

KOTRANSLAČNÍ DĚJE ANEB PRVNÍ OKAMŽIKY ŽIVOTA PROTEINU

Souhrn přednášky z Letní školy pro středoškolské učitele a studenty středních škol

MICHAL H. KOLÁŘ

Ústav fyzikální chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha
michal@mhko.science

Klíčová slova: ribozom, ribozomální tunel, sbalování proteinů, antibiotika, translační uvěznění, zastavení ribozomu, kotranslační děje

Obsah

1. Úvod do biochemie proteinů
2. Ribozom a peptidový tunel
3. Tři etapy zrození proteinu
4. Sbalování proteinů
5. Proměnlivá rychlost translace a translační uvěznění
6. Závěr

1. Úvod do biochemie proteinů

Text vznikl na základě přednášky autora na 35. letní škole středoškolských učitelů a studentů středních škol. Shrňme pro začátek základní poznatky o proteinech a jejich stavebních jednotkách, abychom je mohli později využít v dalším textu.

Proteiny jsou nevětvené biopolymery, které vznikají z aminokyselin (obr. 1, nahoře). V proteinech se uplatňují α -aminokyseliny, ve kterých jsou aminoskupina $-\text{NH}_2$ a karboxylová skupina $-\text{COOH}$ vázány na společný uhlík, tzv. C_α uhlík. Ten dále váže atom vodíku a nějakou čtvrtou chemickou skupinu, kterou může být další vodík (u aminokyseliny glycinu) nebo jiná chemická skupina. V takovém

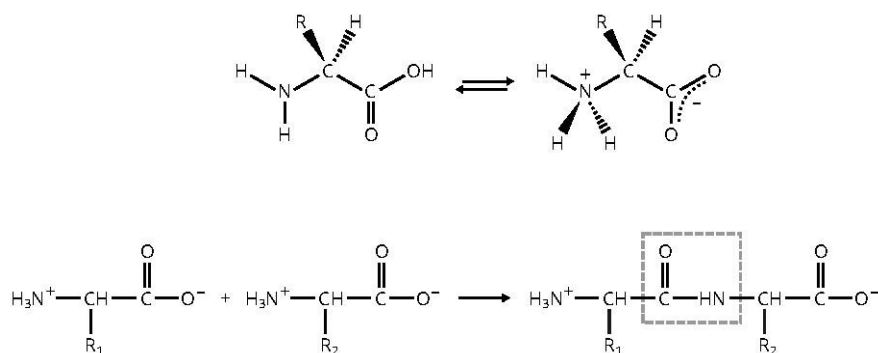
případě je C_α chirální a aminokyselina existuje ve dvou zrcadlově obrácených formách D a L, z nichž v proteinech se vyskytuje pouze L-forma. Polymery složené jen z několika málo aminokyselin (< 50) označujeme jako peptidy. Počet aminokyselinových částí, který musí polymer obsahovat, abychom ho nazývali proteinem a nikoli peptidem, je spíše otázkou vkusu než pevně smluvených pravidel. Např. v klasické práci Lindorff-Larsen a spol. nazývají proteinem i polymer složený z 10 aminokyselin¹.

Rozlišujeme 22 proteintvorných aminokyselin. Jedna z nich, prolin, je ve skutečnosti iminokyselina (*N*-alkylaminokyselina). Další dvě, selenocystein a pyrolysin, mají složitější mechanismus zabudování do proteinu a vyskytují se vzácněji. Jelikož jsou proteiny nevětvené, je jejich chemické složení dáno sekvencí pospojovaných aminokyselinových jednotek. Sekvence se obvykle uvádí pomocí jednopísmenných značek. Prvním proteinem s kompletně určeným chemickým složením byl inzulin^{2,3}. Aminokyselinovou sekvenci inzulinu stanovil v 50. letech 20. století Frederick Sanger a jeho spolupracovníci. Sanger následně za práci na struktuře proteinů získal svou první Nobelovu cenu za chemii (1958).

Proteinový řetězec je sekvencně nesymetrický, protože na tzv. N-konci se vyskytuje samostatná $-\text{NH}_2$ skupina (může být protonovaná) a na tzv. C-konci skupina $-\text{COOH}$ (může být deprotonovaná). Jednotlivé aminokyselinové zbytky jsou propojené amidovou vazbou, která se v případě proteinů označuje jako peptidová (obr. 1, dole).

