

JOANNA TRYLSKA

Interdyscyplinarne Centrum Modelowania Matematycznego i Komputerowego
Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa
E-mail: joanna@icm.edu.pl

BUDOWA PRZESTRZENNA I DZIAŁANIE RYBOSOMU BAKTERYJNEGO. NAGRODA NOBLA Z CHEMII 2009

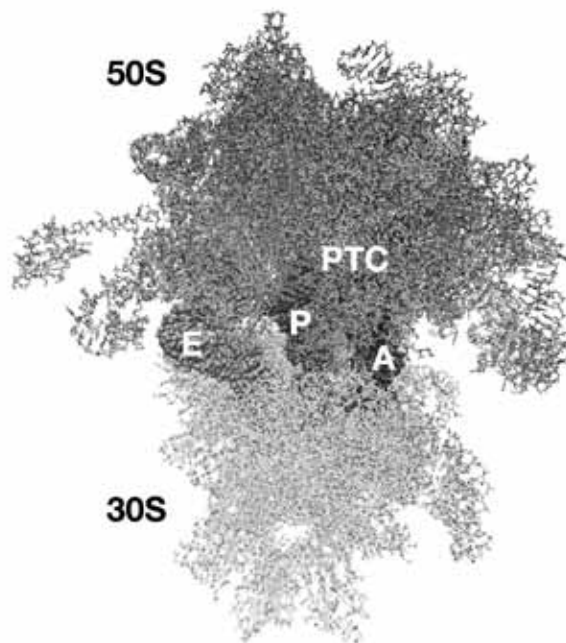
WSTĘP

Biosynteza białka (translacja) jest jednym z najważniejszych procesów zachodzących w komórkach. Białka są niezbędne do życia, gdyż pełnią wiele różnorodnych funkcji. Biorą między innymi udział w transporcie mniejszych cząsteczek, odgrywają rolę strukturalną, regulatorową, magazynują, tworzą przeciwciała, działają jako przełączniki molekularne, przekazują sygnały w komórkach nerwowych. Bardzo istotną rolą białek jest funkcja enzymatyczna – są odpowiedzialne za prawidłowy i szybki przebieg większości reakcji enzymatycznych.

Proces syntezy białek jest bardzo skomplikowany i nadal nie do końca poznany. Główną maszyną biomolekularną biorącą udział w tej syntezie jest rybosom. Rybosom sam składa się z białek i RNA i można go podzielić na dwie podjednostki, dużą i małą, które u bakterii oznaczane są odpowiednio 50S i 30S (S to jednostki Svedberga ich współczynników sedymentacji). Podjednostki te w czasie translacji asocjują do rybosomu 70S o całkowitej masie około 2,5 MDa (Ryc. 1). Bakteryjna podjednostka 30S składa się z 21 białek i jednego łańcucha RNA (16S RNA, około 1500 nukleotydów). Podjednostka 50S zawiera ponad 30 białek i dwa łańcuchy RNA (23S RNA – około 2900 nukleotydów i 5S RNA – około 120 nukleotydów). Dwie trzecie masy rybosomu stanowi więc RNA. Białko syntetyzowane jest zgodnie z informacją określającą kolejność przyłączania aminokwasów zawartą w mRNA.

Translacja jest procesem niesłychanie szybkim i dokładnym. U bakterii *Escherichia*

coli do łańcucha peptydowego dołączanych jest 10-20 aminokwasów w ciągu sekundy (RODNINA i WINTERMEYER 1998), a częstość wprowadzania błędów wynosi około jeden na 10000 aminokwasów. W syntezie białek oprócz rybosomu bierze udział też wiele innych cząsteczek: tRNA, mRNA oraz inne biał-



Ryc. 1. Struktura rybosomu 70S z bakterii *E. coli*.

Pokazano tylko położenia atomów ciężkich. (kod Protein Data Bank 3DF3 i 3DF4 (BOROVINSKAYA i współaut. 2008)). A-, P- oraz E-tRNA zaznaczono w postaci czasz van der Waalsa.

ka, które przyspieszają różne etapy tego procesu (tzw. czynniki translacyjne). Aby translacja przebiegała prawidłowo i szybko wszystkie te cząsteczki muszą ze sobą oddziaływać w sposób skoordynowany w odpowiednim czasie i przestrzeni.

