



Wybrane konserwatywne sekwencje w dużym rybosomalnym RNA

Beata Dudzińska
Instytut Chemii Bioorganicznej
Polska Akademia Nauk, Poznań

W sierpniu 1999 r. rozwiązano rentgenograficznie strukturę rybosomu 70S przy rozdzielczości 7.5 Å (1). W przeprowadzonych badaniach wykazano z dużą dokładnością jak ułożone są rRNA i białka w podjednostkach oraz względem siebie, a także jakie oddziaływania zachodzą między podjednostkami po ich asocjacji. Od tej pory co roku ukazywały się kolejne artykuły opisujące struktury zarówno rybosomu (2,3) jak i poszczególnych podjednostek 50S (4-6) i 30S (7-11) z coraz większą dokładnością. W maju 2001 r. rozwiązano strukturę rybosomu 70S przy rozdzielczości 5.5 Å (12). Pokazano różnice konformacyjne między rybosomem 70S i pojedynczymi podjednostkami, co potwierdza wcześniejsze hipotezy dotyczące zmian konformacyjnych zachodzących w rybosomie po asocjacji podjednostek. Zaobserwowano np. różnice w położeniu przedostatniej helisy 16S rRNA w rybosomie 70S w porównaniu z jej położeniem w izolowanej podjednostce. Helisa ta jest jednym z najważniejszych miejsc podjednostki 30S, ponieważ tworzy mostki łączące podjednostki ze sobą i właśnie tym tłumaczy się zmianę jej konformacji. Również w podjednostce 50S znaleziono różnice świadczące o dynamice rybosomu podczas asocjacji podjednostek. Wcześniej słupki L7/L12 i L1 opisywano jako bardzo elastyczne, co utrudniało ich charakterystykę (4-6). Na podstawie różnic ich konformacji w strukturze rybosomu 70S wysnuto wniosek, że elementy te prawdopodobnie stabilizowane są przez interakcję z podjednostką 30S.

Adres do korespondencji

Beata Dudzińska,
Instytut Chemii
Bioorganicznej PAN,
ul. Noskowskiego 12/14,
61-704 Poznań;
e-mail:
madej@ibch.poznan.pl

biotechnologia

Niezbędna dla prawidłowego funkcjonowania rybosomu asocjacja powoduje utworzenie mostków łączących dwie podjednostki, a to powoduje również zmianę konformacji rRNA. Mostki utworzone między podjednostkami były już opisywane, nigdy jednak z taką dokładnością. Struktura rybosomu 70S rozwiązana przy rozdzielczości 5.5 Å pozwoliła wyodrębnić poszczególne nukleotydy i aminokwasy biorące udział w tworzeniu mostków. Z taką samą dokładnością opisano interakcje między tRNA, rRNA i białkami w rybosomie w miejscach A, P i E. Tak jednoznaczne scharakteryzowanie miejsc oddziaływania tRNA z rybosomem skłoniło mnie do badań nad konserwatywnymi sekwencjami L-rRNA.

Konserwatywne sekwencje w dużym rybosomalnym RNA próbowano opisać już wcześniej, np. w 1990 r. (13), jednak opracowano je na podstawie 42 sekwencji różnych organizmów. Ponad dziesięć lat później dysponujemy o wiele większą liczbą znanych sekwencji. Korzystając z bazy danych *The European Large Subunit Ribosomal RNA Database* (14), przedstawiam konserwatywne sekwencje w L-rRNA. Szczególnie zainteresowały mnie ze względu na swe zachowawcze sekwencje, położenie i funkcję w procesie elongacji łańcucha polipeptydowego cztery miejsca, scharakteryzowane w tabeli 1.