2. Ribozom a peptidový tunel

Peptidovými vazbami lze aminokyseliny propojit v laboratoři, avšak přináší to řadu úskalí. Při jednoduché kondenzaci glycinu G a fenylalaninu F bude vznikat nejen peptid GF, ale také FG, GG, které budou v závislosti na



Obr. 1. Nahoře: Strukturální vzorec L- α -aminokyseliny s postranním řetězcem R v nenabité a nabité formě. Dole: Vznik peptidové vazby kondenzační reakcí dvou aminokyselin s postranními řetězci R_1 a R_2

podmínkách reagovat dále na FFG, GFG atp. K získání požadovaného dipeptidu lze využít chránících skupin a technik pokročilé organické syntézy, ale připravit tak protein o 300 aminokyselinách by bylo nepraktické.

Za účelem tvorby peptidových vazeb vytvořila evoluce složitý katalyzátor, který se nazývá ribozom. Skládá se ze dvou podjednotek (obr. 2, vlevo): malá ribozomální podjednotka, u bakterií označovaná 30S, čte genetickou informaci a velká ribozomální podjednotka, u bakterií 50S, katalyzuje vznik peptidových vazeb. Každá podjednotka se skládá z ribozomální RNA (rRNA) a několika proteinů; bakteriální ribozom o molekulové hmotnosti 2,6 MDa obsahuje celkem 3 vlákna rRNA a asi 50 ribozomálních proteinů. Ribozom vyšších organismů je větší a obsahuje více ribozomálních proteinů.

Již rané experimenty s ribozomem ukázaly, že pokud je rodící se protein vystaven hydrolytickým enzymům, je určitá jeho část před hydrolyzou chráněna⁴. Toto zjištění vedlo k hypotéze, že ve velké ribozomální podjednotce je prostor (tunel), ve kterém je rodící se protein ukryt⁵. Tunel se podařilo identifikovat pomocí kryogenní elektronové mikroskopie⁶ a detailní informace o něm přineslo až rozřešení atomární struktury velké podjednotky⁷. Ukázalo se ostatně, že ribozom je protkaný i menšími tunely a že asi 40 % objemu ribozomu tvoří voda.

Ribozomální (nebo peptidový) tunel se rozprostírá na 10 nm mezi katalytickým centrem a povrchem ribozomu a většinu jeho stěn tvoří rRNA (obr. 2, uprostřed). Šířka tunelu se pohybuje mezi 1 a 2 nm. Nejužší místo se nachází v první třetině tunelu směrem od katalytického místa a je tvořeno smyčkami ribozomálních proteinů uL4 a uL22. V poslední třetině je část stěn tunelu tvořena smyčkou proteinu uL23 a ústí tunelu lemováno proteinem uL24. Stěny peptidového tunelu a jeho obsah jsou tedy prvními objekty, se kterými se rodící se protein setkává.

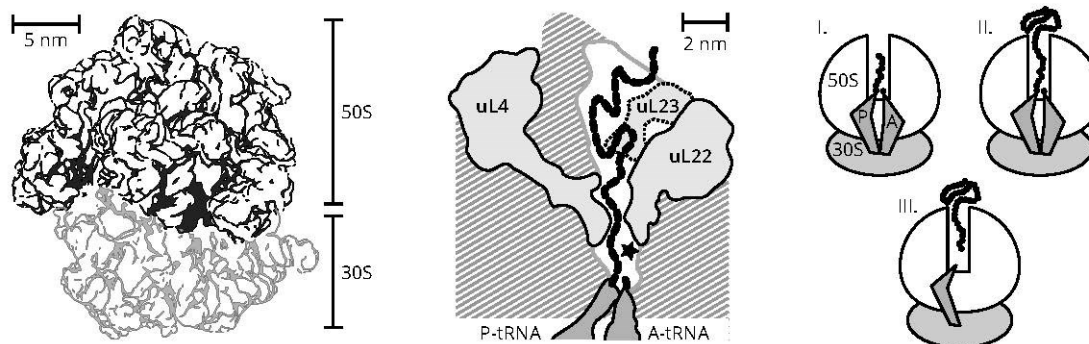
3. Tři etapy zrození proteinu

Ribozom katalyzuje syntézu proteinů tím, že řízeně, podle mRNA, umožňuje dvěma molekulám tRNA nesoucím aminokyseliny, tzv. aminoacylovaným tRNA (aa-tRNA), přiblížit se a zaujmout vzájemnou orientaci takovou, aby vznikla peptidová vazba. Molekuly aa-tRNA procházejí ribozomem a rodící se protein se prodlužuje aminokyselinou po aminokyselině. V průběhu translace postupuje peptidovým tunelem na povrch ribozomu a nakonec je uvolněn do cytosolu, případně do membrány nebo mimobuněčného prostoru.

