



Funkcja wybranych fragmentów 16S rRNA małej podjednostki rybosomalnej w procesie biosyntezy białka

Kamilla Bąkowska

Instytut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk, Poznań

Function of selected fragments of 16S rRNA of small ribosomal subunit in protein biosynthesis

Summary

The mechanism of protein biosynthesis and selected fragments of rRNAs are universally conserved. Understanding structural basis for the functional capabilities of rRNAs is essential to regulation of protein synthesis. In this paper I describe function of the most important fragments of 16S rRNA of small ribosomal subunit.

Key words:

protein biosynthesis, ribosome, small ribosomal subunit, 16S rRNA, conservative structures.

1. Wprowadzenie

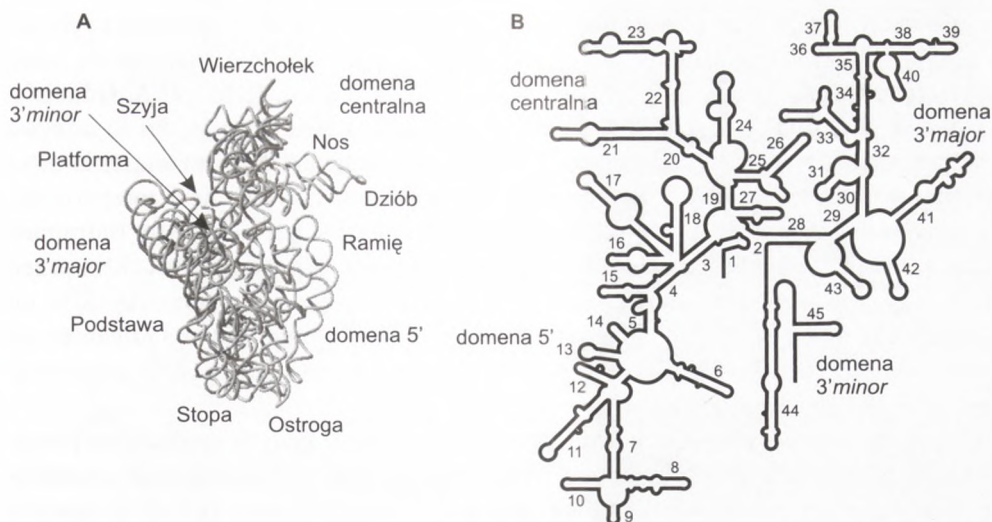
Biosynteza białka, skomplikowany i wieloetapowy proces, jest koordynowana przez złożoną strukturę rybosomu, składającą się z białek i kwasów nukleinowych. Oba komponenty są funkcjonalne i aktywne w tym procesie. Oddziaływanie białek rybosomalnych i rRNA między sobą powoduje stabilizację kompleksu rybosomalnego, a rRNA bezpośrednio uczestniczy w procesie translacji. Kluczem do wyjaśnienia i zrozumienia mechanizmu działania rybosomu jest poznanie jego złożonej struktury.

Adres do korespondencji

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

biotechnologia

2 (69) 206–214 2005



Rys. 1. Struktura małej podjednostki rybosomalnej 30S: A – struktura trzeciorzędowa 30S *H. marismortui*, widok od strony zewnętrznej; B – struktura drugorzędowa 16S rRNA (liczby oznaczają numery helisy).

2. Struktura małej podjednostki rybosomalnej

Rybosom prokariotyczny 70S składa się z dwóch podjednostek: małej 30S i dużej 50S. Podjednostka 30S zbudowana jest z 16S rRNA (~1500 nt) i 21 białek (określane jako S1 – S21), natomiast podjednostka 50S z 23S rRNA (~2900 nt), 5S rRNA (~120 nt) i 34 białek (L1 –L34).

W obrębie małej podjednostki (rys. 1A) wyróżniono wierzchołek (*head*), który połączony jest z podstawą (*body*) przez przewężenie (*neck*) w pobliżu platformy (*platform*). Po prawej stronie podstawy znajduje się niewielkie ramię (*shoulder*), pozostające w bliskim kontakcie z wierzchołkiem podjednostki, tworząc szczelinę między tymi elementami; oddziaływanie to jest niezbędne dla stabilności rybosomu [1]. Na dole po prawej stronie podstawy znajduje się wystająca helisa RNA nazwana ostrogą (*spur*). Powierzchnia podjednostki stanowi najważniejszą funkcjonalnie część i utworzona jest głównie z helikalnych nici 16S rRNA tworzących szkielet podstawy, ramienia i platformy [2].