Tabela 1

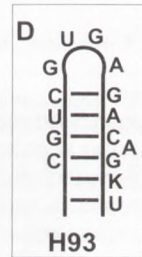
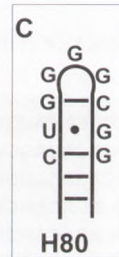
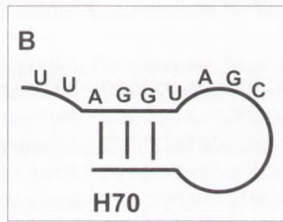
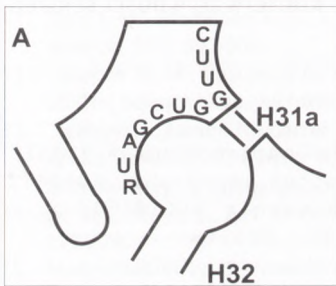
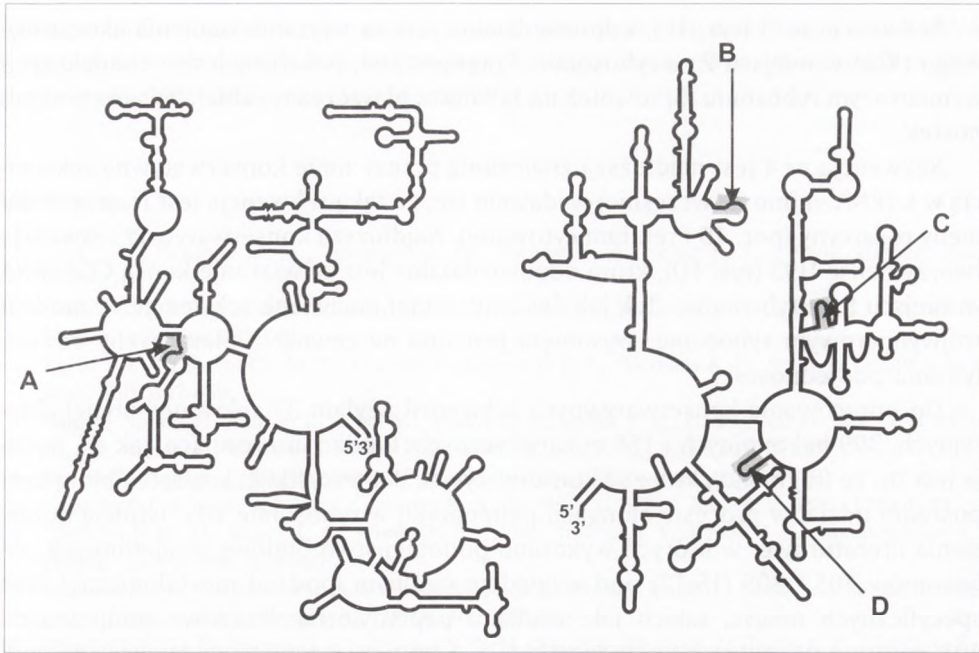
Wybrane konserwatywne sekwencje L-rRNA, oraz ich położenie.

| Nr | Seqwencja | Położenie w strukturze II rz. L-rRNA | Pozycja dla <i>E. coli</i> | Pozycja dla <i>O. sativa</i> |
|----|---------------------|--------------------------------------|----------------------------|------------------------------|
| 1 | RUA GCU GGU UC | H31a/H32 | 801-812 | 934-945 |
| 2 | UAA GGU AGC | H69 | 1926-1934 | 2255-2263 |
| 3 | CUG GGG CGG | H80 | 2248-2256 | 2606-2614 |
| 4 | CGU CGU GAG ACA GKU | H93 | 2590-2605 | 2932-2946 |

R = A lub G

K = U lub C

Seqwencja nr 1, położona w strukturze II-rzędowej L rRNA między helisami H31a i H32 (rys. 1A), w strukturze III-rzędowej rybosomu 70S znajduje się w głębszej części podjednostki 50S od strony połączenia podjednostek, w badaniach wykazano, że między innymi ten fragment dużego rRNA tworzy tunel wyjścia polipeptydu z rybosomu (6). Tunel wyjścia zbudowany jest z wielu fragmentów L-rRNA, zazwyczaj są to pętle w strukturze II-rzędowej zawierające się w domenach I-V, a także z nieglobularnych części białek rybosomalnych L4, L22 i L39.