Od ponad 50 lat naukowcy starali się odkryć dokładną budowę rybosomu i poznać w nim miejsca, z którymi oddziałują niezbędne do translacji substraty. Znaczący postęp w poznaniu jego budowy dokonał się dopiero w 2000 r., kiedy opublikowano struktury małej i dużej podjednostki rybosomu, tj. wyznaczono położenia ich jąder atomów ciężkich. Nagrodę Nobla z chemii w 2009 r. otrzymało trzech naukowców, których badania dopro-

wadziły właśnie do określenia trójwymiarowej struktury rybosomu na poziomie atomowym. Są to Venkatraman Ramakrishnan (Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology in Cambridge, Wielka Brytania), Thomas A. Steitz (Yale University, USA) oraz Ada E. Yonath (Weizmann Institute of Science, Rehovot, Izrael). Struktura rybosomu jest niezwykle skomplikowana i jeszcze kilkanaście lat temu uważano, że w ogóle nie uda się jej wyznaczyć. Ci naukowcy i ich współpracownicy ostatecznie pokazali jak wygląda rybosom na poziomie atomowym, co razem z doświadczeniami biochemicznymi było kamieniem milowym w określeniu mechanizmu jego działania.

SYLWETKI NOBLISTÓW

Venkatraman Ramakrishnan urodził się w 1952 r. w Indiach (Chidambaram, Tamil Nadu). Doktorat z fizyki uzyskał w 1976 r. na Uniwersytecie w Ohio w USA. Staż poddoktorski odbył na Uniwersytecie Yale w New Haven. Od 1999 r. prowadzi grupę badawczą w Laboratorium Biologii Molekularnej w Cambridge w Wielkiej Brytanii. Ma obywatelstwo amerykańskie. Więcej informacji o nim można znaleźć na stronie <http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/ribo/homepage/ramak/>.

Thomas Steitz jest obywatelem USA. Urodził się w 1940 r. w Milwaukee w USA. Doktorat z biologii molekularnej i biochemii obronił w 1966 r. na Uniwersytecie Harvar-

da w Cambridge. Obecnie jest profesorem na Uniwersytecie Yale oraz naukowcem Howard Hughes Medical Institute. Strona jego laboratorium to <http://www.yale.edu/steitz/>.

Ada Yonath jest obywatelką Izraela. Urodziła się w 1939 r. w Jerozolimie. Doktorat z krystalografii promieni X obroniła w 1968 r. w Instytucie Weizmanna w Rehovot, gdzie obecnie jest profesorem i dyrektorem Kimmelman Center for Biomolecular Structure and Assembly. Więcej informacji o jej badaniach można znaleźć na stronie http://www.weizmann.ac.il/sb/faculty_pages/Yonath/home.html.

KRYSZTAŁY RYBOSOMU

Jedną z technik badania struktury biomolekuł jest rentgenowska analiza strukturalna, nazywana krystalografią rentgenowską (promieni X). Do wyznaczenia pełnoatomowej struktury rybosomu zastosowano właśnie technikę krystalografii (RHODES 2006). Jest to technika, w której stwarza się odpowiednie warunki środowiska, do tego, aby biomolekuła zmieniła stan skupienia i utworzyła stabilny kryształ. Technika ta wymaga wyhodowania doskonale uporządkowanych kryształów zawierających szereg powtarzających się regularnie identycznych makrocząsteczek (w tym przypadku rybosomów). Aby ten cel zrealizować trzeba opracować specyficzny i optymalny dla danej molekuly skład roztworu do krystalizacji. Formowanie kryształów zależy od wielu czynników, m. in. pH, tem-

peratury, rodzaju i siły jonowej roztworu do krystalizacji, stężenia molekuly.

Po uzyskaniu regularnych i trwałych kryształów umieszcza się je w wiązce promieni X, przeważnie dodatkowo je schładzając w parach ciekłego azotu do temperatury około -170°C . Promienie X mają długość fali zbliżoną do odległości międzyatomowych w kryształach ($\sim 1,5\text{\AA}$, $1\text{\AA}=10^{-10}\text{m}$) i są zdolne do dyfrakcji (ugięcia) na elektronach cząsteczek tworzących kryształ. Kryształ w wiązce jest dodatkowo obracany i na detektorze (kliszy fotograficznej czy obecnie matrycy fotoczulłej) zapisywany jest tzw. obraz dyfrakcyjny promieniowania rentgenowskiego. Jest to dwuwymiarowy obraz szeregu regularnych plamek zwanych refleksami. Informację o strukturze molekuly wyznacza się z pomia-

rów położenia i natężenia tych refleksów. Określa się tzw. mapę gęstości elektronowej, czyli rozkład elektronów w kryształach. W następnym etapie tę mapę trzeba zinterpretować wpasowując w konkretne obszary gęstości elektronowej odpowiednie aminokwasy i nukleotydy. To pozwala wyznaczyć położenia (współrzędne) jąder atomów w kryształach. Od jakości tej mapy zależy dokładność z jaką te położenia otrzymujemy. Poziomą dokładność struktury definiuje parametr zwany rozdzielczością (podawany w Å), im mniejszy, tym mapa jest bardziej szczegółowa. Rozdzielczość około 3Å daje już możliwość, przy wsparciu modelowania i mikroskopii elektronowej, uzyskania położenia większości atomów ciężkich w makrocząsteczce.