W strukturze II-rzędowej 16S rRNA (rys. 1B) można wyróżnić cztery domeny: 5', centralną, 3' *major* oraz 3' *minor* ([3] i prace tam cytowane).

3. Funkcja zachowawczych fragmentów 16S rRNA

Dla zrozumienia mechanizmu translacji niezbędne jest poznanie w jaki sposób rybosom oddziałuje z komponentami niezbędnymi w procesie translacji, m. in. z mRNA, tRNA, czy czynnikami elongacyjnymi. mRNA stanowi matrycę dla biosynte-

zy peptydu, zatem poznanie miejsc i sposobu oddziaływania tej cząsteczki z rybosomem jest niezwykle ważne. W małej podjednostce rybosomalnej znajduje się tunel wejścia mRNA, w którym odbywa się oddziaływanie mRNA – 16S rRNA. Oddziaływanie tRNA z podjednostką 30S we wszystkich trzech miejscach (A, P i E) odbywa się poprzez domenę antykodonową i nie tylko stabilizuje mechanizm wiązania tRNA do rybosomu, ale jest również niezbędne w procesach takich jak: mechanizm rozpoznania, transllokacja tRNA i kataliza powstawania wiązania peptydowego. Natomiast czynnik elongacyjny EF-Tu ochrania wiązanie estrowe zacylowanego AA-tRNA przed hydrolizą pod wpływem wody oraz jest zaangażowany w dostarczenie AA-tRNA do właściwego miejsca w rybosomie. Drugim czynnikiem elongacyjnym, zależnym od hydrolizy GTP, jest EF-G, który odpowiedzialny jest za transllokację tRNA odpowiednio z miejsc A i P do P i E.

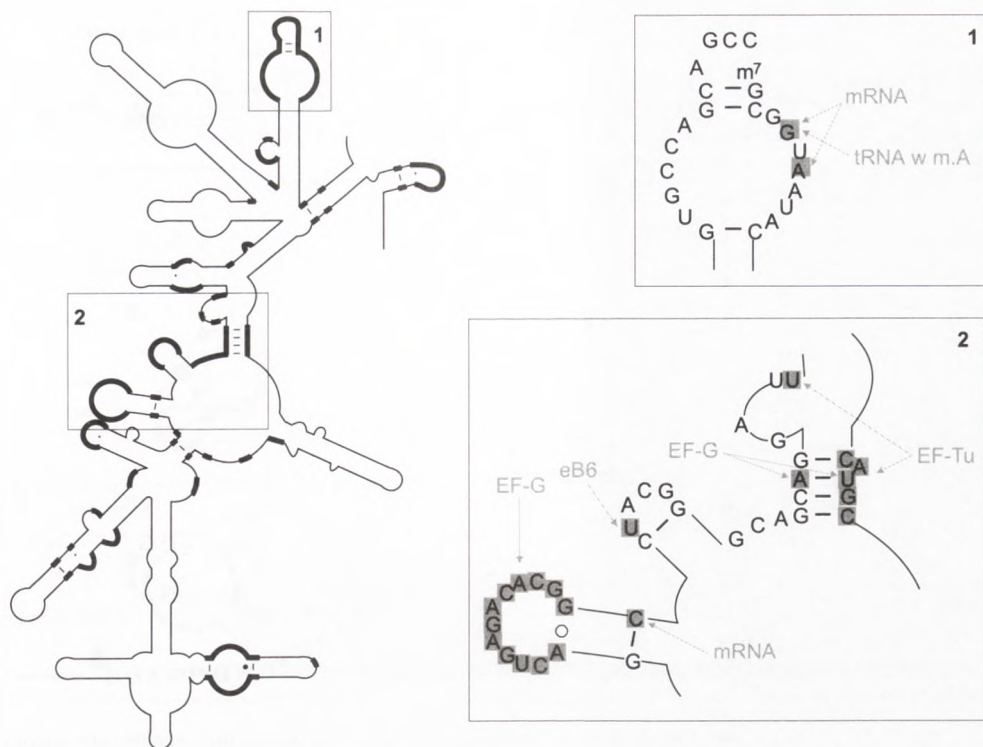
Uniwersalny we wszystkich królestwach organizmów żywych mechanizm procesu biosyntezy białka jest prawdopodobnie konsekwencją zachowawczego charakteru niektórych fragmentów 16S rRNA. Każda z czterech domen 16S rRNA zawiera konserwatywne nukleotydy, które odgrywają istotną rolę w procesie translacji.