Rys. 1. Schemat L-rRNA z wyszczególnionymi konserwatywnymi sekwencjami: A – sekwencja nr 1; B – sekwencja nr 2; C – sekwencja nr 3; D – sekwencja nr 4.

Sekwencja nr 2 jest częścią helisy H70 L rRNA (Rys. 1B). Helisa H69 odpowiedzialna jest za wiązanie ramienia pętli D tRNA do rybosomu w miejscu A i P, natomiast helisa H71 za wiązanie ramienia akceptorowego tRNA do rybosomu w miejscu A. Helisa H70, położona jest w strukturze III-rzędowej bardzo blisko tych dwóch helis i, mimo że nie wymienia się jej jako fragmentu odpowiedzialnego za wiązanie tRNA, to właśnie tutaj znajduje się 9-nukleotydomowa konserwatywna sekwencja, najdłuższa w tym obszarze. Bardzo ciekawe, jak się wydaje, jest również to, że H70, podobnie jak H69 i H71, wysunięte są na zewnątrz płaszczyzny oddziaływania podjednostek. Jest całkiem prawdopodobne, że i H70 odgrywa rolę w tworzeniu wiązania peptydowego na rybosomie.

Sekwencja nr 3 (rys. 1C), odpowiedzialna jest za wiązanie ramienia akceptorowego tRNA w miejscu P na rybosomie. Fragment ten, położony jest w modelu trójwymiarowym rybosomu (5) również na zewnątrz płaszczyzny oddziaływania podjednostek.

Sekwencja nr 4 jest najdłuższą znaną przeze mnie konserwatywną sekwencją w L-rRNA, mimo że wcześniej wydawało się, że taką sekwencją jest fragment domeny α -sarcyny (por. 15 i ref. tam cytowane). Najdłuższa konserwatywna sekwencja tworzy helisę H93 (rys. 1D), która odpowiedzialna jest za wiązanie końca CCA tRNA w miejscu P na rybosomie. Tak jak dwie wcześniej omawiane sekwencje, w modelu trójwymiarowym rybosomu, wysunięta jest ona na zewnątrz płaszczyzny oddziaływania podjednostek.

Do opracowania konserwatywnych sekwencji użyłam 37 sekwencji archebakteryjnych, 399 bakteryjnych i 156 eukariotycznych. Bardzo interesujące, jak się wydaje jest to, że fragmenty, które są konserwatywne dla wszystkich królestw, biorą bezpośredni udział w procesie elongacji polipeptydu w rybosomie 70S. Istnieją doniesienia literaturowe, w których wykazano podobieństwo budowy podjednostek, rybosomów 70S i 80S (16,17) pod względem ogólnym (podział morfologiczny) oraz specyficznych miejsc, takich jak: centrum peptydylotransferazowe podjednostki 60S, centrum dekodujące podjednostki 40S, a także płaszczyzny oddziaływania podjednostek ze sobą. Na tej podstawie oraz na podstawie konserwatywności sekwen-

| | |
|-------------------------|----------------------------------|
| UUUAGAACCGUCGUGAGACAGGU | Haloarcula marismortui AF034619 |
| UUUAAAACCGUCGUGAGACAGGU | Methanococcus jannaschii AU67472 |
| UUCAGAACCGUCGUGAGACAGGU | Aeropyrum pernix AB019554 |
| UUUAGAACCGUCGUGAGACAGUU | Frankia sp. M55343 |
| UUCAGAACCGUCGUGAGACAGUU | Synechocystis sp. D90916 |
| UUCAGAACCGUCGUGAGACAGUU | Bacillus sp. X60981 |
| UUUAGAACCGUCGUGAGACAGUU | Rickettsia rickettsii U11022 |
| UUUAGAACCGUCGUGAGACAGUU | Escherichia coli D12649 |
| UUUAGAACCGUCGUGAGACAGUU | Salmonella bongori U77927 |
| UUCAGAACCGUCGUGAGACAGUU | Borrelia burgdorferi AU03396 |
| UUCAGAACCGUCGUGAGACAGUU | Thermus thermophilus X12612 |
| UUUAGAACCGUCGUGAGACAGGU | Humulus lupulus AF223066 |
| UUUAGAACCGUCGUGAGACAGGU | Xenopus laevis X02995 |
| UUUAGAACCGUCGUGAGACAGGU | Oryza sativa M16845 |
| UUUAGAACCGUCGUGAGACAGGU | Funaria hygrometrica X74114 |
| UUUAGAACCGUCGUGAGACAGGU | Homo sapiens J01866 |
| UUUAGAACCGUCGUGAGACAGGU | Mus musculus J00623 |
| UUUAGAACCGUCGUGAGACAGGU | Saccharomyces cerevisiae U53879 |
| UUUAGAACCGUCGUGAGACAGGU | Arabidopsis thaliana AC006837 |
| UUUAGAACCGUCGUGAGACAGGU | Citrus limon X05910 |

