

# RNA v proteosyntéze

## Ústřední úloha ribozomální RNA

Jiří Jonák

V předchozím dílu (Živa 2007, 5: 195–198) jsme si vyložili pravidla genetického kódu a tvorby aminoacyl-tRNA (aa-tRNA). Nyní se budeme zabývat mechanismy té fáze proteosyntézy, která se nazývá ribozomální. Na ribozomech se scházejí molekuly aa-tRNA a mRNA spolu s dalšími aktéry, především translačními faktory, k cyklicky se opakující součinnosti, jejímž výsledkem je nová bílkovina.

Ribozomy jsou ribonukleoproteinové částice zhruba kulovitého tvaru. Skládají se vždy ze dvou nepodobných podjednotek (větší a menší) a toto uspořádání i jejich funkce jsou evolučně konzervovány. U prokaryot, mitochondrií a chloroplastů jsou menší a označují se jako 70S (podle rychlosti sedimentace, molekulová hmotnost cca 2 600 000). Cytoplazmatické ribozomy eukaryot, včetně rostlin, jsou větší a označují se jako 80S (molekulová hmotnost cca 4 200 000). V buňkách eukaryot tak vedle sebe nacházíme oba typy ribozomů. Ani celé ribozomální podjednotky, ani jejich jednotlivé součásti se však nedají mezi oběma typy ribozomů zaměňovat bez ztráty funkčnosti. Z lékařského hlediska je také důležité, že 70S a 80S ribozomy se navzájem liší v citlivosti k určitým antibiotikům.

Ribozomální částice jsou vystavěny z několika různých molekul ribozomální RNA

(rRNA) a mnoha desítek různých ribozomálních bílkovin (r-bílkovin, viz tab.). Přitom RNA tvoří 50–60 % hmoty každého ribozomu. Proč je jí tak mnoho? Ačkoli tomu bylo dříve naopak, od konce 80. let se postupně prokázalo, že ne r-bílkoviny, ale molekuly rRNA jsou základem i pro funkce ribozomu a nejen pro jeho strukturu a tvar. Hlavní roli zde hraje schopnost molekul RNA samovolně se sbalovat do kompaktních útvarů, které mohou měnit svou konformaci a tím i svůj interakční potenciál.

Jak jsem uvedl v předchozím příspěvku, ribozom se aktivně účastní dekodovacího procesu, tj. čtení kodonů v mRNA antikodony v aa-tRNA. Bylo totiž vypočteno a experimentálně ověřeno, že termodynamické rozdíly ve stabilitách dvojných komplexů mezi různými kodony v mRNA a antikodony tRNA nestačí samy o sobě zabezpečit takovou selektivitu dekodovacího procesu,

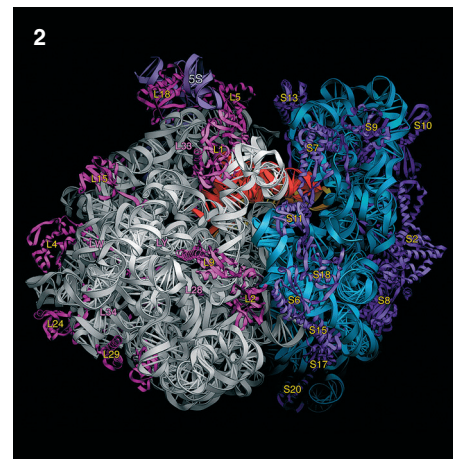
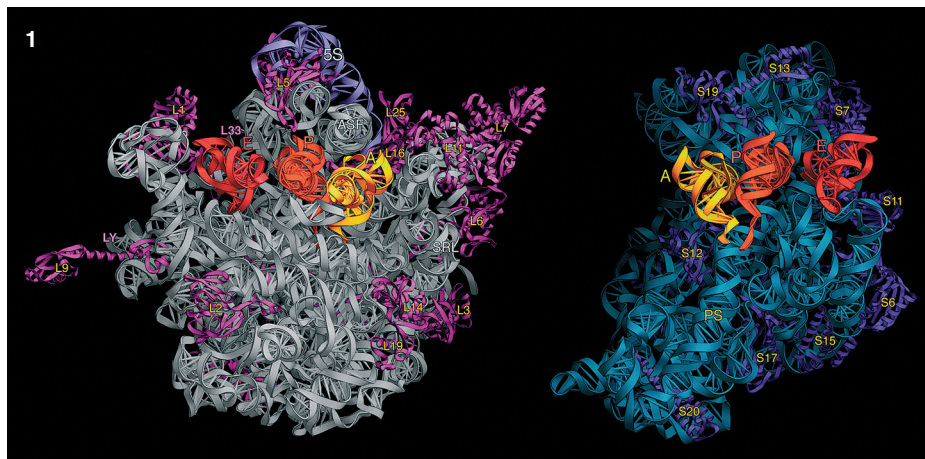
kteřá by zajišťovala přesnost translace změřenou *in vivo*. Ta dosahuje hodnoty  $10^3$ – $10^4$ , k chybování dochází jen v rozsahu 1:1 000 až 1:10 000. Energie vazby kodon-antikodon však nemůže zaručit nižší hladinu chybování než jen 1:10 až 1:100, ale ribozom stabilitu komplexu a přesnost dekodování řádově zvýší. Pak se takový správný trojný komplex mRNA-aa-tRNA-ribozom dá i dobře izolovat např. filtrací přes nitrocelulózoový filtr a nerozpadne se ani při opakovaném promývání puforem, jsou-li přítomny hořecnaté ionty v koncentraci zhruba  $10^{-2}$  mol/l. Pokud ale kodon a antikodon nejsou plně komplementární, ribozom nic nestabilizuje a na filtru nic nezůstane.

