

Ribozom – továrna na proteiny

Komplex, v němž se setkávají dva světy

**MARIAN
NOVOTNÝ**

Jedním ze základních buněčných procesů je translace. Při translaci, jak název napovídá, je informace zapsaná v pořadí nukleotidů mRNA překládána do sekvence aminokyselin proteinů. Hlavní továrnou na výrobu proteinů jsou u prokaryot i eukaryot ribozomy. Proteiny v buňkách obstarávají většinu práce, a proto se jejich vzniku věnovala vždy velká pozornost. Stranou nezůstala ani komise pro udělování Nobelovy ceny, za translaci jich udělila hned několik. Jednu z nich obdrželi v roce 1968 Robert Holley, Gobind Khorna a Marshall Nirenberg za rozluštění genetického kódu. Další, spojenou s ribozomem, dostali v roce 1974 Albert Claude, Christian de Duve a George E. Palade za rozvoj elektronové mikroskopie a ultracentrifugačních technik.¹

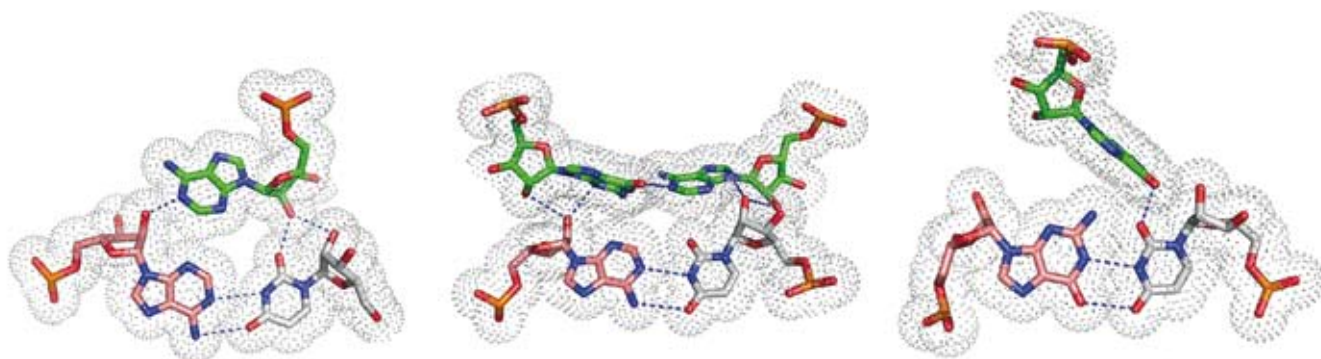
Roku 2009 obdrželi Nobelovu cenu za chemii Ada E. Yonathová, Venkatraman Ramakrishnan a Thomas A. Steitz za své „studie struktury a funkce ribozomu“ (viz životopisný rámeček). Odpověděli na otázky: Jak získat strukturu velkého nesymetrického makromolekulárního komplexu? Jak dosahuje ribozom své spolehlivosti při překládání mRNA do proteinu? Jak vzniká peptidická vazba (je její tvorba katalyzována proteinem, nebo RNA)?

1. Struktury ribozomu odhalují, proč můžou některé tRNA vázat více než jeden kodon. Správnost párování bází na pozici 1 (A) a pozici 2 (B) kodonu je kontrolována za pomoci efektivního párování nukleotidů kodonu a antikodonu, ale také za pomoci nukleotidů 16S RNA, které zajišťují správnou geometrii vazby vytvářením vodíkových můstků a kontaktem Van der Wallsových povrchů s kodonem a antikodonem. Párování na pozici 3 (C) kodonu je však z hlediska geometrie vazby kontrolováno méně přísně (chybějí nukleotidy, které by vázaly jak kodon, tak antikodon), a proto je na třetí pozici často tolerováno více nukleotidů. Většina organismů nemá 64 tRNA a bez tolerování více nukleotidů na 3. pozici by nebyly schopny zajistit translaci. Obrázek © Marian Novotný; vytvořeno programem Pymol na základě struktury 1IBM.

Cesta za strukturou

Skupiny Yonathové, Ramakrishnana i Steitze získaly nezávisle na sobě trojrozměrné struktury malé a velké podjednotky prokaryotického ribozomu s přesností, která umožňovala určit polohu valné většiny atomů celé podjednotky (s výjimkou vodíkových atomů).

