

**Mirosława Z. Barciszewska,
Jan Barciszewski**

Institut Chemii Bioorganicznej PAN
Poznań

Nowo poznane funkcje transferowych kwasów rybonukleinowych i możliwości ich wykorzystania w biotechnologii

1. Wprowadzenie

Biotechnologia jest to praktyczne wykorzystanie osiągnięć biologii molekularnej. Opisuje ona:

- 1) stosowane techniki badawcze i procesy jak: inżynieria genetyczna, fermentacja, enzymy, monoklonalne przeciwciała, inżynieria mikrobiologiczna,
- 2) zastosowania, np. w medycynie, przemyśle spożywczym, produkcji nasion, hodowli roślin, odkażaniu środowiska,
- 3) możliwości tworzenia ekonomicznych powiązań pomiędzy różnymi gałęziami nauki i przemysłu,
- 4) spodziewane krótko i długoterminowe efekty ekonomiczne i społeczne.

Zagadnienie to jest bardzo szerokie i wieloznaczne. Pod pojęciem biotechnologii rozumiemy nowe biotechnologie oparte o rekombinacyjny DNA i wykorzystujące precyzyjną wiedzę o strukturze i funkcji komórki oraz o jej ważnych składnikach. Jest ona niezbędna do sterowania i manipulacji produktami wytwarzanymi przez komórki. Potencjalnie każdy z najważniejszych składników komórki może być obiektem zainteresowania biotechnologii. Można wyodrębnić geny, umieścić je w plazmidach, transformować nimi bakterie, które mogą następnie produkować dowolne białka. Niezwykle interesujący jest fakt, że właśnie w nowych biotechnologiach wykorzystuje się finezyjność postępowania.

W niniejszym artykule chcielibyśmy zwrócić uwagę na cząsteczki transferowych kwasów rybonukleinowych (tRNA) – podstawowy czynnik w przekazywaniu i modyfikacji informacji genetycznej. Bez precyzyjnej wiedzy o rozpoznawaniu kodon–antykodon czy degeneracji kodu genetycznego nie jest możliwe programowane otrzymywanie białek *in vitro*. Wiadomo również, że w naturalnych białkach, obok 20 podstawowych aminokwasów występują tzw. modyfikowane, które decydują o swoistych właściwościach i funkcji danego białka. Bez poznania mechanizmu działania transferowych kwasów rybonukleinowych nie byłoby możliwe zrozumienie i funkcjonowanie, np. rzadkiego aminokwasu selenocysteiny w centrum aktywnym niektórych ważnych biologicznie białek. Wprowadzanie modyfikowanych aminokwasów do białek możliwe jest poprzez supresorowe tRNA.

Transferowe kwasy rybonukleinowe (tRNA) wypełniają różne funkcje w komórce. Ich udział w biosyntezie białka u prokariotów jest dobrze poznany. Transferowe RNA są składnikami komórek, które powstały prawdopodobnie około 4 miliardów lat temu we wczesnym okresie prebiotycznym, kiedy to tworzenie skomplikowanych związków organicznych doprowadziło do powstania łańcuchów polinukleotydowych zdolnych do przechowywania informacji, jak również do samoreplikacji (1,2). Do niedawna sądzono, że kwasy rybonukleinowe mogą jedynie przechowywać informację genetyczną. Znane są teraz przykłady RNA zdolnych do jej wyrażania (3). Mamy tu na myśli hydrolizę katalizowaną przez cząsteczki RNA (3). Transferowe RNA realizują

centralną funkcję w procesie biosyntezy białka polegającą na tym, że są one specyficznie aminoacylowane przez swoiste syntetazy (muszą być unikatowe) oraz jednocześnie przechodzą przez ten sam aparat syntetyzujący białko (powinny być identyczne).

Cząsteczka tRNA funkcjonuje na skrzyżowaniu szlaków przepływu informacji zawartej w łańcuchach polinukleotydowych (mRNA) oraz białkach (syntetazy aminoacylo-tRNA). Wynika z tego, że bierze udział w translacji informacyjnego RNA (mRNA) zachodzącej na rybosomie. Jest to oczywiście uproszczenie, bowiem translacja to proces tłumaczenia języka aminokwasów na język kwasów nukleinowych, zachodzący z udziałem syntetaz aminoacylo-tRNA w którym aminokwas zostaje związany z transferowym kwasem rybonukleinowym (58). Rola rybosomów polega na ustawianiu (sortowaniu) odpowiednich aminoacylo-tRNA względem informacyjnego RNA, umożliwiając tworzenie się wiązania peptydowego prawie „automatycznie”. Do nowego spojrzenia na rybosomy zachęcają odkrycia właściwości katalitycznych (enzymatycznych) niektórych kwasów rybonukleinowych (kataliza RNA). Te właściwości mocno stymulują rozpatrywanie „świata RNA” jako pierwotnego (przed światem DNA) w którym sama cząsteczka RNA mogła katalizować wiele procesów biochemicznych (2,4,5,50). Na udział katalizy RNA w funkcjonowaniu rybosomów mogą wskazywać następujące fakty:

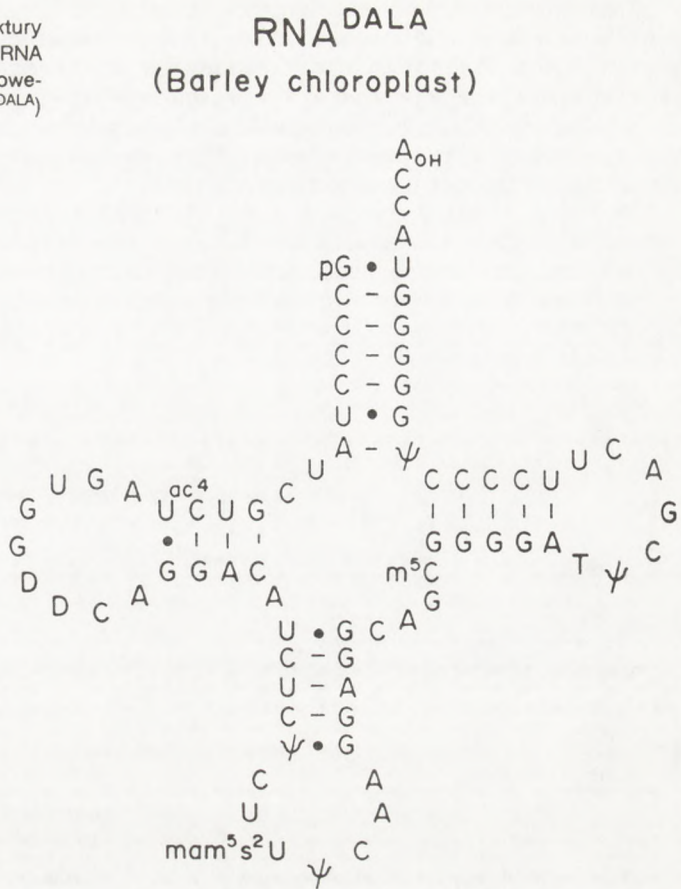
- wysoka zachowawczość struktur pierwszo- i drugorzędowej rybosomalnych RNA (6),
- antykodon aminoacylo-tRNA może być specyficznie, kowalentnie związany do określonego nukleotydu w rybosomalnym 16S rRNA,
- ekranowanie antykodonu tRNA przed chemiczną modyfikacją wskazuje na oddziaływanie aminoacylo-tRNA z 16S rRNA (7),
- mutacje 16S rRNA w miejscu oddziaływania z tRNA zwiększają odporność rybosomów na antybiotyki. Możliwe jest mapowanie miejsca wiązania antybiotyków (8).