Na rozdíl od syntéz, které jsou adaptovány na rozpoznání vždy jen dvou specifických substrátů — tRNA a aminokyseliny, a navíc mají specifická katalytická a editační místa, musí ribozom měnit svou specifitu v každém kole dekodovacího procesu. Do hry totiž vstupuje téměř vždy jiný kodon, a tak se musí také vybrat vždy jiná aminoacyl-tRNA. Dekodování na ribozomu přitom musí být velmi rychlé, aby zajistilo vysokou rychlost proteosyntézy. Např. bakterie *Escherichia coli* se dělí v optimálním prostředí jedenkrát za 20 až 30 minut. To předpokládá, že za tuto dobu se také zdvojnásobí většina bílkovin buňky, jejichž počet se odhaduje na více než 4 000 a jsou složeny v průměru ze 300–400 aminokyselin. (Obdobné nároky se samozřejmě kladou i na rychlost syntézy nové molekuly DNA a molekul všech tříd RNA.) Nová bílkovina roste na ribozomu průměrnou rychlostí 10 aminokyselin za sekundu a zvládnutí výše popsaných požadavků tak nezbytně vyžaduje současné zapojení několika desítek tisíc ribozomů současně a ještě ve formě poly-

Tab. Ribozomy — jejich složení a klasifikace (podle T. M. Devlina 2006, upraveno)

Původ ribozomů	Velikost	Podjednotky a jejich složení
<b>Prokaryota</b>		
<i>Escherichia coli</i>	70S	50S: 23S; 5S rRNA; 34 bílkovin 30S: 16S rRNA; 21 bílkovin
<b>Eukaryota</b>		
1. Cytosol	80S	60S: 28S; 5,8S; 5S rRNA; 50 bílkovin 40S: 18S rRNA; 34 bílkovin
2. Mitochondrie		
a) živočišné	55–60S	40–45S: 16S rRNA; 70–100 bílkovin 30–35S: 12S rRNA;
b) vyšších rostlin	77–80S	60S: 25S; 5S rRNA; 70–75 bílkovin 40S: 19S rRNA;
3. Chloroplasty	70S	50S: 23S; 5S; 4,5S rRNA; 34–38 bílkovin 30S: 16S rRNA; 20–24 bílkovin

Obr. 1 Krystalové struktury ribozomálních podjednotek 50S (vlevo) a 30S (vpravo) bakterie *Thermus thermophilus* po rozevření 70S ribozomu. Pohled na styčné plochy obou podjednotek. Modelově je znázorněna poloha molekul tRNA na místech E, P a A (zkratky viz obr. 6) a oblast dekodovacího centra na 30S podjednotce a peptidyltransferázového centra na 50S podjednotce. Šedivě 23S rRNA, světle fialové 5S rRNA, růžově r-bílkoviny 50S podjednotky (označeny L), modře 16S rRNA, tmavě fialové r-bílkoviny 30S podjednotky (označeny S). Červeně tRNA v místech A a P, žlutě tRNA v místě E. Na ribozom 70S se mohou *in vivo* současně vázat nejvýše dvě tRNA. Obr. 2 Krystalová struktura 70S ribozomu z *Thermus thermophilus*, pohled z boku. Vlevo 50S podjednotka, vpravo 30S. Snímek H. Nollera, se svolením autora



