



Molekularne podstawy biosyntezy białka – funkcja 23S rRNA

Kamilla Bąkowska-Żywicka, Anna Kietrys

Instytut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk, Poznań

Molecular basics of protein biosynthesis – function of 23S rRNA

Summary

The main function of ribosome is to serve as a site of mRNA translation into a sequence of amino acids in a process called protein biosynthesis. Most important for understanding the translational mechanism is how a ribosome interacts with the factors playing role in this complicated cellular process. The key elements of these interactions are the functional domains of rRNAs. In this paper, we present the functional importance of 23S rRNA in polypeptide biosynthesis.

Key words:

23S rRNA, large ribosomal subunit, protein biosynthesis, ribosome.

1. Wprowadzenie

Jednym z ostatnich etapów regulacji ekspresji genu jest proces translacji zachodzący w rybosomie. Struktura rybosomu jest dość dobrze poznana, natomiast oddziaływania rybosomu z czynnikami biorącymi udział w biosyntezie białka oraz określenie dynamicznych zmian tych interakcji podczas poszczególnych etapów translacji, nadal pozostają wielkim wyzwaniem. Zmiany strukturalne rybosomu mają zasadnicze znaczenie funkcjonalne i regulatorowe podczas biosyntezy białka. Są one istotne dla całego kompleksu zagadnień ekspresji genu.

W celu poznania mechanizmu działania tej złożonej maszyny komórkowej, przedstawiamy funkcję wybranych fragmen-

Adres do korespondencji

Kamilla
Bąkowska-Żywicka,
Instytut Chemii
Bioorganicznej,
Polska Akademia Nauk,
ul. Noskowskiego 12/14,
61-704 Poznań;
e-mail:
bakowska@ibch.poznan.pl