Na pytanie o istotę aktywności rybosomalnego centrum peptydylo-transferazy nie ma na razie jasnej odpowiedzi (9,10).

Rybosomy, naszym zdaniem, nie tłumaczą informacyjnego RNA, ale czytają i rozpoznają go głównie dzięki specyficznym oddziaływaniom kwas nukleinowy-kwas nukleinowy. Ponieważ RNA mogą wykazywać właściwości enzymatyczne (3,6,50), rybosomy można rozpatrywać jako swoistą „maszynę”, która ustawia aminoacylo-tRNA komplementarnie do kodonów mRNA i inicjuje reakcję między aminoacylo-tRNA i przyległymi peptydylo-tRNA, katalizowaną za pomocą peptydylo-transferazy. Precyzja mechanizmu biosyntezy białka zależna jest od reakcji estryfikacji tRNA właściwym aminokwasem (możliwa jest acylacja błędnym aminokwasem) oraz od wybiórczości oddziaływań mRNA-tRNA. Cząsteczka tRNA musi zawierać w swej strukturze wszelkie informacje konieczne dla swoistych oddziaływań z różnymi komponentami „układu translacyjnego”, jak czynniki inicjujące i elongacyjne, białka i kwasy nukleinowe w rybosomalnych miejscach akceptorowym i peptydylowym, czynniki terminujące (11), a także informacje niezbędne do rozpoznawania tylko specyficznych syntetaz aminoacylo-tRNA (58). U wyższych organizmów (eukariontów) stwierdzono, że większość syntetaz aminoacylo-tRNA, a także innych enzymów i białek występuje w postaci kompleksów o dużej masie cząsteczkowej, które to mogą stanowić fragment supramolekularnej organizacji układu biosyntezy białka *in vivo* (51,58). Podstawowe pytanie o mechanizm aktywacji aminokwasu i specyficznej estryfikacji tRNA pozostaje w tym kontekście bez precyzyjnej odpowiedzi.

O złożoności procesu biosyntezy białka można zorientować się analizując jego przebieg np. u *Xenopus laevis*. Komórki jajowe (oocyty) w stanie przedwitolinogennym, mimo że posiadają niewielką ilość rybosomów, aktywnie syntetyzują białko. Zawierają one głównie 5S rRNA i tRNA. Tylko niewielka populacja tRNA oocyty pozostaje w cytozolu, a ponad 90% komórkowego tRNA związana jest w kompleksie białkowo-nukleinowym o stałej sedymentacji 42S. Te układy (cząstki) nazywane również tesarisomami (ang. *thesaurisomes*) (52), mają politetrameryczną strukturę. Każda podjednostka zawiera tRNA, 5S rRNA, białko „a” o Mr 50 000 i białko „b” o Mr 40 000 w stosunku 3:1:2:1. Oczywiście, w kompleksie 42S są reprezentowane wszystkie tRNA.

Rys. 1. Model liścia koniczyny (struktury drugorzędowej) transferowego RNA specyficznego dla kwasu glutaminowego (nazywanego również RNA^{DALA}) z chloroplastów jęczmienia.



Inne białka, np. syntetazy aminoacylo-tRNA są zasocjowane z 42S, ale nie w stosunkach stechiometrycznych. Tesaurisomy posiadają – jak się wydaje – dwojaką funkcję, przechowywania małych RNA (5S rRNA i tRNA) oraz reacylacji tRNA. Magazynowanie tych dwóch rodzajów RNA zapobiega degradacji i deacylacji, a ponadto umożliwia utrzymanie stałego stężenia wolnego tRNA w oocycie. Jeśli cały tRNA zostałby uwolniony z kompleksu 42S wówczas ilość tRNA w cytozolu wyniosłaby 2,5–12,5 mg/ml (0,1– 0,5 mM) (53). Tak wysokie stężenie uniemożliwiałoby efektywną biosyntezę białka głównie z powodu oddziaływań tRNA z komplementarnymi antykodonami. Istotną funkcją „przechowywania” tRNA przez tesaurisomy jest reacylacja tRNA uwolnionych z rybosomów. Zatem możemy przyjąć, że tRNA podlega ciągłej wymianie między rybosomami, cytoplazmą oraz kompleksami 42S (tesaurisomy) (53). Możliwość wykorzystania specyficznej reakcji aminoacylacji *in vitro* do badania aktywności tRNA była jedną z ważniejszych przyczyn szybkiego rozwoju badań tych kwasów rybonukleinowych.

Inną, nie mniej ważną, cechą jest ich stosunkowo prosta budowa. Transferowe RNA zawierają od 75 do 93 nukleotydów w tym ok. 20% modyfikowanych. Przedstawiane są one zwykle w postaci liścia koniczyny zaproponowanego w 1965 r. przez Elizabeth Keller i Roberta W. Hollaya. W modelu tym wyróżnić można pięć ramion: aminokwasowe, dwuhydrourydyny, antykodonowe, dodatkowe i rybotymidyny, z których dwa elementy, ramię akceptorowe i antykodonu szczególnie decydują o specyficzności oddziaływań kodon–antykonon (12) (rys. 1).

Transferowe RNA są chyba najczęściej badaną grupą makrocząsteczek biorących udział w biosyntezie białka. Już choćby poznanie ponad 700 sekwencji nukleotydowych tRNA oraz tyle samo ich genów najdobitniej o tym świadczy (13). Otrzymano monokryształy tRNA^{Phe}, których analiza umożliwiła zaproponowanie modelu struktury III- rzędowej. Jest to jak dotychczas jedyny przykład wykrystalizowania i rozwiązania struktury przestrzennej natywnego kwasu rybonukleinowego. Problematykę struktury i funkcji tRNA omawiano w kilku innych bardzo dobrych, naszym zdaniem, pracach przeglądowych (11–17,48).

W niniejszym artykule omówimy nowe funkcje tRNA nie związane z procesem biosyntezy białka (18) mogące mieć praktyczne znaczenie. Rozwój badań w tym obszarze jest bardzo szybki i prace przeglądowe z tego zakresu uległy już częściowej deaktualizacji (16,59).