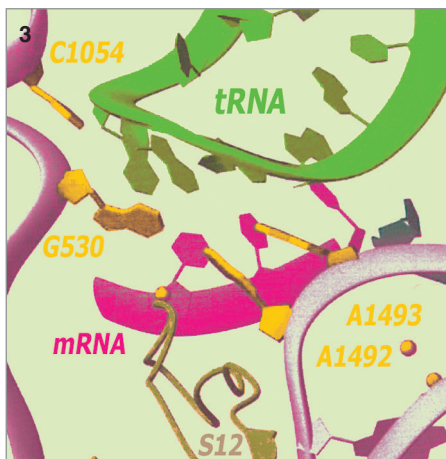
zomů (tj. útvarů, kdy jedna molekula mRNA je překládána současně několika ribozomy pohybujícími se po ní za sebou).

### Úspěšné dekódování mRNA na ribozomu

Co tedy vlastně ribozom při výběru správné tRNA dělá? A jaké nástroje k zajištění translační přesnosti používá? K osvětlení mechanismu tohoto pochodu se dospělo teprve nedávno, když se po více než 25 let trvajícím úsilí podařilo získat vhodné krystalizované ribozomální částice a z nich odvodit rentgenostrukturní analýzou jejich konformační strukturu, tj. navrhnout jejich atomové modely. Několik laboratorí nezávisle určilo struktury jak samotných ribozomálních podjednotek 30S, resp. 50S (obr. 1), tak i 70S ribozomu (obr. 2), a to i v komplexech s mRNA a tRNA. K osvětlení dekódovacího mechanismu přispěly i rozsáhlé biochemické experimenty využívající technik označených jako footprinting — otiskování a cross-linking — sešívání a mutační analýzy aplikované na molekuly 16S rRNA a 23S rRNA, které tvoří páteř ribozomálních 30S, resp. 50S podjednotek. Těmito přístupy se na 30S podjednotce také poprvé identifikovala a lokalizovala oblast dekódovacího centra. Ve shodě s předchozími názory bylo zjištěno, že se nachází na ploše, kterou 30S podjednotka přiléhá k 50S. Dále byly v 16S rRNA nalezeny oblasti důležité pro funkci dekódovacího místa včetně tří vývojově konzervovaných bází (A1492, A1493 a G530), které jsou např. u *E. coli* nezbytné pro její životnost. K určení pozice míst, kam se vážou na ribozom molekuly tRNA a translační faktory (oblast SRL, obr. 1), a k určení celkových tvarů ribozomálních částic přispěla nezávislým způsobem také novější technika nazvaná kryoelektronová mikroskopie (vzorek se prohlíží při velmi nízké teplotě, obvykle tekutého dusíku).

Nicméně ke strukturnímu objasnění mechanismů umožňujících dekódování byly zásadní výsledky krystalografické. Zejména, když byla v laboratoři V. Ramakrishnana (Cambridge, UK) vyřešena krystalická struktura 30S podjednotky při rozlišení cca 3 Å, a to jak samotné, tak v komplexu s fragmenty antikodonové smyčky tRNA, mRNA a antibiotiky (např. aminoglykozidovým paromomycinem), která zvyšují chybování při translaci.

Bylo zjištěno, že si ribozom vytvořil prostřednictvím určitých úseků 16S rRNA a ribozomálního proteinu S12 nástroj, kterým striktně sleduje kvalitu párování mezi kodonem a antikodonem. Děje se to tak, že kritické báze 16S rRNA se vážou ke komplexu kodon-antikodon jako čidla a kvalita jejich vazby signalizuje, zda výběr aa-tRNA byl správný nebo zda má být aa-tRNA z translačního pochodu vyloučena. Podstata selekčního procesu spočívá v přímém rozpoznání 3D-geometrie párování mezi bázemi kodonu a antikodonu (obr. 3). Aby tvar komplexu kodon-antikodon „prošel“ výběrem zdárně, párování v prvních dvou pozicích musí být vždy „rigorózní“, Watson-Crickova typu, tj. A s U a G s C. To se dá právě v malém žlábkem dvoušroubovicového útvaru, který vytváří kodon s antikodonem při vzájemné interakci, velmi dobře odlišit od párování, které toto pravidlo nedodrжуje. Třetí, „wobble“ pozice komplexu kodon-antikodon už není monitorována tak přísně — jak vyplývá z geometrie interakcí v této



