

Sens antysensu w procesach regulatorowych biosyntezy białka

Tomasz Twardowski

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN
Poznań

Końcowym etapem przekazu informacji genetycznej jest synteza łańcucha polipeptydowego będąca wieloetapowym procesem zasocjowanym z wieloma strukturami komórkowymi. Informacja genetyczna jest zawarta w komórce w formie cząsteczki DNA, będącej polinukleotydem zbudowanym z czterech nukleotydów: A, C, G i T. O układzie przestrzennym cząsteczki i formowaniu struktury czwartorzędowej, np. helisy przez łańcuchy DNA, decydują nie tylko siły wiązania wodorowego pomiędzy komplementarnymi zasadami. Równie istotne są oddziaływania hydrofobowe oraz oddziaływania z molekułami wody. Niemniej ważny jest efekt jonów dwuwartościowych (głównie Mg^{++}) oraz jednowartościowych. Możemy przyjąć spekulatywnie, że poprzez ich lokalizację w bruzdach spirali mogą one być czynnikami odpowiedzialnymi za stabilizację układów przestrzennych rozpoznawanych przez komplementarne struktury kwasów nukleinowych.

Aktywna biologicznie cząsteczka kwasu nukleinowego, DNA czy też RNA, na przykład w trakcie procesu replikacji, transkrypcji, czy też translacji jest jednoniciowa, dostępna dla innych molekuł uczestniczących w tych procesach. Wysoki stopień poprawności biosyntezy jest w zasadniczy sposób sterowany oddziaływaniami wodorowymi pomiędzy zasadami nukleotydowymi w procesie określanym terminem hybrydyzacja zasad. Dokładność reprodukcji materiału genetycznego jest lepsza niż 10^{-6} . Błędy w przekazie informacji genetycznej są powodowane przez mutacje czy też specyficzne efekторы. Mutacje, czyli wbudowania błędnych elementów strukturalnych (zasady lub aminokwasu) zdarzają się w sposób naturalny, jak również są wywoływane czynnikami egzogennymi. Zazwyczaj prowadzą do degeneracji układu, powodując zmiany genetyczne. Zahamowanie procesu biosyntezy może być spowodowane także przez produkty naturalne występujące w przyrodzie.

Szybkość biosyntezy białka jest determinowana przez szereg czynników. Tak np. odczytywanie kodu genetycznego przebiega z szybkością ok. 1 trypletu na sekundę w układzie retikulocytów królika, natomiast w układzie bakteryjnym *E. coli* ok. 7 - 10 trypletów na sekundę. Wierność procesu translacji jest rzędu 10^{-4} . Rozpoznanie właściwego trypletu przez antykodon jest w zasadzie procesem oddziaływania nici „sensowej” z „antysensową” dwóch łańcuchów polinukleotydowych: mRNA i AA-tRNA. Komplementarne oddziaływa-

nie dwóch przeciwbieżnych polinukleotydów stanowi podstawę istotnych procesów regulatorowych.

W 1985 r. stwierdzono, że wstrzyknięcie do oocytów żaby zdefiniowanych, zsyntetyzowanych chemicznie antysensowych oligonukleotydów komplementarnych do określonych sekwencji rRNA, powoduje zablokowanie biosyntezy białka w tym układzie biologicznym (1). Jak czuły jest system i jak specyficzna technika inhibowania procesów biosyntezy białka ilustruje następujący eksperyment: antysensowy oligonukleotyd o długości 16 zasad, komplementarny do określonego fragmentu tzw. domeny α -sarcyny rybosomalnego RNA (zawierającego 4000 zasad), wprowadzony do układu biosyntetyzującego białko na rybosomach pszenicznych powoduje rozpad rybosomów, a w dalszej konsekwencji całkowitą inhibicję procesu (2, 3, 4). Specyficzność oddziaływania antysensowego oligonukleotydu związana jest z jego długością. Z analizy statystycznej wiadomo, że sekwencja 8 dowolnych zasad nie powinna wystąpić więcej niż raz w strukturze dowolnego rRNA. Jednocześnie taka długość oligonukleotydu gwarantuje wystarczająco silne wiązanie w procesie hybrydyzacji. Efektywne działania biologiczne antysensowego oligomeru można osiągnąć albo w wyniku wprowadzenia (np. wstrzyknięcia) do układu komórkowego *in vivo*, względnie też w wyniku wbudowania (zaprogramowania) antysensowego oligonukleotydu do określonego genu, co powoduje endogenne wytwarzanie tego czynnika. W warunkach testów *in vitro* stosowanie antysensowych oligonukleotydów wymaga dopracowania warunków hybrydyzacji specyficznych dla danego układu.