Wszystkie znane funkcje tRNA można umownie podzielić na dwie grupy. Do jednej z nich zaliczamy te w których zaangażowane są wolne tRNA, a do drugiej grupy te, które wykorzystują właściwości aminoacylo-tRNA (tab. 1).

Tabela 1

Funkcje i właściwości transferowych kwasów rybonukleinowych

tRNA	Aminoacylo-tRNA
– udział w tworzeniu tetra i pentafosforanów guanozyny	– udział w biosyntezie białka
– wpływ modyfikowanych nukleozydów w tRNA na ekspresję niektórych genów białek	– transport aminokwasów – synteza aminoacylofosfatydylogliceroli
– udział w inicjacji transkrypcji przez odwrotną transkryptazę	– udział w specyficznej degradacji białek
– regulacja biosyntezy niektórych białek	– kofaktor dehydrogenazy w syntezie chlorofilu
	– udział w supresji i rozszerzaniu znaczenia kodu genetycznego
– udział w specyficznym wiązaniu hormonów	– udział w biosyntezie lipopolisacharydów
– udział tRNA w przetwarzaniu RNA (splicing)	– udział w syntezie ścian komórkowych
– udział tRNA w indukcji interferonu	
– inhibicje fosfofruktokinazy, (regulator glikolizy)	

Charakterystykę tRNA biorących udział w supresji opisaliśmy niedawno w „Postęпах Biochemii” (19) i „Wiadomościach Chemicznych” (60).

W niniejszej pracy omówimy następujące właściwości i funkcje tRNA:

- tworzenie kompleksów tRNA-RNA,
- właściwości immunogenne tRNA,
- udział tRNA w procesie inicjacji transkrypcji przez odwrotną transkryptazę,
- rola tRNA w specyficznym wiązaniu hormonów,
- tRNA jako kofaktor w syntezie chlorofilu,
- udział tRNA w układzie degradującym białka.

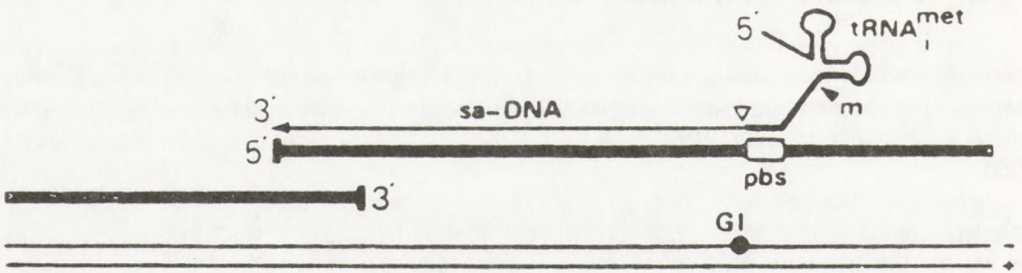
2. Tworzenie kompleksów tRNA–RNA

Znane są przykłady wybiórczego oddziaływania tRNA z innymi kwasami rybonukleinowymi prawdopodobnie dla realizacji ich nieznannej roli. Dotychczas wykazano, że tylko niektóre tRNA tworzą specyficzne kompleksy z rybosomalnymi RNA, a mianowicie: inicjujący tRNA^{Met} i 23S rRNA *Escherichia coli* (20), tRNA^{Pro} i 28S rRNA myszy (21) oraz tRNA^{Glu} i 28S rRNA człowieka (22).

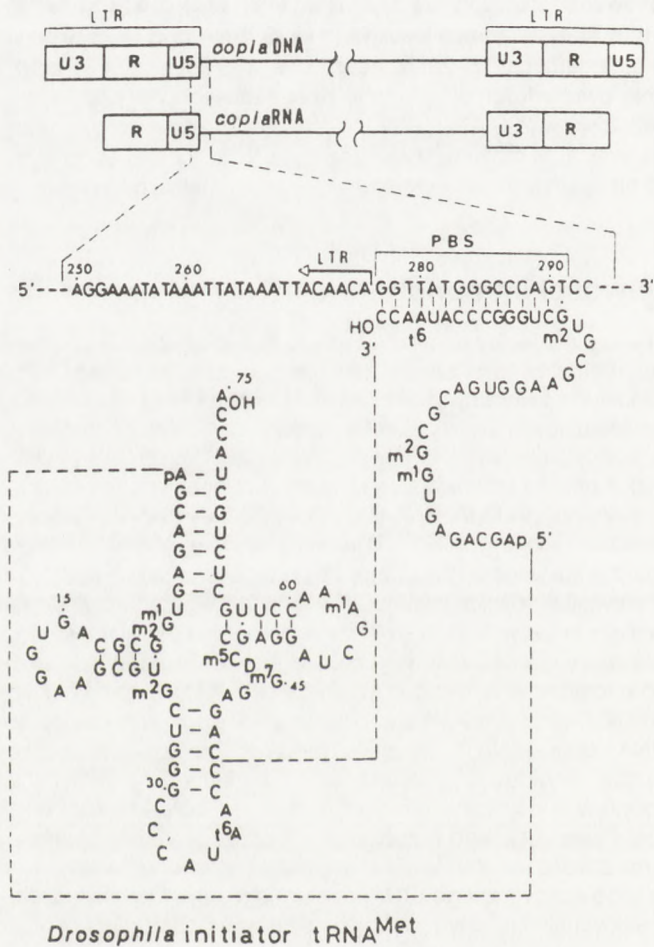
Inicjujący tRNA (tRNA^{Met}, specyficzny dla metioniny ulegający reakcji formylowania) tworzy swoisty i stabilny kompleks z 23S rRNA *E. coli* (temp. 75°C, 0,6 M NaCl), prawdopodobnie w wyniku oddziaływań wodorowych między komplementarnymi regionami tych dwóch RNA. tRNA^{Met} może oddziaływać poprzez sekwencję 17 nukleotydową począwszy od guanozyny w pozycji 5 w ramieniu aminokwasowym aż do dwuhydrourydyny w pozycji 21. Przypuszcza się, że asocjacja tych RNA może odgrywać istotną rolę w inicjacji syntezy białka poprzez odpowiednie dopasowanie podjednostki rybosomalnej 50S do kompleksu podjednostki 30S z tRNA^{Met}(20). Inny stabilny kompleks tRNA^{Glu} i 28S rRNA człowieka tworzy się w wyniku oddziaływania komplementarnych 15–26 nukleotydów występujących między pozycjami 20 i 50, w tRNA^{Glu} (ramię dwuhydrourydyny, ramię i pętla antykodonu oraz ramię rybotymidyny) i nukleotydami 2262–2240 w 28S rRNA (22). Jakkolwiek funkcja biologiczna tego typu oddziaływań nie jest obecnie znana, to można przypuszczać, że wszelkie mutacje w tych regionach obu RNA mogą wpływać na specyficzność i efektywność rybosomalnej biosyntezy białka.