Obr. 3 Jak ribozom monitoruje kvalitu interakce kodonu s antikodonem v dekódovacím centru na 30S podjednotce. Kodon v mRNA místě A je růžový, antikodonová smyčka tRNA zelená. Kritické „monitorovací“ báze z vlákna 16S rRNA, které se vážou ke komplexu kodon-antikodon, jsou uvedeny čísly a znázorněny žlutě. S12 je ribozomální protein. Kulčky představují hořčičnaté ionty. Většina monitorovacích kontaktů se uskutečňuje prostřednictvím bází A1492, A1493, G530 a dále C1054 v 16S rRNA a Ser50 ribozomálního proteinu S12 na straně 30S podjednotky a malým žlábkem dvoušroubovicového útvaru, který vytváří kodon s antikodonem při vzájemné interakci. Je sledována právě dokonalost tvaru tohoto žlábků. Upraveno podle Ogle a kol., *Science* (2001)

části selekčního místa ribozomu. Párování např. typu G-U je tolerováno a nevyvolá signál, aby tRNA ribozom opustila. Vytvoří-li tedy útvar kodon-antikodon charakteristický Watson-Crickův komplex, výběr proběhne zdárně, naopak dostane-li se do komplexu kodon-antikodon na prvních dvou místech i jen jediná nerigorózní báze, změní se konformace celého útvaru. Tam, kde tím došlo k přerušení vazeb s dekódovacím centrem, se exponují partneři pro vazbu vodíkovými můstky, poruší se vrstvení (stacking) bází a změní se rotační stav komplexu. Jistě dostatek podnětů k zamítnutí aa-tRNA. Ribozom prostě přednostně stabilizuje vazbu správného substrátu.

Dále se ukazuje, že ribozom používá při dekódování mechanismus „induced-fit“. To znamená, že teprve vazbou se správným substrátem u něj dochází k výše uvedené reorientaci dekódovacích prvků v 16S rRNA a S12 do nejvhodnějších poloh pro reakci (vazbu). Pokud však kodon a antikodonem nejsou komplementární i jen v jediné poloze, k reorientaci už nedojde. Takže i když aa-tRNA s relativně velmi podobným antikodonem úspěšně proklouzne první branou selekčního procesu (kdy se především vyřazují zcela nepříbuzné aa-tRNA), potom je s vysokou pravděpodobností vyřazena v druhé fázi selekce nazvané korektura (proofreading). Komplementarita substrátu, aa-tRNA, je tak kontrolována dvakrát a četnost chybování, která dosahuje po první fázi selekce hodnot až  $10^{-2}$ , se sníží na  $10^{-5}$ – $10^{-3}$ . Flexibilita čidla, 16S rRNA, znamená, že vnímá a rozlišuje změnami své konformace a změny navíc signalizuje (i přes aa-tRNA) opět konformačně dále. To je nezbytné pro další krok translace, usazení aa-tRNA do vazebného místa na ribozomu (A/A, akomodace aa-tRNA, obr. 6/ID). Správný komplex kodon-antikodon dává správný

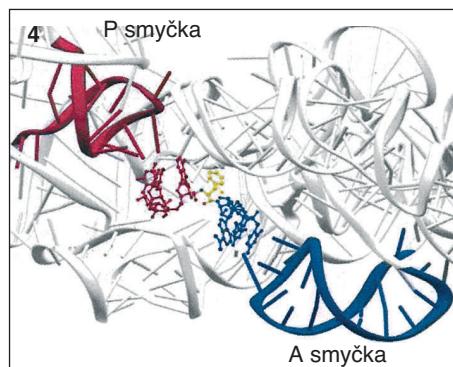
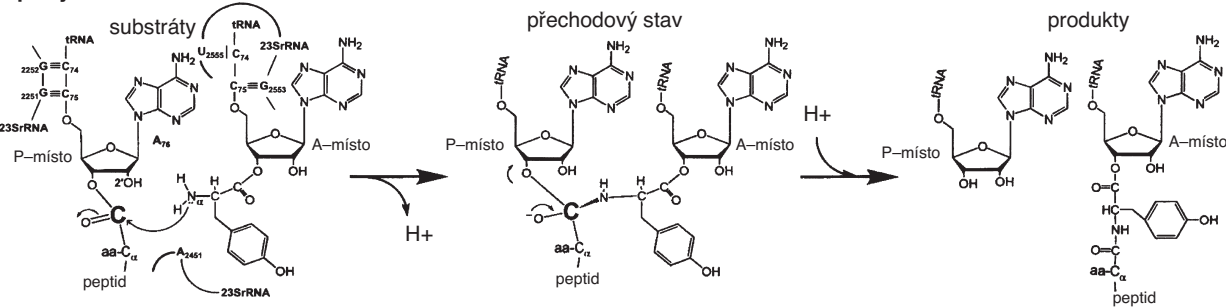
signál, který to umožní, naopak při nekomplementaritě komplexu je aa-tRNA z ribozomu uvolněna (podrobně na obr. 6). Dále se ukázalo, že lokální konformační změny v dekódovacím místě vedou i k navněk pozorovatelné celkové přestavbě tvaru 30S částice. Jde-li o správný komplex kodon-antikodon, její hlava a rameno se navzájem sevrou.