Trudność w krystalizacji rybosomu wynikała przede wszystkim z jego ogromnego rozmiaru oraz skomplikowanej i niesymetrycznej budowy. Rybosomy bakteryjne, to kompleksy makromolekularne zawierające dużo ruchliwych fragmentów białek i RNA, które trudno było "upakować" do regularnego kryształu. Dodatkowo, w czasie doświadczeń dysocjacji ulegały podjednostki rybosomu. W latach 70. nie było oczywiste, że da się wyhodować kryształy rybosomu, które będą dawały obraz dyfrakcyjny na poziomie szczegółowości poniżej 3Å. Jeśli chodzi o interpretację obrazu dyfrakcyjnego (potocznie – rozwiązanie struktury) to istotnym problemem był brak symetrii rybosomu.

Ada Yonath jest pionierem jeśli chodzi o krystalografię rybosomów. W jej laboratorium otrzymano pierwsze kryształy dużej

podjednostki rybosomu bakteryjnego. Już w latach 70. zapoczątkowała krystalografię rybosomu używając rybosomów z termofilnych i halofilnych bakterii. W latach 80. uzyskała ona pierwsze kryształy podjednostki 50S, które były stabilne mechanicznie i dawały się schładzać do niskich temperatur (APPELT i współaut. 1981, SHEVACK i współaut. 1985). Dobrych jakości kryształy, które dawały obraz dyfrakcyjny na poziomie dokładności atomowej, uzyskała w 1991 r. z bakterii *Haloarcula marismortui* pochodzącej z zasolonego Morza Martwego (VONBOHLEN i współaut. 1991). To był istotny krok naprzód w kierunku rozwiązania struktury rybosomu. Opracowano warunki uzyskiwania dobrej jakości stabilnych kryształów jego podjednostek. Jednak naukowcy nie potrafili tego obrazu dyfrakcyjnego zinterpretować, czyli przełożyć na trójwymiarową strukturę rybosomu. To zajęło następnych 10 lat. Tutaj do akcji wkroczyła pozostała dwójka, T. Steitz i V. Ramakrishnan. Pomogła w tym zadaniu technika kriokrystalografii, która pozwoliła zmniejszyć uszkodzenia próbki podczas nasświetlania promieniami X, wprowadzenie fotoczujnych matryc zamiast standardowej kliszy fotograficznej oraz promieniowanie synchrotronowe, dające się dostrajać do pożądanej długości fali i generujące promieniowanie rentgenowskie o dużej intensywności (RHODES 2006). Wykorzystano także obrazy rybosomu otrzymane techniką mikroskopii elektronowej z kriotransferem (FRANK i współaut. 1995).

WYZNACZENIE STRUKTURY RYBOSOMU NA PODSTAWIE RENTGENOGRAMU

Laboratorium Ady Yonath miało znaczący udział w uzyskaniu dobrej jakości kryształów. Jednak Thomas Steitz i współpracownicy pierwsi rozwiązyli tzw. problem fazowy dla podjednostki 50S rybosomu. Promieniowanie X, rozproszone przez różne atomy w kryształach, wykazuje różnicę dróg i wynikającą stąd różnicę faz, która w pewnych kierunkach powoduje wzmocnienie lub osłabienie promieniowania rozproszonego. Do zastosowania wzoru wiążącego strukturę kryształu z obrazem dyfrakcyjnym potrzebna jest informacja o amplitudzie oraz fazie każdej fali elektromagnetycznej. Amplitudy wylicza się z intensywności refleksów, ale faz nie da się wyznaczyć doświadczalnie.

Do rozwiązania problemu fazowego dla dużej podjednostki rybosomu Steitz i współpracownicy używali między innymi obrazów rybosomu pochodzących z mikroskopii elektronowej, uzyskanych w laboratorium Joachima Franka (FRANK i współaut. 1995) oraz technik krystalograficznych izomorficznego podstawienia i dyfrakcji anomalnej (RHODES 2006). Stopniowo poprawiano poziom dokładności struktury dużej podjednostki rybosomu z *H. marismortui*. W 1998 r. uzyskano rozdzielczość 9Å, a w 1999 r. poprawiono ją do 5Å.