W minionych kilku latach było szereg doniesień o specyficznych procesach zatrzymywanych przez antysensowe oligomery w wyniku zablokowania translacji lub transkrypcji (5 – 7). Przykładowo już w 1987 r. wykonano eksperyment w kwiatach petunii (5). Stwierdzono, że występowanie w nich czerwonego lub różowego barwnika determinowane jest biosyntezą flawonoidów, dla których kluczową rolę odgrywa enzym syntetaza chalkonowa. Dla fragmentu genu tego enzymu zsyntetyzowano komplementarny antysensowy oligonukleotyd, który został wprowadzony (poprzez szereg transformacji) do genomu petunii. Otrzymane transgeniczne rośliny nie zawierały flawonoidów i wszystkie kwiaty były białe! Praktyczne zastosowanie w rolnictwie znalazły antysensowe oligomery w zapobieganiu zbyt szybkiemu dojrzewaniu pomidorów, co ma istotne znaczenie ekonomiczne przy ... produkcji ketchupu (7). Enzym polygalacturonaza odpowiedzialny jest za degradację polimerów pektyny, co prowadzi do miękczenia owoców. Synteza tego właśnie enzymu wzrasta w zasadniczy sposób w trakcie dojrzewania pomidorów. Opracowanie antysensowego oligonukleotydu dla genu tego enzymu spowodowało obniżenie syntezy enzymu o 90% w układzie roślinnym, a w konsekwencji spowolnienie procesu dojrzewania i miękczania owoców, poprawiając w ten sposób np. zdolność pomidorów do długotrwałego transportu i przechowywania.

Z mechanizmem działania antysensowych oligonukleotydów ściśle wiąże się jedno z największych odkryć biologii molekularnej ostatnich lat: rybozomy, czyli cząsteczki kwasu rybonukleinowego charakteryzujące się właściwościami

enzymatycznymi. Początkowo zakładano, że rybozymem musi być kwas rybonukleinowy; obecnie wiadomo, iż struktury mieszane, zawierające oligodezoksynukleotydy w swym składzie charakteryzuje nawet wyższa aktywność biologiczna (w porównaniu do serii rybo) (8).

Elementem decydującym o poprawności rozpoznania substratu oraz determinującym aktywność specyficzną rybozomu jest hybrydyzacja substratu przez sekwencje flankujące (9). Termin „sekwencje flankujące” oznacza krótkie (ok. 15-mer) oligonukleotydy znajdujące się po obu stronach (tj. od końców 3' i 5') centrum katalitycznego rybozomu. Centrum katalityczne omawianego rybozomu ma strukturę „młotka” (*hammerhead*). Oddziaływanie tych sekwencji flankujących z substratem, czyli innym kwasem nukleinowym, przebiega w sposób w pełni podobny do oddziaływania sensowy-antysensowy oligonukleotyd. Rozpoznanie komplementarnych łańcuchów oligonukleotydowych determinuje szybkość oraz specyficznosc reakcji i warunkowane jest obecnością jonów dwuwartościowych (Mg^{+2}) i jednowartościowych (sperminy) (9). Jony te wnikają w strukturę przestrzenną łańcuchów oligonukleotydowych, umożliwiając wzajemną adaptację konfiguracji, co warunkuje efektywne parowanie komplementarnych zasad. Jednakże nie wszyscy autorzy zgadzają się z tezą o kontrolnej funkcji oddziaływania sensowy-antysensowy oligonukleotyd w mechanizmie funkcjonowania rybozomu. Według odmiennej koncepcji (10) czynnikiem limitującym szybkość reakcji hydrolitycznej rybozomu typu *hammerhead* jest jego centrum katalityczne, a jony dwuwartościowe są ligandami oddziałującymi w stanie przejściowym z grupą 2'OH rybozy w centrum aktywnym. W myśl tej hipotezy rybozomy należy zaliczyć do grupy enzymów aktywowanych jonami metali, czyli metaloenzymów.

Problem regulacji biosyntezy białka, będącego ostatnim etapem ekspresji genu, z pewnością jeszcze nie jest zamknięty, a wydaje się, że wręcz odwrotnie — może stanowić jedno z najciekawszych zagadnień następnej dekady.

Literatura

1. Saxena S. K., Ackerman E. J., (1990), *J. Biol. Chem.*, 265, 3263 – 3269.
2. Bohun E., Twardowski T., (1992), *Acta Bioch. Pol.*, 39, 65 – 73.
3. Bohun E., Twardowski T., (1993), *Acta Bioch. Pol.*, 40, 13 – 16.
4. Nierhaus K. H., Schilling-Bartetzko S., T. Twardowski, (1992), *Biochimie*, 74, 403 – 410.
5. Cotten M., (1990), *Trends in Biotechnology*, 8, 174 – 179.
6. Rossi J. J., Sarver N., (1990), *Trends in Biotechnology*, 8, 179 – 184.
7. Smith C. J. S., Watson C. F., Ray J., et al., (1988), *Nature*, 334, 724 – 726.
8. Hendry P., McCall M. J., Santiago F. S., Jennings P. A., (1992), *Nucl. Acids Res.*, 20, 5737 – 5741.
9. Hendry P., McCall M. J., Santiago F. S., Jennings P. S., (1992), *Nucleic Acid Res.*, (1992), 20, 5737 – 5741.
10. Piccirilli J. A., Vyle J. S., Caruthers M. H., Cech T. R., (1993), *Nature*, 361, 85 – 88.

Antisense makes sense in protein biosynthesis regulation

Summary

Protein biosynthesis occurs in nature with frequency error better than 10^{-4} . Regulation of polypeptide synthesis is caused by several factors. Recently the effect of antisense oligonucleotides on peptide synthesis *in vivo* as well as *in vitro* has been presented. The specific recognition of substrate by ribozyme is also determined by sense-antisense hybridization reaction of ribozymes flanking sequences.

key words:

antisense oligonucleotides, protein biosynthesis, regulation, ribozymes, translation.

Adres dla korespondencji:

Tomasz Twardowski, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12, 61 – 704 Poznań.