### Ribozom je „induced-fit“ ribozom

Posledním příkladem přímé účasti RNA při proteosyntéze, který chci uvést, je ribozomální katalýza tvorby peptidické vazby. Tímto pochodem se jedna aminokyselina za druhou postupně připojují do rostoucího peptidového vlákna, buduje se molekula nové bílkoviny. Jak už bylo řečeno, bílkoviny a peptidy se tvoří od začátku do konce na ribozomech a dokud nejsou hotovy, zůstávají na nich vázány. Rostoucí bílkovina je vázána na ribozom prostřednictvím tRNA a tento meziprodukt se nazývá peptidyl-tRNA. Úkolem ribozomu je, aby peptidovou část peptidyl-tRNA prodlužoval na karboxylovém C-konci, přidával k ní postupně aminokyseliny vybírané podle kodonů v překládané mRNA. Bílkoviny se tedy na ribozomu syntetizují od N-konce, a to je také první část nové bílkoviny, která se dostává volná z ribozomu do cytosolu. Druhým svým koncem, tj. poslední C-koncovou aminokyselinou, je rostoucí peptid vázán na tRNA ve formě peptidyl-tRNA, která se pohybuje uvnitř 70S/80S ribozomu, mezi oběma podjednotkami (obr. 1).

Jak tedy k růstu peptidu vlastně dochází? Na ribozomu existuje vazebné místo pro peptidyl-tRNA (místo P, obr. 6) a vazebné místo pro právě vybranou aa-tRNA (A). Na obě místa jsou tyto dvě molekuly tRNA vázány interakcí kodon-antikodon, přičemž kodony vázící obě tRNA spolu na mRNA sousedí. Párování kodon-antikodon nastává v těch částech P a A místa, která jsou na malé ribozomální podjednotce. V místě A jde o výše popsané dekódovací centrum. Dále, akceptorové konce obou tRNA se na ribozom vážou v těch částech míst P a A, která jsou už na velké ribozomální podjednotce — v oblasti nazvané peptidyltransferázové (PT) centrum. Prodloužení peptidického řetězce o další aminokyselinu je pak pochod, při kterém se peptidyltransferázou přenesou peptid z peptidyl-tRNA (při prvním přenosu methioninový zbytek z iniciační methionyl-tRNA) v místě P na α-aminoskupinu aminokyseliny z aa-tRNA v místě A. Jde o tzv. peptidyltransferázovou reakci (obr. 5). Při ní se uvolní esterová vazba, kterou je vázán karboxy-konec peptidu na tRNA v místě P a tento konec peptidu se spojí peptidickou vazbou s α-NH<sub>2</sub>-skupinou aminokyseliny aa-tRNA v místě A. Chemicky jde o nukleofilní atak α-NH<sub>2</sub>-skupinou na karbonylový uhlík poslední aminokyseliny peptidu v peptidyl-tRNA. Na místě A tak vznikne peptidyl-tRNA delší o jednu aminokyselinu. V dalším kroku se pochodem nazvaným translokace přesune peptidyl-tRNA z místa A na místo P, a to spolu s mRNA. Posun mRNA má délku právě jednoho kodonu (obr. 6). Do uvolněného místa A se dostane následující kodon z mRNA a výše popsaným selekčním pochodem se naváže nová aminoacyl-tRNA. Prodloužení rostoucího řetězce bílkovin o další aminokyselinu tak může znovu proběhnout. Uvedené reakce se stále opakují, mluvíme o elongačním