W laboratorium V. Ramakrishnana pracowano nad interpretacją obrazu dyfrakcyjnego dla struktury małej podjednostki rybosomu. W 1999 r. opublikowano strukturę

podjednostki 30S z bakterii *T. thermophilus* z rozdzielczością 5,5Å (CLEMONS i współaut. 1999). Ada Yonath również pracowała nad uzyskaniem z obrazów dyfrakcyjnych trójwymiarowej struktury małej i dużej podjednostki rybosomu. W 1999 r. uzyskała strukturę podjednostki 30S (*T. thermophilus*) z rozdzielczością 4,5Å (TOCILJ i współaut. 1999). W tym samym roku Harry Nöller i współpracownicy przedstawili strukturę całego rybosomu (70S, *T. thermophilus*) zawierającą tRNA w miejscach A, P i E, z rozdzielczością 7,8Å (CATE i współaut. 1999).

Wszystkie te struktury nie miały jednak jeszcze rozdzielczości atomowej. Przełomowym był rok 2000. Wtedy T. Steitz i współpracownicy opublikowali strukturę podjednostki 50S rybosomu z *H. marismortui* z rozdzielczością 2,4Å (BAN i współaut. 2000), V. Ramakrishnan i współpracownicy – strukturę podjednostki 30S rybosomu z *T. thermophilus* z rozdzielczością 3Å (CARTER i współ-

aut. 2000) oraz A. Yonath i współpracownicy – podjednostki 30S z rozdzielczością 3,3Å (SCHLUENZEN i współaut. 2000). Ale już rok później pojawiła się w laboratorium A. Yonath kolejna struktura, podjednostki 50S rybosomu bakterii *Deinococcus radiodurans* z rozdzielczością 3,1Å (HARMS i współaut. 2001). W 2001 r. uzyskano także w laboratorium H. Nöllera strukturę rybosomu 70S z poziomem szczegółowości około 5,5Å (YUSUPOV i współaut. 2001). Cały rybosom bakterii *E. coli* zobrazowano na poziomie atomowym (rozdzielczość 3,5Å) w laboratorium J. H. D. Cate (SCHUWIRTH i współaut. 2005). W ostatnich latach pojawiło się wiele struktur rybosomu prokariotycznego i jego podjednostek związanych z antybiotykami czy czynnikami translacyjnymi. Kolejnym przełomowym etapem badań będzie rozwiązanie atomowej struktury rybosomów z organizmów eukariotycznych.

MECHANIZM DZIAŁANIA RYBOSOMU BAKTERYJNEGO

Znajomość struktury małej i dużej podjednostki rybosomu okazała się niezwykle przydatna dla zrozumienia mechanizmu jego działania. Synteza białek przebiega z grubsza w kilku etapach, ważna jest jej inicjacja, wydłużanie łańcucha polipeptydowego, terminacja translacji po napotkaniu kodonu stop w mRNA oraz odnawianie (ang. recycling) rybosomu, aby był gotowy do rozpoczęcia syntezy kolejnego polipeptydu. Trójwymiarowe pełnoatomowe struktury podjednostek rybosomu pokazały, potwierdziły lub dały bardziej szczegółowe informacje na temat wszystkich etapów procesu translacji. Umożliwiły także badania modelowania komputerowego nad tym ogromnym kompleksem oraz zaproponowanie kolejnych doświadczeń biochemicznych.

Rybosom bakteryjny składa się w sumie z około 240 000 atomów (podjednostka 50S to około 145 000 i 30S to około 95 000 atomów). Rozmiary rybosomu bakterii to około 250Å w każdym kierunku. Podjednostka 30S wiąże mRNA i jest odpowiedzialna za prawidłowe dekodowanie kolejności kodonów tworzących łańcuch mRNA i tym samym, za dokładność translacji. Rybosom ma trzy miejsca wiążące tRNA (A – aminoacylowe, P – peptydylowe i E – wyjścia), które znajdują się na granicy podjednostek (Ryc. 1). Sposoby przyłączania tRNA do rybosomu na po-

ziomie atomowym zostały ujawnione dzięki strukturalnym krystalograficznym. Dla prawidłowej translacji kluczowym jest, aby do miejsca A przyłączyło się komplementarne tRNA, niosące na swoim drugim końcu CCA odpowiedni aminokwas. Musi zachodzić więc dyskriminacja oddziaływania kodon mRNA-antykodon tRNA na poziomie właściwego parowania zasad. Reakcja utworzenia wiązania peptydowego zachodzi pomiędzy aminokwasami, które znajdują się na końcach A- i P-tRNA. Aminoacylowane końce A- i P-tRNA są właściwie pozycjonowane przez rybosom do reakcji. Po utworzeniu wiązania peptydowego następuje przesunięcie (translokacja) tRNA z miejsc A i P do miejsc P i E. Następuje też w tym samym czasie przesunięcie łańcucha mRNA o odległość dokładnie jednego kodonu. Energia potrzebna do szybkiej i efektywnej translokacji pochodzi z GTP, które przynoszone jest do rybosomu przez jeden z czynników translacyjnych (białko EF-G). Translokacja tRNA obejmuje względny ruch podjednostek rybosomu, mała podjednostka obraca się względem dużej (Ryc. 1). tRNA muszą w tym czasie przebyć drogę około 50Å. Struktury rybosomu pokazały, że obszar styku podjednostek złożony jest głównie z rybosomowego RNA. Podjednostki oddziałują ze sobą za pomocą mostków, w skład których wchodzi głównie atomy RNA.