3.1. Domena 5' 16S rRNA

Domena 5' (helisy h1 – h18) tworzy podstawę podjednostki 30S, silnie upakowaną na spodzie i zwężającą się do pojedynczych helis w górnej części [4]. Na rysunku 2 przedstawiono sekwencję drugorzędową tej domeny, z naniesionymi nukleotydami konserwatywnymi oraz funkcjonalnie ważnymi w procesie translacji, oddziałującymi z poszczególnymi elementami układu translacyjnego.

Domena 5' oddziałuje przede wszystkim z czynnikami elongacyjnymi. Helisa 5 oraz nukleotyd 368* helisy 15 oddziałują z czynnikiem EF-Tu [5]. Natomiast para zasad 57:356 oraz pętla należąca do helisy 13 wykazują oddziaływanie z czynnikiem elongacyjnym EF-G [6,7]. Wykazano również oddziaływanie z cząsteczką mRNA w obrębie helisy 18 w dwóch miejscach. Są to nukleotyd 532 [8] oraz nukleotyd 530 [9] oddziałujące z cząsteczką mRNA odpowiednio w pozycjach +11 i +12. Domena 5' (nukleotyd 530) oddziałuje również z cząsteczką tRNA (z nukleotydami 34-36) w rybosomalnym miejscu A [10]. Dwa spośród nukleotydów domeny 5' są zaangażowane w tworzenie mostków między podjednostkami. Nukleotyd 272 (h11) tworzy z parą zasad 1713:1747 23S rRNA (H63:H101) mostek typu RNA-RNA nazywany eB10. Natomiast nukleotyd 343 (h14) oddziałując białkiem dużej podjednostki L23 tworzy mostek RNA-białko, eB6 [10-12].