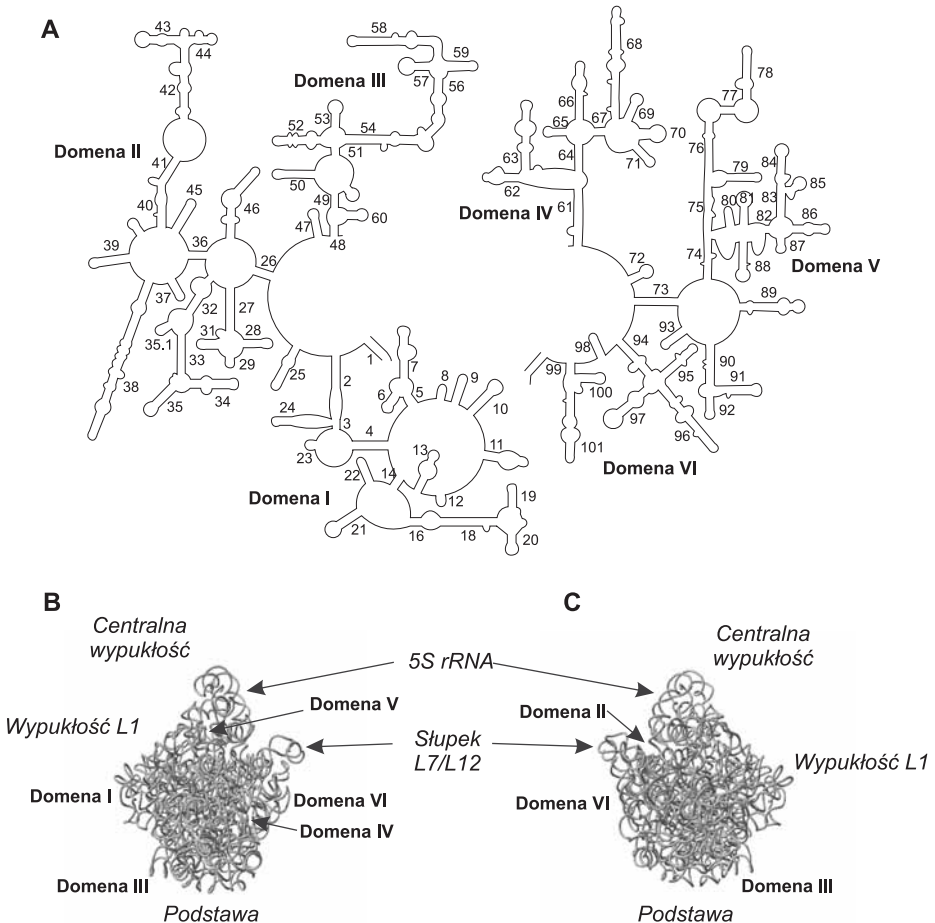
biotechnologia

1 (76) 186–196 2007

tów 23S rRNA dużej podjednostki rybosomalnej w procesie biosyntezy białka. Rola jaką pełnią konserwatywne fragmenty 16S rRNA małej podjednostki rybosomalnej została przez nas wcześniej opisana (1).

2. Budowa dużej podjednostki rybosomalnej

Duża podjednostka 50S organizmów prokariotycznych zbudowana jest z 23S rRNA, 5S rRNA i 34 białek (L1 – L34) (2), składających się na cztery podstawowe ele-



Rys. 1. Struktura dużej podjednostki rybosomalnej 50S: A – schemat struktury II-rzędowej 23S rRNA, liczby oznaczają numery helis [na podstawie struktury 23S rRNA *E. coli*, struktura pobrana z (30), numer J01695]; B – struktura trzeciorzędowa 50S *H. marismortui*, widok od strony oddziaływania podjednostek [struktura pobrana z (31), numer 1FFK]; C – struktura trzeciorzędowa 50S *H. marismortui*, widok od strony zewnętrznej [struktura pobrana z (31), numer 1FFK].

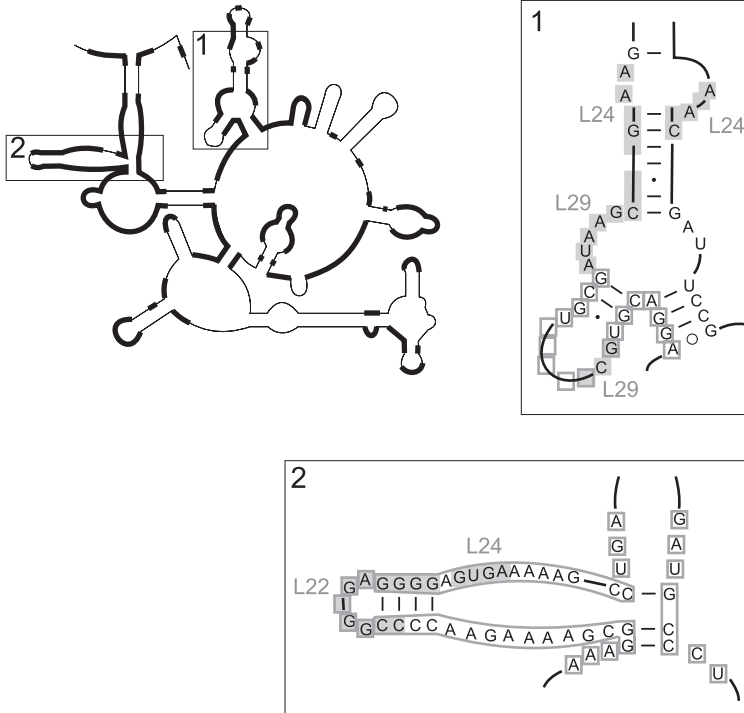
menty morfologiczne: podstawę (ang. *body*) w dolnej części podjednostki oraz trzy wypukłości: (1) centralną wypukłość (ang. *central protuberance*) ze zasocjowanym palcem miejsca A (ASF, ang. *A-site finger*, tworzy go helisa H38 L-rRNA), (2) wypukłość białka L1 (ang. *L1 protuberance*) i (3) słupek L7/L12 (ang. *L7/L12 stalk*), oddziałujący z czynnikami elongacyjnymi (2-4). W strukturze II-rzędowej dużego rybosomalnego RNA (L-rRNA) można wyróżnić sześć domen, oznaczanych jako I-VI ((2) i prace tam cytowane), które wraz z cząsteczką 5S rRNA tworzą skomplikowaną, jednolitą strukturę. W przeciwieństwie do małej podjednostki, domeny 23S rRNA wzajemnie się ze sobą przeplatają. Podział rybosomalnego L-RNA na domeny wraz z ich lokalizacją w strukturze krystalicznej podjednostki 50S (2) przedstawiono na rysunku 1.