## 5 Peptidyltransferázová reakce



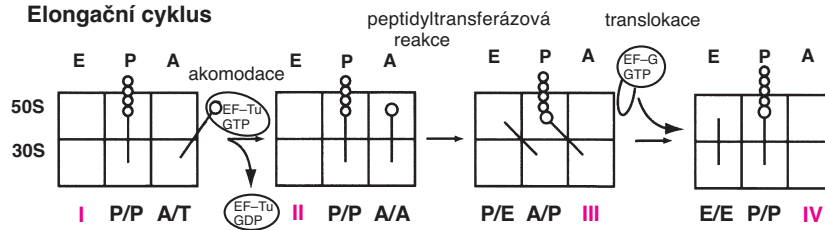
Obr. 4 Peptidyltransferázové centrum na 50S podjednotce ribozomu z archaebakterie *Haloarcula marismortii*. Červené vlákno je smyčka P a modré vlákno je smyčka A z 23S rRNA. Mezi nimi je znázorněna (kuličky a tyčky) pozice –CCA konce peptidyl-tRNA (červeně) v místě P a –CCA konce aminoacyl-tRNA v místě A (modře). Žlutě je znázorněn inhibitor peptidyl-transferázy, který byl přítomen při krystalizaci 50S podjednotky. Obr. se svolením P. Nissen (Science 2000)

(prodlužovacím) cyklu. Vše pokračuje, dokud se při čtení mRNA v A místě ribozomu nenarazí na jeden z terminačních tripletů.

Tvorba peptidové vazby nevyžaduje žádný další zdroj energie (ATP nebo GTP). Ta je primárně obsažena v esterové vazbě molekul aminoacyl-tRNA, které do ribozomu vstupují, a neztrácí se ani při jejich přeměně na molekuly peptidyl-tRNA, jak jsme již o tom mluvili. Rozdíl mezi volnou energií esterové vazby, kterou je připojen peptidový (nebo na začátku methionylový) zbytek na tRNA v místě P, a volnou energií peptidové vazby je pak dostatečný k uskutečnění peptidyltransferázové reakce. Smíchá-li se však samotná peptidyl-tRNA s aminoacyl-tRNA, k reakci prakticky nedojde. Dojde k ní až po přidání 70S ribozomu anebo jen velké ribozomální podjednotky. Reakce se zrychlí až 10<sup>7</sup>krát.

Dlouho se hledala odpověď na otázku, jaké složky ribozomu, tj. ribozomální bílkovina(y) nebo rRNA, se na PT reakci podílejí a jakou svou částí vstupují do katalytického procesu. Jaký je katalytický mechanismus? Co je ribozomální peptidáza za enzym? Při určení krystalové struktury 50S podjednotky z archaebakterie *Haloarcula marismortii* v r. 2000 navrhla laboratoř T. A. Steitz, že báze A2451 z její 23S rRNA přímo vstupuje do katalytického procesu jako acido-bazické činidlo, které odnímá proton z  $\alpha$ -aminoskupiny aa-tRNA (v místě A), aby ji aktivovalo k provedení nukleofilního útoku. Tuto funkci A2451 však řada dalších experimentů zpochybnila. Jako o další možné aktivační skupině se uvažuje o 2'-OH skupině peptidyl-tRNA v místě P (obr. 5), neboť se pro-