Struktury malé i velké podjednotky byly určeny rentgenovou krystalografií. Nutnou a často obtížně splnitelnou podmínkou pro použití rentgenové krystalografie je získání krystalu sloučeniny, proteinu či komplexu proteinů, které chceme studovat. Krystal si lze představit jako naprosto pravidelné, často symetrické uspořádání až tisíců miliard molekul. Podmínky, za kterých látky krystalizují, nejsou dosud podrobně objasněny, ale obecně lze říci, že čím je látka menší a jednodušší, tím snáze krystalizuje (všichni známe z kuchyně krystaly jedlé soli). Naopak čím je větší (a v případě komplexů i nesymetrickější), tím obtížnější je připravit z ní krystaly. Strukturální biologové sice už od sedmdesátých let určují struktury virových kapsid, které jsou často mnohonásobně větší než ribozom, ale virové kapsidy se skládají obvykle jen z několika málo často se opakujících proteinů s velkou vnitřní symetrií. Ribozom je naproti tomu složen ze dvou podjednotek. Malá podjednotka ribozomu má molekulovou hmotnost okolo 800 000 daltonů (to se rovná hmotnosti 66 666 atomů uhlíku) a skládá se z 20 proteinů a z molekuly RNA dlouhé asi 1600 nukleotidů (16S RNA). Velká podjednotka ribozomu má velikost asi 1 500 000 daltonů a skládá se z 33 proteinů a dvou molekul RNA. Větší molekula RNA (23S RNA) je dlouhá okolo 2900 nukleotidů a ta menší (5S RNA) asi 120 nukleotidů. Jde o komplexy tak velké, že k jejich





ADA E. YONATHOV

(Weizmann Institute of Science, Izrael)

*22. 6. 1939 v Jeruzalémě. Její rodiče se tam prstehovali z Polska. V dětství neměla adne vlastn knížky. Jako stredoskolsk studentka (Tichon Chada v Tel Avivu) si privydelvala doučováním. Vzorem j byla Marie Curie-Sklodovská. Po maturitě studovala Hebrejskou univerzitu v Jeruzalémě, kde získala titul bakalre z chemie (1962) a titul magistra z biochemie (1964). V roce 1968 obdržela Ph.D. z rentgenov krystalografie ve Weizmannove ustavu v Rechovotu. Mj. spolupracovala s NASA při výzkumech ve vesmíru.

VENKATRAMAN RAMAKRISHNAN

(MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, Velk Británie)

*1952 v idambaramu v jihoindickém stt Tamilnadu. M americk občanství. Doktorandsk studium v oboru fyzika absolvoval na Ohijsk univerzitě v USA (1976). Je vedoucím vdeckm pracovníkem ve vzkumn laboratoři molekulrn biologie na Cambridgesk univerzitě ve Velké Británii.

THOMAS A. STEITZ

(Yaleova univerzita, New Haven, CT, USA)

*1940 v Milwaukee. V roce 1966 získal doktorsk titul v oboru molekulrn biologie a biochemie na Harvardově univerzitě. Působí na Yaleove univerzitě v New Havenu a v tamějším Lkarskm institutu Howarda Hughese.



popisu přestal stačit standardn formát pro popis a ukládání do databáze struktur makromolekul – proteinov databanky. Tento formát se s uspchem pouival 30 let, ale jeho tvůrci nepoitali s tím, že me být kdy určena struktura, která m více než 100 000 atomů. Proto musí být v databázi struktury ribozomů formln rozděleny do nkolyka substruktur, aby mohly být popsány standardním formátem. O symetrii nemůže být v prpad ribozomu ani rei.

Pokusy o krystalizaci ribozomu

Na zaatku osmdesátých let, kdy Ada Yonathov zainala s pokusy o krystalizaci ribozomu, byla jednou z mála lid, kteří vrili, že vůbec půjde krystaly ribozomu (difrakujc do vysokého rozlien) připravit. Jedním ze zásadních příspěvků Ady Yonathov bylo pouit ribozomů bakterií z extrémne teplých pramen (*Geobacillus stearothermophilus*) a Mrtvého moe (*Haloarcula marismortui*). Podobn bakterie sehrály pblinne v tze době zsadn roli při vynálezu polymerzove reetevov reakce (PCR). Jde při nejmenším o druh případ, kdy studium zdnlive obskurních organismů vedlo k objevu ocennmu Nobelovou cenou. Yonathove očekávala, že tyto bakterie budou mít stabilnější ribozomy než bakterie bnne studovne (jako *E. coli*) a že poskytnou vti ˇanci získat krystal. Její očekávání se potvrdila, už v polovině osmdesátých let získala krystaly s rozlišením okolo 6, ty vak nestačily k získání informace o poloze jednotlivých atomů. Ještě vti přísnosti dosáhla Yonathov

Mgr. Marian Novotn, PhD., (*1979) vystudoval biologii na Prirodovdeck fakultě UK, doktorát získal ve ˇvedsku na Uppsalsk univerzitě. Půl roku působil t v Evropskm bioinformatickm institutu. Nyní se na PrF UK v Praze zabývá strukturn bioinformatikou, zejména hodnocenm kvality proteinových struktur a jejich souvislostí s funkcí proteinu.

dalším vylepšováním purifikace a krystalizace a hlavně zmraenm vzniklých krystalů v tekutm dusíku. Zmražené krystaly mají totz vti trvanlivost v paprsku rentgenového zren, což usnadnuje sběr dat a snižuje požadavky na množství materiálu. Data z jednoho zmraženého krystalu mohla být sbírána i ˇest dn.