2.1. Domena I 23S rRNA

Domenę I tworzą helisy H1 – H24, umiejscowione po zewnętrznej stronie podjednostki (2). Wąska część tej domeny rozpoczyna się w pobliżu domeny VI, gdzie położone są końce 5' i 3' stanowiące helisę H1, a następnie rozwija się w globularną strukturę położoną z tyłu podjednostki, poniżej regionu L1. Zasadniczą funkcją domeny I jest tworzenie ścian tunelu wyjścia syntetyzowanego przez rybosom polipeptydu (ang. *nascent-peptide exit tunnel*), który rozpoczyna się w centrum aktywnym rybosomu w domenie V i przebiegając przez domeny IV, III, II i I, kończy się po zewnętrznej stronie dużej podjednostki rybosomalnej (5). Ściany tunelu wyjścia polipeptydu są zbudowane głównie z rRNA. W obrębie domeny I, w tworzeniu tunelu wyjścia biorą udział nukleotydy 23-37*, 53-70, 85-97 oraz 442-517. Wszystkie z nich znajdują się w regionach jednoniciowych 23S rRNA i tworzą pętle. Długość tunelu wynosi około 100 Å (polipeptyd o takiej długości jest chroniony przed proteolizą), a średnica od 10 do 20 Å. Z dokładniejszych badań rybosomu 70S ((6,7) i prace tam cytowane) wiadomo, że w obrębie domeny I, tunel jest w większości prosty.

Domena I oddziałuje ponadto z końcem CCA cząsteczki tRNA w miejscu E (nukleotydy 199 helisy H11 23S rRNA) (4), oraz z sześcioma białkami rybosomalnymi (2,8). Helisy H19-H20 silnie oddziałują z białkiem L4, natomiast H2 z H24 – z L22. Oba te białka regulują proces translacji poprzez oddziaływanie z nowo zsyntetyzowanym polipeptydem (9-11). Wykazano również, że nukleotydy 194-201, 224-227 oraz 248-257 tworzące odpowiednio helisy H11, H12 i H13 oddziałują z białkiem L15. Ponadto zaobserwowano interakcje między helisami H7 i H19-H20 a białkiem L24 oraz pomiędzy helisami H5-H7 a białkiem L29, dla którego sugeruje się udział w tworzeniu miejsca wiązania SRP (ang. *signal recognition particle*). W strukturze krystalicznej podjednostki 50S *H. marismortui* obserwowano także słabe oddziaływania pomiędzy nukleotydami domeny I a białkiem L23 (2).

* Wszystkie pozycje nukleotydów wymienione w tekście dotyczą *E. coli*.



Rys. 2. Schemat struktury drugorzędowej domeny I 23S rRNA. Pogrubioną linią zaznaczone zostały sekwencje konserwatywne. Na powiększonych fragmentach wyróżniono nukleotydy oddziałujące z białkami rybosomalnymi (szare kwadraty) oraz nukleotydy tworzące tunel wyjścia polipeptydu (szare obramowanie).