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

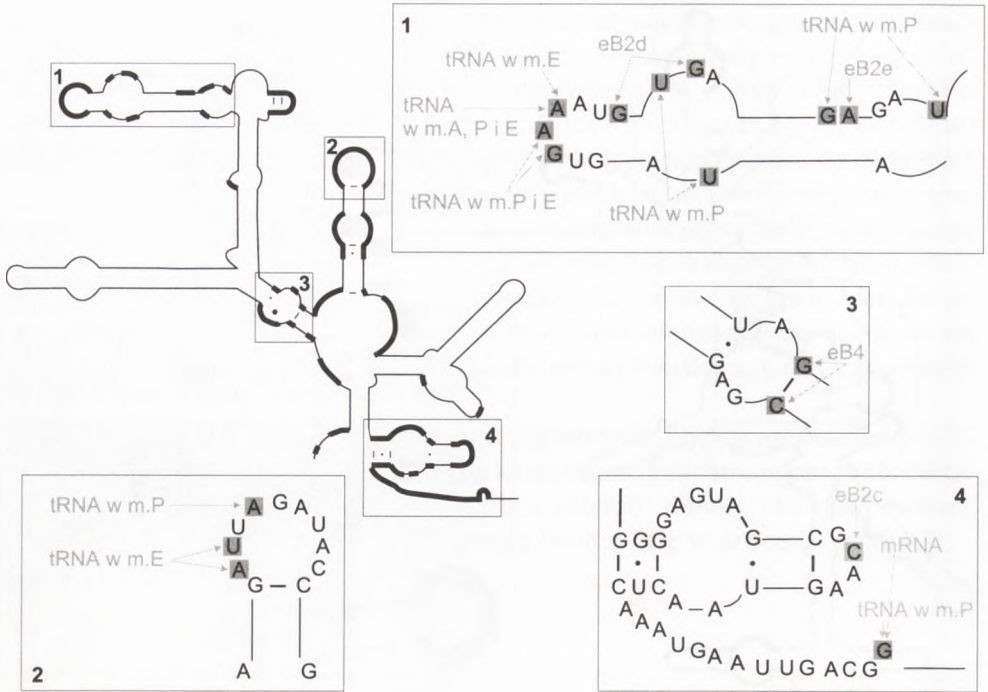


Rys. 2. Struktura drugorzędowa domeny 5' 16S rRNA. Pogrubioną linią zaznaczone zostały sekwencje konserwatywne. Na powiększonych fragmentach wyróżniono nukleotydy oddziałujące z mRNA, tRNA, czynnikami elongacyjnymi i nukleotydy tworzące mostki.

3.2. Domena centralna 16S rRNA

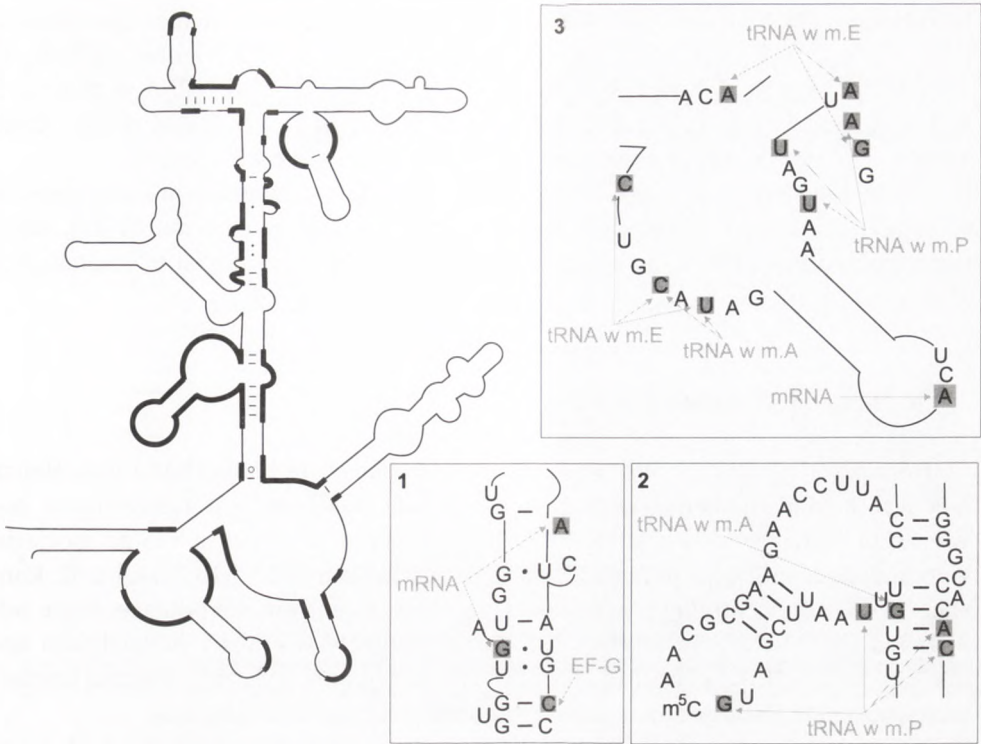
Centralna domena 16S rRNA zawiera helisy h19 – h27 (rys. 3). Ten fragment rRNA, wraz z asocjowanymi białkami, kształtuje platformę i część podstawy podjednostki 30S. Na podstawie badań stwierdzono, że wewnętrzna struktura trzeciorzędowa domeny centralnej to wiele krótkich helis wspólnie upakowanych ([3] i prace tam cytowane). Labilna struktura platformy zawiera elementy o decydującym znaczeniu dla wiązania tRNA w miejscu P oraz asocjacji podjednostek. Na końcu 3' domeny centralnej znajduje się helisa h27, która jest istotna dla przekształceń konformacyjnych rybosomu podczas procesu translacji. Z domeną centralną oddziałują białka: S2, S7, S12, S16 [4], S4, S5, S6, S8, S15, S17 [2,4,14] oraz S11 i S18 [2,15].

