

Kotranslační děje aneb první okamžiky života proteinu

Michal H. Kolář

Ústav fyzikální chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 16628
Praha, Česká republika, michal@mhko.science

Toto je první verze rukopisu odeslaná 3. 9. 2021 do redakce Chemických listů. Nezahrnuje recenzní ani redakční úpravy.

Abstrakt

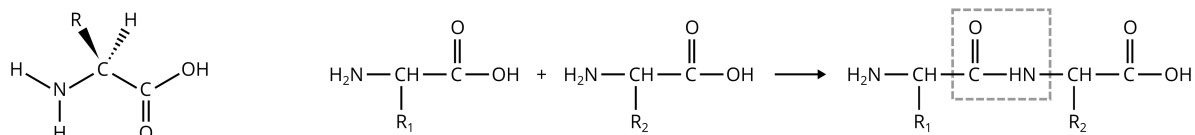
Proteiny jsou biopolymery složené z aminokyselin. V živých organizmech se účastní téměř všech procesů. Proteiny vznikají v buňkách výhradně v ribozomech, a to v procesu zvaném translace. Během ní jsou propojovány jednotlivé aminokyseliny chemickou vazbou podle předem daného scénáře uloženého ve formě genetické informace. Vzhledem k vlastní době života tráví proteiny na ribozomu nezanedbatelný čas. Tento referát stručně popisuje syntézu proteinů a shrnuje současný stav poznání o dějích, kterých se účastní protein před tím, než se uvolní z ribozomu. Tyto děje se označují jako kotranslační.

Klíčová slova

ribozom, ribozomální tunel, proteinové balení, antibiotika, translační uvěznění

1 Úvod do biochemie proteinů

Proteiny jsou nevětvené biopolymery, které vznikají z aminokyselin (Obr. 1, vlevo). 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 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.



Obrázek 1: Vlevo: Strukturální vzorec L- α -aminokyseliny s postranním řetězcem R. Vpravo: Vznik peptidové vazby kondenzační reakcí dvou aminokyselin s postranními řetězci R₁ a R₂.

Rozlišujeme 22 proteinotvorných aminokyselin. Jedna z nich, prolin, je ve skutečnosti iminokyselina (N-alkylaminokyselina). Další dvě, selenocystein a pyrrolysin, považujeme kvůli složitějšímu mechanismu zabudování do proteinu za neklasické. Jelikož jsou proteiny nevětvené, je jejich chemické složení dáno sekvencí pospojovaných aminokyselinových zbytků obvykle uvedené pomocí jednopísmenných značek. Prvním proteinem s kompletně určenou sekvencí byl inzulin.^{1,2} Podařilo se to v 50. letech 20. století Fredericku Sangerovi a jeho spolupracovníkům. Sanger následně za práci na struktuře proteinů získal svou první Nobelovu cenu za chemii (1958).

Proteinový řetězec je sekvenčně nesymetrický, protože na tzv. N-konci se vyskytuje samostatná -NH_2 skupina (může být protonovaná) a na tzv. C-konci skupina -COOH (může být deprotonovaná). Jednotlivé aminokyselinové zbytky jsou propojené amidovou vazbou, která se v případě proteinů označuje jako peptidová (Obr. 1, vpravo).

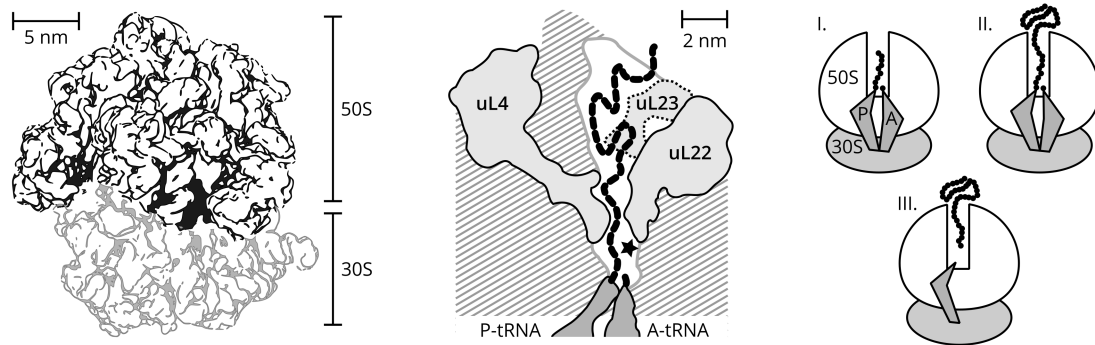
2 Ribozom a peptidový tunel

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 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, označovaná 30S, čte genetickou informaci, a velká ribozomální podjednotka 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.