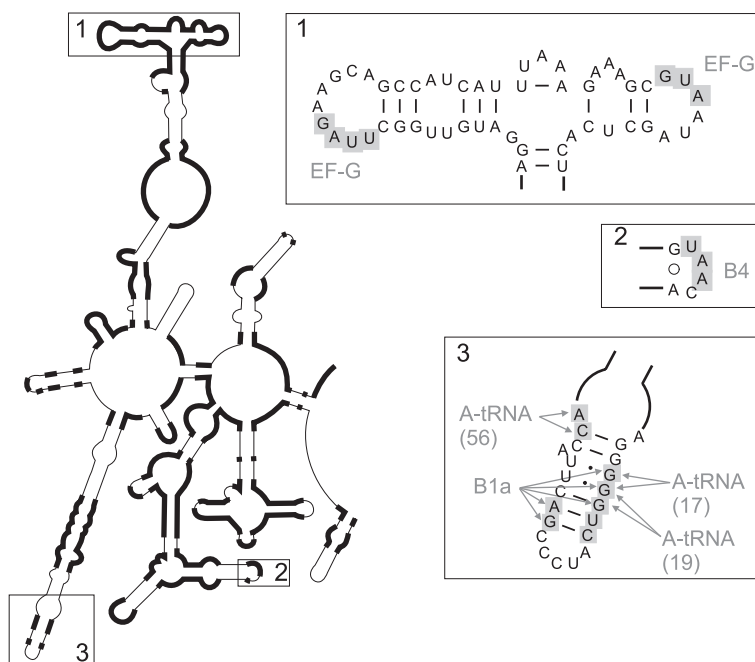
Dokładne położenie nukleotydów konserwatywnych we wszystkich królestwach, które są funkcjonalnie ważne w procesie translacji, przedstawiono na schemacie struktury II-rzędowej tej domeny na rysunku 2.

2.2. Domena II L-rRNA

Domena II jest największą z sześciu domen 23S rRNA i stanowi największy obszar zewnętrznej części podjednostki. Zawiera helisy H25 – H46. W strukturze domeny II można wyróżnić trzy wystające elementy, skierowane w stronę płaszczyzny oddziaływania podjednostek (2). Jeden z nich (zawierający helisy H42 – H44) stanowi część rRNA wypukłości L7/L12. Fragmenty helisy H43 i H44 (nukleotydy w pozycjach 1051 – 1108, patrz rys. 3) wraz z fragmentem domeny VI i białkami L6, L11, L4 i L7/L12 tworzą centrum GTPazowe rybosomu (GAC, ang. *GTPase-associated centre*) (12,13). Centrum to odpowiedzialne jest za wiązanie czynników elongacyjnych

(EF-G i EF-Tu), czynnika inicjującego IF-2 i czynnika uwalniającego RF3. Wszystkie te czynniki należą do białek wykazujących właściwości GTPazy. Druga wypukłość domeny II to helisa H38, która jest najdłuższą nierozgałęzioną helisą w podjednostce. Rozpoczyna się ona od strony zewnętrznej 50S, zagina pod kątem około 90° i kieruje w stronę małej podjednostki pomiędzy domeną V 23S rRNA a częścią 5S rRNA. Tworzy w ten sposób mostek między podjednostkami, B1a, w który ze strony podjednostki 30S zaangażowane są białka S13 i S19. Ponadto, nukleotydy 881-883 oraz 898-899 oddziałują odpowiednio z nukleotydami 17-19 pętli DHU oraz nukleotydem 56 pętli T Ψ C części tRNA w miejscu A (patrz fragment 3 na rys. 3). Trzeci region domeny II (helisy H32 – H35.1) skierowany jest dokładnie w kierunku małej podjednostki. Jego koniec, pętla helisy H34, oddziałuje bezpośrednio z helisą h20 i białkiem S15 małej podjednostki, tworząc mostek B4 (4).

Znaczny fragment domeny II tworzy również ściany tunelu wyjścia polipeptydu (7). Z domeną tą oddziałuje aż 15 rybosomalnych białek dużej podjednostki (2,8). Są to białka L1, L3, L4, L6, L9, L10, L11, L13, L15, L30, wykazujące silne oddziaływania z nukleotydami 23S rRNA oraz białka L2, L5, L18 i L12, oddziałujące słabiej z L-rRNA w obrębie tej domeny.