W obrębie domeny centralnej znaleziono aż 11 pozycji oddziałujących z cząsteczką tRNA. Najwięcej nukleotydów oddziałuje z cząsteczką tRNA w miejscu P. Większość z nich jest skupionych w obrębie helisy 23. Są to: nukleotydy 694 i 711 oddziałujące z parą zasad 20:1 cząsteczki tRNA [16]; nukleotydy 686, 701 i 717 od-



Rys. 3. Struktura drugorzędowa domeny centralnej 16S rRNA. Pogrubioną linią zaznaczone zostały sekwencje konserwatywne. Na powiększonych fragmentach wyróżniono nukleotydy oddziałujące z tRNA, mRNA i nukleotydy tworzące mostki.

działające z łodygą antykodonową tRNA w pozycji 47 [17] oraz nukleotyd 693, który oddziałuje z łodygą antykodonową tRNA w pozycji 32 [18]. Wykazano również interakcje między pętlą antykodonową tRNA w miejscu P (nukleotydy 34 i 39) a 16S rRNA w pozycji odpowiednio 926 i 790 [11]. Z cząsteczką tRNA w miejscu A (para zasad 20:1) oddziałują jedynie dwa nukleotydy: 694 i 711, uwidocznione metodą *cross-linking* [16]. Nukleotyd 693 oddziałuje z pętlą antykodonową tRNA w miejscu E (pozycje 32 i 37), natomiast nukleotydy 694 i 695 zaangażowane są w oddziaływanie z nukleotydami 38 i 39 tRNA [18]. W rejonie 3' domeny centralnej (h28, pozycja 926) znajduje się miejsce oddziaływania z mRNA w pozycji +2 [9]. Domena ta tworzy również cztery konserwatywne miejsca kontaktu z dużą podjednostką. Trzy z nich to mostki typu RNA-RNA. W ich tworzeniu biorą udział nukleotydy: 698 i 703 (mostek eB2d kontaktujący się z nukleotydami 1848 i 1895 helisy H68 23S rRNA), para zasad 580:761 (mostek eB4 tworzący kontakt z nukleotydem w pozycji 716 helisy H34) oraz nukleotyd 899 (mostek eB2c – kontakt z H62 w pozycji 1693). Istnieje również mostek eB2e, w powstaniu którego bierze udział nukleotyd 712 (h23) oraz białko L2.



Rys. 4. Struktura drugorzędowa domeny 3' major 16S rRNA. Pogrubioną linią zaznaczone zostały sekwencje konserwatywne. Na powiększonych fragmentach wyróżniono nukleotydy oddziałujące z tRNA, mRNA i nukleotydy tworzące mostki.

3.3. Domena 3' major 16S rRNA

Wierzchołek podjednostki 30S zbudowany jest z domeny 3' major (helisy h28 – h43 (rys. 4). Trzeciorzędową strukturę tej domeny o skomplikowanej architekturze, złożoną z krótkich helis i kilku wielohelisowych połączeń stabilizuje zgrupowanie białek w obrębie wierzchołka. Zwłaszcza białko S7, jak się wydaje, wpływa na stabilność struktury w obrębie całego centrum dekodującego, stanowiącego część wierzchołka [15]. Z domeną 3' major oddziałują również białka: S2, S3, S9, S10, S13, S14 i S19 [4,15].

W obrębie domeny 3' major można wyróżnić wiele funkcjonalnych fragmentów oddziałujących z cząsteczką tRNA we wszystkich trzech miejscach. Aż w sześciu spośród tych fragmentów ma miejsce oddziaływanie z łydą lub pętlą antykodową tRNA w miejscu A. Nukleotydy 1229 i 1230 helisy h30 wykazują oddziaływanie z nukleotydami 28 i 30 cząsteczki tRNA. Pozycja 966 16S rRNA (h31) oddziałuje z nukleotydem 34 i wraz z pozycją 957, również z nukleotydem 32 [18]. Natomiast dwa nukleotydy helisy h43 (1338, 1339) są zaangażowane w interakcje z łydą an-