Z hlediska translace můžeme rozlišit tři etapy zrození proteinu (obr. 2, vpravo). První etapa zahrnuje dobu, po kterou rodící se protein postupuje tunelem než dosáhne povrchu ribozomu. Tunel je schopný pojmout 40–60 aminokyselin⁴ a při průměrné rychlosti bakteriální translace přibližně 15 aminokyselin za sekundu⁸ trvá první etapa asi 4 sekundy.

Ve druhé etapě zůstává rodící se protein připoutaný k ribozomu, avšak část proteinu již ribozomální tunel opustila a nachází se v cytosolu nebo membráně. Aminokyseliny se připojují na C-konec rodícího se proteinu, proto ribozomální tunel jako první opouští N-konec. Trvání druhé etapy závisí na celkové délce syntetizovaného proteinu. Pro typický bakteriální protein o 300 aminokyselinách trvá druhá etapa asi 16 sekund, pro extrémně dlouhé proteiny⁹ může přesáhnout 100 sekund.

Třetí etapa začíná přerušením chemické vazby mezi rodícím se proteinem a tRNA. Uvolněný C-konec rodícího se proteinu uniká ribozomálním tunelem ven, čímž končí třetí etapa zrození. Zrání proteinu, které začalo kotranslačně, pokračuje tzv. posttranslačně mimo ribozom. Vznikají disulfidové vazby, vybrané postranní řetězce jsou glykosylovány nebo fosforylovány atp. Třetí etapa probíhá oproti



Obr. 2. Vlevo: Bakteriální ribozom s jeho velkou (50S) a malou (30S) podjednotkou. Uprostřed: Schéma ribozomálního tunelu se zvýrazněnou tRNA nesoucí rodící se protein (P-tRNA), tRNA nesoucí aminokyselinu (A-tRNA) a několika ribozomálními proteiny, které zasahují do stěn tunelu. Hvězdičkou je označeno vazebné místo pro makrolidová antibiotika. Vpravo: Schématické znázornění tří etap zrození proteinu. V I. etapě rodící se protein narůstá na C-konci a N-konec putuje k východu z ribozomálního tunelu. Ve II. etapě rodící se protein narůstá na C-konci a N-konec opustil ribozom a ve III. etapě je C-konec uvolněný z tRNA a putuje směrem k východu

prvním dvěma velmi rychle. C-konec rodícího se peptidu je z tunelu tažen silou vyvolanou sbalováním proteinu¹⁰ a únikový čas je řádově 0,1 ms (cit.¹¹).

4. Sbalování proteinů

Kotranslačně také začíná tzv. sbalování proteinů. Nevětvený řetězec aminokyselinových jednotek sbalováním získává funkční trojrozměrný (3D) tvar odpovídající minimu Gibbsovy energie. Ve vodném prostředí, mimo ribozom, se malé proteiny balí v řádu mikrosekund, typické proteiny v řádu milisekund a sbalování velkých proteinů může trvat i několik sekund.

Zpočátku strukturální studie ribozomů naznačovaly, že ribozomální tunel je dostatečně velký pouze pro malé 3D struktury, např. α -helix¹². Helikální konformace velmi blízko katalytického místa ribozomu byla později charakterizována na atomární úrovni pro rodící se proteiny MifM (cit.¹³) a VemP (cit.¹⁴). V těchto případech způsobuje α -helix blízko katalytického místa translační uvěznění (viz dále). U proteinu VemP je za vznik helikální struktury spoluodpovědný ribozomální tunel, neboť VemP je mimo ribozom nehelikální¹⁵.

V poslední době se objevily silné experimentální argumenty pro kotranslační sbalování větších struktur uvnitř tunelu¹⁶. Blízko ústí tunelu se např. sbaluje N-terminální doména proteinu HemK složená z pěti α -helixů. Fluorescenční experimenty ukázaly, že 3D tvar domény HemK uvnitř tunelu je odlišný od nativní struktury mimo ribozom¹⁷.