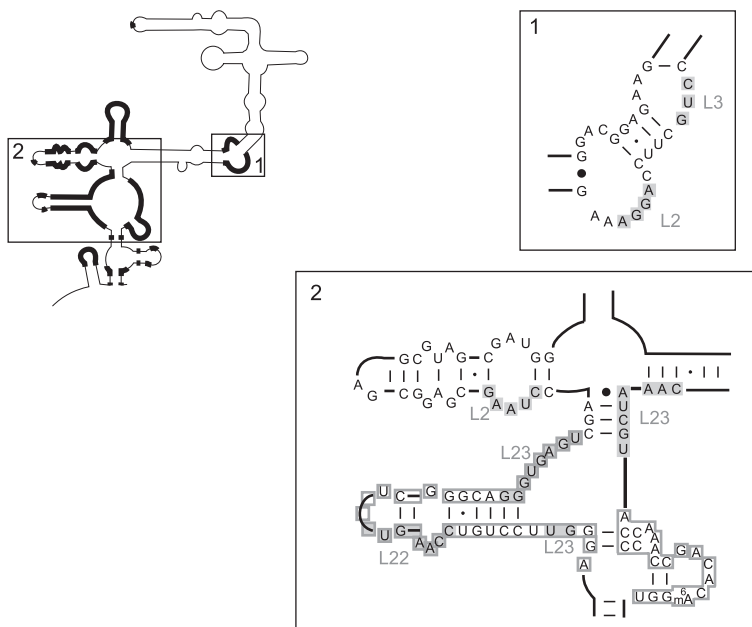
Rys. 3. Schemat struktury drugorzędowej domeny II 23S rRNA. Pogrubioną linią zaznaczone zostały sekwencje konserwatywne. Na powiększonych fragmentach wyróżniono nukleotydy oddziałujące z czynnikiem elongacyjnym (EF-G), tRNA w miejscu A (A-tRNA) oraz tworzące mostki (B1a, B4).

2.3. Domena III L-rRNA

Domena III jest zwartą, globularną domeną, składającą się z helis H47 – H60 (2). Zajmuje ona spodnią lewą część dużej podjednostki. Kształtem przypomina czteroramienną gwiazdę, której wierzchołki stanowią helisy: H48, H52, H57 i H58. Najbardziej rozległe oddziaływania domeny III mają miejsce z fragmentami domen I, IV i VI, natomiast w przeciwieństwie do pozostałych domen tylko w niewielkim stopniu oddziałuje z domeną V. Strukturę tej domeny stabilizują oddziaływania z czterema białkami, tj. z L2, L3, L22 oraz L23 (2,8) a fragmenty domeny II w obrębie nukleotydów 1262-1621 tworzą tunel wyjścia polipeptydu (rys. 4) (7).

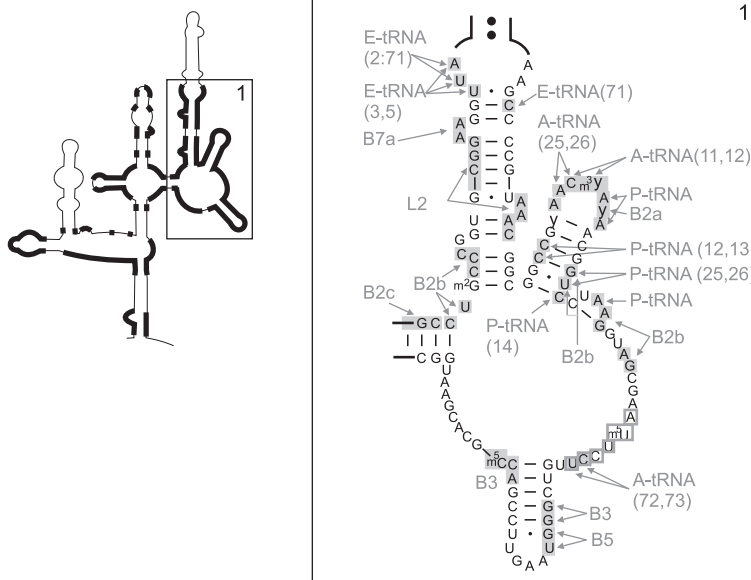
2.4. Domena IV L-rRNA

Domena IV zbudowana jest z helis H61 – H71. Zajmuje ona większą część płaszczyzny podjednostki 50S, która oddziałuje z 30S (2). Tworzy ona duży przekątny płat płaskiej powierzchni rybosomu i łączy się z domenami III i V po zewnętrznej stronie rybosomu.



Rys. 4. Schemat struktury drugorzędowej domeny III 23S rRNA. Pogrubioną linią zaznaczone zostały sekwencje konserwatywne. Na powiększonych fragmentach wyróżniono nukleotydy oddziałujące z białkami rybosomalnymi (szare kwadraty) oraz nukleotydy tworzące tunel wyjścia polipeptydu (szare obramowanie).