Część oddziaływań między podjednostkami realizowanych jest poprzez cząsteczki wody. Po translokacji do pustego miejsca A dołączane jest kolejne aminoacylowane tRNA, deacylowane tRNA opuszcza miejsce E i cykl wydłużania łańcucha polipeptydowego trwa aż do napotkania na mRNA kodonu stop i związania się kolejnego czynnika translacyjnego.

Centrum peptydylotransferazowe (ang. peptidyl transferase center, PTC), czyli miejsce reakcji katalizujące tworzenie wiązania peptydowego, znajduje się w dużej podjednostce i zbudowane jest z samego rybosomowego RNA (Ryc. 1). Stanowi je fragment domeny piątej 23S RNA, która odpowiednio pozycjonuje końce aminoacylowego i peptydylowego tRNA. Oddziaływanie odbywa się przez wiązania wodorowe z atomami 23S RNA. Najbliższy atom białka znajduje się około 18Å od miejsca tworzenia wiązania peptydowego. To potwierdziło wcześniejsze przypuszczenia, że rybosom może być rybozymem, tj. enzymem, który swoją katalityczną funkcję czerpie z RNA, a nie z białka. Rybosomowe RNA pełni więc nie tylko rolę strukturalną, ale jest też aktywne katalitycznie. Rybosom jako rybozym przyspiesza reakcję tworzenia wiązania peptydowego pomiędzy aminokwasami co najmniej 10^5 razy. Rybosom odpowiednio pozycjonuje substraty (poprzez sieć wiązań wodorowych) do reakcji utworzenia wiązania peptydowego. Badania strukturalne nad podjednostką 50S, które prowadzono w laboratorium T. Steitz (SCHMEING i współaut. 2005) oraz biochemiczne w laboratoriach M. Rodniny i W. Wintermeyera (RODNINA i współaut. 2007) przyczyniły się istotnie do zrozumienia mechanizmu tworzenia wiązania peptydowego w PTC.

Obecnie wiadomo więc, że wszystkie istotne dla translacji funkcje, tj. dekodowanie mRNA, tworzenie wiązania peptydowego i translokacja tRNA, zachodzą przy udziale rybosomowego RNA. Dodatkowo zaobserwowano, że mimo tego, że rybosom nie jest symetryczną makrocząsteczką, to obszar RNA wokół centrum katalitycznego PTC jest symetryczny i jego sekwencja jest zachowana wśród różnych organizmów (AGMON i współaut. 2005). Spowodowało to spekulacje na temat ewolucji samego rybosomu (BOKOV i STEINBERG 2009).

Zdefiniowano minimalny fragment RNA zbudowany z ponad 100 nukleotydów (tzw. proto-rybosom), który mógł w przeszłości pełnić funkcję miejsca katalitycznego dla łączenia aminokwasów.

Polipeptyd wydostaje się z rybosomu przez tunel, który ma około 100Å długości i jego brzeg zbudowany jest głównie z RNA. Struktury pokazały, że średnica tego tunelu waha się między 10Å a 20Å, w zależności od położenia (BAN i współaut. 2000, HARMS i współaut. 2001). W tunelu rybosomu polipeptyd jest chroniony, aby nie został zdegradowany. Uważa się także, że ograniczone środowisko tunelu stwarza dobre warunki do wstępnego fałdowania się polipeptydu np. w kierunku helisy α .

Aby synteza białka zachodziła sprawnie i szybko wiele komponentów musi ze sobą spójnie oddziaływać (rybosom, mRNA, tRNA, czynniki translacyjne). Różne czynniki translacyjne (białka) przyłączają się i odłączają od rybosomu w odpowiednich fazach translacji. W niektórych z nich zachodzi hydroliza GTP, która napędza zmiany konformacyjne rybosomu, czy wspomaga wiązanie do rybosomu cząsteczki tRNA. W inicjacji translacji u prokariotów biorą udział trzy czynniki inicjujące IF1, IF2 i IF3, które oddziałują z podjednostką 30S. W 2001 r. określono na poziomie atomowym jak łączy się czynnik IF1 z małą podjednostką rybosomu *T. thermophilus*, z rozdzielczością 3,2Å (CARTER i współaut. 2001). W październiku 2009 r. opublikowano pełnoatomowe struktury rybosomu z dwoma czynnikami elongacyjnymi (EF-Tu i EF-G), które są odpowiedzialne za prawidłowe wydłużanie łańcucha polipeptydowego (GAO i współaut. 2009, SCHMEING i współaut. 2009). EF-Tu wiąże się z aminoacylo-tRNA i dostarcza je do miejsca wiązania A-tRNA w rybosomie, a EF-G pomaga w procesie translokacji A i P-tRNA. Sygnały stop są rozpoznawane przez białkowe czynniki uwalniające; bakteryjny czynnik RF1 rozpoznaje kodony UAA i UAG, a białko RF2 kodony UAA i UGA. Struktura rybosomu z czynnikiem RF2 pozwoliła na lepsze zrozumienie, jak kończy się synteza danego polipeptydu i jakie mechanizmy prowadzą do jego uwolnienia z rybosomu (WEIXLBAUMER i współaut. 2008).

INHIBITORY RYBOSOMU BAKTERII

Zakażenia bakteryjne są niejednokrotnie przyczyną śmierci, dlatego że bakterie potrafią się skutecznie bronić i nabierają opor-

ności na dotychczas stosowane antybiotyki (MARKIEWICZ i KWIATKOWSKI 2006). Wiele antybiotyków blokuje działanie rybosomów

bakterii, co zaburza syntezę białek bakteryjnych, bez których bakterie nie mogą przeżyć. Dlatego też rybosomy bakteryjne są bardzo istotnym celem, w który możemy uderzać nowymi antybiotykami.

Wyznaczenie struktury przestrzennej podjednostek rybosomu miało istotne znaczenie dla poznania mechanizmów działania antybiotyków oraz dla wyjaśnienia, dlaczego zaburzają one translację u bakterii. Udało się bowiem uzyskać kryształy małej i dużej podjednostki rybosomu w kompleksach z niektórymi antybiotykami i pokazać jak antybiotyki oddziałują z rybosomem. Okazało się, że większość antybiotyków blokujących działanie rybosomu wiąże się do rybosomowego RNA, a nie do białek. Istnieją jednak różne mechanizmy blokowania prawidłowego działania podjednostek, gdyż antybiotyki przyłączają się do różnych miejsc rybosomu.

Pierwsze struktury pełnoatomowe wyznaczono dla kompleksu podjednostki 30S z antybiotykami aminoglikozydowymi (paromomycyną, streptomycyną i spektynomycyną) (CARTER i współaut. 2000). Przykładowa struktura podjednostki 30S z paromomycyną przedstawiona jest na Ryc. 2. Aminoglikozyd przyłącza się do miejsca A, co umożliwia wiązanie się do rybosomu takich tRNA, które nie są komplementarne do mRNA. Skutkuje to powstawaniem białka bakterii o niewłaściwej kolejności aminokwasów. Poznano także mechanizm przyłączania się do małej podjednostki rybosomu tetracykliny i edeiny (PIOLETTI i współaut. 2001). W kolejnym etapie określono strukturę podjednostki 50S w kompleksie z makrolidami, np. erytromycyną (SCHLUNZEN i współaut. 2001). Stwierdzono, że ta klasa antybiotyków łączy się w pobliżu centrum PTC rybosomu i blokuje tworzenie łańcucha peptydowego poprzez mechanicz-



Ryc 2. Struktura małej podjednostki rybosomu z bakterii *T. thermophilus* (kod Protein Data Bank 1IBK).

Rybosomowe RNA zaznaczono kolorem czarnym a białka szarym. Przedstawiono tylko atomy łańcucha głównego RNA (fosfory) oraz białek (węgle C) połączone wstęgą. Paromomycyna w miejscu wiązania zaznaczona jest na biało w postaci czasz van der Waalsa.

ne blokowanie samego początku tunelu. Obecnie znamy sposoby oddziaływania z rybosomem wielu antybiotyków na poziomie atomowym, co pozwala na proponowanie lepszych pochodnych, na które być może bakteriom będzie się trudniej uodpornić.

PODSUMOWANIE

Znajomość struktury rybosomu, czyli średnich położenia wszystkich jego jąder atomowych pozwoliła lepiej opisać i zrozumieć mechanizm syntezy białek, a także sposób działania antybiotyków, które blokują prawidłowe funkcjonowanie rybosomu. Umożliwia to lepsze projektowanie doświadczeń biochemicznych i genetycznych, wyjaśniających różne aspekty działania rybosomu. Należy jednak pamiętać, że krystalografia daje nam obraz statyczny danej cząsteczki, a atomy w molekułach ulegają ciągłym ruchom termicz-

nym. Mając jednak średnie położenia wszystkich jąder atomowych rybosomu możemy komputerowo symulować jego dynamikę, używając technik modelowania biomolekularnego. Przy pomocy technik komputerowych możemy także szukać potencjalnych nowych miejsc wiązania antybiotyków oraz poprawiać znane już antybiotyki tak, żeby bardziej specyficznie i selektywnie wiązały się z rybosomem.

Obecnie krystalografia rentgenowska dostarcza nam dokładnej informacji struktural-

nej o obiektach mających rozmiary setek Å, takich jak rybosom, nukleosom czy kapsydy wirusów. W połączeniu z technikami jądrowego rezonansu magnetycznego (dostarcza pełnoatomowych informacji o strukturze przestrzennej małych białek czy kwasów nukleinowych w roztworze) oraz mikroskopii elektronowej (informacje o strukturze są z dokładnością około 10Å) krystalografia rentgenowska jest bardzo skutecznym narzędziem

biologii strukturalnej. Istotne będzie teraz zdefiniowanie strukturalne za pomocą wszystkich technik różnych konformacyjnych stanów przejściowych rybosomu w czasie translacji. Kolejnym etapem będzie określenie pełnoatomowej struktury rybosomu eukariotycznego 80S, który jest większy i ma bardziej skomplikowaną budowę (BAKOWSKA-ŻYWICKA i TWARDOWSKI 2008).

THE STRUCTURE AND FUNCTION OF THE RIBOSOME. NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY 2009

Summary

The Nobel prize in chemistry was awarded to Venkatraman Ramakrishnan, Thomas A. Steitz and Ada E. Yonath for their studies on the structure and function of the ribosome. These scientists used X-ray crystallography to determine the three dimensional structure of the bacterial ribosome at atomic resolution. The knowledge of the positions of atoms in such a large macromolecular complex helped to

resolve its mechanism of action. Their studies confirmed that the ribosome is a ribozyme and exerts its catalytic power from the RNA and not proteins. This paves way to design novel antibiotics targeting the bacterial ribosome. Next step would be to determine a high resolution structure of the eukaryotic ribosome which is larger and more complicated than the prokaryotic one.

LITERATURA

- AGMON F., BASHAN A., ZARIVACH R., YONATH A., 2005. *Symmetry at the active site of the ribosome: Structural and functional implications*. Biol. Chem. 386, 833-844.
- APPELT K., DIJK J., REINHARDT R., SANHUESA S., WHITE S. W., WILSON K. S., YONATH A., 1981. *The crystallization of ribosomal-proteins from the 50S subunit of the escherichia-coli and bacillus-stearothermophilus ribosome*. J. Biol. Chem. 256, 1787-1790.
- BAKOWSKA-ŻYWICKA K., TWARDOWSKI T., 2008. *Struktura i funkcjonowanie rybosomu eukariotycznego*. Post. Biochem. 54, 251-263.
- BAN N., NISSEN P., HANSEN J., MOORE P. B., STEITZ T. A., 2000. *The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 angstrom resolution*. Science 289, 905-920.
- BOKOV K., STEINBERG S. V., 2009. *A hierarchical model for evolution of 23S ribosomal RNA*. Nature 457, 977-980.
- BOROVINSKAYA M. A., SHOJI S., FREDRICK K., CATE J. H. D., 2008. *Structural basis for hygromycin b inhibition of protein biosynthesis*. RNA-a Publication of the RNA Society 14, 1590-1599.
- CARTER A. P., CLEMONS W. M., BRODERSEN D. E., MORGAN-WARREN R. J., WIMBERLY B. T., RAMAKRISHNAN V., 2000. *Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics*. Nature 407, 340-348.
- CARTER A. P., CLEMONS W. M., BRODERSEN D. E., MORGAN-WARREN R. J., HARTSCH T., WIMBERLY B. T., RAMAKRISHNAN V., 2001. *Crystal structure of an initiation factor bound to the 30S ribosomal subunit*. Science 291, 498-501.
- CATE J. H., YUSUPOV M. M., YUSUPOVA G. Z., EARNEST T. N., NOLLER H. F., 1999. *X-ray crystal structures of 70S ribosome functional complexes*. Science 285, 2095-2104.
- CLEMONS W. M., MAY J. L. C., WIMBERLY B. T., MCCUTCHEON J. P., CAPEL M. S., RAMAKRISHNAN V., 1999. *Structure of a bacterial 30S ribosomal subunit at 5.5 angstrom resolution*. Nature 400, 833-840.
- FRANK J., ZHU J., PENCZEK P., LI Y. H., SRIVASTAVA S., VERSCHOOR A., RADERMACHER M., GRASSUCCI R., LATA R. K., AGRAWAL R. K., 1995. *A model of protein-synthesis based on cryoelectron microscopy of the e-coli ribosome*. Nature 376, 441-444.
- GAO Y. G., SELMER M., DUNHAM C. M., WEIXLBAUMER A., KELLEY A. C., RAMAKRISHNAN V., 2009. *The structure of the ribosome with elongation factor G trapped in the posttranslocational state*. Science 326, 694-699.
- HARMS J., SCHLUENZEN F., ZARIVACH R., BASHAN A., GAT S., AGMON I., BARTELS H., FRANCESCHI F., YONATH A., 2001. *High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium*. Cell 107, 679-688.
- MARKIEWICZ Z., KWIATKOWSKI Z. A., 2006. *Bakterie, antybiotyki, lekooporność*. PWN, Warszawa.
- PIOLETTI M., SCHLUENZEN F., HARMS J., ZARIVACH R., GLUHMAN M., AVILA H., BASHAN A., BARTELS H., AUERBACH T., JACOBI C., HARTSCH T., YONATH A., FRANCESCHI F., 2001. *Crystal structures of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine and IF3*. EMBO J. 20, 1829-1839.
- RHODES, G., 2006. *Crystallography made crystal clear*. Elsevier Inc.
- RODNINA M. V., WINTERMEYER W., 1998. *Form follows function: Structure of an elongation factor G-ribosome complex*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 7237-7239.
- RODNINA M. V., BERINGER M., WINTERMEYER W., 2007. *How ribosomes make peptide bonds*. Trends Biochem. Sci. 32, 20-26.
- SCHLUENZEN F., TOCILJ A., ZARIVACH R., HARMS J., GLUHMAN M., JANELL D., BASHAN A., BARTELS H., AGMON I., FRANCESCHI F., YONATH A., 2000. *Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 angstrom resolution*. Cell 102, 615-623.