3. Właściwości immunogenne tRNA

Natywne kwasy nukleinowe zasadniczo nie stymulują produkcji przeciwciał po iniekcji do zwierząt eksperymentalnych. Wiadomo, że takie przeciwciała mogą być generowane wobec kwasów nukleinowych związanych z białkiem. Ostatnio stwierdzono (23), że przy niektórych chorobach manifestujących się zapaleniem mięśni, czynnikami antygennymi są syntetazy aminoacylo-tRNA specyficzne dla treoniny (przeciwciało PL 7), histydyny (Jo-1) oraz alaniny i tRNA^{Ala} (PL 12). Spośród stosowanych kwasów nukleinowych, przeciwciało PL 12 wytrąca tylko tRNA^{Ala}. Przeciwciała dla DNA, RNA i kompleksów białkowo-nukleinowych nie powodują wytrącania cząsteczek innych tRNA. Immunospecyficzne tRNA poddano frakcjonowaniu, a następnie analizie sekwencji. Wykazano, że są to izoakceptorowe tRNA^{Ala} mające identyczne antykodony, a niewielkie różnice występują w innych miejscach cząsteczki tRNA. Analiza topografii kompleksów: przeciwciało –tRNA^{Ala} za pomocą specyficznych nukleaz, pozwoliła na określenie miejsca wiązania autoantygeny odpowiedzialnego za rozpoznanie i wiązanie przeciwciał, które to stanowi antykodon cząsteczki tRNA^{Ala} z dwoma nukleotydami dodatkowymi na końcu 3':UmUIGCm²U'GmC. Występowanie obok siebie w surowicy przeciwciał dla syntetazy alanylo-tRNA oraz tRNA^{Ala} może sugerować, że oba te białka powinny swoiście rozpoznawać pętlę antykodonu. Dotychczasowe badania nie wskazują jednak na udział fragmentu antykodonu w specyficznej aminoacylacji tego tRNA. Antykodon tRNA^{Ala} nie jest, jak się wydaje, miejscem specyficznego rozpoznawania przez syntetazę alanylo-tRNA (49). Obserwacja ta daje możliwość wykorzystania tej właściwości w praktyce medycznej. Szybkie wyodrębnienie tego specyficznego tRNA, analiza jego struktury pierwszorzędowej oraz identyfikacja zmian w sekwencji nukleotydowej może stanowić podstawę do opracowania testu diagnostycznego.



Rys. 2. Schemat inicjacji syntezy DNA wirusa mozaiki kalafiora przez inicjujący roślinny tRNA^{Met} (28), pbs – przypuszczalne miejsce wiązania (ang. putative binding site); – miejsce połączenia tRNA i DNA.



Rys. 3. Organizacja genomowego DNA i RNA retowirusa copia oraz model inicjacji jego replikacji. 15 nukleotydowy fragment przyległy do końca 5'LTR jest komplementarny do 15 nukleotydów (poz. 25–39) inicjatorowego tRNA^{Met}*Drosophila* (30).

4. Udział tRNA w inicjacji transkrypcji za pomocą odwrotnej transkryptazy

Replikacja retrowirusów niosących informację genetyczną zakodowaną w kwasie rybonukleinowym (wirusy RNA) odbywa się poprzez syntezę DNA na matrycy RNA. Proces ten nazywany jest odwrotną transkrypcją. Jest on inicjowany poprzez specyficzne oddziaływania wodorowe tRNA z genomowym RNA (ang. *primer binding site*, PBS (24)), a następnie poprzez kowalentne związanie oligodeoksynukleotydu (DNA) z końcem 3' cząsteczki tRNA jako inicjatorem reakcji (ang. *primer tRNA*). Takie oddziaływanie dotychczas stwierdzono dla tRNA^{Trp}, tRNA^{Pro} i tRNA^{Lys} w przypadku wirusów grypy, sarkomy i białaczki (25). Zauważono także udział innych tRNA, jak tRNA^{Phe}, tRNA^{Gly} i tRNA^{Glu} w inicjacji transkrypcji w organizmach podobnych do retrowirusów (26). Wiele interesujących podobieństw do retrowirusów ssaków wykazuje wirus mozaiki kalafiora (ang. *cauliflower mosaic virus*, (CaMV)), który jest wirusem DNA. Zawiera on miejsca inicjacji syntezy obu nici DNA poprzez odwrotną transkryptazę, które znajdują się w 3 pojedynczo niciowych, nieciągłych fragmentach: G-1 na nici ujemnej (DNA-) oraz G-2 i G-3 na nici dodatniej wirionu DNA (DNA+). Zauważono homologię 14 końcówkich nukleotydów (od końca 3') inicjatorowych roślinnych tRNA (tRNA_i) z fragmentem „DNA-” przyległym do miejsca G-1. Na nici „DNA-” syntetyzowany jest 35S rRNA (8,2 tys. par zasad, poly A(+), 180 nukleotydów LTR tzn. Long Terminal Repeats), który w odległości 600 nukleotydów od swego końca 5' jest homologiczny z fragmentem tRNA_i^{Met} (27,28) (rys. 2).

Mechanizm replikacji zakłada inicjację poprzez wiązanie DNA z inicjującym tRNA^{Met} komórek gospodarza (28,29). W oparciu o podobny mechanizm, funkcjonuje tRNA^{Ser} muszki owocowej, który jest inicjatorem transkrypcji retrotransposomu 297 *Drosophila*. Znalaziono tutaj 18 końcowych 3' nukleotydów tRNA^{Ser} komplementarnych sekwencji do DNA w miejscu oddziaływania transposomu 297 (30). Ostatnio wskazano również na możliwości transkrypcji wg innego mechanizmu. W komórkach *Drosophila* znajdują się cząstki podobne do wirusów (ang. *virus like particles*, VLP) zawierające RNA (5 tys. par zasad, VLP, H-RNA), który jest homologiczny z elementem mobilnym copia (31). W cząstkach VLP stwierdzono aktywność transkryptazy (ang. *reversed transcriptase*, RT). Analiza sekwencji RNA wykazała, że komórkowy tRNA_i^{Met} jest inicjatorem syntezy pierwszej nici DNA. Wydłużenie łańcucha DNA odbywa się nie od końca 3'tRNA, jak w przypadkach poprzednio omówionych, ale od wewnątrz cząsteczki tRNA (pozycja 39) (rys. 3).

15 nukleotydowy fragment inicjatorowego tRNA_i^{Met} *Drosophila* (nukleotydy 25-39) jest komplementarny do sekwencji stanowiącej miejsca wiązania VLP H-RNA. Poznanie tego mechanizmu, jak się wydaje, jest bardzo ważne choćby ze względu na wirus HIV, należący również do retrowirusów. Zrozumienie specyfiki inicjacji i oddziaływanie tRNA z matrycą może okazać się przydatne dla opracowania leków antywirusowych. Generalnie są tutaj dwie możliwości, wykorzystanie związków niskocząsteczkowych, które inhibują odwrotną transkryptazę oraz mutantów tRNA silnie wiążących się z białkiem.

