

**Ribozimas.  
RNA enzimes.**

Evileidys Vázquez Almoguera(1), Neyma Bruce Diago(2), Isnais Luna Rodríguez(3).

**RESUMEN**

Los avances logrados en los últimos años en el campo de la Biología Celular y Molecular han ayudado a profundizar sobre el estudio de los ácidos nucleicos, particularmente de los ARN determinando su función informacional y catalítica, considerandolos un intermediario químico esencial en el desarrollo de la vida en el planeta. El descubrimiento de los ARN catalíticos ha modificado la definición de la palabra "enzima", permitiendo que cada día ocupen un lugar justo como herramientas terapéuticas.

**palabras claves:** ARN, ADN ,ENZIMAS ,RIBOZIMAS, INTRONES.

1. Licenciada en Ciencias Farmacéuticas Profesor Instructor de Bioquímica. 2Especialista de Primer Grado en Bioquímica Clínica Profesor Asistente.
2. Licenciada en Bioquímica Profesor Instructor de Bioquímica.

**INTRODUCCIÓN**

En los años 60 al revelarse la complejidad estructural y funcional del ARN llevó a Carl Woese, Francis Crick y Leslie Orgel a proponer que está macromolécula puede tener funciones catalíticas e informacionales dentro de la células (2). La presencia de ambas funciones surgiere que la molécula de ARN autoreplicativa podía existir.

Parece probable que la vida en sí comenzara su evolución con los ácidos nucleicos, puesto que éstas son las únicas sustancias biológicas que poseen la propiedad de autoduplicación. Hoy día, los ácidos nucleicos actúan como depositarios y trasmisores de la información genética de cada célula, tejido y organismo. Los planos para la construcción de un organismo están codificados en su ácido nucleico. Gran parte del desarrollo físico de un organismo a lo largo de su vida está programado en estas moléculas. Las proteínas que elaborarán sus células y las funciones que realizarán están todas registradas en los ácidos nucleicos.

Existen dos tipos de ácidos nucleicos, el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN) que se diferencian, tanto estructural como funcionalmente. La heterogeneidad de los ARN, ha determinado su función informacional y catalítica, por lo que lo han considerado un intermediario químico esencial en el desarrollo de la vida en el planeta.

En esta revisión bibliográfica nos proponemos describir a nivel molecular la relación que existe entre las características estructurales de los ARN y su función como biocatalizadores.

**DESARROLLO**

El descubrimiento de los ARN catalíticos ha cambiado la definición de la palabra "enzima". En las células existen tres tipos principales de ARN, tomando como criterio su participación en la síntesis de proteínas se han denominado:(1)

ARNt: cuya función es transportar los aminoácidos hacia los ribosomas durante la síntesis de proteínas, por lo que existen

tantos ARNt como aminoácidos diferentes contienen las proteínas.

ARNr: se encuentra formando parte de los ribosomas donde esta muy relacionado con proteínas.

ARNm: transfiere la información genética del ADN, de uno o más polipéptidos específicos de un gen o un conjunto de genes de un cromosoma, suelen ser moléculas con un tiempo de vida media muy corta.

Existen otros tipos de ARNs denominados ARN pequeños especializados en funciones reguladoras y catalíticas:

ARNsn: del inglés small nuclear (pequeño nuclear) se presentan asociados con más de 10 proteínas diferentes, formando partículas de ribonucleoproteínas (RNPsn) que participan en el proceso de maduración de los ARNhn para originar los ARNm y del preARNr.

ARNhn: heterogéneo nuclear es precursor del ARNm.

ARNsc: del inglés small cytoplasmic (pequeño citoplasmático). El ejemplo más importante lo constituye el ARN 7SL, que se encuentra unido a 6 proteínas, formando las partículas de reconocimiento del

péptido señal (SRP) que participa en la translocación de las proteínas, las que deben ser procesadas en el RER.

ARN como material genético: son los ARN virales los cuales cumplen dos funciones una servir de material genético y otra sirve como ARNm y dirige la síntesis ribosomal de proteínas virales.

### ESTRUCTURA DE LOS ARN QUE LE PERMITE SER CATALIZADO-RES.(2,3,4)

1. Existe en varias formas tautoméricas, lactama, lactima y doble lactima, siendo la primera la que predomina a pH 7.

2. La existencia de más de 30 tipos diferentes de bases raras y presentan apareamientos inusuales los cuales permiten que el nucleótido sea más reactivo o que los enlaces adyacentes sean más susceptibles, ejemplos C=C, A=A, G=U, G=G.

3. Existe 10 veces más ARN que ADN. El más abundante es el ARNr.

4. La estructura tridimensional del ARN muestra regiones apareadas que oscilan de 20pb hasta 50-100pb en los ARNm estos apareamientos no son al azar, como en el ADN monohíbrido sino que:

- Cada molécula particular tiene un patrón definido de apareamiento.
- En el ARNr 16S se encuentran apareamiento entre regiones distantes de la estructura primaria.
- Una secuencia de base puede aparearse con secuencias de la molécula lo que se relaciona con cambios conformacionales que ocurren en los ribosomas.
- En los ARNm y ARNt hay apareamientos inusuales por puentes de hidrógeno que pueden ocurrir: entre bases que no se complementan, entre una base y el esqueleto azúcar o con diferentes partes del esqueleto.
- La estructura de los ARNt en solución cambia durante su funcionamiento.
- Los ARNt que poseen la base rara querina tienden a tener una biosíntesis proteica menos activa.
- Los extremos 5' y 3' pueden estar bloqueados en las estructuras secundarias lo que los protege del ataque de las exonucleasas, pero pudiera ser una inactivación del carácter nucleofílico de los mismos.
- La violación de la ley de pares de base en los ARN disminuye la estabilidad de la doble hélice intracatenaria y hace posible su fácil apareamiento-desapareamiento.
- Entre la variedad de estructuras que pueden formar los ARNm están la formación de asa, hay genes que codifican ARN con capacidad de formar estructuras terminales y antiterminales.
- Los tres grupos fosfato libres y el grupo hidroxilo 2 libre le permiten propiedades catalíticas
- Los ARN pueden formar doble hélice tipo A en arrollamiento al azar lo que favorece su función catalítica.

### PROPIEDADES DE LOS BIOCATALIZADORES PRESENTES EN LAS RIBOZIMAS. (2,4)

Características estructurales.

- Crear un ambiente hidrofóbico.
- Presencia de grupos reactivos. (NH, OH, C=O, P, Mg<sup>2+</sup> imidazol que es el más reactivo).

- La estructura tridimensional debe estar determinada por la estructura primaria, la estructura tridimensional de las ribozimas tiende a ser grande sin embargo todavía no es conocida, lo que sí está claro es que es importante para su función.
- Especificidad de sustrato: para los ribozimas es frecuentemente una molécula de ARN, algunas veces el sustrato es parte de la propia ribozima, con el sustrato de ARN, el ARN catalítico puede hacer uso de interacciones de apareamiento de bases para alinear el sustrato para la reacción.
- Especificidad de acción: las ribozimas intervienen en dos tipos de reacciones.  
Formación del enlace fosfodiéster, actividad polimerasa, el oxígeno del OH 3' realiza un ataque nucleofílico sobre el primer átomo de P de un NTP el resultado es un desplazamiento electrónico de dicho átomo de P al vecino y la aceptación del e- del O<sub>2</sub> del OH formándose un enlace fosfodiéster.  
Hidrólisis del enlace fosfodiéster, actividad endonucleasa, el sitio de ruptura es reconocido por una secuencia específica y es escindido por una molécula de guanocina externa que actúa como cofactor o con una adenina de la protuberancia de la ribozima produciendo una reacción de transesterificación  
Características funcionales.  
Factores que explican el poder catalítico de una ribozima.
- Efecto de proximidad y orientación del sustrato y la ribozima, contribuye a aumentar la velocidad de la reacción en el orden de 10<sup>5</sup> veces. Ejemplo el ARN<sup>sn</sup> es capaz de romper 2 enlaces y formar 1 mediante este efecto.
- Pueden llevar a cabo Catálisis Ácido-Básica, los ésteres fosfóricos pueden experimentar catálisis ácido básica general y los iones metálicos aumentan la posibilidad en los polifosfatos, y los grupos aminos de las bases nitrogenadas pueden participar.
- Pueden llevar a cabo Catálisis Covalente, pueden ser nucleofílicas o electrofílicas, el más reactivo es el imidazol, amino e hidroxilo la realizan en las proteínas y los tres están presentes en los ARN.
- Puede haber Catálisis por Distorsión, formar enzimas como la lisosima la realizan, el ARN no puede formar doble hélice tipo B por impedimento estérico del OH 2 del azúcar sin embargo pueden formar tipo A en la cual los pares de base están inclinados 20 grados del eje perpendicular al oxis de la hélice.
- Presentan carácter específico, logrado cuando el sustrato por apareamiento de bases se une a la ribozima.
- Sobre los mecanismos de control es del factor que menos se conoce.

## **RIBOZIMAS MAS ESTUDIADAS.**

Ribonucleasa P (RN asa P):

El ARN<sup>t</sup> de la E. coli que lee el codón GAU y transfiere tirosina, está formado por 85 nucleótidos. La E.coli contiene 2 genes para este ARN<sup>t</sup> que están adyacentes y presentan 2 secuencias idénticas de 350 bases, cada una con su espaciador de 200 nucleótidos. Los 2 genes son transcritos en un solo ARN, que es cortado cuando se ha completado su síntesis. La RNA asa P es una de las enzimas que participan en el proceso de maduración del ARN<sup>t</sup>-tyr. Formada por una porción proteica de Mr=17 500 y una porción de ARN de 377 nucleótidos llamado M1ARN (1).

Estudios realizados por Sidney Altman y col, en 1983 revelaron que el ARN por sí mismo, si se le proporcionaba una concentración suficientemente elevada de Mg<sup>2+</sup>, o una concentración baja de Mg<sup>2+</sup> y la molécula básica pequeña espermina, era capaz de catalizar la fragmentación específica de los pre-ARN<sup>t</sup>. Además el ARN actuaba como una verdadera enzima, sin modificarse en el proceso y obedeciendo la cinética de Michaelis Menten.

La adición de la porción proteica, aumenta la actividad de la RNA asaP pero no es esencial para la unión del sustrato ni para su fragmentación. A concentraciones salinas elevadas, el ARN pasa a ser un catalizador muy eficiente, su Km. se hace muy baja y la Kcat/ Km. se aproxima a  $10^7$  (mol/L)<sup>-1</sup> (s<sup>-1</sup>). (5).

#### Peptidil transferasa:

La síntesis del enlace peptídico es realizado por el complejo enzimático de la peptidil transferasa que es parte integrante de la subunidad 50 S ribosomal.

Harry Noller y col. en 1993 han demostrado que el tratamiento extremo con proteasas no destruye por completo la actividad de la peptidil transferasa, pero el tratamiento con ribonucleasa sí lo hace. Lo que implica que la transferencia peptídica, paso crucial de la translocación está catalizado por una ribozima (ARNr 23S) tal vez con la ayuda de algunas proteínas ribosómicas. (2,5,6)

#### Intrones del grupo I:

Thomas Cech y col en 1992 descubrieron, examinando la eliminación de un intrón (secuencia de interposición o IVS) de los ARN prerribosómicos 26S del protista Tetrahymena Thermophila encontraron que el propio ARNt llevaba a cabo la escisión de su intrón de 413 nucleótidos, así como el reempalme necesario. Además el IVS pasaba por una serie de reacciones intramoleculares dentro del intrón, que lo llevaban a perder 19 nucleótidos de su extremo 5'. El producto final es una molécula denominada L-19 IVS (del inglés intervening sequence lacking 19 nucleotide). Esta actividad no es considerada una verdadera catálisis puesto que el "catalizador" se modifica en la reacción. Sin embargo, la L-19 IVS tiene capacidades catalíticas reales. Es capaz de alargar o acortar pequeños oligonucleótidos. Son sus mejores sustratos oligonucleótidos, por ejemplo el oligomero sintético C5 que puede formar pares de base con una secuencia específica rica en G de la L-19 IVS. La actividad enzimática resulta un ciclo de reacciones de transesterificación Cada ribozima procesa cerca de 100 moléculas de sustrato por hora. Sigue una cinética de Michaelis Menten. Es específico para oligonucleótidos de ARN. Es inhibido competitivamente por la 3' desoxiguanosina (dC5). La Kcat/Km es de  $10^3$  (mol/L)<sup>-1</sup> S<sup>-1</sup>, baja comparada con la de muchas enzimas. La hidrólisis de C5 por esta ribozima es acelerada por un factor de  $10^{10}$  y su Km. para la guanosina es de 30MM. (2,5,7,8)

Otros ARN catalíticos son conocidos algunos ARNs pequeños de virus de plantas forman una estructura que promueve una reacción de autoruptura. En un caso la actividad de ruptura fue localizada en un fragmento de 19 nucleótidos constituyendo la menor ribozima conocida.

#### **CONCLUSIONES**

1 – La heterogeneidad estructural de los ARN ha determinado su función informacional catalítica. 2 – Se ha demostrado que la mayoría de las propiedades de las enzimas están presentes en las ribozimas. 3 – Entre las ribozimas más estudiadas se encuentra la RNAasa P, la Peptidil transferasa y los intrones del grupo I .

#### **ABSTRACT**

The advances made in the last five years in the field of Molecular Biology have been useful for deepening into the study of nucleic acids, particularly those of RNA, by assessing its informative and catalytic function, and considering them as a primary chemical mediator for the evolution of life on the planet. The discovery of the RNA catalytic has modified the definition of the term "enzyme" so that they each day occupy a right place as therapeutic tools.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Carbella. Hernández. Et al. Bioquímica médica, Tomo I-II. 1ra Edición. La Habana, Editora. Ciencias Médicas, 1999: T – I :191. T
- 2 II: 484. 2 – Lehninger. Al et al, Principles of Biochemistry. 2da Edición. Worth Publ. 1993: 659, 667. 3 – Murria, RH et al Bioquímica de Harpe. 13ra Edición. México. Editorial. El Manual Moderno, Saa de CV, 1994: 487. 3 Stryer. I Biochemistry. 4ta Edición. Freeman Publ, 1995: Cap. 33.
- 4 Mathews CK, Van Hold KE. Bioquímica. 2da Edición. MC Graw- 4111 – InterAmericana, 1998: 437 – 438. 6 - Noller, HF ( 1993 ) T RNA – RNA Interactions and peptidil transferase. FASEBJ. 7: 87 – 89. 7 – Cech, TR ( 1986 ) RNAasa enzyme: Sc. Am 255 ( nov ), 64 – 65. 8 – Cech, TR ( 1987 ) The chemistry of self – splicing RNA and RNA enzyme. Eci 236, 1532 – 39.