Kotranslačně se proteiny sbalují nejen uvnitř tunelu, ale také mimo ribozom během druhé etapy zrození. U bakterií se u ústí tunelu váže pomocný protein, trigger faktor, který zajišťuje, aby rodící se protein zaujal správný 3D tvar. Teoreticky možných tvarů totiž existuje astronomické množství¹⁸.

5. Proměnlivá rychlost translace a translační uvěznění

Translace neprobíhá konstantní rychlostí. Mezi nejdůležitější okolnosti ovlivňující rychlost translace patří 1) dostupnost aa-tRNA v blízkosti ribozomu, 2) využití tzv. synonymních kodonů, 3) 3D struktura mRNA a 4) primární struktura rodícího se proteinu a jeho interakce s ribozomálním tunelem¹⁹.

Extrémním případem zpomalení translace je tzv. translační uvěznění (angl. translational arrest nebo ribosomal stalling)²⁰. Ribozom se dostane do stavu, kdy k rodícímu se proteinu nelze připojit další aminokyselinu, ale zároveň nelze translaci přerušit a ribozom recyklovat.

Určité sekvence rodícího se proteinu způsobují konformační změny v katalytickém místě velké podjednotky ribozomu a inhibují tak vznik peptidové vazby. Příkladem jsou polyprolinové sekvence. U nich může být translační uvěznění uvolněno vazbou speciálního proteinu, u bakterií

elongačního faktoru P (cit.²¹), který katalytické místo stabilizuje a umožňuje vazbu další aminokyseliny do rodícího se proteinu.

Je známo několik specifických sekvencí, které inhibují vznik peptidové vazby uvnitř ribozomu a v buňce vedou k významným fyziologickým změnám. Např. translační uvěznění způsobené C-koncem peptidu SecM (cit.^{22,23}) zvyšuje produkci proteinu SecA důležitého pro export proteinů přes buněčnou membránu. U bakterií rodu *Vibrio* plní obdobnou funkci peptid VemP (cit.²⁴). Translační uvěznění způsobené peptidy SecM i VemP lze uvolnit působením mechanické síly na N-konec rodícího se proteinu^{10,14}.

S translačním uvězněním úzce souvisí téma antibiotik. Makrolidová antibiotika jako např. erythromycin se vážou do ribozomálního tunelu poblíž zúžení u ribozomálních proteinů uL4 a uL22 (obr. 2, uprostřed)²⁵. Původně panovalo přesvědčení, že tunel se vazbou makrolidu zneprůchodní buď přímo, nebo konformační změnou uL22 (cit.^{26,27}). Atomistické experimentální modely bakteriálních ribozomů a molekulární simulace však prokázaly, že tunel při vazbě makrolidů zůstává průchozí. Allostericky se ovšem mění konformace katalytického místa, a tedy jeho schopnost katalyzovat vznik peptidových vazeb^{28,29}.

6. Závěr

Proteiny vznikají na ribozomech během složité kaskády přísně regulovaných dějů. Než rodící se protein opustí ribozom, účastní se řady dějů, které definují jeho budoucí podstatu a zároveň regulují samotnou syntézu, přičemž některé z těchto dějů jsou popsány v tomto referátu. Klíčovou rolí při kotranslačních dějích hraje ribozomální tunel. Ten vystupuje nejen jako prostor, kterým rodící se protein opouští ribozom, ale také jako aktivní prostředí, v němž dochází ke specifickým interakcím s mnoha fyziologickými projevy.

Řadě detailů translace sice stále nerozumíme, ale rozvoj molekulárně biologických protokolů, metod strukturální biologie a výpočetní biofyziky posouvá porozumění rychle kupředu. Dokonalé pochopení kotranslačních dějů proto brzy povede k rozvoji medicíně významných směrů výzkumu a aplikací, ať už v boji proti antibiotické rezistenci, nebo při léčbě neurodegenerativních onemocnění způsobených chybným sbalováním proteinů.

Tento text částečně pokrývá přednášku přednesenou na 35. letní škole pro středoškolské učitele a studenty středních škol pořádanou VŠCHT Praha. Vznik textu byl podpořen projektem č. 19-06479Y Grantové agentury České republiky.