5. Udział tRNA w specyficznym wiązaniu hormonów sterydowych

Hormony sterydowe regulują procesy fizjologiczne (modulując ekspresję genów) poprzez oddziaływania z wewnątrzkomórkowymi białkami zwanymi receptorami (32-36). Po związaniu z hormonem zmieniają one swoją strukturę (ulegają transformacji) i umożliwiają specyficzne oddziaływanie powstałego kompleksu (hormon i transformowany receptor) z odpowiednim ge-

nem. Oprócz dwóch form receptora przed i po transformacji występuje on również w formie pośredniej. Ulega ona związaniu do DNA oraz co najważniejsze zawiera kwas rybonukleinowy. Prawdopodobny skład poszczególnych form receptora przedstawiony jest w tabeli 2.

Tabela 2

Właściwości niektórych receptorów steroidowych

Forma receptora	Receptory	
	glukokortykoidu	androgenu
nietransformowany	9,1 S; Mr 319 000; oligomeryczny; nie wiąże się do DNA	9,1±0,17 S; n = 30 nie wiąże DNA; brak RNA; promień Stokesa 73Å, Mr 275 000 300 000
przejściowa	6S; Mr 132 000; wiąże się do DNA; zawiera RNA (tRNA)	7,7±0,015 S; 50mM KCl; n = 17, wiąże DNA; nukleazy przekształcają 7,7 do 4,4 S; gęstość 1,2459±0,014 g/cm ³ n = 6; kompleks białkowo-nukleinowy
transformowany	4S; Mr 96 000; monomeryczny; wiąże DNA	4,4±0,08 S, n = 18, promień Stokesa 61Å; Mr 120 000; 400 mM KCl.

Wyczerpujące badania prowadzono jedynie nad oddziaływaniami receptora wiążącego glukokortykoid. Wykazano, że niskocząsteczkowy RNA wiążący się z „formą pośrednią” receptora stanowi mieszaninę kilku tRNA (52% tRNA^{Arg}, 17% tRNA^{Lys}, 9% tRNA^{His}, 22% stanowi sześć innych tRNA). Wniosek taki wysunięto na podstawie następujących przesłanek:

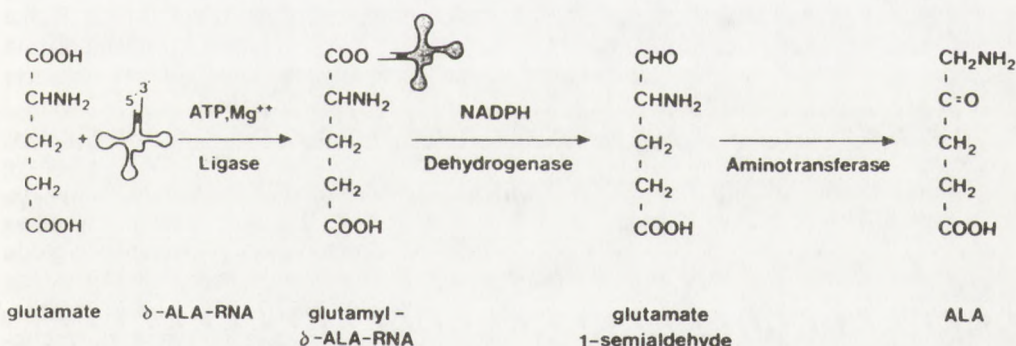
- omawiane RNA są składnikami cytoplazmy,
- stosunkowo duża zawartość RNA, to jest około 2–3 mg można wyodrębnić z 15 ml kultury tkankowej,
- analizowany RNA oraz tRNA charakteryzują się stałą sedymentacji 4S,
- niskocząsteczkowy RNA, a także różne tRNA ulegają asocjacji z formą 4S receptora dając formę 6S receptora,
- taki sam stosunek RNA lub tRNA jest niezbędny do spowodowania zauważalnego, w gradencie sacharozy, przesunięcia frakcji 4S do 6S,
- RNA, podobnie jak tRNA, nie jest poliadenylowany,
- łatwość reakcji kinazowania RNA za pomocą [γ -³²P] ATP i T4 kinazy wskazuje na brak modyfikacji końca 5',
- niskocząsteczkowy RNA ulega aminoacylacji,
- aminoacylowany RNA wiąże się z formą 4S receptora.

Obserwacje te niedwuznacznie wskazują, że omawiany niskocząsteczkowy RNA stanowi mieszaninę transferowych kwasów rybonukleinowych. W związku z tym powstają tutaj dwa podstawowe pytania: jakie cechy strukturalne tRNA są istotne do wiązania z receptorem i hormonami jednocześnie oraz jaka jest funkcja fizjologiczna oddziaływania hormonów sterydowych z tRNA. Nasuwają się tutaj pewne podobieństwa ze specyficzną degradacją białek z udziałem ubikwityny, o czym będziemy mówić nieco później. W celu określenia miejsca wiązania sterydów do tRNA prowadzono badania wpływu progesteronu na syntezę białka, a w szczególności na reakcję aminoacylacji. Przypuszcza się, że steroid oddziałuje z pętlą dwuhydrourydyny tRNA. W przypadku tRNA^{Phe} drożdży są to nukleozydy w pozycjach 18, 19, 20 (56). Ostatnio rozwiąza-

no strukturę krystaliczną kompleksu receptora glukortykoidu z DNA. Okazało się, że element wiążący DNA zawiera jony cynku i charakteryzuje się obecnością tzw. palca cynkowego (61,62). Z drugiej strony wiadomo, że jony cynku hydrolizują cząsteczki tRNA. Z praktycznego punktu widzenia ważne jest poznanie specyfiki oddziaływań tRNA z białkami zawierającymi cynk.