Již rané experimenty s ribozomem ukázaly, že pokud je rodící se protein vystaven hydrolytickým enzymům, je určitá jeho část před hydrolýzou chráněna.³ Vedlo to k hypotéze, že ve velké ribozomální podjednotce je prostor (tunel), ve kterém je rodící se protein ukryt.⁴ Tunel se podařilo identifikovat pomocí kryogenní elektronové mikroskopie⁵ a detailní informace o něm přineslo až rozřešení atomární struktury velké podjednotky.⁶ 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



Obrázek 2: Vlevo: 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 opouští ribozom a ve III. etapě je C-konec uvolněný z tRNA a putuje směrem k východu.

tvořena smyčkou proteinu uL23 a ústí tunelu lemováno proteinem uL24. Stěny peptidového tunelu a jeho obsah jsou to první, s čím se rodící se protein setká.

3 Tři etapy zrození proteinu

Ribozom katalyzuje syntézu proteinů tak, že řízeně, podle mRNA, umožňuje dvěma molekulám tRNA nesoucích aminokyseliny, tzv. aminoacylovaným tRNA (aa-tRNA), přiblížit se k sobě natolik, 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 aminokyselin³ a při průměrné rychlosti bakteriální translace přibližně 15 aminokyselin za vteřinu⁷ trvá první fáze asi 4 vteřiny.

Ve druhé etapě zůstává rodící se protein připoutaný k ribozomu, avšak část proteinu již ribozomální tunel opouští 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 fáze závisí na celkové délce syntetizovaného proteinu. Pro typický bakteriální protein o 300 aminokyselinách trvá druhá fáze asi 16 vteřin, pro extrémně dlouhé proteiny⁸ může přesáhnout 100 vteřin.

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. post-translačně mimo ribozom. Vznikají disulfidové vazby, vybrané postranní řetězce jsou glykosylovány nebo fosforylovány, atp. Třetí etapa probíhá oproti prvním dvěma velmi rychle. C-konec rodícího se peptidu je z tunelu

tažen silou vyvolanou proteinovým balením⁹ a únikový čas je řádově 0,1 ms.¹⁰

4 Proteinové balení

Kotranslačně také začíná tzv. proteinové balení. Nevětvený řetízek aminokyselinových tak zbytků získává funkční trojrozměrný (3D) tvar odpovídající minimumu Gibbsovy energie. Ve vodném prostředí, mimo ribozom, se malé proteiny balí v řádu mikrosekund, typické proteiny v řádu milisekund a balení velkých proteinů může trvat i několik sekund.

Z počátku strukturní studie ribozomů naznačovaly, že ribozomální tunel je dostatečně velký pouze pro malé 3D struktury, např. α -helix.¹¹ Helikální konformace velmi blízko katalytického místa byla později charakterizována na atomární úrovni pro proteiny MifM¹² a VemP.¹³ V těchto případech způsobuje α -helix blízko katalytického místa translační uvěznění (viz dále). U proteinu VemP je za vznik helicální struktury spoluodpovědný ribozomální tunel, neboť VemP je mimo ribozom nehelicální.¹⁴

V poslední době se objevily silné experimentální argumenty pro kotranslační balení větších struktur uvnitř tunelu.¹⁵ Blízko ústí tunelu se např. balí N-terminální doména proteinu HemK složená z pěti α -helixů.¹⁶ Fluorescenční experimenty ukázaly, že 3D tvar domény HemK uvnitř tunelu je odlišný od nativní struktury mimo ribozom.

Kotranslačně se proteiny balí nejen uvnitř tunelu, ale také mimo ribozom během druhé etapy zrození. U ústí tunelu se váže pomocný protein, trigger faktor, který zajišťuje, aby rodící se protein zaujal ten správný 3D tvar. Teoretický možných tvarů totiž existuje astronomické množství.¹⁷

5 Proměnlivá rychlost translace a translační uvěznění

Translace neprobíhá konstantní rychlostí. Mezi nejdůležitější okolnosti ovlivňující rychlost translace patří i) dostupnost aa-tRNA v blízkosti ribozomu, ii) využití tzv. synonymních kodonů, iii) 3D struktura mRNA a iv) primární struktura rodícího se proteinu a jeho interakce s ribozomálním tunelem.¹⁸

Extrémním případem zpomalení translace je tzv. *translační uvěznění* (angl. translational arrest nebo ribosomal stalling).¹⁹ 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,²⁰ 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^{21,22} zvyšuje produkci proteinu SecA důležitého pro export proteinů přes buněčnou membránu. U bakterií rodu *Vibrio* plní obdobnou funkci peptid VemP.²³ Translační uvěznění způsobené peptidy SecM i VemP lze uvolnit působením mechanické síly na N-konec rodícího se proteinu.^{9,13}

S translačním uvězněním úzce souvisí téma antibiotik. Makrolidová antibiotika jako např. erythromycin, se váží do ribozomálního tunelu poblíž zúžení u ribozomálních proteinů uL4 a uL22 (Obr. 2, uprostřed).²⁴ Původně panovalo přesvědčení, že tunel se vazbou makrolidu zneprůchodní buď přímo, nebo konformační změnou uL22.^{25,26} 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.^{27,28}

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 roli kotranslačních dějích hraje ribozomální tunel. Ten vystupuje nejen jako prostor, kterým rodící se protein opouští ribozom, ale také jako aktivní prostředí, ve kterém dochází ke specifickým interakcím s mnoha fyziologickými projevy.

Řadě detailů translace sice stále nerozumíme, ale rozvoj molekulárně biologických protokolů, metod strukturní 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 proteinovým balením.

Poděkování

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.

English title

Co-translational events or the first moments in the life of protein

Abstract

Proteins are biopolymers composed of amino acids. Proteins play a role in almost 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 talk given by the author at the Summer school for high-school teachers and students organized by UCT Prague in August 2021.

Keywords

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

Reference

- [1] F. Sanger, H. Tuppy, *Biochem. J.* **49**, 481 (1951).
- [2] F. Sanger, E. O. P. Thompson, *Biochem. J.* **53**, 353 (1953).
- [3] L. I. Malkin, A. Rich, *J. Mol. Biol.* **26**, 329 (1967).
- [4] G. Blobel, D. D. Sabatini, *J. Cell Biol.* **45**, 130 (1970).
- [5] J. Frank, *et al.*, *Nature* **376**, 441 (1995).
- [6] N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Science* **289**, 905 (2000).
- [7] R. Young, H. Bremer, *Biochem. J.* **160**, 185 (1976).
- [8] N. B. Reuven, E. V. Koonin, K. E. Rudd, M. P. Deutscher, *J. Bacteriol.* **177**, 5393 (1995).
- [9] D. H. Goldman, *et al.*, *Science* **348**, 457 (2015).
- [10] P. T. Bui, T. X. Hoang, *J. Chem. Phys.* **153**, 045105 (2020).
- [11] N. R. Voss, M. Gerstein, T. A. Steitz, P. B. Moore, *J. Mol. Biol.* **360**, 893 (2006).
- [12] D. Sohmen, *et al.*, *Nat. Commun.* **6**, 6941 (2015).
- [13] T. Su, *et al.*, *eLife* **6**, e25642 (2017).
- [14] M. H. Kolář, *et al.*, *bioRxiv* p. 2021.04.15.440051 (2021).
- [15] O. B. Nilsson, *et al.*, *Cell Rep.* **12**, 1533 (2015).
- [16] W. Holtkamp, *et al.*, *Science* **350**, 1104 (2015).
- [17] R. Zwanzig, A. Szabo, B. Bagchi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 20 (1992).
- [18] E. Samatova, J. Daberger, M. Liutkute, M. V. Rodnina, *Front. Microbiol.* **11** (2021).
- [19] D. N. Wilson, R. Beckmann, *Curr. Opin. Struc. Biol.* **21**, 274 (2011).
- [20] P. Huter, *et al.*, *Mol. Cell* **68**, 515 (2017).
- [21] H. Nakatogawa, K. Ito, *Mol. Cell* **7**, 185 (2001).
- [22] J. Zhang, *et al.*, *eLife* **4**, e09684 (2015).
- [23] E. Ishii, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, E5513 (2015).

- [24] D. N. Wilson, *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 35 (2014).
- [25] I. S. Gabashvili, *et al.*, *Mol. Cell* **8**, 181 (2001).
- [26] R. Berisio, *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **10**, 366 (2003).
- [27] S. Sothiselvam, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 9804 (2014).
- [28] S. Arenz, *et al.*, *Nat. Commun.* **7**, ncomms12026 (2016).