

Ribozimi

Zoko, Nikolina

Undergraduate thesis / Završni rad

2009

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:232588>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-01**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Ribozimi

Ribozymes

Seminarski rad

Nikolina Zoko
Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)
Mentor: prof. dr. sc. M. Kalafatić

Zagreb, 2009.

SADRŽAJ:

1.	UVOD	3
2.	KATALITIČKA RAZNOLIKOST RNA	4
2.1.	MALI SAMOCIJEPAJUĆI RIBOZIMI (NUKLEOLITIČKI RIBOZIMI).....	5
2.1.1.	HDV RIBOZIM	6
2.1.2.	HAIRPIN RIBOZIM.....	7
2.1.3.	HAMMERHEAD RIBOZIM	8
2.1.4.	VS RIBOZIM.....	10
2.2.	RIBONUKLEAZA P	11
2.2.1.	KATALIZA RNaza P RIBOZIMA.....	11
2.2.2.	STRUKTURA I KATALITIČKA SRŽ RNaza P RIBOZIMA	11
2.2.3.	PREPOZNAVANJE SUPSTRATA RNaza P RIBOZIMA.....	13
2.2.4.	FUNKCIJA PROTEINA U RNaza P RIBOZIMU	13
2.3.	INTRONI GRUPE I.....	14
2.3.1.	KATALIZA INTRONA GRUPE I	14
2.3.2.	STRUKTURA INTRONA GRUPE I	15
2.3.3.	AKTIVNO MJESTO INTRONA GRUPE I	16
2.4.	INTRONI GRUPE II.....	17
2.4.1.	KATALIZA INTRONA GRUPE II.....	17
2.4.2.	STRUKTURA INTRONA GRUPE II	18
2.4.3.	AKTIVNO MJESTO INTRONA GRUPE II.....	19
2.5.	RIBOSOMI	20
3.	TEORIJE O RNA SVIJETU	21
4.	LITERATURA.....	22
5.	SAŽETAK.....	27
6.	SUMMARY	28

1. UVOD

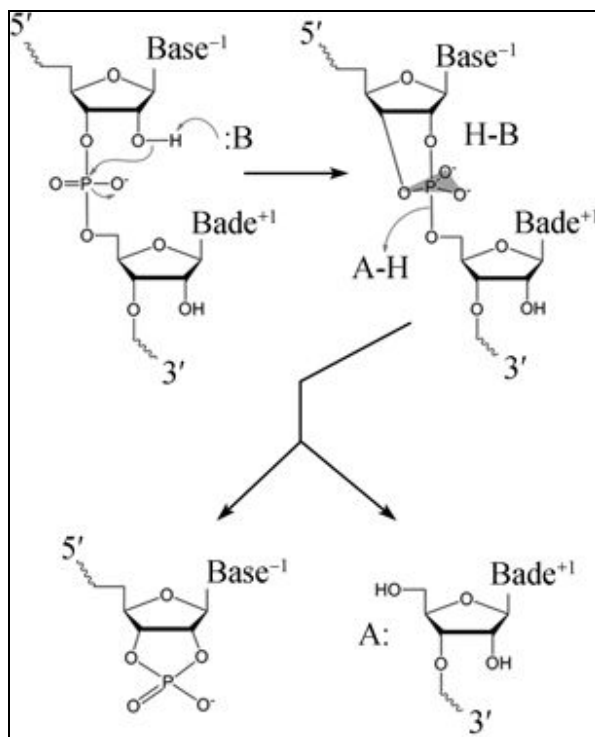
Ribozimi su RNA (eng. ribonucleic acid, ribonukleinska kiselina) molekule koje kataliziraju kemijsku reakciju (RNA enzimi). I prije otkrića ribozima pretpostavljalo se da RNA ima katalitičku aktivnost jer se znalo da formira visoko organizirane sekundarne strukture kao što to rade i proteini. Carl Woese, Francis Crick i Leslie Orgel su bili prvi znanstvenici koji su pretpostavljali da RNA može biti katalizator (Woese 1967). Dvojica znanstvenika koji su takve pretpostavke i potvrdili otkrićem ribozima su Sidney Altman, koji je radio na bakterijskom RNaza P kompleksu, i Thomas R. Cech, koji je proučavao RNA splicing vrste *Tetrahymena thermophila*. Za svoje otkriće dobili su Nobelovu nagradu 1989. godine. Ribozimi su grupirani u dvije skupine, male i velike, s obzirom na veličinu njihovih primarnih struktura. Dije se u četiri skupine s obzirom na reakcije koje kataliziraju: 1) nukleolitički ribozimi (katalizatori reakcija mjesno specifičnih cijepanja), 2) ribozimi introna grupa I i II (katalizatori dvaju uzastopnih fosfotransesterifikacijskih reakcija), 3) RNaza P (ribonukleaza P) ribozim (reakcija hidrolize prilikom maturacije tRNA) i 4) ribosomi (katalizatori peptidil-transfer reakcije). Ribozimi su široko rašireni u sve tri domene života (*Bacteria*, *Archaea*, *Eucaryota*) i uključeni su u različite biološke procese. Mali, nukleolitički ribozimi su česti u virusnom, virusoidnom i satelitnom RNA genomu gdje su odgovorni za uređivanje intermedijera replikacije kotrljajućeg kruga do dužine genoma. Introni grupa I i II su brojni u genomima organela i precizno izrezivanje ovih introna važno je za aktivnost bočnih eksona. Nedavno je utvrđeno da se važan biološki proces, sinteza polipeptida, odvija uz pomoć peptidil-transferazne aktivnosti rRNA komponente ribosoma (Cech, 2000.). NMR spektroskopija i kristalizacija su primarni postupci koji se koriste u otkrivanju detaljne strukture ribozima. Prvi ribozim čija je atomska struktura bila poznata je kristalna struktura hammerhead ribozima (Pley, Flaherty, McKay, 1994.). Danas je poznata atomska kristalna struktura skoro svih ribozima, a to je pomoglo razumijevanju odvijanja reakcije RNA katalize. Iako su primarne i tercijarne strukture ribozima dosta različite, čini se da je kiselo-bazna kataliza prevladavajući mehanizam svih ribozima.

2. KATALITIČKA RAZNOLIKOST RNA

Ribozimi u prirodi kataliziraju prijenos fosfata kroz 2 tipa kemijskih reakcija koje se razlikuju u produktima. Male RNA koje same sebe cijepaju (self-cleaving RNA) kataliziraju reverzibilnu reakciju cijepanja fosfodieterske veze koja daje 5'-hidroksilni kraj i 2'-3' ciklični fosfat kraj. RNaza P, ribozim odgovoran za cijepanje 5'-kraja prekursorke tRNA, i samoizrezujući introni (self-splicing introni) kataliziraju cijepanje fosfodieterske veze i ligacijske reakcije koje daju 5'-fosfatni i 3'-hidroksilni kraj. Obe vrste reakcija fosfatnog prijenosa se odvijaju inverzijom konfiguracije stereokemijski izrazito nepremostivih kisika koji su vezani za kiralni fosfor koji je podvrgnut nukleofilnom napadu, što ukazuje na S_N2 tip mehanizma reakcije. Nastojanja da se shvate mehanizmi reakcija enzima vode teorija prijelaznog stanja (transition state theory) i činjenica da katalizator funkcionira tako da smanjuje energetska barijeru između prijelaznog stanja i osnovnog stanja (stanja najniže energije) reaktanata. Moguće katalitičke strategije ribozima uključuju: pozicioniranje reaktivnih grupa u optimalnu orijentaciju, opću kiselo-baznu katalizu prijenosa protona da bi se aktivirali nukleofilni kisikovi atomi ili da bi se stabilizirale oksianionske grupe, elektrostatsku katalizu kroz stabilizaciju negativnog naboja koji se nakuplja u prijelaznom stanju, i destabilizaciju osnovnog stanja. Znanstvenici su pokušavali shvatiti koji od ovih mehanizama koriste RNA enzimi. U kontrastu s kemijskom raznolikošću aminokiselinskih bočnih lanaca koji čine aktivna mjesta enzima proteina, samo 4 nukleotida su na raspolaganju aktivnom mjestu ribozima. Aminokiseline mogu imati različite nepolarne, nabijene i nenabijene bočne lance za kiselo-baznu i elektrostatsku katalizu. Iako biokemijske i strukturalne osobine ribonukleotida čine ribonukleotide pogodnima za pohranu i transmisiju genetske informacije kroz komplementarno sparivanje baza, oni nisu toliko «stručni» u katalitičkoj kemiji. Ionizacija dušičnih baza i riboza-fosfat okosnice se odvija pri visokom ili niskom pH, što je problem za sudjelovanje baza u kiselo-baznoj katalizi pri neutralnom pH. Pri neutralnom pH nijedna pozitivno nabijena RNA funkcionalna grupa nije sposobna funkcionirati kao Lewisova kiselina da bi aktivirala nukleofil ili stabilizirala elektronegativno prijelazno stanje ili oksianionsku izlaznu grupu. Sve ribozimske reakcije su stimulirane dvovalentnim kationima i do nedavno se smatralo da sve ove katalitičke reakcije funkcioniraju upotrebom metalnih iona kao kofaktora. Proteinski metaloenzimi mogu katalizirati slične reakcije kao i ribozimi, i činilo se da metalni ioni nude ribozimima kemijsku raznolikost koju RNA funkcionalne grupe nemaju. Ipak, bio je potreban oprez da bi se

razlikovale nespecifične kationske interakcije koje stabiliziraju funkcionalne ribozimske strukture i specifične metalne interakcije koje direktno doprinose katalizi.