6. Transferowy RNA jako kofaktor w biosyntezie chlorofilu

Cząsteczka chlorofilu syntetyzowana jest z 8 cząsteczek kwasu δ -aminolewulinowego (DALA), który jest powszechnie znanym uniwersalnym prekursorem porfiryń. DALA z kolei może powstać z pochodnej kwasu bursztynowego, koenzymu A i glicerynu (u ssaków, drożdży i grzybów) oraz kwasu glutaminowego u roślin, archabakterii, cyjanobakterii, *Chlamydomonas* (37). Chlorofil powodujący zielone zabarwienie roślin jest niezbędny do przyjmowania energii światła. Zatem chemiczna ingerencja w przebieg i mechanizm syntezy chlorofilu może mieć niezwykle pożądany efekt przy zastosowaniu herbicydów mogących wpływać szczególnie niekorzystnie na chwasty. Z tego punktu widzenia stwierdzenie nowej funkcji transferowych RNA jako kofaktora syntezy chlorofilu może doprowadzić do opracowania nowego herbicydu (aspekt biotechnologiczny). W ciągu ostatnich 10 lat w kilku laboratoriach pokazano, że w ekstrakcie chloroplastów kwas glutaminowy ulega redukcji do semialdehydu kwasu glutaminowego, który dalej w wyniku transaminacji przekształca się w kwas aminolewulinowy. Proponowane były różne mechanizmy tego procesu, ale dopiero w 1984 r. wykazano, że RNA bierze w nim udział (38). W połowie 1986 r. natomiast stwierdzono, że glutamyl-tRNA^{Glu} jest produktem przejściowym w syntezie chlorofilu (rys. 1). Początkowo sądzono, że w chloroplastach znajdują się trzy izoakceptory tRNA specyficzne dla kwasu glutaminowego (39). Obecne dowody wskazują jednak na obecność tylko jednego izoakceptorowego tRNA^{Glu}, będącego produktem pojedynczego genu tRNA^{Glu} chloroplastów. Aktywny w syntezie chlorofilu tRNA^{Glu} zawierający modyfikowany nukleozyd 5-metyloaminometylo-2-tiourydyne w pętli antykodonu musi brać udział również w procesie biosyntezy białka. Inni badacze wykorzystując technikę elektroforezy na żelu poliakrylamidowym modyfikowanym rtęcią nie znaleźli pochodnych siarkowych nukleozydów w chloroplastowym tRNA kukurydzy (40).



Rys. 4. Mechanizm reakcji syntezy prekursora chlorofilu. Kwas glutaminowy w reakcji aminoacylacji zostaje przyłączony do tRNA^{Glu} (DALA-RNA). Aminokwas w aminoacylo-tRNA przekształca się za pomocą dehydrogenazy w semialdehyd, a następnie w kwas δ -aminolewulinowy za pomocą aminotransferazy. Te przekształcenia prowadzą do powstania chlorofilu (39).

Synteza kwasu aminolewulinowego rozpoczyna się reakcją aminoacylacji tRNA (aktywacja aminokwasu) kwasem glutaminowym (rys. 4). Aktywna reszta kwasu glutaminowego w Glu-tRNA^{Glu} ulega następnie redukcji do aldehydu za pomocą dehydrogenazy. Kolejny enzym katalizuje reakcję transaminacji powodując zmianę grup aminowej i karbonylowej w aldehydzie kwasu glutaminowego z wytworzeniem ALA.

Warto zastanowić się nad pochodzeniem dwóch dalszych tRNA przyłączających kwas glutaminowy (izoakceptorowych tRNA^{Glu}), o których wspominaliśmy wcześniej. Obecnie znaleziono dowody wskazujące, że są one modyfikowanymi izoakceptorami tRNA specyficznymi dla glutaminy! (tRNA^{Gln}), które ulegają błędnej aminoacylacji kwasem glutaminowym tworząc Glu-tRNA^{Gln}. Te aminoacylo-tRNA mogą być przekształcone dalej w Gln-tRNA^{Gln} za pomocą surowego ekstraktu z chloroplastów. Reakcja ta wymaga specyficznej aminotransferazy oraz glutaminy lub asparaginy jako donorów. Badania procesu aminoacylacji pokazały, że w chloroplastach, roślinnych i zwierzęcych mitochondriach oraz cyjanobakteriach nie ma syntetazy glutaminylo-tRNA. Dlatego zapotrzebowanie na glutaminę istniejące w komórkach i organellach realizowane jest poprzez modyfikację kwasu glutaminowego błędnie przyłączonego do tRNA (57). Podobną sytuację stwierdzono u bakterii gramdodatnich. Wydaje się zatem, że ten mechanizm tworzenia Gln-tRNA^{Gln} jest często spotykany i w związku z tym interesująco jawi się problem dokładności biosyntezy białka oraz pochodzenia organelli (57).

Stwierdzono ponadto, że w procesie syntezy chlorofilu aktywne są chloroplastowe tRNA^{Glu} jęczmienia, *Chlorella* i *Chlamydomonas*. Nieaktywne w oddziaływaniu z dehydrogenazą są tRNA^{Glu} *E. coli*, cytoplazmatyczne tRNA roślin (jęczmień, pszenica, łubin), ssaków oraz *Schizosaccharomyces pombe* (18,47).

7. Udział tRNA w systemie degradującym białka

W komórkach prokariotycznych i eukariotycznych znajdują się białka charakteryzujące się podobnym czasem życia do długości życia danego organizmu, a także obecne są polipeptydy, których okres półrozpadu jest mniejszy niż 1% czasu istnienia komórki. Szybkość degradacji białek jest funkcją stanu fizjologicznego komórki i, jak się wydaje, jest różna dla większości białek. W szczególności, białka uszkodzone lub – ogólnie mówiąc – nienormalne są bardzo niestabilne *in vivo*. Mechanizm selektywnej degradacji nie jest całkowicie poznany chociaż wiadomo, że jest on zaangażowany w szeregu procesach komórkowych, takich jak: regulacja poziomu kluczowych enzymów w wielu drogach metabolicznych, reagowanie na zmieniające się parametry zewnętrzne komórki oraz selektywne usuwanie uszkodzonych białek (41,42). Białka regulatorowe charakteryzują się bardzo krótkim czasem życia *in vivo*. Ich mataboliczna nietrwałość pozwala na szybkie dopasowanie ich do właściwego stężenia poprzez regulację zmian w szybkości ich syntezy i degradacji.

Ważną właściwością selektywnej wewnątrzkomórkowej degradacji białek we wszystkich organizmach jest zależność od energii przemian metabolicznych. Ta zależność od ATP, choć nie wymagana na gruncie czysto termodynamicznym, jest czynnikiem odróżniającym różne mechanizmy tego swoistego procesu: lizosomalny i nielizosomalny (42). Lizosomy zaangażowane są w degradacji białek endocytoplazmatycznych oraz wewnątrzkomórkowych w warunkach głodu pokarmowego. Z drugiej strony, nielizosomalny system proteolityczny zależny od ATP składa się z wielu komponentów. Jeden z nich stanowi termostabilne białko ubikwityna (masa cząsteczkowa Mr 8565, 76 aminokwasów). Ten polipeptyd charakteryzuje się niezwykle zachowawczą strukturą pierwszorzędową i pozostał nie zmieniony w czasie ewolucji w organizmach takich jak drożdże lub człowiek. Ubikwityna w reakcji zależnej od ATP przyłącza się poprzez glicynę znajdującą się na końcu karboksylowym wiązaniem izopeptydowym do białka. Przyłączenie może również nastąpić poprzez grupę aminową lizyny znajdującą się wewnątrz łańcucha. Białka piętnowane ubikwityną są swoiście degradowane poprzez specyficzną

proteazę zależną od ATP. Mechanizm reakcji przyłączenia ubikwiny został częściowo poznany (43). W pierwszym etapie ubikwina ulega aktywacji do wysokoenergetycznego estru siarkowego dwoma enzymami E_1 i E_2 . W drugim etapie, trzeci enzym E_3 katalizuje tworzenie wiązania izopeptydowego pomiędzy kompleksem przejściowym ubikwiny oraz substratem białkowym. E_3 posiadając selektywne miejsce wiązania substratu rozpoznaje jego cechy strukturalne i umożliwia proteolizę zależną od ubikwiny. W szeregu badaniach stwierdzono, że wolna grupa amino na końcu peptydu jest istotnym czynnikiem strukturalnym dla rozpoznawania poprzez ubikwinę.