## 6 Elongační cyklus



Obr. 5 Peptidyltransferázová reakce, substráty, meziproducty, produkty a chemismus (podle S. Strobel, upraveno). Velká ribozomální podjednotka (50S u prokaryot, 60S u eukaryot) obsahuje katalytické centrum — peptidyltransferázové centrum (PT). Jak je popsáno v textu, ve výchozí poloze katalytického procesu jsou jako substráty PT centra vázány na jeho místě P –CCA konec peptidyl-tRNA a na jeho místě A –CCA konec aminoacyl-tRNA (zde tyrozyl-tRNA). Peptid v peptidyl-tRNA i aminokyselina v aminoacyl-tRNA jsou na své t-RNA vázány esterovou vazbou vytvořenou mezi 3' OH skupinou ribózy 3' koncového adenosinu obou tRNA a karboxylovou skupinou C-koncové aminokyseliny peptidu, případně aminokyseliny samotné. Soudí se, že PT reakce probíhá v přechodném stavu přes meziproduct, jehož rozpad vede k deacylaci tRNA na P místě a připojení uvolněného peptidu na aa-tRNA na místě A (produkty reakce) ♦ Obr. 6 Zjednodušené schéma elongačního cyklu (bližší v textu). Na 70S ribozomu existuje vazebné místo P pro peptidyl-tRNA a vazebné místo A pro aa-tRNA. Každé z míst má dvě části: na 30S podjednotce a na 50S podjednotce. Vlákno mRNA není znázorněno. Na ribozomu existuje ještě 3. místo pro tRNA, tzv. E (exit) — přes toto místo opouští ribozom tRNA zbavená peptidu. Při dekódování mRNA se každá aa-tRNA dostává na ribozom nejprve do jeho místa A/T, a to jen ve formě trojného komplexu s elongačním faktorem EF-Tu a GTP. Přejde aa-tRNA ze stavu A/T (prvotní vazby na ribozom, I) do stavu A/A (připravení se na peptidyltransferázovou reakci, II) se nazývá akomodace a je podminěn vytvořením rigorózního komplexu kodon-antikodon (viz text). Tím se totiž indukují hydrolyza GTP vedoucí ke změně konformace EF-Tu, a tak ztrátě jeho afinity k aa-tRNA. Při PT reakci se přenesou peptid z peptidyl-tRNA v místě P/P na aa-tRNA v místě A/A (není znázorněno). Soudí se, že čerstvě prodloužený peptidový konec se ihned přesune do P místa PT centra. Tak vzniká tzv. hybridní A/P forma vazebného místa pro peptidyl-tRNA: svou antikodonovou oblast zůstává tRNA vázána na A místo na 30S podjednotce, ale akceptorovou oblast nesoucí peptid se už váže do P místa na 50S podjednotce (III). Posun antikodonové oblasti peptidyl-tRNA do P místa na 30S spolu s mRNA se nazývá translokace a účastní se ho další elongační faktor EF-G a GTP. Tím se ribozom dostane do stavu, kdy má volné místo A a může vázat další aa-tRNA (IV). Sled reakcí se opakuje. Podle V. Ramakrishnana (Cell 2002), upraveno

kázalo, že je nezbytná pro PT aktivitu. Pak by šlo o tzv. katalýzu podporovanou substrátem. Báze A2451 je také pro translační proces nepostradatelná, neboť její zmutování má za následek dominantně-letální fenotyp, ale její přesnou úlohu zatím neznáme. Co vlastně víme o složení PT centra?

Cílené biochemické práce z laboratoře H. Nollera z konce 80. let 20. stol. už ukázaly, že přesné usazení –CCA konce aa-tRNA do ribozomálního místa A a –CCA konce peptidyl-tRNA do ribozomálního místa P v PT centru zajišťuje ribozom prostřednictvím interakcí s vysoce konzervovanými smyčkami A a P z 23S rRNA. Krystalové modely 50S a 70S ukázaly, že PT centrum je složeno právě z těchto úseků 23S rRNA (a dalších) a do vzdálenosti 18 Å se nenachází žádný protein nebo jeho zbytek (obr. 4). Přitom přímo v krystalu, z kterého byl model odvozen, se dá demonstrovat PT aktivita. Všechny tyto výsledky se tak dnes považují za přesvědčivý důvod pro tvrzení, že centrální reakce proteosyntézy — tvorba peptidové vazby — je téměř jistě katalyzována jen RNA a ribozom je nepochybně

jasný ribozym. Nicméně znovu, co tedy ribozom vlastně dělá, pokud se jeho složky katalýzy (asi) přímo nezúčastní? V čem je jeho jedinečnost? Zřejmě se potvrzuje dávná představa propagovaná už v 60. letech 20. stol. pražskou laboratoří I. Rychlíka v Ústavu organické chemie a biochemie tehdejší ČSAV, že ribozom asi „jen“ zajišťuje správné sesazení a orientaci substrátů (a tím jako správný enzym snižuje aktivační energii reakce) tak, aby spolu mohly reagovat („entropická katalýza?“). Přiblíží nukleofilní  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> skupinu aa-tRNA na van der Waalsovskou vzdálenost k elektrofilnímu karbonylovému uhlíku, se kterým má reagovat. (Bez externí aktivace  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> skupiny?) Skoro to nutí až ke zvolání: „Vždyť je to tak prosté, milý Watsone!“ (Zde kolega S. Holmese.) Ale detaily ještě neznáme. Se srovnání konformací prázdných ribozomů s ribozomy s navázanými tRNA navíc vyplynulo, že také PT centrum se substráty používá mechanismus „induced-fit“. Vazba substrátů (aa-tRNA) v místě A indukují v ribozomu konformační změnu, kterou se exponuje esterová skupina peptidyl-tRNA, aby mohla

být atakována aminoskupinou aa-tRNA, ale chráněna před hydrolyzou.