Helisy H67 – H71 stanowią najważniejszą część domeny IV i formują brzeg szczeliny miejsca aktywnego (patrz powiększony fragment na rys. 5). W tym rejonie domeny IV występują liczne interakcje między 23S rRNA a innymi czynnikami biorącymi udział w biosyntezie białka. Pięć spośród nukleotydów helisy H68 jest zaangażowanych w oddziaływania z łodygą akceptorową cząsteczki tRNA znajdującej się w rybosomalnym miejscu E (4,14). Ponadto, część akceptorowa cząsteczki tRNA w miejscu A jest stabilizowana poprzez interakcje z nukleotydami 1942 i 1943 helisy H71 (4). Stwierdzono również interakcje helis H69 i H70 położonych w centralnym miejscu brzegu szczeliny z łodygą DHU cząsteczki tRNA, zajmującej zarówno miejsce A (nukleotydy 11 i 12 tRNA oddziałują z nukleotydami 1914 i 1915 23S rRNA; nukleotydy 25 i 26 tRNA oddziałują z nukleotydami 1913 i 1914 23S rRNA (4)), jak i miejsce P (nukleotydy 12 i 13 tRNA oddziałują z nukleotydami 1908 i 1909 23S rRNA; nukleotydy 25 i 26 tRNA oddziałują z nukleotydami 1922 i 1923 23S rRNA (4,15,16)). W interakcjach z cząsteczką tRNA zajmującą rybosomalne miejsce P biorą również udział nukleotydy w pozycjach: 1916, 1918, 1926 (17,18) oraz 1924 (15). Niezwykle ważna helisa H69 (nukleotydy 1912-1913, 1918) oddziałuje również z helisą h44 16S rRNA w pozycjach 1409-1410 oraz 1495-1496, tworząc mostek B2a między podjednostkami (19). Fakt ten może mieć znaczący wpływ na dynamikę translacji, a szczególnie na sam mechanizm translokacji cząsteczek tRNA. W rejonie



Rys. 5. Schemat struktury drugorzędowej domeny IV 23S rRNA. Pogrubioną linią zaznaczone zostały sekwencje konserwatywne. Na powiększonych fragmentach wyróżniono nukleotydy oddziałujące z tRNA w miejscu A, P oraz E (A-tRNA, P-tRNA, E-tRNA), białkami rybosomalnymi (L2), nukleotydy tworzące mostki (B2a, B2b, B2c, B3, B7a) oraz tunel wyjścia polipeptydu (szare obramowanie).

tym istnieje ponadto 6 innych mostków spinających obie podjednostki (4,19). Są to: 1) mostek B2b, tworzony poprzez oddziaływania helis H67, H69 oraz H71 23S rRNA z fragmentami helis H24 i H45 16S rRNA, 2) mostek B2c, w którego udział zaangażowane są H66 i H67 oraz H24 i H27, 3) mostek B3, pomiędzy H71 i H44, 4) mostek B5, tworzony zarówno dzięki oddziaływaniom RNA-RNA (H62, H64 i H71 wiążą się z H44) jak i białko-RNA (L14-H44), 5) mostek B6, w którym oddziałują helisy H62 z H44 oraz białko L19 z helisą H44, oraz 6) mostek B7a, tworzony dzięki interakcjom helisy H68 z helisą H23.