tykodonową tRNA w pozycjach 40 i 41 [2,4,14,21]. Znalaziono również dwa miejsca oddziaływania z tRNA w miejscu A w pozycji 32 i 40. Są to odpowiednio nukleotydy 1378 i 955 [18]. Nukleotydy 30-36 łodygi i pętli antykodonowej tRNA w miejscu E wykazują oddziaływanie z nukleotydami: 1339, 1340 (30, 35, 36 w tRNA), 1376, 1378 (32 w tRNA), 937 (33 w tRNA), 1382 (34 w tRNA) [2,4,12,18,21].

Nukleotydy helis h33 i h44 (1044, 1208) oddziałują z czynnikiem elongacyjnym EF-G [6,7]. Dwa inne nukleotydy (1360, 1196) tworzą tunel wejścia mRNA [19]. Natomiast nukleotydy helis h28 (1052, 1196) i h34 (1395) biorą udział w interakcjach z cząsteczką mRNA w pozycjach: +6, +7 (8) oraz +8 i +9 (9).

3.4. Domena 3' *minor* 16S rRNA

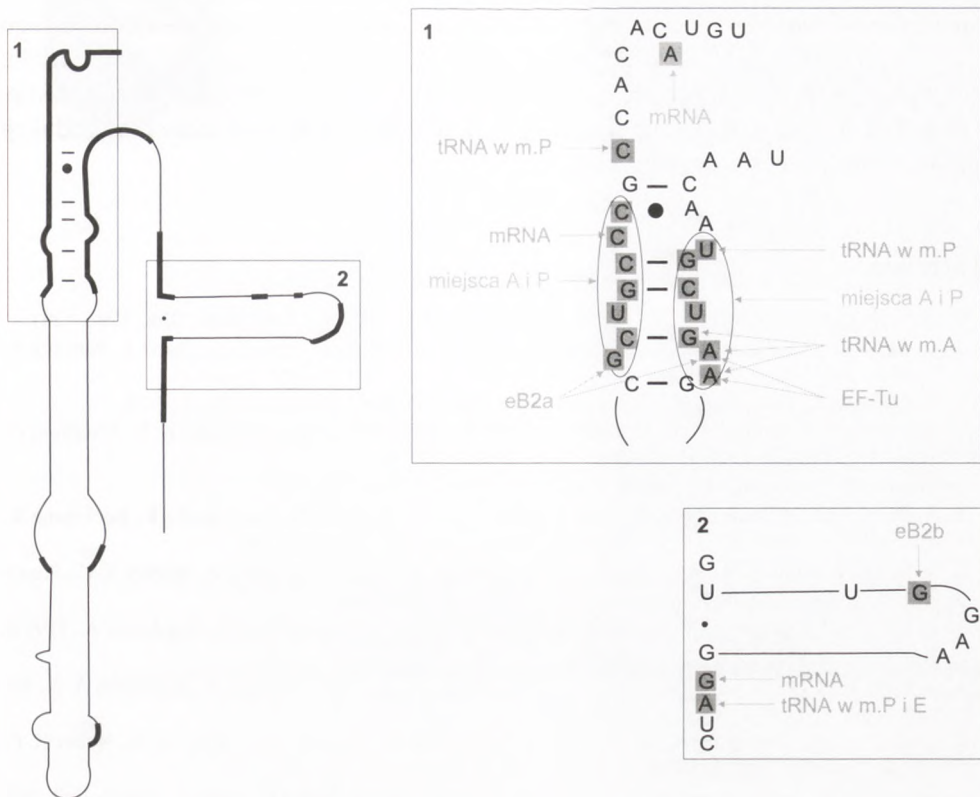
Domena 3' *minor* 16S rRNA (rys. 5) zawiera tylko dwie helisy: h44 i h45. Helisa h44 jest najdłuższą helisą w podjednostce 30S, położona jest na zewnątrz powierzchni oddziaływania podjednostek i odpowiada wraz z helisą h45 za asocjację z podjednostką 50S [4]. Domena 3' *minor*, wraz z helisami h27, h18, h34, h1/h2, końcami 3' i 5' oraz centralnym pseudowęzłem tworzą centrum dekodujące, które odpowiada za translokację mRNA i tRNA oraz kontrolę wierności oddziaływań kodon-antykonon [15]. Sekwencje 16S rRNA w tym regionie wykazują znaczną konserwatywność, co jest zgodne z uniwersalnością procesu dekodowania.

