. W., (1995), *Nature*, 374, 777-782.
22. Suga H., Lohse P. A., Szostak J. W., (1998), *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 1151-1156.
23. Illangasekare M., Yarus M., (1999), *RNA*, 11, 1482-1489.
24. Orgel L. E., (1987), *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, vol. LII, ed. Cold Spring Harbor Laboratory, 9-16.
25. Benner S. A., Allemann R. K., Ellington A. D., Ge L., Glasfeld A., Leanz G. F., Krauch T., McPherson L. J., Moroney S., Piccirilli J. A., Weinhold E., (1987), *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, vol. LIII, ed. Cold Spring Harbor Laboratory, 53-63.
26. Huang F., Bugg C. W., Yarus M., (2000), *Biochemistry*, 39, 15548-15555.
27. Jadhav V. R., Yarus M., (2002), *Biochemistry*, 41, 723-729.
28. Nahvi A., Sudarsan N., Ebert M. S., Zou X., Brown K. L., Breaker R. R., (2002), *Chemistry & Biology*, 9, 1043-1049.
29. Winkler W., Nahvi A., Breaker R. R., (2002), *Nature*, 419, 952-956.
30. Meizels N., Weiner A. M., (1987), *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, vol. LIII, ed. Cold Spring Harbor Laboratory, 743-749.
31. Green R., Switzer C., Noller H. F., (1998), *Science*, 280, 286-289.
32. Nissen P., Hansen J., Ban N., Moore P. B., Steitz T. A., (2000), *Science*, 289, 920-930.
33. DeGrado W. F., (1993), *Nature*, 365, 488-489.
34. Vlassov A., Khvorova A., Yarus M., (2001), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 98, 7706-7711.
35. *The Arabidopsis Genome Initiative*, (2000), *Nature*, 408, 796-815.
36. *International Human Genome Sequencing Consortium*, (2001), *Nature*, 409, 860-921.
37. Croft L., Schandorff S., Clark F., Burrage K., Arctander P., Mattick J. S., (2000), *Nat. Genet.*, 24, 340-341.
38. Xie J., Black D. L., (2000), *Nature*, 410, 936-939.
39. Grabowski P. J., Black D. L., (2001), *Progress in Neurobiology*, 65, 289-308.
40. Grosshans H., Slack F. J., (2002), *J. Cell. Biol.*, 156, 17-21.