Rys. 2. Porównanie sekwencji 20 organizmów. Ciemniejszym kolorem zaznaczono sekwencję konserwatywną nr 4.

cji ważnych funkcjonalnie, przypuszczam, że opisane przeze mnie fragmenty L-rRNA biorą udział w elongacji łańcucha polipeptydowego, zarówno w rybosomach prokariotycznych 70S jak i eukariotycznych 80S.

Literatura

1. Cate J. H., Yusupov M. M., Yusupova G. Zh., Earnest T. N., Noller H. F., (1999), *Science*, 285, 2095-2104.
2. Gabashvili I. S., Agrawal R. K., Spahn Ch. M. T., Grassucci R. A., Svergun D. I., Frank J., Penczek P., (2000), *Cell*, 100, 537-549.
3. Agrawal R. K., Spahn Ch. M. T., Penczek P., Grassucci R. A., Nierhaus K. H., Frank J., (2000), *J. Cell Biol.*, 150, 447-459.
4. Ban N., Nissen P., Hansen J., Capel M., Moore P. B., Steitz T. A., (1999), *Nature*, 400, 841-847.
5. Ban N., Nissen P., Hansen J., Moore P. B., Steitz T. A., (2000), *Science*, 905-920.
6. Nissen P., Hansen J., Ban N., Moore P. B., Steitz T. A., (2000), *Science*, 920-930.
7. Gabashvili I. S., Agrawal R. K., Grassucci R. A., Frank J., (1999), *J. Mol. Biol.*, 286, 1285-1291.
8. Clemons Jr W. M., May J. L. C., Wimberly B. T., McCutcheon J. P., Capel M. S., Ramakrishnan V., (1999), *Nature*, 400, 833-840.
9. Schluenzen F., Tocilj A., Zarivach R., Harms J., Gluehmann M., Janell D., Bashan A., Bartels H., Agmon I., Franceschi F., Yonath A., (2000), 102, 615-623.
10. 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.
11. Ogle J. M., Brodersen D. E., Clemons Jr W. M., Tarry M. J., Carter A. P., Ramakrishnan V., (2001), *Science*, 292, 897-902.
12. Yusupov M. M., Yusupova G. Zh., Baucom A., Lieberman K., Earnest T. N., Cate J. H., Noller H. F., (2001), *Science*, 292, 883-896.
13. Egebjerg J., Larsen N., Garret R. A., (1990), *The Ribosome. Structure, Function and Evolution.*, Eds. Hill W. E., Dahlberg A., Garrett R. A., Moor P. B., Schlessinger D., Warner J. R., American Society for Microbiology, Washington, D.C.
14. de Rijk, Wuyts J., van de Peer Y., Winkelmanns T., de Wachter R., (2000) *Nucleic Acids Res.*, 28, 177-178.
15. Madej-Dudzińska B., Nawrot M., Twardowski T., (2000), *J. Plant Physiol.*, 156, 567-569.
16. Dube P., Wieske M., Stark H., Schatz M., Stahl J., Zemlin F., Lutsch G., van Heel M., (1998), *Structure*, 6, 389-399.
17. Morgan D. G., Menetret J-F, Radermacher M., Neuhof A., Akey I. A., Rapoport T. A., Akey Ch. W., (2000), *J. Mol. Biol.*, 301, 301-321.