Najważniejszą częścią centrum dekodującego jest górna część helisy h44. Fragment helisy powyżej pętli zewnętrznej (nukleotydy: 1402 – 1408 i 1492 – 1498) tworzy miejsca A i P wiązania tRNA [10,15,20]. Pętle antykodonowe tRNA w miejscach A i P oraz sekwencje kodonowe mRNA nie oddziałują z żadnym białkiem małej podjednostki. Ponadto cząsteczki tRNA w miejscu A oddziałują z helisami: h29 (1345, 1348) z nukleotydem 47 łodygi antykodonowej [17], h44 (1400) z nukleotydem 34 pętli antykodonowej [21,22] oraz h45 (1531, 1542) z nukleotydem 8 ramienia akceptorowego (16) tRNA w miejscu P (nukleotydy 34 i 38) oddziałuje z nukleotydami 1492-1494 helisy h44. Natomiast tRNA w miejscu E (nukleotydy 37 i 38) wykazuje oddziaływanie z nukleotydami 1510 i 1542 [4].

Elastyczny koniec 3' zawiera sekwencję anty-Shine-Dalgarno, która odpowiada za prawidłowe wiązanie mRNA [19]. Elementy centrum dekodującego znajdujące się pomiędzy podstawą a wierzchołkiem podjednostki (nukleotydy 1196 i 1360) tworzą tunel wejścia mRNA [19]. Z cząsteczką mRNA oddziałują ponadto nukleotydy 1402 i 1530 w pozycjach odpowiednio -1/-8 oraz +4 [8].

W domenie 3' *minor*, w pobliżu regionu dekodującego w helisie h44 (1492-1493) znajdują się również miejsca interakcji z czynnikiem elongacyjnym EF-Tu [6,7]. W miejscu tym znajdują się też białka S4, S5 i S12.

Helisa H44 tworzy mostki z podjednostką 50S aż w pięciu regionach B2a, B3, B5a i b, B7 [10]. Para zasad 1408:1493 tworzy mostek eB2a z nukleotydami 1910-1920 helisy H69. Mostek eB3 tworzą pary zasad 1418:1482 oraz 1948:1960



Rys. 5. Struktura drugorzędowa domeny 3' *minor* 16S rRNA. Pogrubioną linią zaznaczone zostały sekwencje konserwatywne. Na powiększonych fragmentach wyróżniono nukleotydy oddziałujące z tRNA, mRNA, czynnikami elongacyjnymi, nukleotydy tworzące mostki oraz rybosomalne miejsca A i P.

helisy H71. Na mostek eB5b składają się oddziaływania między parą 1428:1472 a parą 1689:1704 helisy H62. Mostki eB5a i eB7 to oddziaływania typu RNA-białko. Oprócz nukleotydów 1422 i 1446 są w nie zaangażowane odpowiednio białko L23 i L24.

6. Podsumowanie

Jednym z najważniejszych procesów życiowych na poziomie komórkowym jest biosynteza białka. Właśnie białka odpowiedzialne są za prawidłowy przebieg większości reakcji w żywym organizmie. Proces ten jest bardzo skomplikowany i do dziś nie jest w pełni poznany. Aby biosynteza białka zachodziła we właściwy sposób niezbędne jest skoordynowane współdziałanie wielu makrocząsteczek. Biorą w niej udział cząsteczki tRNA, mRNA, wiele białek i rybosomy, które są molekularnymi

„maszynami” koordynującymi cały ten złożony proces. Poznanie elementów tego złożonego układu nukleoproteinowego umożliwi regulację biosyntezy polipeptydu. Natomiast znajomość mechanizmów regulujących proces biosyntezy białka, a w konsekwencji umiejętności manipulowania nimi, ma zasadnicze znaczenie dla produkcji opartych na procesie syntezy białka.