LITERATURA

1. Lindorff-Larsen K., Piana S., Dror R. O., Shaw D. E.: *Science* 334, 517 (2011).

2. Sanger F., Tuppy H.: *Biochem. J.* 49, 481 (1951).
3. Sanger F., Thompson E. O. P.: *Biochem. J.* 53, 353 (1953).
4. Malkin L. I., Rich A.: *J. Mol. Biol.* 26, 329 (1967).
5. Blobel G., Sabatini D. D.: *J. Cell Biol.* 45, 130 (1970).
6. Frank J., Zhu J., Penczek P., Li Y., Srivastava S., Verschoor A., Radermacher M., Grassucci R., Lata R. K., Agrawal R. K.: *Nature* 376, 441 (1995).
7. Ban N., Nissen P., Hansen J., Moore P. B., Steitz T. A.: *Science* 289, 905 (2000).
8. Young R., Bremer H.: *Biochem. J.* 160, 185 (1976).
9. Reuven N. B., Koonin E. V., Rudd K. E., Deutscher M. P.: *J. Bacteriol.* 177, 5393 (1995).
10. Goldman D. H., Kaiser C. M., Milin A., Righini M., Tinoco I., Bustamante C.: *Science* 348, 457 (2015).
11. Bui P. T., Hoang T. X.: *J. Chem. Phys.* 153, 045105 (2020).
12. Voss N. R., Gerstein M., Steitz T. A., Moore P. B.: *J. Mol. Biol.* 360, 893 (2006).
13. Sohmen D., Chiba S., Shimokawa-Chiba N., Innis C. A., Berninghausen O., Beckmann R., Ito K., Wilson D. N.: *Nat. Commun.* 6, 6941 (2015).
14. Su T., Cheng J., Sohmen D., Hedman R., Berninghausen O., von Heijne G., Wilson D. N., Beckmann R.: *eLife* 6, e25642 (2017).
15. Kolář M. H., Nagy G., Kunkel J., Vaiana S. M., Bock L. V., Grubmüller H.: *bioRxiv* 021.04.15.440051 (2021).
16. Nilsson O. B. a 11 spoluautorů: *Cell Rep.* 12, 1533 (2015).
17. Holtkamp W., Kokic G., Jäger M., Mittelstaet J., Komar A. A., Rodnina M. V.: *Science* 350, 1104 (2015).
18. Zwanzig R., Szabo A., Bagchi B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 20 (1992).
19. Samatova E., Daberger J., Liutkute M., Rodnina M. V.: *Front. Microbiol.* 11, (2021).
20. Wilson D. N., Beckmann R.: *Curr. Opin. Struc. Biol.* 21, 274 (2011).
21. Huter P. a 17 spoluautorů: *Mol. Cell* 68, 515 (2017).
22. Nakatogawa H., Ito K.: *Mol. Cell* 7, 185 (2001).
23. Zhang J., Pan X., Yan K., Sun S., Gao N., Sui S.-F.: *eLife* 4, e09684 (2015).
24. Ishii E., Chiba S., Hashimoto N., Kojima S., Homma M., Ito K., Akiyama Y., Mori H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, E5513 (2015).
25. Wilson D. N.: *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 35 (2014).
26. Gabashvili I. S., Gregory S. T., Valle M., Grassucci R., Worbs M., Wahl M. C., Dahlberg A. E., Frank J.: *Mol. Cell* 8, 181 (2001).
27. Berisio R., Schlutzenzen F., Harms J., Bashan A., Auerbach T., Baram D., Yonath A.: *Nat. Struct. Mol. Biol.* 10, 366 (2003).
28. Sothiselvam S. a 11 spoluautorů: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 9804 (2014).
29. Arenz S., Bock L. V., Graf M., Innis C. A., Beckmann R., Grubmüller H., Vaiana A. C., Wilson D. N.: *Nat. Commun.* 7, 12026 (2016).

M. H. Kolář (*Department of Physical Chemistry, University of Chemistry and Technology, Prague*): **Co-translational Events or the First Moments in the Life of Protein**

Proteins are biopolymers composed of amino acids. Proteins play a role almost in all processes in living organisms. In cells, proteins are synthesized on ribosomes in a process called translation, where amino acids are connected one at a time by a chemical bond according to a pre-defined scenario stored as the genetic information. Relative to their lifetime, proteins spend non-negligible time attached to the ribosome. This review focuses on phenomena that involve a nascent protein before it is released from the ribosome, i.e., in the first moments of their own synthesis, co-translationally. The text partly covers a lecture given by the author at the Summer School for High School Teachers and Students organized by UCT Prague in August 2021.

Keywords: ribosome, ribosome tunnel, protein folding, antibiotics, translational arrest, ribosome stalling, co-translational events