Pokazano również, że koniugacja ubikwiny oraz degradacja białek zależna jest od obecności tRNA jako kofaktora (44). Dodatek rybonukleazy hamuje ten proces. Badania kinetyczne wskazały, że tRNA związane są z reakcją koniugacji a nie z tworzeniem się wiązania izopeptydowego. Początkowo przypuszczano, że tRNA aktywuje ubikwinę według mechanizmu podobnego do aktywacji aminokwasów podczas aminoacylacji tRNA (45). Funkcję tRNA w reakcji koniugacji udało się bliżej poznać badając rozpad białek zawierających na końcu aminowym, kwaśne aminokwasy: albumina wołowa z końcowym kwasem asparaginowym, inhibitor trypsyny soi z kwasem asparaginowym i globulina wołowa z kwasem glutaminowym. Stwierdzono, że zanim przyłączy się ubikwina następuje potranslacyjna modyfikacja końcowego aminokwasu w białku. Z innych badań wiadomo, że bakterie i eukarionty zawierają enzymy, transferazy aminoacylo-tRNA: białko, które katalizują właśnie potranslacyjne przyłączenie specyficznych reszt aminokwasowych do N-końca białek akceptorowych. Jedną z najlepiej poznanych transferaz jest arginylo-tRNA: białko transferaza (45). Degradacja albuminy wołowej, inhibitora trypsyny soi i globuliny znakowanych jodem 125 przez ubikwinę zależna była od obecności tRNA, (co wykazano prowadząc reakcję w obecności rybonukleazy). Hydroliza tRNA uniemożliwiła argynowanie substratu, natomiast dodawanie dalszych ilości tRNA powodowało reaktywację systemu ubikwiny. Te obserwacje zostały potwierdzone w innych doświadczeniach w których badano czas życia białek jako funkcję dodatkowej reszty aminokwasowej na końcu N.

Klonowana β -galaktozydaza zawierająca kwas glutaminowy lub asparaginowy na końcu aminowym ma połowiczny czas rozpadu 10–30 min, natomiast β -galaktozydaza arginina na N końcu ma $T_{1/2}$ poniżej 2 min. Jest wielce prawdopodobne, że kwas glutaminowy lub asparaginowy nie są czynnikami destabilizującymi, ale po przyłączeniu innych czynników destabilizujących mogą powodować degradację. Z tych badań wynika, że udział arginylo-tRNA w procesie degradacji białek z udziałem ubikwiny jest oczywisty. Zagadnienie to ma kapitalne znaczenie przy otrzymywaniu nie zdegradowanych białek *in vitro*.

8. Podsumowanie

W artykule tym pokazaliśmy, że transferowe kwasy rybonukleinowe biorą udział w wielu procesach komórkowych. Nie wszystko jednak wiadomo, np. jakie cechy strukturalne oraz jakie właściwości decydują o specyficznej roli danego tRNA. Dotychczasowe 35 lat badań tRNA (część z nich odkryto w 1957 r.) nie pozwoliły na daleko idące uogólnienia. O ile w początkowym okresie badań wydawało się, że poszczególne elementy struktury przestrzennej tRNA są zaangażowane w ściśle określonych procesach, to dzisiaj nie wydaje się to tak oczywiste. Weźmy dla przykładu fragment antykodonu (ramię i pętla). Wiemy ponad wszelką wątpliwość, że jest on nie tylko zaangażowany w oddziaływanie z kodem, ale również jest rozpoznawany przez syntetazy, przeciwciała, odwrotną transkryptazę itd. Ponadto oddziaływania tRNA z kodonami są niejednoznaczne, co potwierdzają odkrycia coraz to nowych supresorowych tRNA (19,60) a także fakt, że aminokwas wbudowany do tworzącego się białka może być transportowany przez tRNA innej specyficzności (18,57). Te dwie ostatnie cechy wskazują na niejednoznaczności w zachowaniu się tRNA i powodują, że ciągle jesteśmy daleko od uzyskania kompletnej odpowiedzi na pytanie jaka jest funkcja lub rola tRNA w komórce. Rozwój technolo-

gii rekombinowanych DNA i RNA (54,55) pozwala zmienić zasadniczo dowolne nukleotydy w sekwencji na poziomie genu oraz dojrzałej cząsteczki RNA. Połączenie tych metod z możliwościami wprowadzenia rekombinowanych tRNA do żywej komórki, oferuje nowe narzędzie badawcze umożliwiające poznanie anatomii cząsteczki tRNA. Różnorodne właściwości cząsteczek tRNA dają szanse praktycznego wykorzystania tego rodzaju kwasów nukleinowych.