2.1. MALI SAMOCIJEPAJUĆI RIBOZIMI (NUKLEOLITIČKI RIBOZIMI)



Slika 1. Reakcijski mehanizam nukleolitičkih ribozima. A označava opću kiselinu, a B opću bazu. Četiri atoma u planarnom položaju su osjenčana sivo u trigonalnom bipiramidalnom prijelaznom stanju.

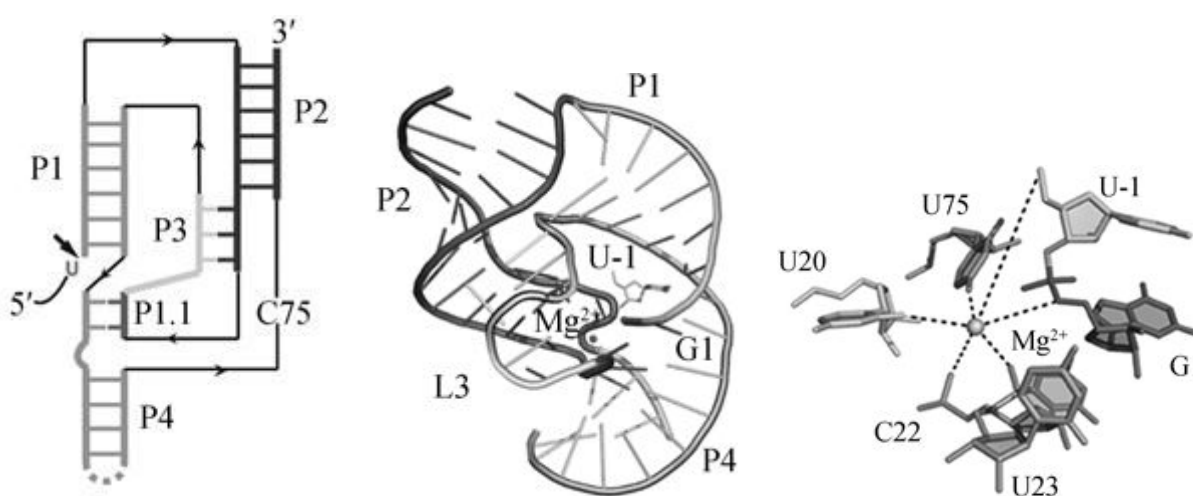
(WU QiJi i sur. Sci China Ser C-Life Sci | Mar. 2009 | vol. 52 | no. 3 | 232-244)

Nukleolitički ribozimi provode mjesno-specifičnu reakciju cijepanja da bi obradili intermedijere reakcije replikacije kotrljajućeg kruga na genomsku veličinu. Reakcija cijepanja je transesterifikacijska reakcija u kojoj 2'-kisik iz mjesta cijepanja napada susjedni 3'-fosfor, stvarajući ciklički 2', 3'-fosfat na 3'-kraju i slobodnu hidroksilnu grupu na 5'-kraju. Kemijska reakcija cijepanja je S_N2 reakcija. Reakcija prvo uključuje deprotonaciju 2'-hidroksilne grupe u mjestu cijepanja. Onda deprotonirani 2'-kisik stvara slabu vezu sa susjednim 3'-fosforom i tako mjesto cijepanja prelazi u prijelazno stanje trigonalne bipiramidalne strukture u kojoj se nukleofil 2'-kisik i izlazna grupa 5'-kisik smještaju na suprotnom vrhu i poredaju s 3'-fosforom (na jednom pravcu). Reakcija završava formiranjem kovalentne veze između 2'-kisika i 3'-fosfora te pucanjem 3'-5' fosfatne veze (Lilley, D. M., 2003.). Općenito, ovi

ribozimi također provode reakciju reverzibilne ligacije, u kojoj 5'-kisik djeluje kao nukleofil koji napada ciklički fosfat. Reakcija je kiselo-bazna reakcija, u kojoj je opća baza uključena u deprotonaciju 2'-hidroksilne grupe da bi se aktivirao 2'-kisik nukleofil, a opća kiselina u protonaciju 5'-kisik izlazne grupe. Nukleolitički ribozimi su tako nazvani zbog činjenice da svi koriste nukleotidne funkcionalne grupe kao opće kiseline i baze, osim HDV ribozima koji možda koristi i metalni ion u aktivnom mjestu da bi djelovao kao opća baza. Kiselo-bazna reakcija je univerzalni mehanizam svih ribozima. Dvije su osobine koje razlikuju male nukleolitičke ribozime od ostalih. Glavna razlika je u tome što nukleolitički ribozimi koriste unutarnje nukleotidne grupe kao nukleofile umjesto neke druge molekule (grupa II introna) ili vanjske molekule (grupa I introna, RNaza P i ribosom). Druga razlika je u tome što su opća baza i kiselina dio ribozima (njihove funkcionalne grupe), dok ostali ribozimi koriste metalne ione.

2.1.1. HDV RIBOZIM

HDV (hepatitis delta virus) je RNA satelitni virus hepatitis B virusa (HBV). Njegov genom čini cirkularna jednolančana RNA od otprilike 1700 nukleotida i replicira se pomoću domaćinske RNA polimeraze II mehanizmom dvostruko kotrljajućeg kruga (Lai 1995.). Replikacija proizvodi linearne multimerne obaju genomske i antigenomske RNA. HDV ribozimi su kodirani u obe RNA za cijepanje multimera u veličinu koja odgovara genomu. Sastoje se od 5 uzvojnica (označenih P1-P4) i veznog dijela od 2 para baza označenog kao P1.1 (Ferré-D'Amaré, Zhou, Doudna 1998.), (slika 2., lijevo).



Slika 2. HDV ribozim. Lijevo-sekundarna struktura, strelice označavaju mjesto cijepanja. Sredina-tercijarna struktura. Desno-aktivno mjesto.

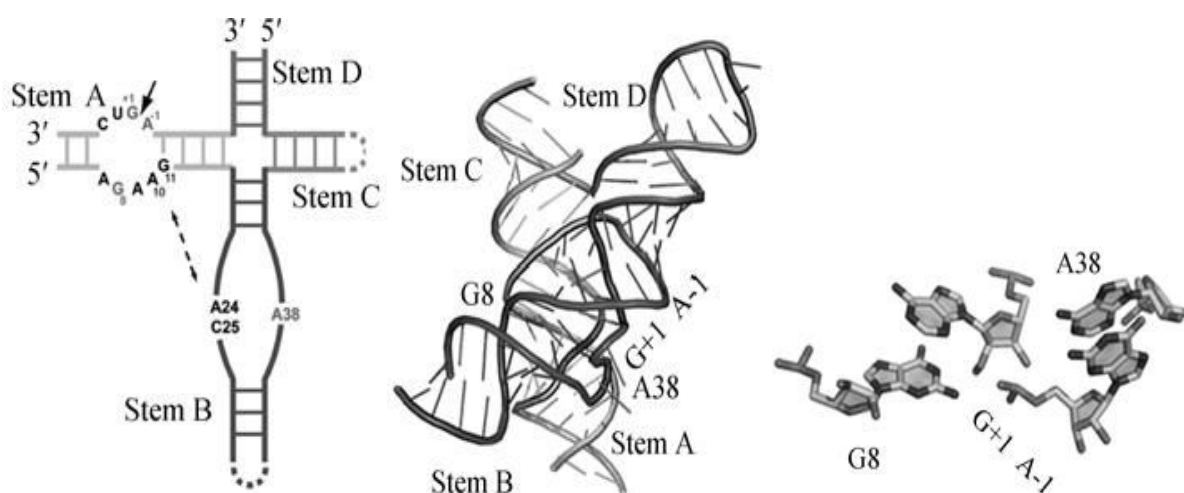
(WU QiJia i sur. Sci China Ser C-Life Sci | Mar. 2009 | vol. 52 | no. 3 | 232-244)

Ove uzvojnice tvore unutarnju dvostruku pseudopetlju: uzvojnice P1 i P2 formiraju jednu pseudopetlju, a P3 i P1.1 drugu, i ove dvije pseudopetlje zajedno čine treću pseudopetlju između P1 i P1.1 (pseudopetlja je struktura nukleinske kiseline koju karakterizira sparivanje baza među nukleotidima u petlji strukture ukosnice s komplementarnim bazama izvan ukosnice). Tih pet uzvojnica je složeno u dvije paralelne grupe u kojima su uzvojnice P1, P1.1 i P4 koaksijalno složene, a P2 uzvojnica je koaksijalno složena na P3 (slika 2., lijevo). Te dvije grupe uzvojnica su povezane s 5 križanja lanaca i dodatno učvršćene sparivanjem P1.1. P1 uzvojnica je supstrat uzvojnica i sadrži mjesto cijepanja. Katalitička srž ribozima uključuje P1.1, P3 i vezne regije, dok je P1, P2 i P4 stabiliziraju. Metalni ion ne sudjeluje izravno u aktiviranju nukleofila, on «privlači» naboje. Kristalografske analize HDV ribozima su pokazale da citozin u aktivnom mjestu možda ima poremećen pK_a i da je uključen u transfer protona. Kasnije biokemijske studije su pokazale da citozin u aktivnom mjestu ima blizu-neutralni pK_a i da je najvjerojatnije opća kiselina i da metalni ioni vezani za HDV ribozim daju malo poboljšanje reakciji katalize (Perrotta i sur. 1999.). Nukleotid C75 je važan u katalizi (slika 2., desno). Kako metalni ioni ne sudjeluju direktno u ovoj reakciji katalize pretpostavilo se da C75 djeluje kao baza koja aktivira 2'-hidroksilnu skupinu nukleotida -1 za nukleofilni napad (Ferré-D'Amaré, Zhou, Doudna 1998.). Potrebna su dodatna istraživanja mutanata C75U da bi se dao odgovor na ove pretpostavke.

2.1.2. HAIRPIN RIBOZIM

Hairpin ribozim (ribozim u obliku ukosnice) je pronađen unutar RNA satelita biljnih virusa, gdje provodi reverzibilnu reakciju samocijepanja da bi stvorio produkte replikacije (kotrljajućeg kruga) genoma. Ovi ribozimi se sastoje od četiri uzvojnice (A, B, C, D) koje tvore četverokraku vezu (slika 3., lijevo). A i B uzvojnice sadrže unutarnju petlju, a mjesto cijepanja ribozima nalazi se u petlji A. Nukleotidi su u ove dvije petlje visoko konzervirani i ključni za katalizu, dok su helikalne regije visoko varijabilne (Walter, Burke 1998.). U aktivnoj strukturi, uzvojnica A se koaksijalno smješta na D, a B na C (slika 3., sredina). Ove dvije koaksijalno smještene («upakirane») domene su anti-paralelno pozicionirane da bi se omogućio kontakt između unutarnjih petlji uzvojnica A i B koji će stvoriti katalitički centar. Aktivno mjesto uključuje ribozni zatvarač (eng. ribose zipper; tercijarna interakcija koju čine uzastopne vodikove veze između okosnica riboza 2'-hidroksilnih krajeva iz dvije regije lanca koje su međusobno povezane anti-paralelno (Cate i sur. 1996.)) koji se formira između A10, G11 u petlji A i A24, C25 u petlji B. Nukleotid G+1 je istisnut iz petlje A i umetnut u džep

unutar petlje B tako da tvori Watson-Crick bazni par sa C25. Ovo izguravanje mijenja konformaciju okosnice i tako 2'-kisik nukleofil A-1 nukleotida postaje dobro pozicioniran za nukleofilni napad. Nukleotidi G8 i A38 su smješteni jako blizu aktivnog centra i povezani su vodikovom vezom s cijepajućim fosfatom (eng. scissile phosphate; onaj fosfat na kojem će se dogoditi cijepanje nukleinske kiseline), i to upućuje na to da ta dva nukleotida možda funkcioniraju kao opća baza i opća kiselina u kiselo-baznoj katalizi (Rupert, Ferre-D'Amare 2001.).



Slika 3. Hairpin ribozim. Lijevo-sekundarna struktura. Sredina-tercijarna struktura. Desno-aktivno mjesto.

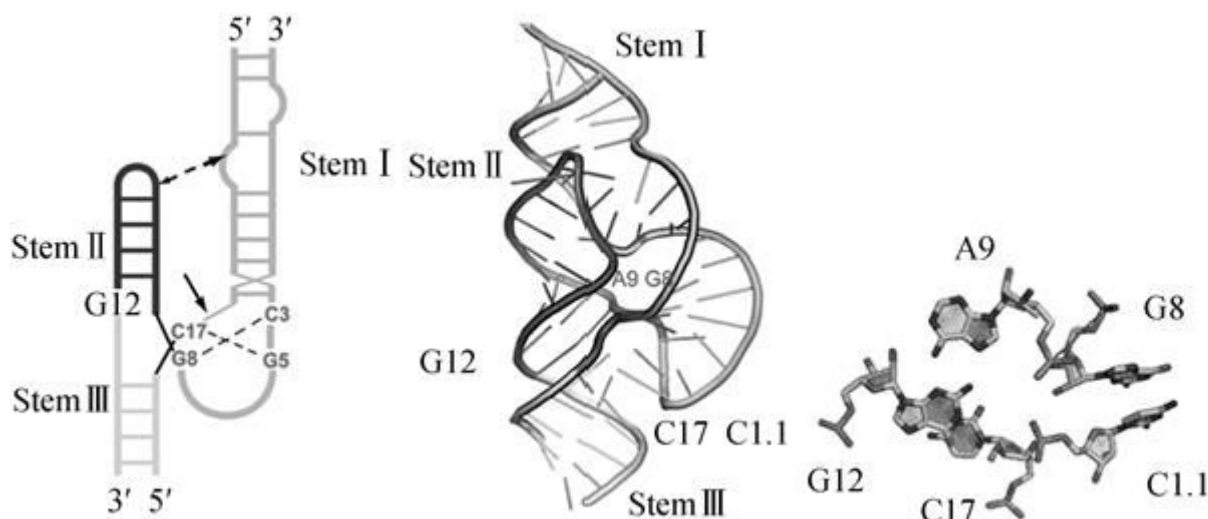
(WU QiJia i sur. Sci China Ser C-Life Sci | Mar. 2009 | vol. 52 | no. 3 | 232-244)

Eksperimentalni dokazi ukazuju na kombinaciju barem 4 mehanizma ove RNA: (1) precizna orijentacija supstrata, (2) preferentno vezanje prijelaznog stanja, (3) elektrostatska kataliza i (4) kiselo-bazna kataliza (Ferre´ -D'Amare 2003.). Hairpin ribozim ne zahtijeva prisustvo metalnih iona kao kofaktora u katalizi (Young, Gill, Grasby 1997.). Katalizira ligaciju jednako učinkovito kao što katalizira cijepanje. Kako se radi o reakcijama transesterifikacije, reverzibilnost zahtijeva da ako G8 i A38 funkcioniraju kao baza i kiselina u reakciji cijepanja, u reakciji ligacije moraju djelovati obrnuto, G8 kao kiselina i A38 kao baza (Fedor 1999.).

2.1.3. HAMMERHEAD RIBOZIM

Hammerhead ribozimi (ribozimi u obliku glave čekića) su male samocijepajuće RNA molekule koje kataliziraju reakciju izomerizacije specifične fosfodieterske veze prilikom replikacije kotrljajućeg kruga. Ovaj ribozim katalizira identične kemijske reakcije kao i hairpin ribozim iako imaju drugačije strukture i drugačije biokemijske osobine, uključujući

različite ovisnosti o pH i metalnim kationima u katalizi reakcije RNA ligacije. Hammerhead ribozim se može pronaći u biljnim viroidima. Najjednostavniji hammerhead ribozim se sastoji od srži koju čine konzervirani nukleotidi i tri bočne uzvojnice koje su u obliku čekića (označene I, II i III). Prvi je ribozim čija je detaljna atomska struktura bila poznata. Uzvojnice II i III su koaksijalno smještene, a uzvojnica I je smještena pod oštrim kutem u odnosu na uzvojnici II (Pley, Flaherty, McKay 1994.), (slika 4., lijevo).

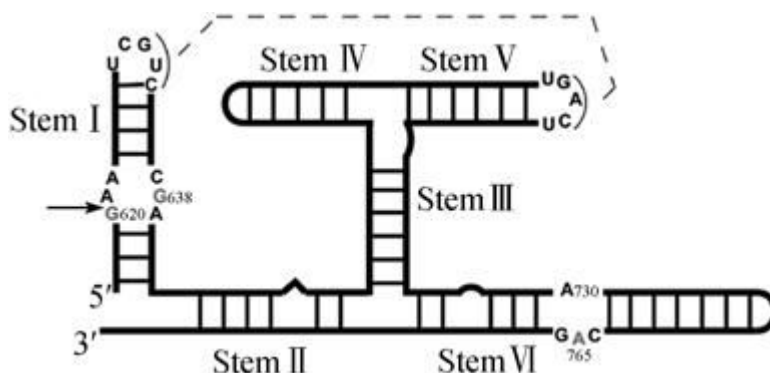


Slika 4. Hammerhead ribozim. Lijevo-sekundarna struktura. Sredina-tercijarna struktura. Desno-aktivno mjesto.
(WU QiJia i sur. Sci China Ser C-Life Sci | Mar. 2009 | vol. 52 | no. 3 | 232-244)

Nažalost, informacija o strukturi koja je zaključena na temelju kristalne strukture ne odgovara biokemijskim podacima u više pogleda, od čega je najveći problem taj što je pozicija cijepajućeg fosfata u kristalnoj strukturi u potpunosti nekompatibilna s mehanizmom napada «in-line» (McKay 1996.). Pretpostavljalo se da kristalna struktura nije katalitički aktivna struktura, nego da predstavlja osnovno stanje (eng. ground state). Ova hipoteza je bila predstavljena kristalnom strukturom cijelog aktivnog ribozima (Martick, Scott 2006.), (slika 4., sredina). U ovom kristalu iskrivljenja okosnice na veznim mjestima uzvojnica II i III primoravaju mjesto cijepanja, nukleotid C17, da se smjesti na uzvojnici III, tako ga smještajući u džep aktivnog mjesta na vezi triju uzvojnica. Nukleotid G5 se veže za furanozni kisik C17 nukleotida vodikovom vezom i tako pomaže pozicioniranju C17 za «in-line» napad. G12 je toliko daleko od 2'-kisika C17 nukleotida da ne može stvarati vodikovu vezu i ribeza G8 nukleotida se veže vodikovom vezom za 5'-kisik izlaznu grupu, što pretpostavlja da ova dva nukleotida djeluju kao opća baza i kiselina. Nukleotid C3 stvara Watson-Crick bazni par sa G8, da pomogne u pozicioniranju (slika 4., desno).

2.1.4. VS RIBOZIM

Varkud satelit (VS) ribozim kojega nalazimo u velikom broju u mitohondrijima roda *Neurospora* je uključen u procesiranje replikacijskih intermedijera. Veliki su otprilike 150 nukleotida i sastoje se od 6 uzvojnica koje stvaraju dvije trokrake veze, 2-3-6 vezu i 3-4-5 vezu (slika 5.).



Slika 5. Sekundarna struktura VS ribozima.

(WU QiJia i sur. Sci China Ser C-Life Sci | Mar. 2009 | vol. 52 | no. 3 | 232-244)

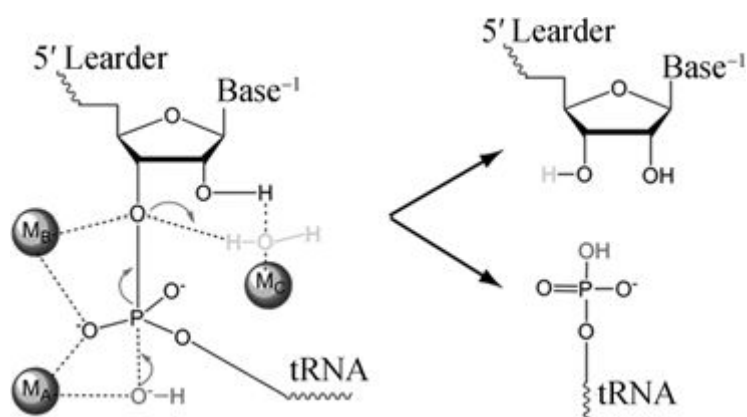
Uzvojnica I je supstratna uzvojnica koja sadrži mjesto cijepanja u svojoj unutarnjoj petlji. Uzvojnice IV, III i VI su koaksijalno smještene tako da stvaraju dugačku kolonu, a uzvojnice II i V se zrakasto pružaju od kolone. Sekvence u ovim dvama trokrakim vezama su od velike važnosti za pakiranje (smještanje) uzvojnica (Lafontaine, Norman, Lilley 2001.). Pretpostavlja se da su katalitički centri VS ribozima smješteni u izbočenoj petlji, označenoj kao A730 petlja VI uzvojnice. Mjesto cijepanja VS ribozima nalazi se poslije G620 u unutarnjoj petlji I uzvojnice. Nukleotidi GUC u terminalnoj petlji uzvojnice I formiraju dalekometne bazne parove sa GAC u terminalnoj petlji uzvojnice V (Andersen, Collins 2000.). Ova interakcija dovodi mjesto cijepanja do aktivnog mjesta. Pretpostavlja se da nukleotidi A765 i G638 možda sudjeluju u kiselo-baznoj katalizi, ali još nije utvrđeno koji od nukleotida se ponaša kao baza, a koji kao kiselina (Hiley, Sood, Fan i sur. 2002.). Istisnuti (savnuti) bazni par između G620 i A638, i G-A istisnuti bazni parovi između G638 i A621 te G638 i A622, pomažu u održavanju 2'-kisika deprotoniranim u blizini opće baze (Hoffmann, Mitchell, Gendron i sur. 2003.).

2.2.RIBONUKLEAZA P

RNaza P je ribonukleoprotein koji se sastoji od jedne RNA i jedne ili više proteinskih komponenti i postoji u sve tri domene života. RNA komponenta je u ovom kompleksu katalitička podjedinica. Za razliku od ostalih ribozima, RNaza P funkcioniše in trans i može procesirati različite supstrate (tRNA, 4.5 rRNA, tmRNA (transfer-messenger RNA)).

2.2.1. KATALIZA RNaza P RIBOZIMA

RNaza P uređuje tRNA gen koristeći reakciju hidrolize koja je također reakcija kiseline-baze. Još nije sasvim sigurno kakav je poredak atoma kemijskih grupa ribozima. Mehanizam reakcije je uglavnom zaključen iz biokemijskih podataka. Pretpostavlja se da je u reakciji nukleofil molekula vode, aktivirana općom bazom. Tri dvovalentna metalna iona su uključena u reakciju. Metal A (na slici 6.) djeluje kao opća baza da bi deprotonirao nukleofil, što rezultira stvaranjem Mg^{2+} -hidrata koji funkcioniše kao nukleofil za početak reakcije. Metal B je uključen u stabilizaciju trigonalnog bipiramidalnog prijelaznog stanja. 2'-hidroksilna grupa mjesta cijepanja prekursorske tRNA (N_{-1}) koordinira treći metalni ion vodom da bi protonirao 3'-izlaznu grupu.



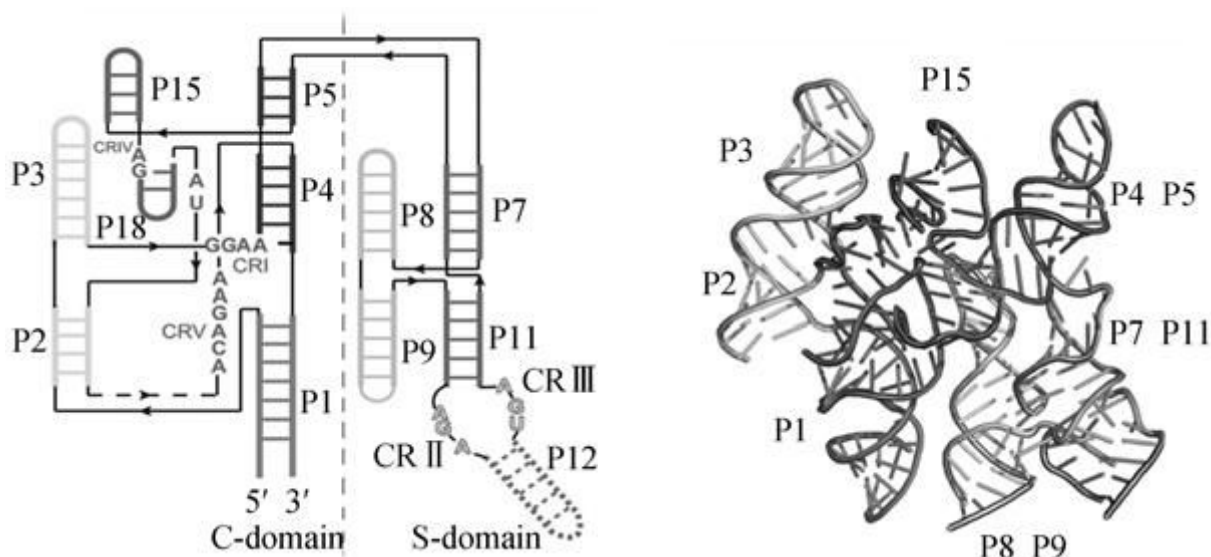
Slika 6. Mehanizam katalize Rnaze P.

(WU QiJia i sur. Sci China Ser C-Life Sci | Mar. 2009 | vol. 52 | no. 3 | 232-244)

2.2.2. STRUKTURA I KATALITIČKA SRŽ RNaza P RIBOZIMA

Primarne sekvence i sekundarne strukture RNaze P su raznolike, ali svi RNaza P ribozimi dijele set visoko konzerviranih strukturalnih elemenata koji čine strukturalnu i

katalitičku srž. Srž se sastoji od 5 konzerviranih regija (CR, od eng. conserved regions), označenih CRI do CRV, koje sadrže mnogo visoko konzerviranih nukleotida (slika 7., desno). Osim uobičajenih struktura srži, svaki RNaza P ribozim sadrži svoje jedinstvene periferne elemente. Ti elementi su filogenetski konzervirani u svakoj domeni života. Bakterijske RNaza P RNA su obično 330-400 nt velike i podijeljene su u 2 grupe: A-tip (ancestralne) i B-tip (*Bacillus*), prema razlikama u perifernim elementima koje sadrže (Kazantsev, Pace 2006.). Ribozimi *Archaea* su slični po veličini bakterijskima, ali imaju različite periferne elemente. Ribozimi *Eucarya* su veličine dvije trećine bakterijskih i nedostaju im mnogi periferni elementi prisutni u bakterijskim ribozimima (Xiao, Scott, Fierke i sur. 2002.). RNaza P ribozimi su podijeljeni u dvije domene koje su neovisno smotane (slika 7., lijevo). S-domena (domena specifičnosti) je uključena u prepoznavanje pre-tRNA supstrata interakcijom sa T ψ C petljom, dok je C-domena (katalitička domena) odgovorna za prepoznavanje pre-tRNA akceptorske uzvojnice i 3'-CCA sekvence i katalizira reakciju hidrolize (Harris, Christian 2003.). Cjelokupna struktura ribozima je kompaktna i zavijena, sastavljena od koaksijalno smještenih uzvojnica koje su spojene zajedno dalekomentim veznim interakcijama. Ove prostorno raspoređene uzvojnice tvore plosnatu površinu odgovornu za vezanje pre-tRNA (Kazantsev, Krivenko, Harrington i sur. 2005.). Pet konzerviranih regija, zajedno s uzvojnicom P15 i tri koaksijalno položene uzvojnice P1-P4-P5, P2-P3 i P8-P9 (slika 7.,desno), tvore katalitičku srž ribozima (Torres-Larios, Swinger, Krasilnikov i sur. 2005.). P4 je važan za katalizu ribozima. Tri dvovalentna metalna iona su ponadana vezana za veliki utor uzvojnice P4 u kristalu, ali ovi metalni ioni su bili predaleko od aktivnog mjesta i zato možda ne sudjeluju u katalizi (Kazantsev, Krivenko, Harrington i sur. 2005.). Umjesto toga, pronađena su dva druga metalna iona u veznim regijama koja su u blizini aktivnog mjesta i koja mogu sudjelovati u katalizi. Periferni elementi nalaze se na površini, dalje od mjesta vezanja supstrata, i mogu stabilizirati cijelu strukturu dalekometnim interakcijama. Iako različiti RNaza P ribozimi sadržavaju različite periferne elemente, tercijarne strukture su održane ulaskom odgovarajućih interakcija.



Slika 7. RNaza P ribozim. Lijevo-sekundarna struktura. Desno-tercijarna struktura.

(WU QiJia i sur. Sci China Ser C-Life Sci | Mar. 2009 | vol. 52 | no. 3 | 232-244)

2.2.3. PREPOZNAVANJE SUPSTRATA RNaza P RIBOZIMA

Iako je dobiveno nekoliko kristalnih struktura ovog ribozima, nema kristala ribozim-supstrat kompleksa, tako da su se spoznaje o vezanju supstrata dobile uglavnom iz biokemijskih podataka i modeliranja tRNA na ribozimskim kristalima. Pre-tRNA za vezanje sadrži 5'-vodeću sekvencu, 3'-CCA i T ψ C petlju. Univerzalno konzerviran adenzin u J5/15 vezi ribozima djeluje s N₋₁ nukleotidom 5'-vodeće sekvence pre-tRNA. Prepoznavanje T ψ C petlje pre-tRNA ostvaruje S-domena ribozima čija dva visoko konzervirana adenozina u P10/11 domeni mogu sudjelovati u vezanju T ψ C petlje. Za interakciju između 3'-CCA tRNA i L15 ribozima se dugo smatralo da je ključna za odabir mjesta hidrolize. Nedavna biokemijska istraživanja su otkrila da je ova interakcija puno kompleksnija od jednostavnog sparivanja baza. Npr., za ovu interakciju su potrebni dvovalentni kationi, a kompenzacijske mutacije koje održavaju sparivanje baza uzrokuju katalitičke defekte, pokazujući da ova interakcija nije jednostavno sparivanje baza (Busch, Kirsebom, Notbohm i sur. 2000.).

2.2.4. FUNKCIJA PROTEINA U RNaza P RIBOZIMU

Proteinska komponenta ovog ribozima može funkcionirati strukturalno ili katalitički i visoko je varijabilna za tri domene života. Čini se da je proteinski dio u korelaciji sa strukturalnom složenošću RNA komponente ribozima. Bakterijske RNaze P imaju

kompleksniju RNA strukturu i sama RNA može izvršiti katalizu. Proteinska komponenta u ovim ribozimima čini samo 10% sveukupne mase. Eukariotski RNaza P ribozimi imaju relativno jednostavne RNA strukture, a proteinska komponenta čini čak 70% strukture (Evans, Marquez, Pace 2006.).

Nedavna istraživanja su otkrila novu ulogu RNaze P u transkripciji tRNA gena RNA polimerazom III, tako povezujući transkripciju s obradom u regulaciji ekspresije tRNA gena. Isto tako, RNaza P je nužna za transkripciju malih, nekodirajućih RNA gena, čiji prekursorski transkripti nisu prepoznati kao supstrati od strane ovog holoenzima. U skladu s tim, RNaza P može djelovati samo kao transkripcijski faktor za polimerazu III, uloga koja je, čini se, ostala sačuvana u eukarya (Jarrous, Reiner 2007.).

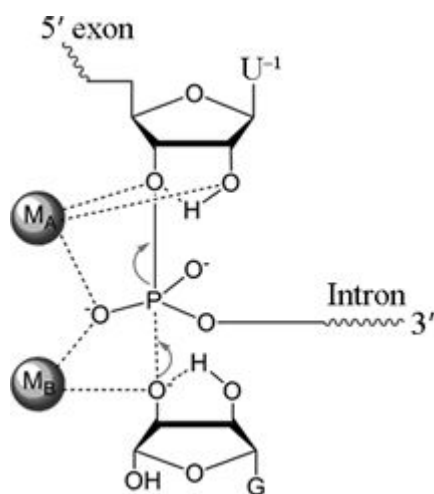
2.3.INTRONI GRUPE I

Grupa I introna je velika grupa RNA koje se mogu samoizrezivati iz gena u kojima se nalaze. Široko su rasprostranjeni u prirodi.

2.3.1. KATALIZA INTRONA GRUPE I

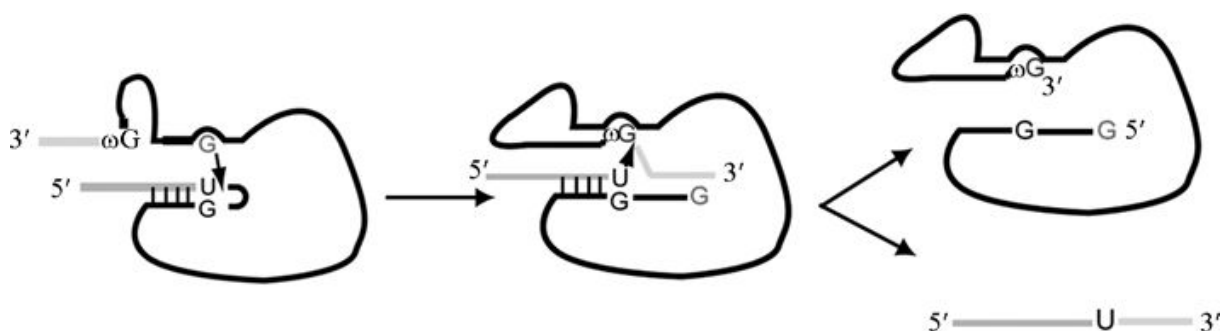
Reakcija samoizrezivanja (eng. self-splicing) je dvostruka uzastopna reakcija fosfotransesterifikacije, što uključuje pravilnu eksciziju introna na 5'- i 3'-izrezujućim krajevima i ligaciju bočnih eksona. U prvom koraku reakcije cijepanja RNA dupleks koji sadrži 5'-supstrat vezan u katalitičku srž introna pozicionira 5'-izrezujuće mjesto za napad. Vanjski gvanozin se veže za aktivno mjesto da započne reakcija, koristeći svoju 3'-hidroksilnu grupu kao nukleofil za napad na fosfat 5'-izrezujućeg mjesta. Zbog ovoga se kida fosfodieterska veza na 5'-izrezujućem mjestu i rezultira stvaranjem slobodne 3'-hidroksilne grupe na 5'-eksonu i 5'-G vezanim intronom. Nakon prvog koraka reakcije dolazi do konformacijskih promjena da bi se oslobodio napadajući gvanozin i da bi se visoko konzervirani gvanozin (ω G) vezao na 3'-kraju introna. Zatim slijedi drugi korak, slobodni 3'-hidroksilni kraj 5'-eksona kao nukleofil napada fosfat na 3'-izrezujućem mjestu. Dolazi do ligacije eksona i oslobađanja introna (slika 9.). Kemijska reakcija introna grupe I je kiselo-bazna. Najmanje dva Mg^{2+} iona su direktno uključena u reakciju. M_B se veže za 3'-hidroksilnu grupu vanjskog gvanozina u prvom koraku, djelujući kao opća baza za aktiviranje nukleofila (slika 8.). Drugi Mg^{2+} (M_A) stabilizira 3'-izlaznu grupu, djelujući kao opća

kiselina. Ova dva metalna iona izmjenjuju uloge u drugom koraku reakcije (M_A kao baza, a M_B kao kiselina).



Slika 8. Prijelazno stanje prvog koraka reakcije katalize grupe I introna.

(WU QiJia i sur. Sci China Ser C-Life Sci | Mar. 2009 | vol. 52 | no. 3 | 232-244)



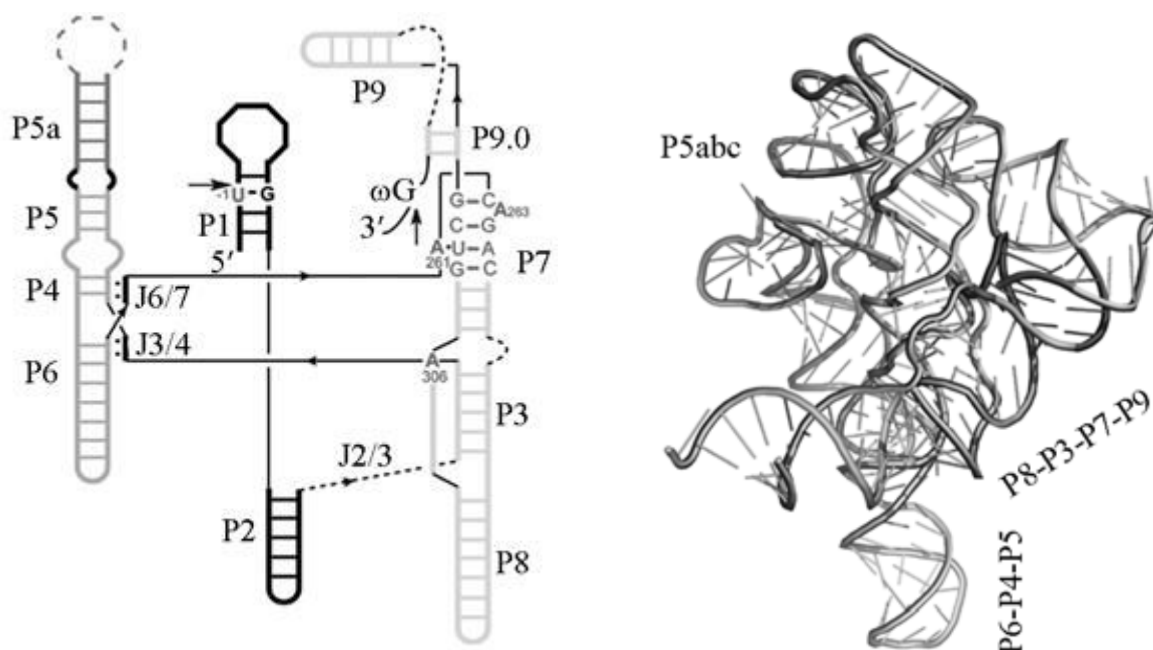
Slika 9. Self-splicing (samo-izrezivanje) introna grupe I.

(WU QiJia i sur. Sci China Ser C-Life Sci | Mar. 2009 | vol. 52 | no. 3 | 232-244)

2.3.2. STRUKTURA INTRONA GRUPE I

Unatoč varijacijama u veličini (stotine do tisuće nukleotida) svi introni zadržavaju središnju konzerviranu sekundarnu strukturu koju čini 9 uzvojnica (sa sparenim bazama) označenih P1 do P9 (Michel, Westhof 1990.). Devet uzvojnica je organizirano u tri domene P1-P2, P4-P6, P3-P9 (slika 10.). Sve su uzvojnice u svakoj domeni koaksijalno smještene. Uzvojnica P1 je supratna uzvojnica koja sadrži 5'-izrezujuće mjesto. Uzvojnice P3 i P7 formiraju pseudopetlju važnu za funkciju ribozima. Tercijarna struktura ovih introna otkriva kompaktnu strukturu u kojoj domena P4-P6 djeluje kao «skela», a domena P3-P9 je čvrsto

omotana oko P4-P6 domene (slika 10.). Tri domene su povezane konzerviranim veznim regijama koje igraju važnu ulogu u formaciji bilo cjelokupne strukture bilo aktivnog mjesta. Osim ovih 9 konzerviranih uzvojnica većina ovih introna sadrži barem jedan dodatni strukturalni element, nazvan periferni element. Ovi elementi su uglavnom uključeni u formiranje tercijarnih interakcija koje stabiliziraju strukturu srži i njihova delecija općenito smanjuje, ali ne eliminira samoizrezivanje (Johnson, Tijerina, Chadee i sur. 2005.).

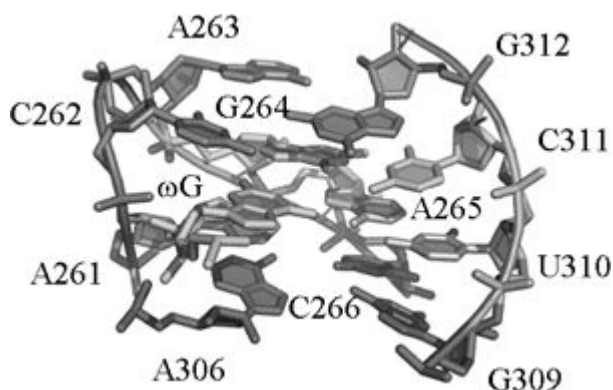


Slika 10. Introna grupe I. Lijevo-sekundarna struktura. Desno-tercijarna struktura.
(WU QiJia i sur. Sci China Ser C-Life Sci | Mar. 2009 | vol. 52 | no. 3 | 232-244)

2.3.3. AKTIVNO MJESTO INTRONA GRUPE I

Aktivno mjesto se nalazi u P7 uzvojnici koja veže ili vanjski gvanozin u prvom koraku reakcije da bi služio kao napadajući nukleofil, ili terminalni gvanozin introna u drugom koraku da bi ga se napalo. Čine ga 4 sloja baznih tripleta. U *Tetrahymena* intronu gvanozin (ili vanjski u prvom koraku ili terminalni u drugom) formira koplanarni bazni triplet (G-triplet) s G264-C311 baznim parom. Ovaj triplet je omeđen (u obliku sendviča) sa tri ostala sloja baznih tripleta. Iznad G-tripleta, C262 se veže sa G312. A263 formira dvije vodikove veze sa malim utorom G312. Baza C262 nukleotida se nalazi točno iznad purinskog prstena ωG. Ispod G-tripleta baza A261 nukleotida dodiruje veliki utor A265-U310 para. U idućem sloju, baza A306 nukleotida dodiruje veliki utor C266-G309 para i formira četvrtu bazu tripleta (slika 11.). Aktivno mjesto ribozima veže dva dvovalentna kationa da bi djelovalo kao

baza i kiselina, deprotoniranjem nukleofila i protoniranjem 3'-izlazne grupe (Guo, Gooding, Cech 2004.).



Slika 11. Katalitički centar *Tetrahymena* ribozima.

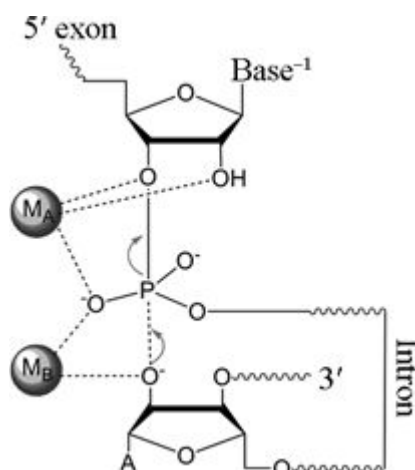
(WU QiJia i sur. Sci China Ser C-Life Sci | Mar. 2009 | vol. 52 | no. 3 | 232-244)

2.4.INTRONI GRUPE II

Ovi introni su druga skupina velikih ribozima (400-1000 nukleotida), koji se izrezuju iz prekursorske mRNA i spajaju svoje bočne eksone ligacijom, bez pomoći proteina. Neobični su jer koriste DNA kao prirodni supstrat. Nalazimo ih u velikom broju u genomu organela i bakterija.

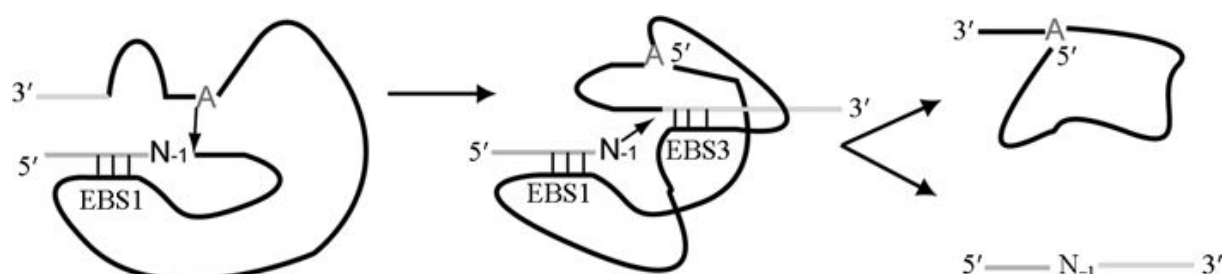
2.4.1. KATALIZA INTRONA GRUPE II

Njihov izrezujući mehanizam je identičan izrezivanju nuklearnih pre-mRNA introna, i pretpostavljalo se da su introni grupe II precizno spliceosomalnih introna (Zhaxybayeva, Gogarten 2003.). Reakcija izrezivanja ovih introna je također i reakcija ester-transfera u dva koraka. U prvom koraku 2'-hidroksilna grupa adenozina u mjestu grananja napada 5'-izrezujuće mjesto. Ovo vodi cijepanju 5'-eksona i formiranju lariat intermedijera te stvaranju slobodnog 3'-hidroksilnog kraja na 5'-eksonu. U drugom koraku 3'-hidroksilna grupa 5'-eksona napada 3'-izrezujuće mjesto i rezultira ligacijom eksona i stvaranjem lariatnog introna (Fedorova, Zingler 2007.), (slika 13.). Dvije su razlike u reakcijama II i I grupe introna (slika 12.). Prvo, introni grupe II koriste unutarnji adenzin u napadu na 5'-izrezujuće mjesto, koristeći njegovu 2'-hidroksilnu grupu kao nukleofil. Drugo, u kontrastu s I grupom introna u kojoj je 2'-hidroksilna grupa u blizini cijepajućeg fosfata uključena u stabilizaciju prijelaznog stanja, u II grupi introna je slobodna (Griffin, Qin, Michels i sur. 1995.).



Slika 12. Prijelazno stanje prvog koraka katalize introna grupe II.

(WU QiJia i sur. Sci China Ser C-Life Sci | Mar. 2009 | vol. 52 | no. 3 | 232-244)

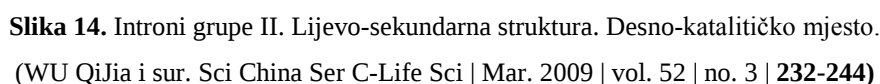


Slika 13. Self-splicing introna grupe II.

(WU QiJia i sur. Sci China Ser C-Life Sci | Mar. 2009 | vol. 52 | no. 3 | 232-244)

2.4.2. STRUKTURA INTRONA GRUPE II

Primarna sekvenca ovih introna je visoko varijabilna osim konzervirane sekvence u domeni V, ali svi se podešavaju u visoko konzerviranu sekundarnu strukturu koja se sastoji od 6 helikalnih domena, označenih I-VI (D1-D6), (slika 14., lijevo). D1 sadrži nukleotide koji su nužni za prepoznavanje i eksona i nukleofila mjesta grananja. D2 i D3 su nužne komponente za punu katalitičku aktivnost i vezne regije među njima (J2/3) su dio aktivnog centra. D4 ima ulogu u mobilnosti introna i malu ulogu u pakiranju ribozima ili katalizi. D5 je najkonzerviranija regija ove grupe introna. Direktno je uključena u stvaranju aktivne srži i nudi funkcionalne grupe za kemijsku katalizu. D6 sadrži adenzin mjesta grananja čiji 2'-hidroksil služi kao napadajući nukleofil u prvom koraku cijepanja (Qin, Pyle 1998.). Introni grupe II su podijeljeni u 3 podgrupe, IIA, IIB i IIC na temelju njihovih razlika u strukturi.



U aktivnom mjestu uključene su tri domene, D1, D5 i D6, i J2/3 linker. D1 veže supstrat, D6 dovodi napadajući nukleofil u prvom koraku cijepanja, dok D5 i J2/3 predstavljaju katalitičku regiju (slika 14., desno). Kad se ovi elementi slože zajedno nastaje aktivno mjesto. Domena I pomaže usidriti i 5'- i 3'-izrezujuća mjesta u domenu V kroz $\kappa\kappa'$, $\zeta\text{-}\zeta'$, $\lambda\text{-}\lambda'$ i $\varepsilon\text{-}\varepsilon'$ interakcije (Costa, Michel 1995.). Pozicioniranje adenzina u mjestu grananja je određeno nepravilnim baznim parovima između bočne polipirimidinske sekvence i sekvence petlje u D1 (Hamill, Pyle 2006.). Domena V je najviše konzervirana i najbitnija za katalizu. Funkcionalne grupe za kemijsku katalizu su takozvana «katalitička trijada» AGC sekvenca i D5 ispučenje (Konforti, Abramovitz, Duarte i sur. 1998.). Nalaze se jedna drugoj u blizini u smotanom ribozimu i najvjerojatnije djeluju zajedno. Domena V također sadrži vezni džep za metalne ione koji sudjeluju u katalizi. Veza J2/3 (između D2 i D3) i ispučenje D5 formiraju trostruku uzvojnica s katalitičkom trijadom (slika 14., lijevo). Trostruka uzvojnica dovodi u blizinu katalitički važne dijelove introna (Toor, Keating, Taylor i sur. 2008.).

2.5.RIBOSOMI

Ribosomi su najvažnije makromolekule koje postoje u sve tri domene života jer kataliziraju reakciju peptidil-transfera da bi translatirali mRNA u proteine. Sastoje se od dvije trećine ribosomalne RNA (rRNA) i jedne trećine ribosomalnih proteina. Kristalne strukture velike ribosomalne podjedinice u kompleksu sa supstratom i analogima produkta pokazuju da je samo RNA u poziciji u kojoj može omogućiti stvaranje peptidne veze. Tri su grupe RNA dovoljno blizu aktivnom mjestu da mogu stvarati vodikovu vezu s napadajućom α -amino grupom: 2'-hidroksilna grupa A76 nukleotida tRNA u P mjestu (P mjesto je mjesto u peptidiltransferaznom centru ribosoma u koje se veže tRNA koja je vezana za rastući peptidni lanac), N3 grupa A2486 nukleotida 23S rRNA i 2'-hidroksilna grupa A2486 nukleotida (Nissen, Hansen, Ban i sur. 2000.). Ove vodikove veze su možda uključene u pozicioniranje α -amino grupe za nukleofilni napad ili, važnije, za direktnu katalizu. U novijim istraživanjima kristalnih struktura ribosoma u kompleksu s mRNA i tRNA saznale su se strukturalne osnove ribosomalnog djelovanja (Selmer, Dunham, Murphy i sur. 2006.). Kristalna struktura velike podjedinice ribosoma je otkrila da nijedan proteinski dio ne postoji bliže od 18 Å od mjesta stvaranja peptidne veze i tako isključila moguću ulogu proteina u ovoj reakciji (Nissen, Hansen, Ban i sur. 2000.). Dakle, proteinska komponenta ne sudjeluje u reakciji peptidil-transfera i zbog toga su ribosomi RNA enzimi, ribozimi.

3. TEORIJE O RNA SVIJETU

Postojanje RNA svijeta je uvjerljiv korak u ranoj evolucijskoj povijesti života na Zemlji. Hipoteze o RNA svijetu predlažu da je postojalo vrijeme kada je RNA bila i genotip i fenotip, uloge koje sada uglavnom izvršavaju DNA i proteini. Iako ne postoje izravni dokazi za postojanje RNA svijeta, pretpostavilo se da su «molekularni fosili» života baziranog na RNA prisutni u modernoj biologiji. Npr., katalitičke RNA molekule (ribozimi) djeluju u procesiranju viralnog genoma, mRNA procesiranju, dorađivanju tRNA i sintezi proteina. Dodatno, male molekule dobivene iz nukleotida funkcioniraju kao kofaktori u različitim reakcijama koje kataliziraju proteini. Ako je postojao RNA svijet onda je morao postojati put kojim je život baziran na RNA prešao u život baziran na DNA i proteinima. RNA i dalje ima ključnu ulogu u živom organizmu (intermedijeri mRNA i tRNA). Genetički je materijal nekih virusa i mora se kopirati u DNA (cDNA) što je još jedan dokaz za moguće nekadašnje postojanje RNA svijeta. Ako je RNA bila glavni izvršitelj katalitičkih funkcija, onda su taj proces morale vršiti jedna ili više RNA molekula. Najjednostavniji sistem za propagaciju RNA-bazirane informacije bi uključivao dvije RNA molekule, replikazu ribozim i njegov komplement, s time da je replikaza odgovorna za stvaranje kopija i sebe i komplementa. Ova aktivnost je možda bila razvijena da bi dozvolila kopiranje ostalih RNA molekula čije su funkcije bile korisne za preživljavanje. Iako nikako nije sigurno da je takav replikaza ribozim postojao u evoluciji, laboratorijska istraživanja se mogu koristiti za određivanje je li RNA uopće sposobna imati ovakvo važno katalitičko djelovanje (McGinness, Joyce, 2003.).

Daljna istraživanja pretpostavljaju da je prvu važnu funkciju u RNA svijetu imao RNA sintetaza ribozim ovisan o kalupu, koji je katalizirao vlastitu replikaciju – od toga «RNA replikaza». Pretpostavke su i dalje nesigurne zbog toga što je potrebna velika sekvenca za takvu replikazu i zbog toga što nedostaje uvjerljiv mehanizam koji bi osigurao osobine koje su njemu pogodne. Zato su neki znanstvenici predložili nukleotid sintetazu ribozim kao alternativnog kandidata, osobito zbog nedavnih eksperimentalnih dokaza koji sugeriraju mogućnost postojanja djelotvorne neenzimatske kalup ovisne sinteze RNA. Ovi su znanstvenici pretpostavili da je RNA sintetaza ribozim ovisan o kalupu nastao kasnije, možda poslije nastanka protostanica (Ma, Yu, Zhang i suradnici, 2007.).

4. LITERATURA

Andersen A A, Collins R A. Rearrangement of a stable RNA secondary structure during VS ribozyme catalysis. *Mol Cell*, 2000, 5(3): 469—478

Busch S, Kirsebom L, Notbohm H, i sur. Differential role of the intermolecular base-pairs G292-C(75) and G293-C(74) in the reaction catalyzed by *Escherichia coli* RNase P RNA. *J Mol Biol*, 2000, 299: 941—951

Carl Woese, *The Genetic Code*, New York: Harper and Row, 1967.

Cate J H, Gooding A R, Podell E, Zhou K, Golden B L, Kundrot C E, Cech T R, Doudna J A. Crystal Structure of a Group I Ribozyme Domain: Principles of RNA Packing. *Science*, 1996, 273:1678-1685

Cech T R. Structural biology. The ribosome is a ribozyme. *Science*, 2000, 289(5481): 878—879

Costa M, Michel F. Frequent use of the same tertiary motif by self-folding RNAs. *EMBO J*, 1995, 14(6): 1276—1285

Duarte E A, Leavitt M C, Yamada O, i sur. Hairpin ribozyme gene therapy for AIDS. *Methods Mol Biol*, 1997, 74: 459—468

Evans D, Marquez S M, Pace N R. RNase P: interface of the RNA and protein worlds. *Trends Biochem Sci*, 2006, 31(6): 333—341

Fedor M J, Williamson J R. The catalytic diversity of RNAs. *Nature*, 2005, 6: 399-412

Fedor M J. Tertiary Structure Stabilization Promotes Hairpin Ribozyme Ligation. *Biochemistry*, 1999, 38: 11040-11050

- Fedorova O, Zingler N. Group II introns: structure, folding and splicing mechanism. *Biol Chem*, 2007, 388(7): 665—678
- Ferre´ -D'Amare A R. The Hairpin Ribozyme. *Biopolymers*, 2004, 73: 71–78
- Ferre´ -D'Amare´ A R, Zhou K, Doudna J A. Crystal structure of a hepatitis delta virus ribozyme. *Nature*, 1998, 395: 567-574
- Griffin E A Jr, Qin Z, Michels W J Jr, i sur. Group II intron ribozymes that cleave DNA and RNA linkages with similar efficiency, and lack contacts with substrate 2'-hydroxyl groups. *Chem Biol*, 1995, 2(11): 761—770
- Guo F, Gooding A R, Cech T R. Structure of the Tetrahymena ribozyme: base triple sandwich and metal ion at the active site. *Mol Cell*, 2004, 16(3): 351—362
- Hamill S, Pyle A M. The receptor for branch-site docking within a group II intron active site. *Mol Cell*, 2006, 23(6): 831—840
- Harris M E, Christian E L. Recent insights into the structure and function of the ribonucleoprotein enzyme ribonuclease P. *Curr Opin Struct Biol*, 2003, 13(3): 325—333
- Hiley S L, Sood V D, Fan J, i sur. 4-thio-U cross-linking identifies the active site of the VS ribozyme. *Embo J*, 2002, 21(17): 4691— 4698
- Hoffmann B, Mitchell G T, Gendron P, i sur. NMR structure of the active conformation of the Varkud satellite ribozyme cleavage site. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(12): 7003—7008
- Ikawa Y, Tsuda K, Matsumura S, Inoue T. De novo synthesis and development of an RNA enzyme. *PNAS*, 2004, 101(38): 13750–13755
- Jarrous N, Reiner R. Human RNase P: a tRNA-processing enzyme and transcription factor. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(11): 3519–3524

Johnson T H, Tijerina P, Chadee A B, i sur. Structural specificity conferred by a group I RNA peripheral element. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(29): 10176—10181

Johnston W K, Unrau P J, Lawrence M S, Glasner M E, Bartel D P. RNA-Catalyzed RNA Polymerization: Accurate and General RNA-Templated Primer Extension. *Science*, 2001, 292: 1319-1325

Kazantsev A V, Pace N R. Bacterial RNase P: a new view of an ancient enzyme. *Nat Rev Microbiol*, 2006, 4(10): 729—740

Kazantsev A V, Krivenko A A, Harrington D J, i sur. Crystal structure of a bacterial ribonuclease P RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(38): 13392—13397

Konforti B B, Abramovitz D L, Duarte C M, i sur. Ribozyme catalysis from the major groove of group II intron domain 5. *Mol Cell*, 1998, 1(3): 433—441

Lafontaine D A, Norman D G, Lilley D M. Structure, folding and activity of the VS ribozyme: importance of the 2-3-6 helical junction. *EMBO J*, 2001, 20(6): 1415—1424

Lai M M. The molecular biology of hepatitis delta virus. *Annu. Rev. Biochem.*, 1995, 64: 259—286

Lawrence M S, Bartel D P. New ligase-derived RNA polymerase ribozymes. *RNA*, 2005, 11: 1173-1180

Lilley D M. The origins of RNA catalysis in ribozymes. *Trends Biochem Sci*, 2003, 28(9): 495—501

Ma W, Yu C, Zhang W, i sur. Nucleotide synthetase ribozymes may have emerged first in the RNA world. *RNA*, 2007, 13: 2012-2019

Martick M, Scott W G. Tertiary contacts distant from the active site prime a ribozyme for catalysis. *Cell*, 2006, 126(2): 309—320

McGinness K E, Joyce G F. In Search of an RNA Replicase Ribozyme. *Chemistry & Biology*, 2003, 10: 5–14

McKay D B. Structure and function of the hammerhead ribozyme: an unfinished story. *RNA*, 1996, 2(5): 395—403

Michel F, Westhof E. Modelling of the three-dimensional architecture of group I catalytic introns based on comparative sequence analysis. *J Mol Biol*, 1990, 216(3): 585—610

Nissen P, Hansen J, Ban N, i sur. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science*, 2000, 289(5481): 920—930

Perrotta A T, Shih I, Been M D. Imidazole Rescue of a Cytosine Mutation in a Self-Cleaving Ribozyme. *Science*, 1999, 286: 123–126

Pley H W, Flaherty K M, McKay D B. Three-dimensional structure of a hammerhead ribozyme. *Nature*, 1994, 372(6501): 68—74

Qin P Z, Pyle A M. The architectural organization and mechanistic function of group II intron structural elements. *Curr Opin Struct Biol*, 1998, 8(3): 301—308

Rupert P B, Ferre-D'Amare A R. Crystal structure of a hairpin ribozyme-inhibitor complex with implications for catalysis. *Nature*, 2001, 410(6830): 780—786

Selmer M, Dunham C M, Murphy F V, i sur. Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. *Science*, 2006, 313 (5795): 1935—1942

Steitz T A, Steitz J A. A general two-metal-ion mechanism for catalytic RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90: 6498-6502

Toor N, Keating K S, Taylor S D, i sur. Crystal structure of a self-spliced group II intron. *Science*, 2008, 320(5872): 77—82

Torres-Larios A, Swinger K K, Krasilnikov A S, i sur. Crystal structure of the RNA component of bacterial ribonuclease P. *Nature*, 2005, 437(7058): 584—587

Walter N G, Burke J M. The hairpin ribozyme: structure, assembly and catalysis. *Curr Opin Chem Biol*, 1998, 2(1): 24—30

Watanabe T, Sullenger B A. Induction of wild-type p53 activity in human cancer cells by ribozymes that repair mutant p53 transcripts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 8490—8494

Welch P J, Yei S, Barber J R. Ribozyme gene therapy for hepatitis C virus infection. *Clin Diagn Virol*, 1998, 10(2-3): 163—171

Wentao Ma, Chunwu Yu, Wentao Zhang, i sur. Nucleotide synthetase ribozymes may have emerged first in the RNA world. *RNA*, 2007, 13: 2012-2019

Wu QiJia, Huang Lin, Zhang Yi. The structure and function of catalytic RNAs. *Sci China Ser C-Life Sci*, 2009, 52(3): 232-244

Xiao S, Scott F, Fierke C A, i sur. Eukaryotic ribonuclease P: a plurality of ribonucleoprotein enzymes. *Annu Rev Biochem*, 2002, 71: 165—189

Young K J, Gill F, Grasby J A. Metal ions play a passive role in the hairpin ribozyme catalysed reaction. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25, 3760—3766

Zaher H S, Unrau P J. Selection of an improved RNA polymerase ribozyme with superior extension and fidelity. *RNA*, 2007, 13: 1017-1026

Zhaxybayeva O, Gogarten J P. Spliceosomal introns: new insights into their evolution. *Curr Biol*, 2003, 13(19): R764—766

5. SAŽETAK

Ribozimi su katalitičke molekule koje moraju biti savijene u visoko uređene tercijarne strukture, kao što to proteini rade da bi obavljali svoje funkcije. Glavni cilj je dovesti nukleofil i izrezujući fosfat u blizinu i aktivirati ih. Nukleolitički ribozimi imaju nukleofil i izrezujući fosfat unutar nukleotida, i imaju relativno jednostavne strukture, zbog čega su aktivne strukture brže formirane. Nukleofil i izrezujući fosfat velikih ribozima su ili razdvojeni većom udaljenošću ili se nalaze u različitim molekulama, stoga je njima složenije prepoznati izrezujuće mjesto i dovesti supstrat u aktivno mjesto. Metalni ioni i proteinski faktori su obično uključeni u savijanje velikih ribozima. Npr., Mg^{2+} je nužan za vezanje supstrata i rješavanje visoko nabijenog aktivnog mjesta RNaze P. Većina introna grupe II treba proteinske faktore da im pomognu u savijanju. Veliki ribozimi, kao što su RNaza P, ribozimi grupe I i grupe II, su metaloenzimi u kojima metalni ioni direktno sudjeluju u katalizi. Na temelju osnovne reakcije koju većina ribozima provodi, koja katalizira mjesno specifično cijepanje ili ligaciju ciljne RNA, i na temelju činjenice da veliki broj ribozima djeluje in trans, ribozimi se koriste u genskoj terapiji, uništavajući mRNA ciljnih gena ili spašavanjem defektnih gena.

Postoji hipoteza o postojanju RNA svijeta na Zemlji koji je prethodio DNA i proteinskom svijetu. Obavljena su brojna istraživanja u posljednje vrijeme koja daju moguće dokaze za takvu hipotezu. Najvjerojatnije je nekakav replikaza ribozim predstavljao takav RNA svijet jer je imao mogućnost autoreplikacije i katalize. Unatoč tim istraživanjima još ne postoje sigurni dokazi koji bi potvrdili hipotezu o postojanju RNA svijeta.

6. SUMMARY

Ribozymes are catalytic molecules, which must be folded into highly ordered tertiary folds, as the protein enzymes did to carry out their function. The ultimate objective is to bring the nucleophile and the scissile phosphate together and activate them. The nucleolytic ribozymes have inner-nucleotide nucleophile and scissile phosphate, and have relatively simple structures, thus the active structure is more readily formed. The nucleophile and scissile phosphate of large ribozymes are either remotely separated or in different molecules, thus it's more complicated for them to recognize the splicing site and bring the substrate to the active site. Metal ions and protein factors are usually involved in the folding of the large ribozymes. For instance, Mg^{2+} is required in the substrate binding and the resolution of the highly charged active site of RNase P. The majority of group II introns need protein factors to assist their folding. More importantly, large ribozymes like RNase P, group I and group II ribozymes are metalloenzymes, in which metal ions directly participate in catalysis.

Based on the fundamental reaction the majority of the ribozymes carry out, which catalyze site-specific cleavage or ligation of target RNA, and on the fact that many ribozymes function in trans, ribozymes are applied in gene therapy, by digesting the mRNA of target genes or by rescuing defective genes.

There is a hypothesis about existence of a RNA world on Earth, which preceded DNA and protein world. Many experiments were made recently that give possible evidences for such hypothesis. Most likely there was some kind of a replicase ribozyme which represented that RNA world because it had features of autoreplication and catalysis. In spite of these experiments, there are no certain evidences which could prove this hypothesis about existence of a RNA world.