Dalším vznamnm příspěvkem k získání struktury ribozomu byl i vynález CCD² detektorů, urychlujících a zprsnujcch sběr dat.³

S pomocí těchto inovací se týmu Ady Yonathove povedlo v roce 1991 dospět až ke krystalům difrakujcm na hranici atomárního rozlien (3).

Trvalo vak dalších devět let, než byly dobře difrakujc krystaly proměněny ve skutene struktury ribozomu. Novou výzvou bylo najít způsob, jak se zorientovat v neprehlednm shluku skvrn, tedy v obrazu difrakujcho krystalu. K rešení tohoto fázového problému prspli dali dva nositel lonsk Nobelovy ceny. Prdevm využití dat z kryoelektro- nove mikroskopie vedlo v roce 2000 k uren atomrn struktury podjednotek ribozomu vemi třemi skupinami nezávisle na sobě.

Na tmr dvacetilet cestě za strukturou ribozomu zmnn laureáti objevili ˇi rozvinuli řadu metodik, které jsou dnes neodmyslitelnou součastí určování struktur i mnohem menších proteinů.

SLOVNÍČEK

kodon – trojice nukleotidů v mRNA určující zařazen jedné aminokyseliny v proteinu

antikodon – trojice nukleotidů v tRNA vzjc se na kodon, je specifick pro každý typ tRNA

mRNA – molekula představující přepis genu, podle něhož je syntetizování protein

tRNA – transferov RNA; molekula nesoucí vdy jednu aminokyselinu do msta syntzy proteinu; každá aminokyselina má svou vlastn tRNA

1) Palade byl první, kter na zaatku padesátých let pozoroval ribozomy.

2) CCD – charge-coupled devices (zařazen s vznmi náboji).

3) Shodou okolností byli i vynález těchto detektorů odmnn r. 2009 Nobelovou cenou (za fyziku).



2. Struktura 70S ribozomu z teplomilné bakterie *Thermus thermophilus*. Zeleně jsou zobrazeny proteiny z velké (50S) podjednotky, modře proteiny malé (30S) podjednotky a zlatě jsou molekuly RNA. Obrázek © Marian Novotný; vytvořeno programem Pymol na základě struktur proteinů 2WRN a 2WRO.

Molekulární pravítko

Jedním z dalších tajemství zůstával i po desetiletích studia způsob, jímž dosahuje ribozom přesnosti při čtení kodonů a jejich překladu. K čtení využívá molekuly tRNA, které na jedné straně nesou aminokyselinu, na druhé straně mají trojici nukleotidů (antikodon), která se může párovat s kodonem mRNA (viz slovníček na předchozí straně). S jedním kodonem se však může efektivně párovat více antikodonů (viz obr. 1), neboť na třetí pozici kodonu jsou párovací pravidla mnohem mírnější než klasická watson-crickovská, která se uplatňují na prvních dvou pozicích.

Struktury určené skupinou Venkiho Ramakrishnana vysvětlují tento jev velice elegantně. Specifické nukleotidy 16S RNA, konkrétně A1492, G530 a A1493, totiž vytvářejí vodíkové můstky s nukleotidy kodonu i antikodonu pouze tehdy, pokud dojde k jejich správnému párování a geometrické orientaci. Nukleotidy podjednotky 16S tvoří „molekulární pravítko“,

což, které „měří“ správnost párování, a zvyšují přesnost čtení, jež je určena komplementaritou nukleotidů kodonu a antikodonu. Na třetí pozici 16S RNA nic nekontroluje, a proto je na ní tolerováno více párů než na prvních dvou pozicích.

Vznik peptidické vazby

Peptidická kovalentní vazba, která spojuje dvě aminokyseliny, vzniká ve velké podjednotce ribozomu (viz obr. 2), v oblasti zvané peptidyl-transferázové centrum. Struktura podjednotky 50S ze Steitzovy laboratoře poněkud překvapivě ukázala, že se v peptidyl-transferázovém centru vyskytuje pouze 23S RNA. Zdálo se tedy, že jednu z nejvýznamějších reakcí v buňce nekatalyzuje žádný protein, ale molekula RNA. Tento nálezný dále podpořil představu, že na začátku historie života mohla hrát RNA zásadní roli. Mohla být nejen nositelem informace, ale i katalyzátorem reakcí. Až pozdější biochemické a simulační studie objasnily detailní reakční mechanismus vzniku peptidické vazby. Ribozom snižuje aktivační entalpii nutnou pro vznik peptidické vazby, jeho příspěvek je spíše entropický. Peptidyl-transferázové centrum je stabilizováno sítí vodíkových můstků, přes které je transportován proton vznikající po ataku aminoskupiny jedné aminokyseliny na esterovou vazbu tRNA, vázající druhou aminokyselinu. Právě tato síť vodíkových můstků je odpovědná za snížení aktivační energie reakce v ribozomu.