- SCHLUNZEN F., ZARIVACH R., HARMS J., BASHAN A., TOCILJ A., ALBRECHT R., YONATH A., FRANCESCHI F., 2001. *Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria*. *Nature* 413, 814–821.
- SCHMEING T. M., HUANG K. S., KITCHEN D. E., STROBEL S. A., STEITZ T. A., 2005. *Structural insights into the roles of water and the 2'-hydroxyl of the p site tRNA in the peptidyl transferase reaction*. *Mol. Cell* 20, 437–448.
- SCHMEING T. M., VOORHEES R. M., KELLEY A. C., GAO Y. G., MURPHY F. V., WEIR J. R., RAMAKRISHNAN V., 2009. *The crystal structure of the ribosome bound to EF-Tu and aminoacyl-trna*. *Science* 326, 688–694.
- SCHUWIRTH B. S., BOROVINSKAYA M. A., HAU C. W., ZHANG W., VILA-SANJURJO A., HOLTON J. M., CATE J. H. D., 2005. *Structures of the bacterial ribosome at 3.5 angstrom resolution*. *Science* 310, 827–834.
- SHEVACK A., GEWITZ H. S., HENNEMANN B., YONATH A., WITTMANN H. G., 1985. *Characterization and crystallization of ribosomal particles from halo-bacterium-marismortui*. *FEBS Lett.* 184, 68–71.
- TOCILJ A., SCHLUNZEN F., JANELL D., GLUHMAN M., HANSEN H. A. S., HARMS J., BASHAN A., BARTELS H., AGMON I., FRANCESCHI F., YONATH A., 1999. *The small ribosomal subunit from thermus thermophilus at 4.5 angstrom resolution: Pattern fittings and the identification of a functional site*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 14252–14257.
- VONBOHLEN K., MAKOWSKI I., HANSEN H. A. S., BARTELS H., BERKOVITCHYELLIN Z., ZAYTSEVBASHAN A., MEYER S., PAULKE C., FRANCESCHI F., YONATH A., 1991. *Characterization and preliminary attempts for derivatization of crystals of large ribosomal-subunits from haloarcula-marismortui diffracting to 3- \AA resolution*. *J. Mol. Biol.* 222, 11–15.
- WEIXLBAUMER A., JIN H., NEUBAUER C., VOORHEES R. M., PETRY S., KELLEY A. C., RAMAKRISHNAN V., 2008. *Insights into translational termination from the structure of RF2 bound to the ribosome*. *Science* 322, 953–956.
- YUSUPOV M. M., YUSUPOVA G. Z., BAUCOM A., LIEBERMAN K., EARNEST T. N., CATE J. H. D., NOLLER H. F., 2001. *Crystal structure of the ribosome at 5.5 angstrom resolution*. *Science* 292, 883–896.