Literatura

1. Rich A., Schimmel P. R., (1977), *Acc. Chem. Res.*, 10, 385–387.
2. Westheimer F. H., (1986), *Nature*, 319, 534–536.
3. Cech T. R., Bass B. L., (1986), *Ann. Rev. Biochem.*, 55, 599–689.
4. Guerrier-Takada S., Altmann S., (1984), *Science*, 232, 285–286.
5. Shvedova T. A., Korneeva G. A., Ostroshchenko V. A., Venkstern T. V., (1987), *Nucleic Acids Res.*, 15, 1745–1752.
6. Brimacombe R., (1984), *Trends Biochem. Sci.*, 9, 273–277.
7. Krzyżosiak W., Denman R., Nurse K., Hellmann W., Boublik M., Gehrke C. W., Argis P. F., Offengand J., (1987), *Biochemistry*, 26, 2353–2364.
8. Moazed D., Noller H. F. (1987), *Nature*, 327, 389–394.
9. Wittmann H. G., (1982), *Ann. Rev. Biochem.*, 51, 155–183.
10. Noller H. F., (1984), *Ann. Rev. Biochem.*, 53, 119–162.
11. Chladek S., Sprinzl M., (1985), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 24, 371–391.
12. Sharp S. J., Schaack J., Cooley L., Burke D. J., Soll D., (1985), *CRC Critic. Rev. Biochem.*, 19, 107–144.
13. Sprinzl M., Dank N., Nock S., Schöll A., (1991), *Compilation of tRNA and tRNA gene sequences, Laboratorium für Biochemie, Universität Bayreuth.*
14. Cedergren R. T., Sankoff D., LaRue B., Grosjean H., (1981), *CRC Critic. Rev. Biochem.*, 15, 35–104.
15. Kernsten H., (1984), *Progr. Nucleic Acids Res., Mol. Biol.*, 31, 59–119.
16. LaRossa B., Soll D., (1982), in: *Transfer RNA*, Ed. S. Altmann, MIT, 136–167.
17. Kim S. H., (1981), in: *Topics in Nucleic Acids Structure*, Ed. S. Neidle, 83–139.
18. Soll D., informacja prywatna.
19. Barciszewska M., Barciszewski J., (1987), *Post. Biochem.*, 33, 467–484.
20. Dahlberg J. E., Kinter C., Lund E., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 1071–1075.
21. Yang W. K., Hwang D. L. R., Kiggans J. O. Jr., Yang D. M., Stringer C. D., Moore D. J., Hartmann F. C., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 80, 443–450.
22. Smardo F. L., Jr., Calvet J. P., (1987), *Nucleic Acids Res.*, 15, 661–681.
23. Bunn C. C., Mathews M. B., (1987), *Science*, 238, 1116–1119.
24. Temin H. M., (1986), *Cell Biophys.*, 9, 9–16.
25. Harada F., Peters G. G., Dahlberg J. E., (1979), *J. Biol. Chem.*, 254, 10979–10895.
26. Colicelli J., Goff S. P., (1986), *J. Virology*, 57, 37–45.
27. Hull R., Covery S. N., (1983), *Trends Biochem. Sci.*, 4, 119–121.
28. Turner D. S., Covey S. N., (1984), *FEBS Letters*, 165, 285–289.
29. Hohn T., Hohn B., Pfeiffer P., (1985), *Trends Biochem. Sci.*, 5, 205–209.
30. Innouye S., Saigo K., Yamada K., Kuchino Y., (1986), *Nucleic Acids Res.*, 14, 3031–3043.
31. Kikuchi Y., Ando Y., Shiba T., (1986), *Nature*, 323, 824–826.
32. Ali M., Vedeckis W. V., (1987), *Science*, 237, 467–470.
33. Ali M., Vedeckis W. V., (1987), *J. Biol. Chem.*, 262, 6771–6777.
34. Ali M., Vedeckis W. M., (1987), *J. Biol. Chem.*, 262, 6778–6784.
35. Rowley D. R., Premout R. T., Johnson H. P., Young C. Y. F., Tindall D. J., (1986), *Biochemistry*, 25, 6988–6995.
36. Klock G., Strahle U., Schutz G., (1987), *Nature*, 329, 734–736.
37. Weinstein J., Belae S. I., (1983), *J. Biol. Chem.*, 258, 67–6803.
38. Kannangara C. G., Gough S. P., Oliver R. P., Rasmussen S. K., (1984), *Carlsberg Res. Commun.*, 49, 417–437.

39. Schon A., Krupp G., Gough S., Berry-Lowe S., Gamini Kannangara C., Soll D., (1986), *Nature*, 323, 281-284.
40. Igloi G., (1987), prace nie opublikowane.
41. Finley D., Varshavsky A., (1985), *Trends Biochem. Sci.*, 9, 343-347.
42. Hershko A., Ciechanover A., (1982), *Ann. Rev. Biochem.*, 51, 335-364.
43. Bachmair A., Finley D., Varshavsky A., (1986), *Science*, 234, 179-186.
44. Farber S., Ciechanover A., (1986), *J. Biol. Chem.*, 261, 3128-3134.
45. Farber S., Ciechanover A., (1987), *Nature*, 326, 808-811.
46. Soffer R. L., w *Transfer RNA: Biological Aspects*, Söll D., Abelson J., Schimmel P. R., (1980), Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 493-505.
47. Barciszewska M., Barciszewski J., (1988), *Mol. Biol. Reports*, 13, 11-14.
48. Cortese R., (1979), in: *Biological Regulation and Development*, R. F. Geldberger, Ed. Plenum Press 1, 401-432.
49. Schimmel P., Putney R., Starzyk R., (1982), *Trends Biochem. Sci.*, 7, 209-212.
50. Barciszewska M., Barciszewski J., (1988), *Wiad. Chem.*, 42, 545-583.
51. Ryazanov A. G., (1984), *FEBS Lett.*, 178, 6-9.
52. Denis H., Le Maire M., (1985), *Eur. J. Biochem.*, 149, 549-556.
53. Le Maire M., Denis H., (1987), *J. Biol. Chem.*, 262, 654-669.
54. Davies J. R., Gassen H. G., (1983), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 22, 13-31.
55. Bruce A. G., Uhlenbeck O. C., (1982), *Biochemistry*, 21, 855-861.
56. Dvorak D. J., Kidson C., Chin R. C., (1976), *J. Biol. Chem.*, 251, 6730-6739.
57. Schon A., Gamini-Kannangara C., Gough S., Soll D., (1988), *Nature*, 331, 187-190.
58. Schimmel P., (1988), *Ann. Rev. Biochem.*, 56, 125-158.
59. Schulmann L. H., Abelson J., (1988), *Science*, 240, 1591-1592.
60. Barciszewska M., Barciszewski J., Legocki A., (1991), *Wiad. Chem.*, 45, 9-27.
61. Neuhaus D., Rhodes D., (1991), *Curr. Biol.*, 1, 268-270.
62. El-Baradi T., Baummeester T., Giltay R., Pieler T., (1991), *EMBO J.*, 10, 1407-1413.

New functions of transfer ribonucleic acids and the possibilities of their application in biotechnology

Summary

Aside from the major role of tRNA in ribosomal protein biosynthesis, many other processes have been discovered in which tRNA or aminoacyl-tRNA is implicated. However, only few of these processes are understood in detail, and often the mechanism of a particular reaction or its significance has remained elusive. It is clear, that in some cases tRNA and aminoacyl-tRNA act as regulators of particular metabolic processes. These multiple roles of tRNA, aminoacyl-tRNA and aminoacyl-tRNA synthetases lend a new dimension to the study of these macromolecules. There is a renaissance in the research on and the investigation of these other functions of tRNA, but there may be a tendency to assemble regulatory roles to still poorly understood tRNA functions.

Because of the diversity of tRNA involvement in cellular functions, there is no straightforward strategy for exploring old or finding new roles for tRNA. Since a detailed discussion of all the commonly known roles of tRNA is impossible in a short review, we will limit ourselves to the areas in which significant advances have been made during the last few years.

In this paper we will describe six functions of tRNA. These include formation of specific complexes of tRNAs with ribosomal RNAs, immunological properties of tRNA, participation of tRNA in priming of reverse transcriptase, and specific binding of steroid hormones, transfer RNA acts as a cofactor in chlorophyll biosynthesis and participates in protein degradation system with ubiquitin. The possibility of taking advantage of these functions and their application in biotechnology is also discussed.

Adres dla korespondencji:

Mirosława Z. Barciszewska, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań.