

# Katalitičke nukleinske kiseline

---

Serenčeš, Marina

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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:217:153696>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-03**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Marina Serenčes

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# KATALITIČKE NUKLEINSKE KISELINE

## Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za Biokemiju

Mentor rada: Doc.dr.sc. Jasmina Rokov Plavec

Zagreb, 2022. godina.



Datum predaje prve verzije Završnog rada:

28. kolovoza 2022.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

23. rujna 2022.

Mentor rada: Doc.dr.sc. Jasmina Rokov Plavec

Potpis:



## Sadržaj

<b>§ SAŽETAK.....</b>	<b>VII</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. Povijest i otkriće katalitičkih nukleinskih kiselina.....	3
1.2. RNA svijet.....	6
1.3. Usporedba ribozima i DNazima s proteinskim enzimima .....	8
<b>§ 2. POZNATI RIBOZIMI I ZANIMLJIVI DNAZIMI .....</b>	<b>10</b>
2.1. Male katalitičke RNA .....	10
2.2. Čekićasti ribozim.....	10
2.3. Ribozimi u obliku ukosnice .....	11
2.4. DNazimi.....	12
<b>§ 3. MEHANIZAM KATALIZE KATALITIČKIH NUKLEINSKIH KISELINA .....</b>	<b>15</b>
3.1. Kataliza metalnim ionima .....	16
3.2. Kiselo-bazna kataliza .....	19
<b>§ 4. PRIMJENA KATALITIČKIH NUKLEINSKIH KISELINA .....</b>	<b>21</b>
4.1. RNA CIJEPAJUĆI DNAZIMI KAO BIOSENZORI.....	22
4.2. DEOKSIRIBOZIMI ZA RAZGRADNJU mRNA IN VIVO .....	24
4.3. PRIMJENA U POJAČAVANJU SIGNALA I SASTAVLJANJU PAMETNIH MATERIJALA.....	24
<b>§ 5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>28</b>
<b>§ 6. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>29</b>



## § Sažetak

Nukleinske kiseline, osim svoje standardne uloge pohrane, prijenosa i ekspresije genske informacije, mogu imati i ulogu ubrzanja kemijske ili biokemijske reakcije, a da pritom iz reakcije izađu nepromijenjeni (ribozimi, deoksiribozimi) ili promijenjeni (samoizrezujući introni grupe I i II). Katalitičke nukleinske kiseline mogu koristiti različite mehanizme za obavljanje svoje katalitičke uloge, pa tako neke koriste katalizu metalnim ionima te kiselinsko-baznu katalizu. Otkrićem ovakvih molekula, teza da su enzimi isključivo proteinskog podrijetla više nije bila točna. Osim toga, otkriće ribozima dovelo je do hipoteze o RNA svijetu prema kojoj je prva molekula živog svijeta bila RNA, koja je bila i nositeljica nasljedne informacije te je imala i katalitičku ulogu.

Nakon otkrića prvog ribozima 1980. godine, znanstvena zajednica je krenula u potragu za molekulama sa sličnom ili istom ulogom, te su otkriveni mnogi novi ribozimi i deoksiribozimi (DNAzimi). Do danas je opisan veliki broj klasa ribozima: glmS ribozimi, ribozimi u obliku ukosnice, ribozimi u obliku glave čekića, HDV ribozim, RNaza P, *twister* ribozim samo su neki od primjera. Fokus u istraživanjima je prebačen s ribozima na DNAzime zbog stabilnosti molekula, jer je s njima lakše raditi te su jeftiniji. Postoji i nekoliko klasa deoksiribozima, primjerice ribonukleaze i RNA-ligaze.

Cilj ovog rada je detaljnije opisati strukturu i mehanizam djelovanja katalitičkih nukleinskih kiselina, ribozima i DNAzima, te predstaviti neke od zanimljivijih primjera ove relativno novootkrivene skupine molekula, čiji se puni potencijal tek treba otkriti.





## § 1. UVOD

Molekule ribonukleinskih i deoksiribonukleinskih kiselina koje imaju katalitička svojstva nazivaju se katalitičkim nukleinskim kiselinama. Pronađene su u svim živim organizmima, uključujući i viruse. Neki od predstavnika katalitičkih nukleinskih kiselina djeluju samo jednokratno: samoizrezujući introni daju funkcionalne molekule glasničke RNA (mRNA) ili ribosomske RNA (rRNA) kataliziranjem vlastitog izrezivanja iz početnih transkripata. Ostali predstavnici se uklapaju u definiciju enzima kao bioloških katalizatora, s time da po sastavu nisu proteini već nukleinske kiseline. Svojstvo enzima je da ubrzavaju kemijske ili biokemijske reakcije, a da pritom iz reakcija izađu nepromijenjeni. Na temelju otkrića katalitičkih molekula RNA predložena je hipoteza RNA-svijeta: RNA je prvotno bila nositeljica nasljedne informacije i biokatalizator, a DNA i proteini su se razvili kasnije.

RNA je dugo smatrana samo posrednikom u proizvodnji proteina, a teza je opovrgnuta 1980.-ih godina prošlog stoljeća otkrićem ribozima koji su povezani s cijepanjem RNA i reakcijama ligacije ili spajanja manjih molekula, za što su Cech i Altman dobili Nobelovu nagradu. Uslijedilo je otkriće niza ribozima bitnih za biološke reakcije u stanici, primjerice ribosomska RNA i peptidil-tRNA koje kataliziraju nastanak peptidne veze na ribosomu.

Osim prirodnih ribozima, još ih je otkriveno u laboratoriju selekcijom in vitro koja podsjeća na proces prirodne evolucije. Veliki broj molekula RNA se podvrgava selekciji i oni sljedovi sa željenom aktivnošću se odabiru i umnažaju. Koristeći ovaj proces usmjerene evolucije, razvijeni su ribozimi koji kataliziraju čitav niz kemijskih reakcija kao što su RNA ligacija, fosforilacija i samoalkilacija.<sup>1</sup>

U prirodi postoji velik broj proteinskih enzima u biološkim reakcijama, pa je teza da postoje i druge biomolekule koje bi imale katalitičku ulogu bila velikim dijelom odbačena sve do 1980.-ih godina, kada su otkrivene enzimske mogućnosti prirodnih RNA. Otkrićem takvih molekula RNA, koje sudjeluju u reakcijama cijepanja i povezivanja molekula RNA, postavilo se pitanje imaju li možda i molekule DNA katalitičku ulogu u nekom od bioloških ili nebioloških procesa.

Usporedbom kemijske strukture DNA i RNA, lako je zaključiti kako se razlikuju u prisutnosti odnosnu nepostojanju 2'-hidroksilne skupine na svakom nukleotidnom monomeru te u razlici T/U (tirozin/uracil) nukleobaza. Ali, priroda koristi DNA i RNA molekule za potpuno

različite stvari. DNA je skladište nasljedne informacije, dok je RNA kratkotrajni prenositelj te informacije i koristi se za čitav niz bioloških funkcija.

DNA većinom ima oblik dvostruke zavojnice, pri čemu je dvolančana struktura uglavnom pravilna, dok enzimska aktivnost zahtijeva nepravilnu trodimenzijsku strukturu, odnosno terciarnu konformaciju koja može vezati supstrate i pozicionirati različite funkcionalne skupine za katalizu. Stoga je vjerojatnost da će prirodna dvolančana DNA biti katalitički aktivna vrlo mala. S druge strane, mnogi eksperimenti su pokazali da jednolančana DNA može biti katalitički aktivna. U jednolančanoj formi, DNA je vrlo slična molekuli RNA. Može sadržavati sekundarne strukture i smatati se u različite trodimenzijske strukture. Prvi rad o postojanju deoksiribozima je objavljen 1994. godine.<sup>2,3</sup>

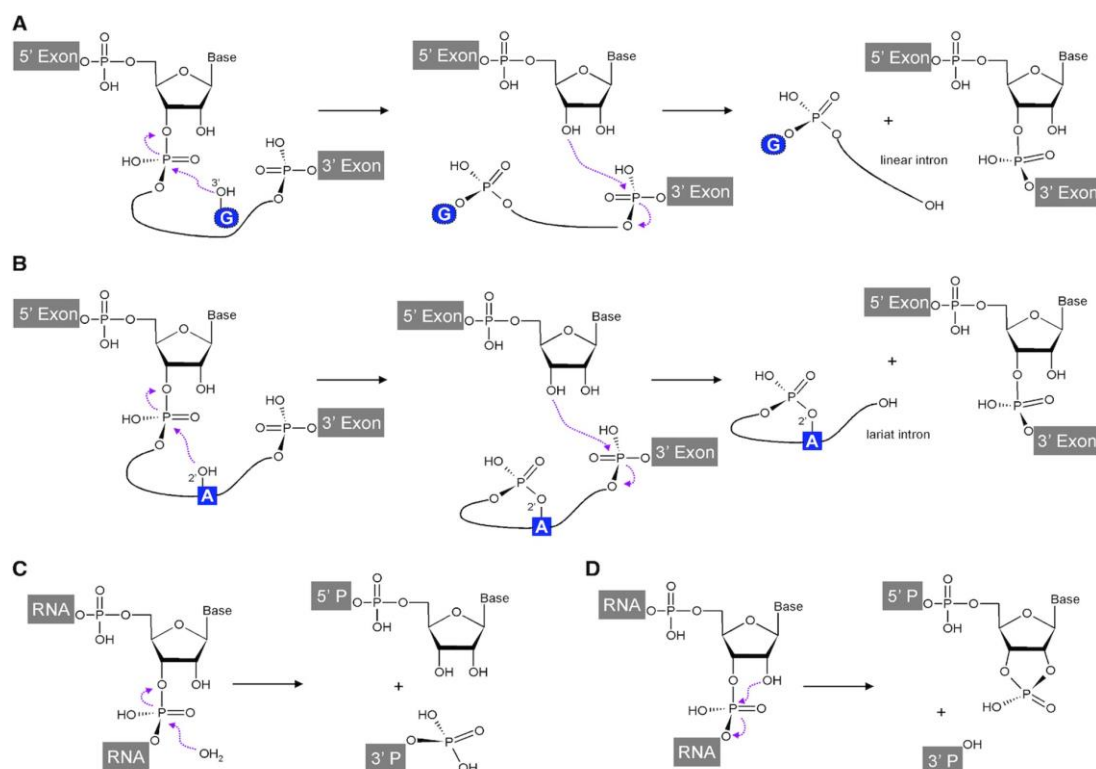
## 1.1. Povijest i otkriće katalitičkih nukleinskih kiselina

Prije skoro 40 godina, početkom 80.-ih godina prošlog stoljeća, znanstvenici Sveučilišta Colorado, predvođeni Thomasom Chechom došli su do neočekivanog otkrića katalitičke RNA koje će otvoriti mnoga pitanja za biokemičare i strukturne biologe te prodrmati temelje i poimanja biološke katalize poznate do tog trenutka. Postavljeno je pitanje o podrijetlu života na Zemlji, uz novo otkriće kao argument u mnogim raspravama o počecima života.

Znanstvenici su bili u potrazi za proteinom koji katalizira reakcije izrezivanja introna i ligacije eksona pre-rRNA kod trepetljikaša *Tetrahymena thermophila* obzirom da su svi do tada poznati biološki katalizatori bili isključivo proteinske prirode. No ono što su uspjeli izolirati je bio aktivni oblik pre-rRNA pri čemu su se reakcije odvijale bez proteina: nakon ekstrakcije SDS-fenolom, zagrijavanja uz SDS i tretmana proteazama, katalitička aktivnost je bila očuvana.

Ova katalitička RNA pripada samoizrezujućim intronima grupe I.

U isto vrijeme, Sidney Altman i suradnici otkrili su da RNA podjedinica bakterijske RNAaze P ima katalitička svojstva. Obje katalitičke RNA u ovim otkrićima ciljaju 3',5'-fosfodietersku vezu u RNA, bilo u seriji od 2 autokatalitičke transesterifikacijske reakcije (za introne grupe I) ili hidrolitičkom reakcijom koju obnaša katalitička komponenta RNA u bakterijskoj RNazi P. Za ova su otkrića Thomas Cech i Sidney Altman dobili Nobelovu nagradu 1989. godine.



Slika 1. Neke od reakcija koje u prirodi katalizira RNA

Većina trenutno poznatih ribozima djeluje na 3',5'-fosfodiesterne veze u RNA (Slika 1A i 1C), a dodatni primjeri susamoizrežujući introni grupe II i snRNA u *spliceosome*-u (Slika 1B). Preuzeto iz <sup>3,4</sup>

Ranije su Harry Noller i suradnici iznijeli zapažanja koja su upućivala na mogućnost da biosintezu proteinana ribosomu, tj. reakciju nastanka peptidne veze katalizira RNA. Dokaz da je ribosomska RNA, a ne ribosomski proteini, katalizator u stvaranju peptidne veze na ribosomu, proizlazi iz kristalne strukture visoke rezolucije koja je otkrila da je peptidil-transferazni centar sastavljen isključivo od RNA ostataka.<sup>5,6</sup>

Kako bi se nadomjestila ograničena kemijska raznolikost RNA nukleobaza, u usporedbi s puno većom kemijskom šarolikosti bočnih ogranaka aminokiselina u proteinima, efikasnost esencijalne i nezamjenjive peptidil-transferazne reakcija je poboljšana na druge načine. Osim ribosomskih i pomoćnih proteina, u priču su uključene i razne kemijske modifikacije koje se

mogu pronaći u molekulama tRNA. Ovakve modifikacije dozvoljavaju optimiziranu translaciju. Iako većina modifikacija tRNA nisu esencijalne, nedostatak nekih može imati drastičan efekt na proces biosinteze proteina što može rezultirati agregiranjem proteina, što dalje ističe njihovu važnost za optimizaciju peptidil-transferazne aktivnosti.

Prvi samocijepajući ribozim koji je otkriven je ribozim u obliku čekića (eng. *hammerhead* ribozim). Otkriven je u satelitnoj RNA virusa prstenaste pjegavosti duhana (eng. *tobacco ringspot virus* TRSV). Potom je u istoj satelitnoj RNA otkriven i ribozim u obliku ukosnice (eng. *hairpin* ribozim).<sup>7,8</sup>

Proučavanjem hepatitis delta virusa otkriven je HDV ribozim. Potom je otkriven *Varkud* satelitni ribozim (VS) u transkriptima DNA koji je povezan s mitohondrijima u određenim neurosporama. Ostali samocijepajući ribozimi su otkriveni bioinformatičkim alatima.

Računalne metode koje pronalaze sekvence slične već poznatim primjerima mogu naći nove primjere samocijepajućih ribozima, ali ne mogu naći nove strukturne klase. Rezultirale su pronalaskom niza HDV ribozima i čekićastih ribozima, za koje se prethodno smatralo da pripadaju klasama koje su sadržavale tek mali broj primjera.<sup>9</sup>

Danas je poznat velik broj ribozima. Na slici 1 prikazane su neke od reakcija koje kataliziraju ribozimi.

Obzirom na veliku sličnost molekula DNA i RNA, znanstvena zajednica je postavila pitanje o postojanju DNA koja će vršiti katalizu. Obzirom da je većina molekula DNA u prirodi dvolančana, vjerojatnost postojanja takve katalitički aktivne DNA je neznatna. No, s druge strane, bilo je poznato da jednolančane molekule DNA mogu tvoriti tercijernu strukturu te je pretpostavljeno da bi mogle i prepoznati ciljnu molekulu te vršiti katalizu. Tako su '90-ih godina prošlog stoljeća, selekcijom *in vitro* iz velikog broja nasumičnih DNA sljedova priređene jednolančane DNA sa specifičnom enzimskom aktivnošću. 1994. godine su Breaker i Joyce objavili prvi rad o DNAzimu: nazvan je GR5 i katalizira cijepanje RNA u prisutnosti  $Pb^{2+}$ . GR5 je kratka molekula od samo 15 nukleotida u katalitičkoj petlji.

U sljedećim godinama je niz različitih deoksiribozima (DNA enzims, DNAzima) razvijen za reakcije koje imaju praktičnu ulogu u istraživanju molekula RNA.<sup>10</sup>

## 1.2. RNA svijet

Kako bismo u potpunosti razumjeli procese koji se odvijaju u stanicama danas, moramo se zapitati kako su se razvili kroz evoluciju. Temeljni problem je ekspresija nasljedne informacije, koja iziskuje nevjerojatno kompliciranu i kompleksnu mašineriju i napreduje od DNA do proteina preko posrednika-molekule RNA. Jedna od teorija koja pokušava objasniti kako se ovaj sustav razvio je hipoteza RNA svijeta. Ova hipoteza zagovara stajalište da je molekula RNA, osim što je pohranjivala nasljedne informacije, sudjelovala u katalizi kemijskih reakcija u jednostavnijim stanicama.

Molekula DNA je tek kasnije u evoluciji preuzela ulogu nositeljice nasljedne informacije, a proteini su postali glavne katalitičke i strukturne komponente stanica.

Ako je ova hipoteza točna, onda prelazak iz RNA svijeta zapravo nikad nije završio. Molekula RNA i dalje katalizira neke od temeljnih reakcija u današnjim stanicama, pa se katalitičke molekule RNA mogu smatrati molekulskim fosilima početaka života.

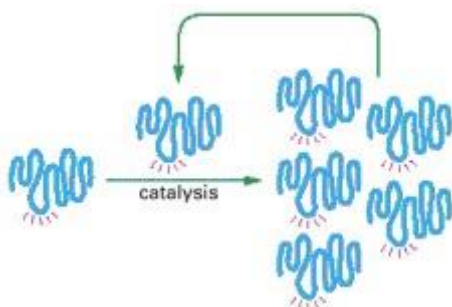
Postoji ideja da se prve biološke molekule na Zemlji bile formirane u reakcijama koje su se koristile katalizom metalnim ionima na kristalnoj površini minerala. Složen sustav molekulske sinteze i razgradnje je potencijalno postojao na ovakvim površinama puno prije nastanka prvih stanica. No problem je što život zahtijeva molekule koje mogu katalizirati reakcije koje rezultiraju rastankom istih ili sličnih molekula. Potom je trebalo odgovoriti na pitanje koje molekule imaju takvo svojstvo. Danas katalizu provode proteini, sastavljeni od niza različitih aminokiselina s kemijski različitim bočnim ograncima koji posljedično mogu zauzimati različite trodimenzijske strukture.

Polinukleotidi pak zadovoljavaju drugo svojstvo: mogu direktno utjecati na stvaranje identičnih kopija svojih sljedova (Slika 2). Ovo svojstvo ovisi o sparivanju nukleotida na temelju komplementarnih baza. Polinukleotid služi kao kalup za stvaranje drugog polinukleotida, što je danas temelj replikacije DNA i transkripcije.

Danas je reakcija polimerizacije nukleotida ubrzana proteinskim enzimima, poput DNA i RNA-polimeraza. No u davnoj prošlosti to nije bilo moguće, jer takvi proteini koji su mogli katalizirati reakcije polimerizacije nisu postojali. Otkriće katalitičkih RNA 1980.-ih godina upućivalo je da RNA mogu biti i katalizatori.

Upravo ova činjenica, da RNA molekula može biti i nositelj informacije i katalizator, je temelj hipoteze o postojanju RNA svijeta.

RNA stoga ima sva nužna svojstva koja molekula mora zadovoljavati kako bi katalizirala vlastitu sintezu.<sup>11</sup>



Slika 2. RNA molekula koja može katalizirati vlastitu sintezu. Crvene crtice označavaju aktivno mjesto hipotetskog RNA enzima. Preuzeto iz<sup>12</sup>

Pretpostavlja se da su prve molekule koje su imale i katalitičku aktivnost i koje su skladištile informacije bili polimeri koji su podsjećali na RNA, ali su bili kemijski jednostavniji. Ne postoje ostaci takvih molekula u stanicama, niti su takvi ostaci pronađeni u fosilima. Unatoč nedostatku tragova, relativna jednostavnost ovih polimera sličnim RNA čini ih boljim kandidatima za prve nositelje katalitičke aktivnosti i nasljedne informacije u odnosu na samu molekulu RNA.

Prijelaz s ove pre-RNA strukture u RNA svijet se morao dogoditi sintezom RNA koristeći ove jednostavnije molekule pre-RNA kao predložak i katalizator. Laboratorijski pokusi su pokazali da ova jednostavnija forma RNA može poslužiti kao predložak za sintezu komplementarne RNA molekule; pre-RNA polimeri mogu katalizirati nastanak ribonukleotidnih prekursora iz jednostavnijih molekula. Jednom kad je nastala prva RNA molekula, mogla je postepeno preuzeti funkcije koje je do tada obnašala pre-RNA, što je dovelo do RNA svijeta.

Danas su znanstvenici usuglašeni oko teze kako su DNA genomima prethodili RNA genomi i da je RNA molekula uistinu u davnoj prošlosti Zemlje i samog života na njoj bila i katalitička i informacijska molekula. U prošlosti je mogla katalizirati puno više reakcija u usporedbi s količinom reakcija koje katalizira danas, a s vremenom je DNA počela prevladavati i preuzimati prednost nad RNA kao nositeljem genetičke informacije. Razvoj metabolizma je zahtijevao sve veće katalitičke izazove, iziskujući veću vjernost, procesivnost, veći broj različitih katalizatora i brzinu, što je rezultiralo prelaskom na proteinsku katalizu.



Ribozimi predstavljaju fosile RNA svijeta, zlatnog doba za tu molekulu. RNA je izgubila većinu svojih katalitičkih uloga, sačuvavši samo fosforil-transferaznu i peptidil-transferaznu aktivnost, vjerojatno zato što su proteinski enzimi uspješniji i efikasniji.

Činjenica da mnogi koenzimi i kofaktori (npr. koenzim A i nikotinamid-dinukleotid (NAD))u proteinskim enzimima u svojoj osnovnoj strukturi imaju ribonukleotide, podupire hipotezu RNA svijeta.<sup>1, 13</sup>

### 1.3. Usporedba ribozima i DNazima s proteinskim enzimima

DNA i RNA molekule imaju mnoge prednosti u katalizi u odnosu na proteine. Nove sekvence katalitičkih nukleinskih kiselina se mogu lako izolirati, dok je za proteine u *in vitro* selekciji isti postupak težak ili gotovo nemoguć. Ako se uzme u obzir činjenica da je prostor u kojem se mogu tražiti novi DNA/RNA enzimi otprilike  $4^{40}$  (odnosno  $\sim 10^{24}$ , jer u obzir dolaze 4 baze i takvi enzimi se sastoje od otprilike 40 nukleotida u nizu), i ako se doda degeneracija (jer su neke sekvence ekvivalenti), lako je zaključiti da je puno lakše naći novu katalitičku nukleinsku kiselinu nego proteinski enzim, kojem je prostor za pronalazak novog spoja veličine  $20^{100}$  ( $\sim 10^{130}$ , broj aminokiselina koje ulaze u sastav enzima je 20, a za prosječna dužina proteina je duža od 100 aminokiselina u slijedu). Pronalazak novog proteinskog enzima u *in vitro* uvjetima je, stoga, gotovo nemoguć.<sup>14</sup>

Štoviše, nasumične proteinske sekvence teško zauzimaju terciarnu strukturu zbog kooperativne prirode smatanja proteina. Elementi sekundarne strukture poput  $\alpha$ -zavojnice i  $\beta$ -ploča su gotovo uvijek nestabilni i nastaju samo u okviru tercijarne strukture. U DNA i RNA molekulama su petlje poprilično stabilne bez elemenata tercijarne strukture.

Stvaranje novih aktivnih mjesta u proteinskim enzimima *de novo* računalnim tehnikama ima svoje prednosti, ali aktivna mjesta se ugrađuju u već poznate proteinske strukture i optimiziraju: ne nastaje novi enzim od nule, kao ni njegov katalitički mehanizam.<sup>15</sup>

Svi potrebni biokemijski alati za pronalazak novih ribozima i deoksiribozima *in vitro* selekcijom su dostupni. Ovo se posebno odnosi na DNA-polimeraze, jer omogućava da se mali broj DNA sekvenci umnoži u veći broj polimeraznom lančanom reakcijom. Za ribozime je još potrebna reverzna transkriptaza i RNA-polimeraza. Usporedno, metode i alati za obavljanje *in vitro* selekcije iz nasumične proteinske sekvence su nedostupni.<sup>16</sup>

Usporedbom samih nukleinskih kiselina, gotovo svi argumenti idu u korist DNA u odnosu na RNA. Neki od argumenata su kemijska i enzimatska stabilnost, troškovi i jednostavnost sinteze.

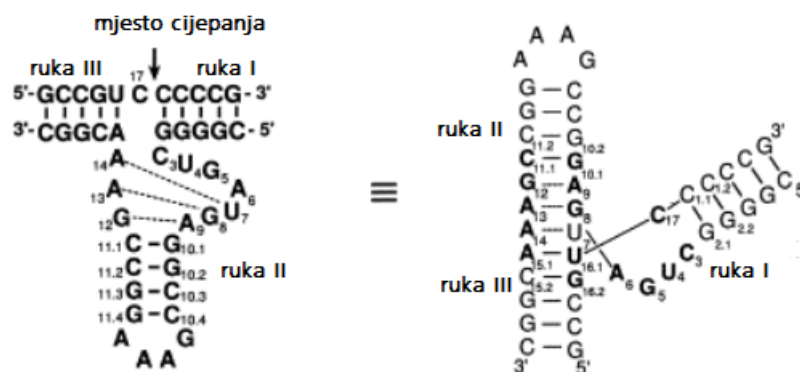
## § 2. POZNATI RIBOZIMI I ZANIMLJIVI DNAZIMI

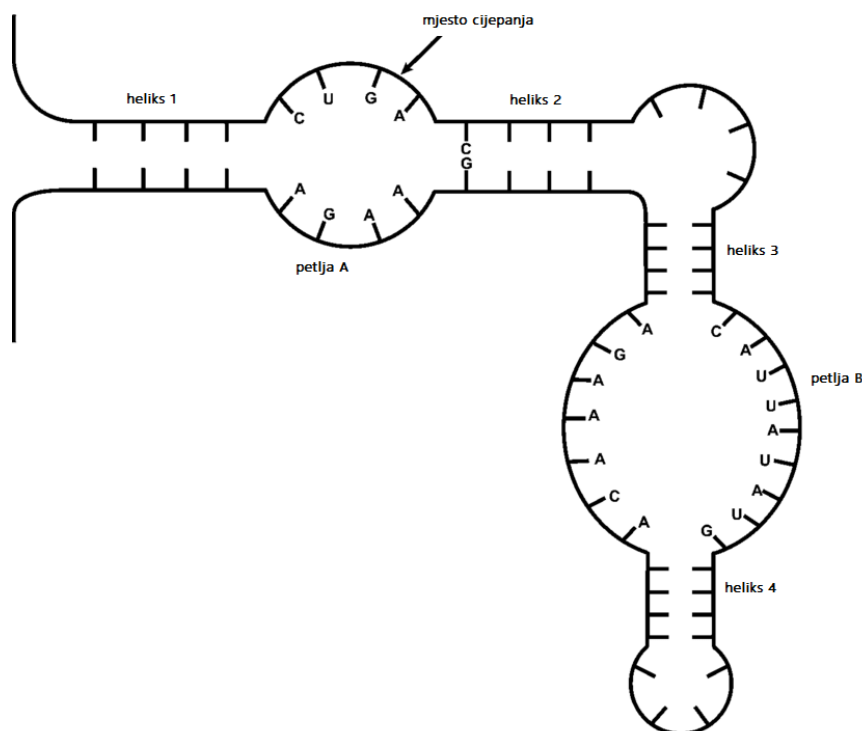
### 2.1. Male katalitičke RNA

Mali ribozimi obično se sastoje od katalitičkih motiva dugačkih 30-150 nukleotida. Izgledno je da ovi ribozimi prirodno funkcioniraju u replikacijskom ciklusu pojedinačnih RNA molekula. Obično dolazi do ubrzanja intramolekulske transesterifikacijske reakcije pri čemu nastaje 5'-OH i 2',3'-ciklički fosfat na mjestu cijepanja. U svim slučajevima, mali ribozimi su konstruirani tako da cijepaju heterogene RNA u *trans*-reakciji. Prepoznavanje i vezanje heterogenih supstrata je pod kontrolom Watson-Crickovog sparivanja baza. Moguće ih je pronaći u genomima satelitnih RNA, virusa i virusoida.

### 2.2. Čekićasti ribozim

Dvodimenzijski katalitički motiv čekićastog ribozima (eng. *hammerhead*) je prvotno pronađen u biljnim virusima i virusnim RNA; kasnije su otkriveni i izolirani primjeri u satelitskim molekulama RNA u životinjama. Svrstavaju se među najmanje katalitičke RNA. Ime su dobili zbog svoje dvodimenzijske strukture. Sekundarna struktura čekićastog ribozima se sastoji od 10 jednostrukih nukleotida okruženih s tri uzvojite strukture koje se nazivaju i ruke (Slika 3). Ruke 1 i 3 se formiraju sparivanjem baza između ribozima i njegove ciljne molekule, dok ruka 2 ima četiri para baza u obliku zavojnice i nesparenu četverostruku petlju koja je odgovorna za katalitičku aktivnost, samocijepajuću *cis*-reakciju. U laboratorijskim uvjetima postignuto je i *trans*-cijepanje. Cijepanje može dogoditi nakon bilo koje NHH sekvence, gdje je N bilo koji nukleotid, a H=A, C ili U, u ciljnoj molekuli RNA. Posljedično, čekićasti ribozim nosi veliki niz potencijalnih mjesta cijepanja u bilo kojoj RNA od interesa. Njegova mala veličina i jednostavni uvjeti za ciljanje molekula, učinili su čekićasti ribozim vrlo čestim u istraživanjima i često korištenim predstavnikom katalitičkih nukleinskih kiselina za reguliranje genske aktivnosti kako *in vitro*, tako i *in vivo*.

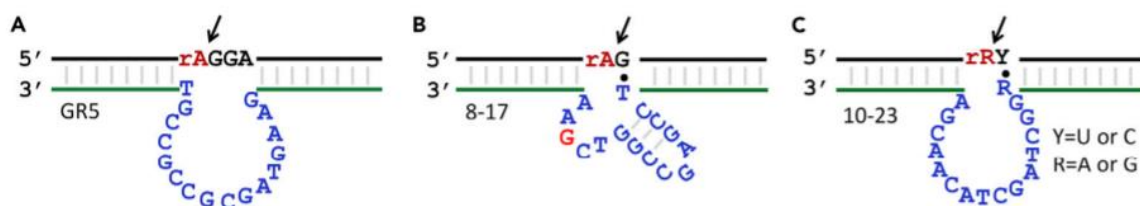




Slika 4: Sekundarna struktura ribozima u obliku ukosnice: sastoji se od 4 uzvojnice formiran od komplementarnih parova koji su povezani jednolančanim regijama. Slijed u petljama A i B je visoko očuvan, kao i GC ostaci u zavojnici 2. Preuzeto i prilagođeno prema <sup>18</sup>

## 2.4. DNazimi

Najbrojnija klasa deoksiribozima pripada ribonukleazama: kataliziraju cijepanje ribonukleotidne fosfodieterske veze transesterifikacijskom reakcijom, uz nastanak 2',3'-cikličkog fosfatnog kraja i 5'-hidroksilnog kraja. Prvi otkriveni deoksiribozim je bila ribonukleaza, otkrivena 1994. Ova molekula, nazvana GR-5, katalizira  $Pb^{2+}$ -ovisno cijepanje jednog fosfoestera brzinom 100 puta bržom od nekatalizirane reakcije. Kasnije su otkriveni dodatni RNA-cijepajući deoksiribozimi koji koriste drugačije metalne kofaktore, uključujući  $Mg^{2+}$ -ovisni E deoksiribozim i  $Ca^{2+}$ -ovisan Mg5 deoksiribozim. Daljnja istraživanja su rezultirala otkrićem drugih DNazima, poput 8-17 i 10-23 deoksiribozima, koji su najistraženiji primjeri.



Slika 5. Sekundarna struktura DNazima GR5, 8-17 i 10-23. Preuzeto iz <sup>19</sup>

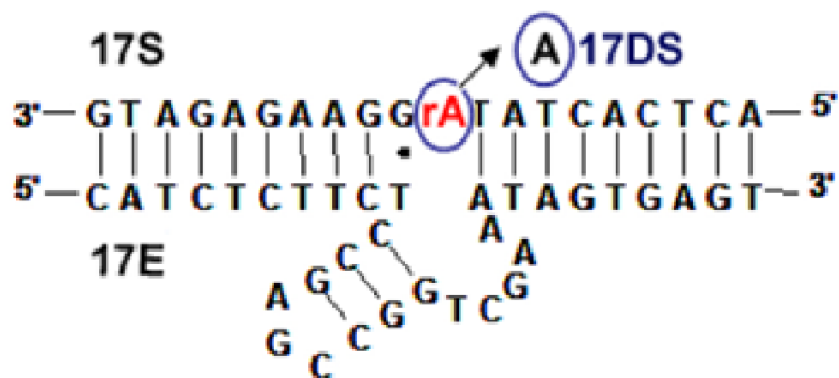
#### 2.4.1. DNazimi tipa 10-23

Deoksiribozimi ovog tipa (10-23) su katalitički aktivne nukleinske kiseline koje cijepaju komplementarnu RNA molekulu u reakciji koja ovisi o bivalentnim kationima. Sastoje se od jezgre od 15 nukleotida i dvije ruke koje vežu supstrate koje su varijabilne u dužini i redosljedu baza. Vežu molekulu RNA prepoznavanjem specifičnog slijeda baza i cijepaju ju između sparene pirimidinske baze i slobodne purinske baze. Cijepanje je efikasnije na AU i GU mjestima. <sup>20</sup>

Od njihovog stvaranja 1997. godine (Santoro i Joyce 1997) korištenjem *in vitro* selekcijske tehnologije, 10-23 DNazimi su uspješno iskorišteni za inhibiciju ekspresije niza virusnih ciljnih gena u staničnoj kulturi i *in vivo*. DNazimi se mogu dizajnirati tako da cijepaju bilo koji slijed s visokom specifičnošću. Često su i aktivniji od ribozima, i zahtijevaju minimalne uvijete na mjestu cijepanja. <sup>21</sup>

#### 2.4.2. DNazim 8-17

Ovaj DNazim katalizira cijepanje DNA supstrata koji sadrži jednu RNA bazu na mjestu cijepanja (Slika 6). Aktivan je u prisustvu bivalentnih metalnih iona u sljedećem redosljedu:  $Pb^{2+} \gg Zn^{2+} \gg Cd^{2+} \gg Mg^{2+} \sim Ca^{2+}$ . Zbog svoje visoke specifičnosti za olovo, pretvoren je u fluorescencijski, kolorimetrijski i elektrokemijski senzor za  $Pb^{2+}$ . <sup>22</sup>

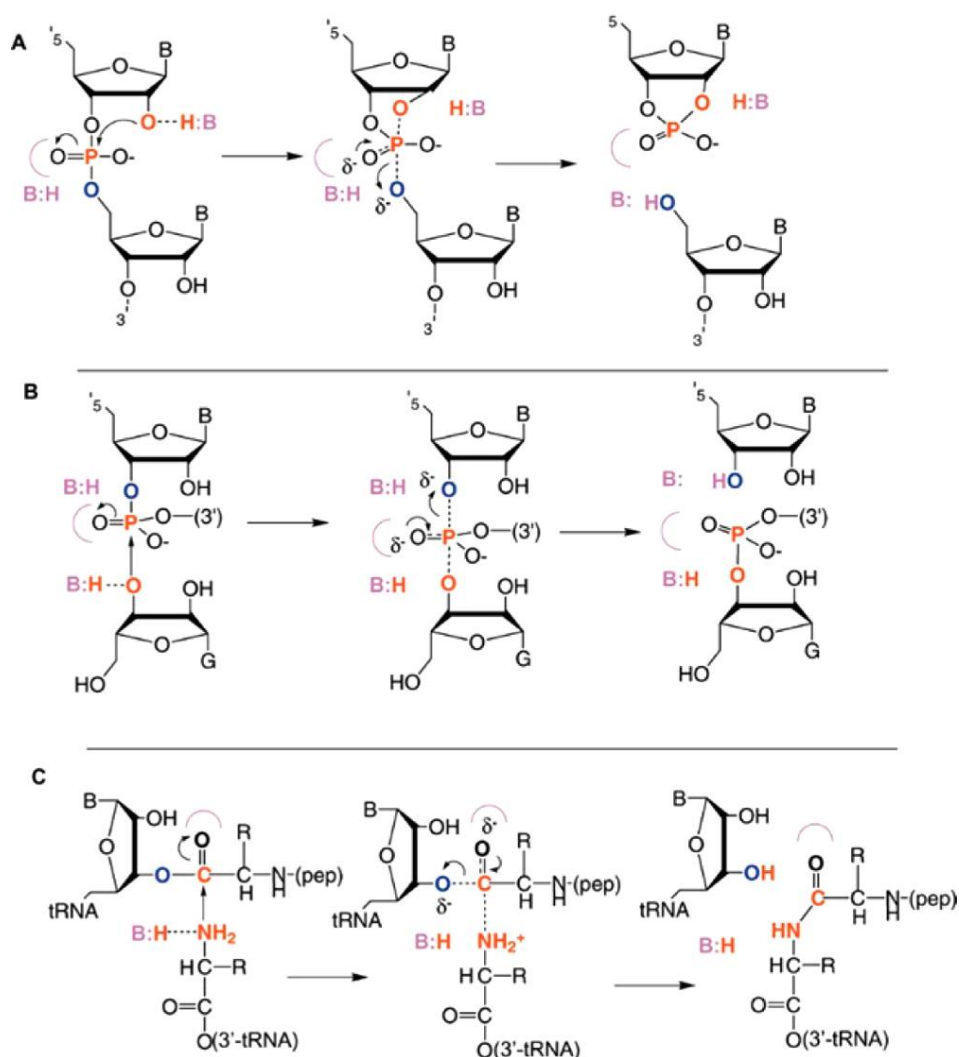


Slika 6. Pretpostavljena sekundarna struktura 8-17 DNAzima: nemodificiran 8-17 u kojem supstrat sadrži jednu RNA bazu rA (crveno) s mjestom cijepanja 17S i enzimom 17E.

Preuzeto iz <sup>22</sup>

## § 3. MEHANIZAM KATALIZE KATALITIČKIH NUKLEINSKIH KISELINA

Sljedeće što se nameće je pitanje kako molekula RNA uopće uspijeva postići ubrzanje reakcije. Osim što može koristiti kiselo-baznu katalizu, dokazano je kako često koristi i katalizu metalnim ionima, te kao i proteini, može vezati i koristiti kofaktore u reakcijama koje katalizira (Slika 7.) . Ribozimi najčešće stvaraju nekovalentne interakcije, uglavnom vodikove veze. U usporedbi s proteinima, molekula ribozima puno teže kontrolira okruženje aktivnog mjesta, ali bez problema u katalizu uključuje interakcije udaljene od aktivnog mjesta i na taj način orijentira i pozicionira supstrat stvaranjem nekovalentnih reakcija.





Slika 7. Reakcije katalizirane ribozimima pronađenim u prirodi.

(A) Intramolekulska fosforil-transferazna reakcija katalizirana ribozimima kao što su čekićasti ribozim, hepatitis delta virus (HDV), ribozim u obliku ukosnice, *glmS*.

(B) Introni grupe I kataliziraju napad vanjskog nukleofila, u ovom slučaju gvanozina, na specifičnu fosfodietersku vezu.

(C) Transfer peptidila kataliziran u aktivnom mjestu ribosoma. Preuzeto iz <sup>23</sup>

Poznato je da se cijepanje RNA može ubrzati na četiri načina: (1) poravnanjem 2'-O nukleofila, fosfora koji se može odcijepiti i 5'-O koji odlazi, (2) olakšanjem deprotonacije 2'-OH u nukleofilnom napadu, (3) neutraliziranjem negativnog naboja na nepremošćujućem fosforilnom kisiku u prijelaznom stanju ili (4) stabiliziranjem negativnog naboja na 5'-O koji odlazi.

Za neki ribozim, kritične nukleobaze i metalni ioni u katalitičkoj jezgri mogu biti određeni rješavanjem kristalne strukture. Primjerice, u aktivnom mjestu čekićastog ribozima, očuvani gvanin G-12 se ponaša kao baza vezanjem vodika na 2'-O nukleofil, dok 2'-OH drugog gvanina, G8, stabilizira kisik koji odlazi kao kiselina. HDV ribozim koristi molekulu vode vezanu na  $Mg^{2+}$  kao bazu i očuvani citozin C75 kao kiselinu. Za *glms* ribozim, potrebna je mala molekula glukozamin-6-fosfata kao kofaktor za katalizu umjesto bivalentnih metalnih iona. <sup>24</sup>

### 3.1. Kataliza metalnim ionima

Prvi problem koji se javlja prilikom istraživanja katalitičke uloge metalnih iona je razlikovanje katalitičke od strukturne uloge metala u mehanizmu. Gotovo svi poznati ribozimi su osjetljivi na ionsku jakost otopine. Metalni kationi često moraju stabilizirati negativni naboj na molekuli RNA što rezultira ovom osjetljivošću. Prilikom slaganja sekundarnih i tercijarnih struktura RNA, dolazi do približavanja negativno nabijenih fosfata, a bez metalnih iona, stvaranje ovih struktura ne bi bilo moguće.

U usporedbi s proteinima, ribozimi imaju mnoštvo veznih mjesta za metale što može predstavljati problem za istraživanja, no s druge strane, ta činjenica povećava vjerojatnost

pravilnog pozicioniranja iona za katalizu. Osim nabijenih fosfata, metalni ioni mogu vezati i 2'-hidroksilnu skupinu riboze, te atome dušika i kisika pirimidinskih i purinskih baza.

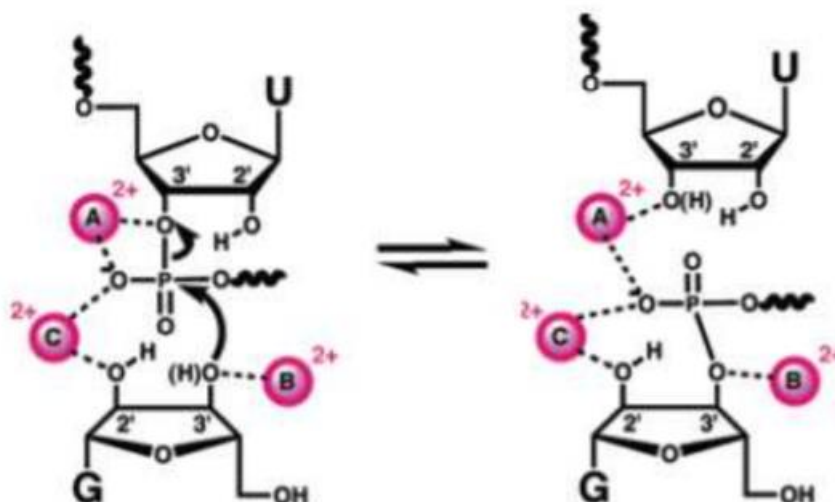
Osim koordiniranja vode u kiselinsko-baznoj katalizi, bivalentni metalni kationi mogu, teoretski, imati više uloga u katalitičkim reakcijama. Mogu deprotonirati nukleofil na početku reakcije i tako ga aktivirati ili koordinirati nukleofil radi lakše deprotonacije nekim drugim deprotonirajućim spojem. U reakciji mogu elektrostatski stabilizirati prijelazno stanje ili čak stabilizirati nabijene izlazne skupine protonacijom ili direktnom koordinacijom kisika.

Položaj metalnog iona moguće je odrediti proučavanjem kristalne strukture promatranog sustava; na temelju udaljenosti metala i skupina katalizatora ili supstrata može se raspravljati o katalitičkoj ulozi metala. Analizom promjena efikasnosti reakcije, poput supstitucije kisika sumporom u fosfatnoj skupini, mogu se dobiti detaljnije informacije o mehanizmu, jer dolazi do promjene specifičnosti vezanja metalnog iona. Ako se jedan od kisika u fosfatnoj skupini okosnice RNA zamijeni elektronski „mekanim“ sumporom, katalitička aktivnost se uvelike smanji ili čak inaktivira jer  $Mg^{2+}$  ion ima slab afinitet za koordinaciju sumpora. Postoji mogućnost vraćanja aktivnosti RNA uz dodatak tiofilnog metala poput kadmija ili mangana koji imaju visok afinitet za koordinaciju sumpora. Ipak, potrebno je uzeti u obzir činjenicu da supstitucija kisikovog atoma sumporom koji je veći, može dovesti do lokalne konformacijske promjene RNA i preraspodjele naboja, dok dodatno metalni ioni mogu nadoknaditi konformacijsku promjenu. U ovom slučaju bi metal imao samo ulogu stabilizatora strukturne nestabilnosti, iako bi prvotno rezultati upućivali na to da metalni ion sudjeluje u katalizi.

U slučaju čekićastog ribozima, prilikom zamjene kisika sumporom, dolazi do značajnog smanjenja brzine reakcije koja je ovisna o  $Mg^{2+}$  (faktor  $10^3$ - $10^5$ ). Ista ta aktivnost se može povratiti dodatkom  $Mn^{2+}$  ili  $Cd^{2+}$ . No, iako bi ovo sugeriralo da metalni ion direktno intezigira s fosfodiesterom na mjestu cijepanja, u čekićastom ribozimu postoji dodatno mjesto osjetljivo na ovakve supstitucije kisika sumporom, ali je njegova pozicija udaljena od aktivnog mjesta u kristalnoj strukturi. NMR pokusi su pokazali da je izmijenjeni sumpor na udaljenom mjestu koordiniran kadmijem, a detekcija koordinacije kadmija na mjestu cijepanja u aktivnom mjestu je bila gotovo nemoguća. Uslijedile su pretpostavke i pokušaji dokazivanja teza da u prijelaznom stanju dolazi do takve konformacijske promjene koja dovodi udaljenu regiju RNA i koordiniranim sumporom približava aktivnom mjestu gdje se događa cijepanje. Daljnjim istraživanjima, kinetičkom analizom i molekulskim modeliranjem dokazano je da u slučaju čekićastog ribozima, metalni kationi imaju isključivo strukturnu ulogu.

Introni grupe I, s druge strane, dokazano koriste metalne ione u katalizi (Slika 8). Predstavljen je model katalize koji koristi dva metalna iona, po uzoru na proteinske enzime koji kataliziraju reakcije prijenosa fosforilne skupine: jedan metal aktivira nukleofil, a uloga drugog je stabilizacija izlazne skupine. Dokazano je da u ovom slučaju metali koordiniraju nukleofil, izlaznu skupinu, slobodni kisik na fosfatu i 2'-OH skupinu koja se nalazi do izlazne skupine. Pretpostavilo se da u koordinaciji tolikog broja skupina sudjeluje više metalnih kationa, pa je predložen mehanizam katalize koji uključuje tri metalna iona. Kasnije je dokazano da u koordinaciji ipak sudjeluju samo 2 metalna iona koji koordiniraju sve četiri navedene skupine, a metalni ioni dodatno pozicioniraju i supstrat. Pritom je uočena analogija između katalize potpomognute metalnim ionima introna grupe I i enzima koji kataliziraju prijenos fosforilne skupine, koji uključuju DNA- i RNA-polimerazu.

Struktura aktivnog mjesta i smisao katalize su se razvili konvergentnom evolucijom minimalno dva puta neovisno jedni o drugom. Priroda je više puta došla do identičnog rješenja za kataliziranje reakcija prijenosa fosforila, što dokazuje efikasnost ovakvog mehanizma.<sup>25, 26</sup>



Slika 8. Mehanizam katalize metalnim ionima na primjeru introna grupe I: metalni ioni su označeni slovima A, B i C. Preuzeto iz<sup>25</sup>

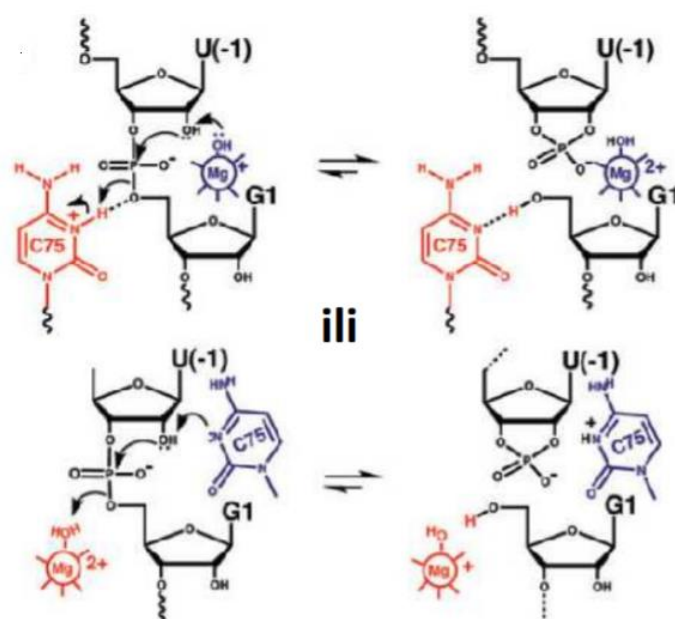
### 3.2. Kiselo-bazna kataliza

Ovaj tip katalize zahtijeva funkcijske skupine koje će poslužiti kao dobri proton donori i akceptori, koje molekula RNA ne posjeduje jer njene funkcionalne skupine nemaju  $pK_a$  blizak fiziološkoj pH vrijednosti. Potencijalno bi adenin i citozin mogli poslužiti kao proton donori i protonirati N1 (odnosno N3) prstena, ali  $pK_a$  vrijednosti su 3,5 za adenin i 4,2 za citozin. Pri pH 7, ove dušične baze su većinom disocirane i, iako su jake kiseline, pri fiziološkom pH su one većinom u obliku konjugirane slabe baze, pa se ne mogu koristiti u kiselinsko-baznoj katalizi. Dok adenin i citozin imaju preniske  $pK_a$  vrijednosti, uracil i gvanin imaju previsoke  $pK_a$  vrijednosti: 9,8 za gvanin i 10,5 za uracil. Ove baze su pri fiziološkom pH najvećim dijelom protonirane i pokazuju slaba proton-donorska svojstva. Da bi uopće postojala mogućnost za RNA da koristi kiselinsko-baznu katalizu, vrijednosti  $pK_a$  dušičnih baza trebaju biti znatno pomaknute prema fiziološkom pH, što je i pokazano NMR-om.

Rješenjem kristalne strukture ribozima iz HVD-a, otkriven je katalitički esencijalan citidin nazvan C75 (Slika 9). Nalazi se pozicioniran blizu 5'-hidroksilne skupine izlazeće skupine. Pritom je uočena i mreža vodikovih veza koje potencijalno stabiliziraju protonirani oblik C75, što omogućava citozinu ulogu proton donora i akceptora u reakciji. Ako se C75 mutira, brzina reakcije se smanji za faktor  $10^5$ , što je usporedivo s mutacijom histidina u ribonukleazi A: ribonukleaza A katalizira reakciju koristeći kiselinsko-baznu katalizu pomoću dva histidina.

Aktivnost je moguće djelomično povratiti pomoću egzogenog imidazola kao proton donora ili akceptora. Daljnji pokusi koji su uključivali istraživanje kinetičkih efekata, uspoređivanjem  $pK_a$  vrijednosti reakcije s raznim analogima imidazola ili baza kojima je zamijenjen C75, dokazali su da C75 ima direktnu ulogu u transferu protona u reakciji.

Postoje još mnoga pitanja na koja se tek treba odgovoriti kako bi se razjasnilo točno djelovanje C75 kao opće baze ili opće kiseline; pošto RNA ima znatno slabiju sposobnost kontroliranja okoliša oko aktivnog mjesta u usporedbi s proteinom, smatra se da RNA može postići ovakve promjene  $pK_a$  vrijednost u svojim šećerima ili bazama pozicioniranjem istih u blizinu metalnog kationa ili negativno nabijenog fosforilnog kisika.<sup>27</sup>



Slika 9. Mehanizmi kiselinno-bazne katalize kod HDV ribozima uz nukleobazu C75. Na gornjoj slici je C75 opća kiselina (crveno), a na donjoj je opća baza (plavo). Preuzeto iz <sup>27</sup>

## § 4. PRIMJENA KATALITIČKIH NUKLEINSKIH KISELINA

Kataliza nukleinskim kiselinama pronalazi svoju primjenu u nizu područja, od unutarstaničnih procesa do nanomaterijala, bioanalitičke kemije pa tako i znanosti o okolišu. Sve veći broj istraživanja i veći interes za ovu grupu spojeva dali su uvid u mehanizme i strukture, no i dalje postoje mnoga pitanja na koja tek treba odgovoriti. Najveći broj novih katalitičkih nukleinskih kiselina otkriven je usmjerenom evolucijom, tj. selekcijom *in vitro*, no nije isključena mogućnost pronalaska novih. Zadnjih 30 godina provode se testiranja u kojima su korišteni modificirani nukleotidi, i, iako su pronađeni zanimljivi DNAzimi, takvi modificirani dNTPovi nepovoljno utječu na PCR reakciju koja je dio metoda usmjerene evolucije. Potraga za novim prirodnim ribozimima i dalje traje, dok su bioinformatičke znanosti iznjedrile nove ribozime u zadnjih 10ak godina. Razvoj ribozima ide u smjeru unutarstanične primjene i za istraživanje granica RNA katalize. Njihova prednost, u odnosu na DNAzime, je što se ne moraju dostaviti u stanicu, već se mogu transkribirati putem plazmida.

Neke od prvotnih ideja o korištenju katalitičkih nukleinskih kiselina kao inhibitora mRNA su se ispostavile kao beskorisne. Neki prijedlozi, koji bi koristili DNAzime i ribozime za inhibiciju genske ekspresije razvojem siRNA, su se također pokazale kao nedostatne, jer bi unutarstanično cijepanje RNA zahtijevalo visoku efikasnost DNAzima koji mogu raditi unutar stanice.

Ne tako davno, postignut je napredak u kombiniranju DNAzima s nanotehnologijom: nanomaterijali, primjerice  $MnO_2$  i  $ZnO$  su korišteni za dostavu DNAzima, a istodobno su služili kao izvor metalnih iona za katalizu. Da bi se ovakav pristup mogao koristiti u *in vivo* uvjetima, potrebno je provesti niz rigoroznih testova sa ovim DNAzimima.

Virusi često koriste RNA-cijepajuće ribozime za proizvodnju virusnih RNA, što je rezultiralo prijedlogom o korištenju ribozima kao biokemijskog alata za ispitivanje bioloških sustava.

Vjeruje se da će se tek pronaći mnogi primjeri DNAzime koji će se potencijalno moći koristiti za detekciju metala, koji će sudjelovati u katalizi novih kemijskih i biokemijskih transformacija i koji će kontrolirati uređaje na nanoskali. Metalni ioni su nužni za katalizu nukleinskim kiselinama, no s biokemijskog aspekta, potrebno je više podataka za uočavanje

uloge metalnih iona u procesu katalize. NMR i rentgenska kristalografija su samo neke od tehnika koje mogu dati korisne i vrijedne informacije o njihovim ulogama.

#### 4.1. RNA CIJEPAJUĆI DNAZIMI KAO BIOSENZORI

Uloga DNAzima kao biosenzora je uvelike istraženija od ostalih primjena DNAzima. DNAzim 17E je u prisustvu  $Zn^{2+}$  iona vrlo sličan DNAzimu 8-17: oba primjera su puno aktivnija u prisustvu  $Pb^{2+}$ . 17E se koristi kao modelni sustav za razvoj različitih signalnih mehanizama, poput fluorescencije, promjene boje, elektrokemije i Ramanove spektroskopije. Kasnija istraživanja su pokazala da GR5 ima puno bolju specifičnost za  $Pb^{2+}$ . S ciljem postizanja bolje specifičnosti, napravljene su mnoge selekcije u prisutnosti ciljnog metala. Tako je otkriveno da je EtNa DNAzim visokospecifičan za  $Ca^{2+}$  u vodi, ali je selektivan za  $Na^+$  u etanolu: zahtijeva kooperativnu reakciju za dva  $Ca^{2+}$  iona, što bi moglo objasniti njegovu visoku specifičnost.

Još DNAzima specifičnih za  $Cu^{2+}$  i  $Cd^{2+}$  odabrano je za istraživanje uvođenjem fosforotioata u mjesto cijepanja: zamjena sumporom je kritična za prepoznavanje ovih mekših metalnih iona, što upućuje da je vezanje fosfatne skupine koja se odcjepljuje njihova glavna katalitička uloga. Metalni ion provodi katalitičku ulogu privremenim vezanjem sa odcjepljujućim fosfatom. Otkriveno je i nekoliko DNAzima koji sadrže aptamerski motiv; primjerice NaA43 u prisutnosti  $Na^+$ . Ima sličnu sekvencu kao Ce13d DNAzim, a aptamerski motiv može, osim  $Na^+$ , vezati i  $K^+$ , no vezanje tog iona dovodi do krivog slaganja i gubitka katalitičke aktivnosti.

Pošto svi DNAzimi dijele sličnu sekundarnu strukturu, slične signalne strategije mogu se koristiti za sve njih.

Zanimljiv primjer je i obojenje potaknuto cijepanjem uz korištenje DNAzima s nanočesticama zlata, AuNPs. DNAzim je korišten za konstruiranje AuPNs i kombinacijom su nastali plavi agregati. Cijepanjem strukture, AuNPs je rastavljen dajući pritom plavo-crveno obojenje. (Slika 10 A)

Senzori na temelju DNAzima se mogu dizajnirati i kroz elektrokemijske signale: enzim označen metilen-plavim (8-17) može prenijeti elektrone na površinu elektrode nakon cijepanja inducirano s  $Pb^{2+}$ . (Slika 10 B) <sup>28,29</sup>





## 4.2. DEOKSIRIBOZIMI ZA RAZGRADNJU mRNA IN VIVO

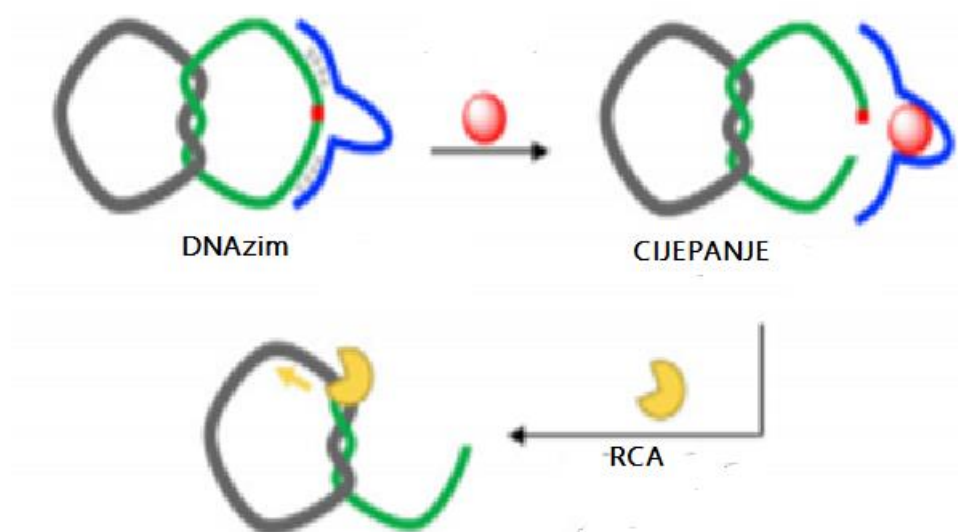
U kontroli genske ekspresije, bitan biološki alat je namjerna razgradnja specifičnih mRNA. RNA cijepanje inducirano deoksiribozimom se dugo vremena predstavljalo kao mogući način postizanja razgradnje mRNA. Nedoumica koja je podijelila znanstvenike jest ta da se može utvrditi radi li se o razgradnji mRNA zbog kataliziranog cijepanja uslijed djelovanja molekule DNA ili se radi o *anti-sense* efektu. Postoje članci koji govore o korištenju 10-23 deoksiribozima za liječenje tumora i astme, ali ne dotiču se problema razlikovanja DNA katalize i *anti-sense* efekta.<sup>32</sup>

Pošto deoksiribozimi pokazuju vrlo slab katalitički efekt ili gotovo nikakav pri slobodnoj koncentraciji bivalentnih metala unutar stanice, problemu se doskočilo korištenjem modificiranih deoksiribozima kako bi se poboljšala *in vivo* kataliza. Uvođenje 2'-O-metilne izmjene u inače nemodificirani 10-23 deoksiribozim, dobiveni su podaci koji idu u korist *in vivo* mRNA razgradnji. Ipak, uvjerljiviji dokazi za mRNA razgradnju kataliziranu DNazimima *in vivo* su i dalje nedostupni.<sup>33, 34</sup>

## 4.3. PRIMJENA U POJAČAVANJU SIGNALA I SASTAVLJANJU PAMETNIH MATERIJALA

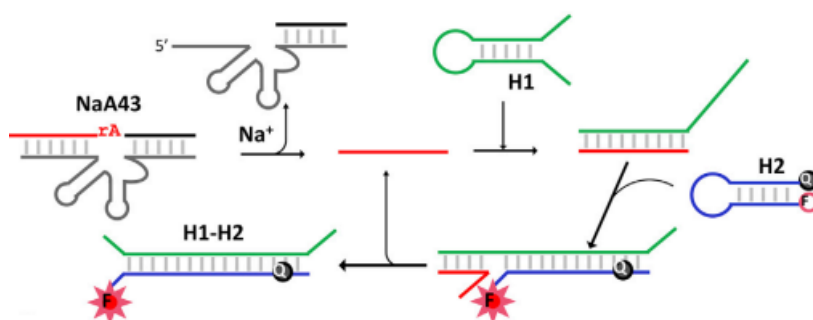
Obzirom da je DNA visoko programibilna molekula, njenom uporabom su sintetizirane mnoge složenije strukture. Također, DNazimi se često mogu spregnuti s metodama za umnažanje DNA kako bi im se pojačala osjetljivost.

Primjer je DNazim specifičan za bakteriju *Escherichia coli* spregnut s umnažanjem kotrljajućeg kruga (eng. *Rolling Circle Amplification*, RCA) kako bi se postigla detekcija bakterije *E. coli*: dizajn dvaju isprepletenih jednostrukih DNA prstenova sprječava da kalup (Slika 12, sivo) bude korišten za RCA; vezanje na metu (Slika 12, crveno) cijepa supstrat (Slika 12, plavo) koji onda služi kao početnica za inicijaciju RCA umnažanja.



Slika 12. Sprezanje DNAzima s RCA za detekciju bakterije *E. coli*. Preuzeto i prilagođena prema <sup>21</sup>

RCA produkt je detektiran duplesnim vezanjem boje (primjerice 3,3'-dietiltiodikarbocijanin), i kao rezultat je dobiven detekcijski limit od 10 stanica po mililitru. U drugom primjeru, Wu i suradnici su koristili CHA reakciju (eng. *Chemical Hazard Assessment Reaction*) za podizanje osjetljivosti  $\text{Na}^+$ -ovisnog DNAzima (NaA43). U prisustvu  $\text{Na}^+$ , fragment cijepajućeg supstrata (crveno) inicira CHA reakciju otvaranjem DNA ukosnice H1 (Slika 13).



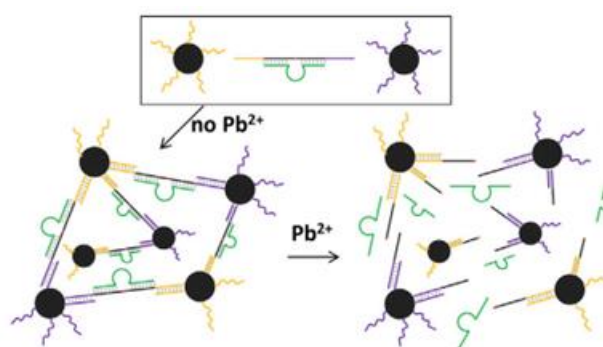
Slika 13. CHA-pojačani DNAzimski sensor za oslikavanje  $\text{Na}^+$ . Preuzeto iz <sup>21</sup>

Otvaranje H1 dovodi do otključavanja H2 i povratka fluorescencije. Pošto je dupleks stvoren između H1 i H2 jači, fragment supstrata se premješta i otpušta. Kao posljedica, višestruke CHA reakcije se mogu inducirati svakim produktom cijepanja, što rezultira pojačanim signalom i pri niskim koncentracijama  $\text{Na}^+$ . <sup>35</sup>

Sjedeća primjena DNAzima uključuje kombinaciju s nanočesticama, jer je uočeno da mogu ugasiti fluorescenciju, apsorbirati ili konjugirati molekulu DNA te inicirati razne signale, poput kolorimetrije, magnetizma i pojačanog Ramanovog raspršenja.

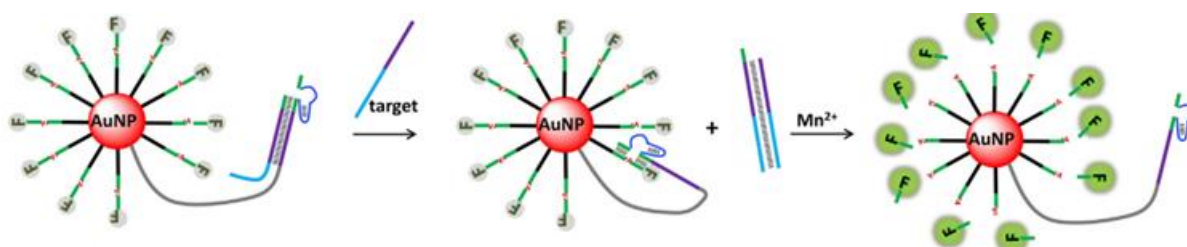
Primjer sa slike 14 prikazuje kombinaciju 8-17 DNAzima i magnetskih „perlica“ sa modificiranom karboksilnom skupinom što je rezultiralo biosenzorom za  $Pb^{2+}$  koje se koristi za oslikavanje magnetnom rezonancom MRI.<sup>36</sup>

U prisustvu  $Pb^{2+}$ , cijepanje supstrata povećava udaljenost između magnetskih nanočestica i smanjuje vrijeme relaksacije.



Slika 14. Nanočestice u kombinaciji s DNAzimom za detekciju  $Pb^{2+}$ . Preuzeto iz<sup>21</sup>

Unutarstanično detektiranje je zanimljiva primjena za funkcionalne nukleinske kiseline. Ali, kao i druge nukleinske kiseline, DNAzimi pate od lošeg unosa u stanicu. Kako bi se doskočilo ovom problemu, nanomaterijali poput ZnO nanočestica i srebrnih nanočestica (AuNP) su korišteni kao prenositelji za unutarstanično detektiranje bazirano na DNAzimima. Zanimljiv primjer je DNAzimski motor konstruiran na AuNP-u za mikrodeteckiju (Slika 15).



Slika 15. DNAzimski motor konstruiran na AuNPu za unutarstanično oslikavanje. Preuzeto iz

AuNp konjugat se može lako unijeti u stanicu, i u prisutnosti ciljne mikroRNA, DNazim je aktivan i može cijepati višestruke supstrate na AuPN-u i tako postepeno dozvoljava pojačanje signala. U procesu se pritom pazilo da se izbjegne cijepanje supstrata prije nego senzor uđe u stanicu.<sup>37, 38</sup>

## § 5. ZAKLJUČAK

Život bi bio nezamisliv bez bioloških katalizatora: osim proteina, u ovu skupinu ubrajamo i katalitičke nukleinske kiseline. Iako su relativno nedavno otkrivene, katalitičke nukleinske kiseline su već pronašle svoju primjenu u mnogim poljima kao što su unutarstanična istraživanja, nanomaterijali, biosenzori i drugo. Sve većim brojem istraživanja i uporabom različitih tehnika došlo se do saznanja o katalitičkom mehanizmu i strukturi ovih molekula, no i dalje je još puno neodgovorenih pitanja kojima se znanost tek treba pozabaviti. Danas su proteini „glavne“ molekule u katalizi biokemijskih i kemijskih reakcija, no otkriće katalitičkih nukleinskih kiselina je samo potvrdilo pretpostavku kako nisu proteini ti koji su u početku obnašali tu dužnost: hipoteza RNA svijeta je, mnogi znanstvenici se slažu, potvrđena upravo otkrićem ribozima.

Do danas je otkriven čitav niz prirodnih ribozima, poput čekićastog ribozima, ribozima u obliku ukosnice i HDV ribozima, koji cijepaju sami sebe. Vjerojatno najbitniji ribozim u stanici je ribosom, koji je samo jedan od nekoliko ribonukleoproteinskih kompleksa u kojima RNA ima katalitičku ulogu. Postoje i katalitičke DNA, DNAzimi, koje su dobivene selekcijom *in vitro* te imaju značajnu primjenu kao biosenzori.

Nedvojbeno je da će se ovo područje znanosti u budućnosti razvijati, te da će i dalje predstavljati izazov i plodno tlo za nove spoznaje i otkrića.

## § 6. LITERATURNI IZVORI

1. L. Ma, J. Liu, Catalytic Nucleic Acids: Biochemistry, Chemical Biology, Biosensors, and Nanotechnology, i Science Vol 23 (2020) str. 1-14
2. S.K. Silverman, Catalytic DNA: Scope, Applications, and Biochemistry of Deoxyribozymes. Trends in biochemical sciences vol. 41,7 (2016): 595-609
3. Cech T.R., Zaug A.J., Grabowski P.J. In vitro splicing of the ribosomal RNA precursor of Tetrahymena: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. Cell (1981); 27:487–496
4. C. Guerrier-Takada K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace, S. Altman, The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. Cell. (1983); 35:849–857
5. P. Nissen, J. Hansen, N. Ban, P.B. Moore, T.A. Steitz T, The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. Science (2000); 289:920–930
6. A. Korostelev, S. Trakhanov, M. Laurberg,H.F. Noller. Crystal structure of a 70S ribosome-tRNA complex reveals functional interactions and rearrangements. Cell. (2006); 126:1065–1077
7. G. A. Prody, J.T. Bakos, J.M. Buzayan, I.R. Schneider, G. Bruening, Autolytic processing of dimeric plant virus satellite RNA. Science. (1986); 231:1577–1580
8. J.M. Buzayan, W.L. Gerlach, G. Bruening, Satellite tobacco ringspot virus RNA: A subset of the RNA sequence is sufficient for autolytic processing. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1986); 83:8859–8862
9. C.E. Weinberg, Z. Weinberg, C. Hammann, Novel ribozymes: discovery, catalytic mechanisms, and the quest to understand biological function, Nucleic Acids Research, Volume 47, Issue 18, (2019) 9480–9494
10. S.K. Silverman, D.A. Baum, Methods in Enzymology Vol. 469 (2009), 95-117  
Author links open overlay panelScott K.Silverman\*Dana A.Baum
11. B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis et al. Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science;(2002). The RNA World and the Origins of Life. Chapter 5
12. B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis et al. Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science;(2002). The RNA World and the Origins of Life. Chapter 6
13. S.K. Silverman, D.A. Baum, Methods in Enzymology Vol. 469 (2009), 95-117  
Author links open overlay panelScott K.Silverman\*Dana A.Baum

14. H. Renata H, et al. Expanding the Enzyme Universe: Accessing Non-Natural Reactions by Mechanism-Guided Directed Evolution. *Angew. Chem. Int. Ed.* (2015);54:3351–3367
15. H.E: Blackwell, RH Grubbs, Highly Efficient Synthesis of Covalently Cross-Linked Peptide Helices by Ring-Closing Metathesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* (1998) ;37:3281–3284
16. A.D. Keefe, J.W. Szostak, Functional proteins from a random-sequence library, *Nature* (2001);410:715–718
17. M. Warashina, K. Taira, Prebiotic Chemistry, Molecular Fossils, Nucleosides, and RNA, *Comprehensive Natural Products Chemistry*, (1999)
18. M.J. Fedor, Structure and function of the hairpin ribozyme, *Journal of Molecular Biology*, Vol. 297, Issue 2 (2000), 269-291
19. G.F. Joyce, RNA cleavage by the 10-23 DNA enzyme. *Methods Enzymol.*, (2001) 341, 503–517.
20. G.F. Joyce, RNA cleavage by the 10-23 DNA enzyme. *Methods Enzymol.*, (2001) 341, 503–517.
21. L. Ma, J. Liu, Catalytic Nucleic Acids: Biochemistry, Chemical Biology, Biosensors, and Nanotechnology, *iScience* 23 (2020)
22. L.M. Khachigian, Cutting a path to a new class of therapeutics. *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 4, (2002) 119–121.
23. D. Mazumdar, N. Nagraj, H.K. Kim, X. Meng, A.K. Brown, Q. Sun, W. Li, Y. Lu, Activity, folding and Z-DNA formation of the 8-17 DNAzyme in the presence of monovalent ions, *J A, Chem Soc.* (2009), 131: 5506-5515
24. E.A: Doherty, J.A. Doudna, Ribozyme structures and mechanisms. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* (2001), 30: 457-475
25. R.F: Gesteland, T.R. Cech, J.F. Atkins, *The RNA World*. 2nd Ed. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Lab. Press; (1999)
26. D.M.J. Lilley, F. Eckstein, *Ribozymes and RNA catalysis*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry (2008)
27. W. L. Ward, K. Plakos, V. J. DeRose, Nucleic Acid Catalysis: Metals, Nucleobases, and other Cofactors, *Chem. Rev.* (2014) 114, 8, 4318-4342
28. Y. Xiang, Y. Lu, DNA as sensors and imaging agents for metal ions. *Inorg. Chem.* (2014) ;53:1925–1942.

29. J. Li et al., In vitro selection and characterization of a highly efficient Zn(II)-dependent RNA-cleaving deoxyribozyme. *Nucleic Acids Res.* (2000);28:481–488
30. S.F. Torabi et al., In vitro selection of a sodium-specific DNAzyme and its application in intracellular sensing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (2015) ;112:5903–5908
31. Y. Xiang, Y Lu, An invasive DNA approach toward a general method for portable quantification of metal ions using a personal glucose meter. *Chem. Commun.* (2013);49:585–587
32. S.W. Santoro, G.F. Joyce, A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1997) ;94:4262–4266
33. L. Lermer et al. Toward an RNaseA mimic: A DNAzyme with imidazoles and cationic amines. *J. Am. Chem. Soc.* (2002) ;124:9960–9961.
34. A.A. Fokina et al. Targeting insulin-like growth factor I with 10–23 DNAzymes: 2'-O-methyl modifications in the catalytic core enhance mRNA cleavage. *Biochemistry.* (2012);51:2181–2191
35. H. Peng, A.M. Newbigging, Z. Wang, J. Tao, W. Deng, X.C. Lee, H. Zhang, DNAzyme-Mediated Assays for Amplified Detection of Nucleic Acids and Proteins, *Anal. Chem* (2018), 190-207
36. Z. Wu, H. Fan, N.S. R. Satyavolu, W.J. Wang, Imaging Endogenous Metal Ions in Living Cells Using a DNAzyme–Catalytic Hairpin Assembly Probe, *Angew Chem Int Ed.*, (2017)
37. K. Hwang, P. Wu, T. Kim, L. Lei, S. Tian, Y. Wang, Y. Lu, Photocaged DNAzymes as a General Method for Sensing Metal Ions in Living Cells, *Angew Chem Int Ed Engl.* (2014) 50: 13798-13802
38. Y. Zing, Z. Yang, R.J. Lake, C. Zheng, Y. Lu, Enzyme-Mediated Endogenous and Bioorthogonal Control of a DNAzyme Fluorescent Sensor for Imaging Metal Ions in Living Cells, *Angewandte Chemie International Edition*, (2019) Vol. 58, 47: 17061-17067