Literatura

1. Gabashvili I. S., Agrawal R. K., Grassucci R. A., Frank J., (1999), *J. Mol. Biol.*, 286, 1285-1291.
2. Gabashvili I. S., Agrawal R. K., Spahn C. M. T., Grassucci R. A., Svergun D. I., Frank J., Penczek P., (2000), *Cell*, 100, 537-549.
3. Piotrowska I., Dudzińska B., Twardowski T., (2002), *Postępy Biochemii*, 48, 1, 2-19.
4. Wimberly B. T., Brodersen D. E., Clemons Jr W. M., Morgan-Warren R. J., Carter A. P., Vonnrhein C., Hartsch T., Ramakrishnan V., (2000), *Nature*, 407, 327-339.
5. Wilson K. S., Nechifor R., (2004), *J. Mol. Biol.*, 337, 1, 15-30.
6. Spahn Ch. M. T., Gomez-Lorenzo M. G., Grassucci R. A., Jorgensen R., Andersen G. R., Beckmann R., Penczek P. A., Ballesta J. P. G., Frank J., (2004), *EMBO J.*, 23, 1008-1019.
7. Valle M., Zavialov A., Li W., Stagg S. M., Sengupta J., Nielsen R. C., Nissen P., Harvey S. C., Ehrenberg M., Frank J., (2003), *Nat. Struct. Biol.*, 10, 11, 899-906.
8. Rinke-Appel J., Junke N., Brimacombe R., Dukudovskaya S., Dontsonova O., Bogdanov A., (1993), *Nucleic Acids Res.*, 21, 12, 2853-2859.
9. Sergiev P. V., Lavrik I. N., Wlasoff V. A., Dokudovskaya S. S., Dontsonova O. A., Bogdanov A. A., Brimacombe R., (1997), *RNA*, 3, 5, 464-475.
10. Yusupov M. M., Yusupova G. Zh., Baucom A., Lieberman K., Earnest T. N., Cate J. H. D., Noller H. F., (2001), *Science*, 292, 883-896.
11. Spahn Ch. M. T., Beckmann R., Eswar N., Penczek P. A., Sali A., Blobel G., Frank J., (2001), *Cell*, 107, 373-386.
12. Carter A. P., Clemons W. M., Brodersen D. E., Morgan-Warren R. J., Wimberly B. T., Ramakrishnan V., (2000), *Nature*, 407, 340-348.
13. Gabashvili I. S., Agrawal R. K., Grassucci R., Squires C. L., Dahlberg A. E., Frank J., (1999), *EMBO J.*, 18, 6501-6507.
14. Clemons Jr W. M., May J. L. C., Wimberly B. T., McCutcheon J. P., Capel M. S., Ramakrishnan V., (1999), *Nature*, 400, 833-840.
15. Schluenzen F., Tocilj A., Zarivach R., Harms J., Gluehmann M., Janell D., Bashan A., Bartels H., Agmon I., Franceschi F., Yonath A., (2000), *Cell*, 102, 615-623.
16. Rinke-Appel J., Junke N., Brimacombe R., Lavrik I., Dukudovskaya S., Dontsonova O., Bogdanov A., (1994), *Nucleic Acids Res.*, 22, 15, 3018-3025.
17. Osswald M., Doring T., Brimacombe R., (1995), *Nucleic Acids Res.*, 23, 22, 4635-4641.
18. Doring T., Mitchell P., Osswald M., Bochkariov D., Brimacombe R., (1994), *EMBO J.*, 13, 11, 2677-2685.
19. Yusupova G. Z., Yusupov M. M., Cate J. H., Noller H. F., (2001), *Cell*, 106, 2, 233-241.
20. Ogle J. M., Brodersen D. E., Clemons Jr W. M., Tarry M. J., Carter A. P., Ramakrishnan V., (2001), *Science*, 292, 897-902.
21. Prince J. B., Taylor B. H., Thurlow D. L., Ofengand J., Zimmermann R. A., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 18, 5450-5454.
22. Cate J. H., Yusupov M. M., Yusupova G. Zh., Earnest T. N., Noller H. F., (1999), *Science*, 285, 2095-2104.