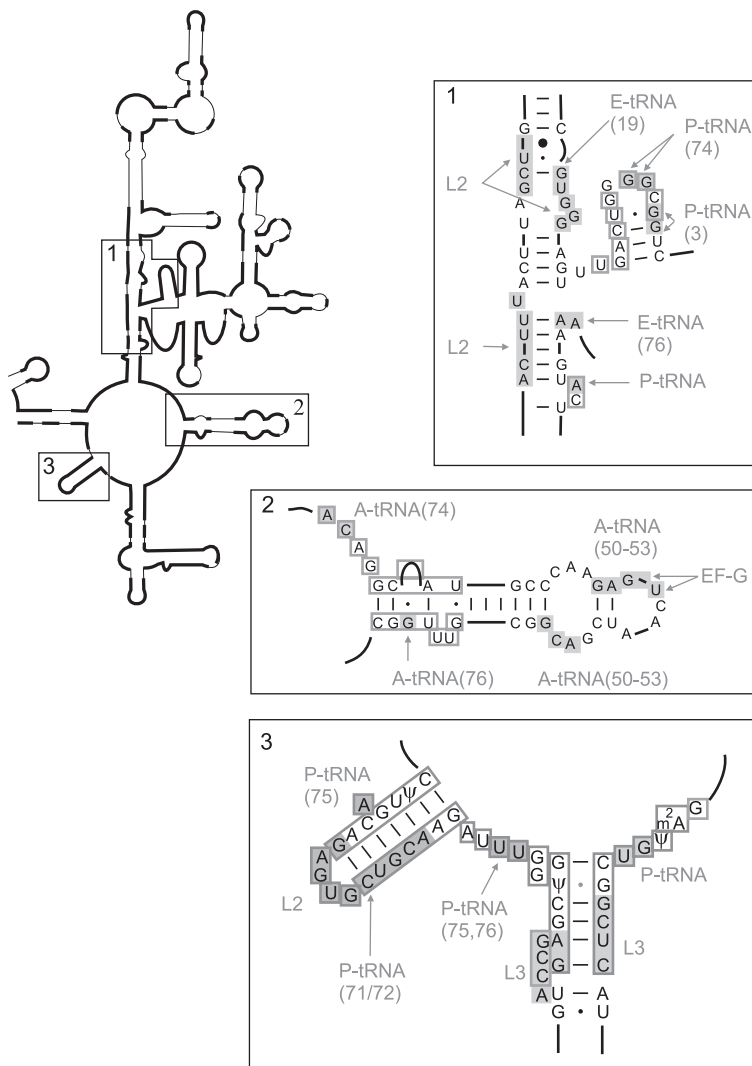
Fragment domeny IV zawierający helisy H67 – H71 to jeden z niewielu regionów 23S rRNA, który nie jest stabilizowany przez białka rybosomalne. W obrębie całej domeny, jedynie nukleotydy 1654-1660 oraz 1992-2000 helisy H61 wykazują oddziaływania z białkiem rybosomalnym L3, helisa H66 wiąże białko L2, a helisa H62 odpowiada za interakcje z białkiem L14 (4,8).

2.5. Domena V L-rRNA

Domena V, zawierająca helisy H72 – H93, jest umiejscowiona pomiędzy domenami IV i II. Oddziałują z nią białka L2, L3, L5, L15, L18 oraz L22 (2,8). Domenę V można podzielić na trzy strukturalne regiony. Pierwszy rozpoczyna się helisą H75 i tworzy miejsce wiązania białka L1. Drugi zawiera helisy H80 – H88, położony jest między cząsteczką 5S rRNA i domeną II. Trzeci region (helisy H89 – H93) rozciąga się w kierunku domeny VI i pomaga stabilizować miejsce wiązania czynnika elongacyjnego EF-G w rybosomie (20). Wykazano również, że helisy H80 i H93 23S rRNA są zaangażowane w oddziaływania z końcem 3'CCA cząsteczek tRNA zajmujących rybosomalne miejsca P i E, natomiast nukleotydy tworzące helisę H89 silnie oddziałują z pętlą TΨC oraz końcem CCA cząsteczki tRNA w miejscu A (4,15-18,21) (rys. 6).

Centralna pętla domeny V, którą otaczają helisy H73, H74, H89, H90 i H93 stanowi najważniejszy region dużej podjednostki rybosomalnej. Stanowi ona centrum peptydylotransferazowe (PTC, ang. *peptidyltransferase center*), którego zasadniczą funkcją jest synteza wiązania peptydowego w rybosomie, a zatem łączenie wiązaniami kowalencyjnymi kolejnych reszt aminokwasowych i tworzenie łańcucha polipeptydowego (22 i prace tam cytowane). Drugą fundamentalną reakcją prowadzoną przez PTC jest uwalnianie utworzonego polipeptydu z peptydylo-tRNA podczas terminacji translacji (23). Sugeruje się udział konserwatywnego nukleotydu A2602 w tej reakcji (24).

Miejsce aktywne rybosomu jest zbudowane wyłącznie z rRNA (2,25). Najbliższe z białek nie znajduje się w takiej odległości do centrum aktywnego PTC, aby mogło pełnić aktywną funkcję jako katalizator w reakcji syntezy wiązania peptydowego (7,22). Dzięki temu możemy umieścić rybosom na liście naturalnie występujących rybozymów.



Rys. 6. Schemat struktury drugorzędowej domeny V 23S rRNA. Pogrubioną linią zaznaczone zostały sekwencje konserwatywne. Na powiększonych fragmentach wyróżniono nukleotydy oddziałujące z tRNA w miejscu A, P i E (A-tRNA, P-tRNA, E-tRNA), białkami rybosomalnymi (L2, L3), czynnikiem elongacyjnym (EF-G) oraz nukleotydy tworzące tunel wyjścia polipeptydu (szare obramowanie).

2.6. Domena VI L-rRNA

Najmniejsza z domen 23S rRNA, domena VI, zbudowana jest z helis H94 – H101 i tworzy dużą część powierzchni podjednostki bezpośrednio poniżej słupka L7/L12 (2). Domena ta kształtem przypomina literę X. Najbardziej interesującym fragmentem tej domeny jest domena sarcyny-rycyny (SRL, ang. *sarcin-ricin loop*) wchodząca

5. Mankin A. S., (2006), *Trends Biochem. Sci.*, 31, 1, 11-13.
6. Tenson T., Ehrenberg M., (2002), *Cell*, 108, 5, 591-594.
7. Nissen P., et al., (2000), *Science*, 289, 5481, 920-930.
8. Klein D. J., Moore P. B., Steitz T. A., (2004), *J. Mol. Biol.*, 340, 1, 141-177.
9. Brodersen D. E., et al., (2002), *J. Mol. Biol.*, 316, 3, 725-768.
10. Brodersen D. E., Nissen P., (2005), *Febs J.*, 272, 9, 2098-2108.
11. Wilson D. N., Nierhaus K. H., (2005), *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 40, 5, 243-267.
12. Sergiev P. V., et al., (2005), *J. Biol. Chem.*, 280, 36, 31882-31889.
13. Sergiev P. V., Bogdanov A. A., Dontsova O. A., (2005), *FEBS Lett.*, 579, 25, 5439-5442.
14. Feinberg J. S., Joseph S., (2001), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 20, 11120-11125.
15. Spahn C. M., et al., (2001), *Cell*, 107, 3, 373-386.
16. Dudzinska-Bajorek B., Bakowska K., Twardowski T., (2006), *J. Plant Physiol.*, 163, 4, 463-474.
17. Bocchetta M., Xiong L., Mankin S., (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 3525-3530.
18. Moazed D. N. H., (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 3725-3728.
19. Gao H., et al., (2003), *Cell*, 113, 6, 789-801.
20. Wilson K. S., Nechifor R., (2004), *J. Mol. Biol.*, 337, 1, 15-30.
21. Moore P. B., Steitz T. A., (2002), *Nature*, 418, 6894, 229-235.
22. Bąkowska-Żywicka K., Tyczewska A., Twardowski T., (2006), *Postępy Biochemii*, 52, 2, 166-172.
23. Polacek N., Mankin A. S., (2005), *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 40, 5, 285-311.
24. Polacek N., et al., (2003), *Mol. Cell.*, 11, 1, 103-112.
25. Harms J., et al., (2001), *Cell*, 107, 5, 679-688.
26. Bohun E., Twardowski T., (1993), *Acta Biochim. Pol.*, 40, 1, 12-16.
27. Stark H., et al., (2002), *Nat. Struct. Biol.*, 9, 11, 849-854.
28. Valle M., et al., (2003), *Nat. Struct. Biol.*, 10, 11, 899-906.
29. La Teana A., Gualerzi C. O., Dahlberg A. E., (2001), *Rna*, 7, 8, 1173-1179.
30. <http://www.rna.icmb.utexas.edu>
31. <http://www.rcsb.org/pdb>