Teprve nové, přesnější struktury ze Steitzovy laboratoře ukázaly, že se na vzniku klíčové sítě vodíkových můstků podílí nejen 23S RNA, jak se původně předpokládalo, ale i molekula tRNA nesoucí aminokyselinu, molekuly vody a ribozomální proteiny. Ribozom je tedy unikátním komplexem, kde se setkává svět RNA se světem proteinů.

Až 50 % všech současných antibiotik ovlivňuje překlad nukleových kyselin do proteinu. Všichni tři letošní nositelé také určili několik struktur ribozomu v komplexu s různými antibiotiky. Tyto struktury nejen blíže vysvětlují mechanismus, který překladu brání, ale především poskytují nástroj pro vývoj nových antibiotik, jichž je nám s rostoucí rezistencí bakterií třeba. Tento přínos spolu s rozvojem krystalografických metod a objasněním mechanismu, jímž vzniká peptidická vazba či je rozpoznán kodon mRNA, dobře ilustrují, že je rozpoznávaná cena v dobrých rukou.⁴ V roce 2009 ji už po třinácté získali strukturní biologové.⁵

Abstract: Ribosome – protein factory by Marian Novotný. The Nobel price in Chemistry was in 2009 awarded to three structural biologists who significantly contributed to the understanding of translation of information carried by RNA to proteins. Their revolutionary insights came from 3D structures of ribosomes. Ada Yonath was the first person to acquire well-diffracting ribosome crystals, Thomas Steitz solved ribosome's phase problem and identified the region of the ribosome responsible for the formation of peptide bond. Venkatraman Ramakrishnan described how is codon correctly recognized by anticodon through a „molecular ruler“ in small ribosomal subunit. Their 3D structures were also used in designing new antibiotics.

Co vyprávějí šumavské smrčiny

Průvodce lesními ekosystémy Šumavy

Publikace širokého týmu odborníků se věnuje velmi aktuální problematice unikátních horských smrčkových lesů na Šumavě. Autoři populární formou vysvětlují moderní pohled na dynamiku horských smrččin, přibližují nejnovější poznatky vlastních dlouholetých výzkumů šumavských horských ekosystémů i výsledky studií bavorských kolegů. Populární text je doplněn ilustracemi, fotografiemi a odbornými rámečky, které jsou určeny pro ty, kteří se chtějí s problematikou seznámit do větší hloubky.

Kniha názorně představuje složitý ekosystém horských smrččin, vzájemné dynamické soužití smrku a kůrovce, význam mrtvého dřeva pro obnovu lesa, vývoj lesů na Šumavě od poslední doby ledové i historické využívání šumavských hvozdů člověkem. Desítky grafů, mapek a fotografií názorně dokumentují popisované souvislosti, dlouhodobé důsledky tzv. kyselých dešťů i klimatických změn, či účinky různého lesnického hospodaření na citlivé horské ekosystémy, a zároveň uvádějí na pravou míru některé mediální mýty.

Objednávky:
tel.: 388 450 260, zdenka.chvostova@npsumava.cz
nebo <http://www.kosmas.cz/knihy/153827>

Autoři:
Prof. Ing. Hana Šantrůčková, CSc.
Doc. RNDr. Jaroslav Vrba, CSc.
a kolektiv

4) V roce 2007 byla udělena Nobelova cena za struktury spojené s přepisem (transkripcí), loni za struktury spojené s překladem (translací), a tak by se dala očekávat Nobelova cena za struktury objasňující poslední část centrálního dogmatu molekulární biologie – replikaci. Thomas Steitz je opět horkým kandidátem, spolu s ním je v pořadí i John Kuriyan...

5) Každý příběh má své „vojevůdce“, kteří se těší uznání, ale taky pěšáky, kteří odvedli kus práce, bez níž by nebylo slávy. Pravidla pro udělování Nobelových cen (sdílet cenu můžou nanejvýš tři lidé), „upřela“ toto vyznamenání i několika „vojevůdčům“. Velkou zásluhu má například Harry Noller, jehož skupina jako první určila strukturu celého ribozomu, nebo Joachim Frank, jehož snímky ribozomu pořízené elektronovým mikroskopem umožnily vyřešit fázový problém při určování struktur ribozomu.