Na tomto místě si neodpustím jednu reminiscenci. V r. 1973 byla J. Černou a I. Rychlíkem publikována práce, na níž jsem se také podílel. Poprvé a jasně prokazovala, že 23S rRNA, její integrita jsou nezbytné pro peptidyltransferázovou aktivitu a zvláště pro vazbu -CCA konce peptidyl-tRNA do P místa PT centra ribozomu. Výsledky jsme interpretovali podle dobového konsenzu, že když 23S rRNA vytváří kostru pro vazbu „katalytických bílkovin“ PT centra, tak potom už i malým narušením této kostry se jejich vazba změní, nebo se omezí přístup pro substrát, a ztratí se tím i PT aktivita. Možnost, že by jen sama RNA stačila na PT aktivitu, z našich výsledků přirozeně také vyplývala, ale nikdo si v té době nedovolil, a ani my, na něco takového jen pomyslet. Také žádné podobné výsledky o RNA jako možné enzymu nebyly v té době k dispozici a do objevu ribozymů zbývalo ještě 10 let.

Ale tak jednoduché to zřejmě také nebude. Jak bylo řečeno, zajištění celistvosti a přesné konformace úseků 23S rRNA v PT centru je nezbytné pro chod peptidyltransferázové reakce. 16S i 23S rRNA jsou nadány samosbalovací schopností, čímž se primárně určí např. celkový tvar 30S i 50S podjednotky (A. Spirin). Pro uvedení PT centra do aktivního stavu to však zřejmě nestačí, neboť samotná 23S rRNA nemá PT aktivitu. K jejímu obnovení je třeba ponechat nebo dodat některé ribozomální bílkoviny (např. L2, L3, L27). Na druhé straně ani žádná samotná r-bílkovina není schopna katalyzovat tvorbu peptidické vazby. Do-

hromady to naznačuje, že obě stavební složky 50S podjednotky jsou nakonec pro funkci PT centra nezbytné. Jak tedy uvést v soulad krystalografické modely PT centra a rekonstituční výsledky? Vysvětlení, které se dnes nabízí, může být asi následující: Přítomnost určitých ribozomálních bílkovin je zřejmě nezbytná k uvedení PT úseků 23S rRNA a/nebo substrátů do aktivní konformace pro katalýzu PT reakce. Neboli zdá se, že bílkoviny, i když ne přímo, by přece jen mohly mít na chodu PT reakce svůj (důležitý) podíl.

Měli jsme možnost trochu nahlédnout do molekulárních a atomových mechanismů proteosyntézy, zvláště pak probrat, jak se strukturální schopnosti RNA využívají k vytvoření aktivního ribozomu. Ukázalo se, že jak ribozom, tak jeho substráty jsou vybraně dynamické molekuly, jejichž konformační přeměny jsou nedílnou součástí těchto pochodů. Je zřejmé, že molekuly RNA hrají hlavní úlohu jak při dekodování mRNA, tak i při tvorbě peptidové vazby. Ribozom je tak strojem vybaveným ribozymovým mechanismem. Navíc jak jeho dekodovací centrum, tak PT centrum využívají mechanismus „induced-fit“ ke zvýšení substrátové specifity. To by mohlo i znamenat, že se tento mechanismus vyvinul už v RNA světě, a že i v tomto ohledu RNA předběhla proteiny. Stereochemické propojení mezi říší aminokyselin a říší nukleotidů přešlo do? /zůstalo v? rukou starodávných bílkovinných enzymů — aminoacyl-tRNA syntetáz.

Ačkoli obecná schémata proteosyntetického pochodu se běžně probírají v každé učebnici biochemie, při vysvětlování ně-

kterých pochodů na molekulární úrovni, a tedy i snaze o pochopení jejich mechanismu, se mnohde stále ještě dostáváme do úzkých. Zatímco v porozumění mechanismu přesnosti dekodování či peptidyltransferázového kroku translace byl učiněn dramatický pokrok, v jiných případech, např. posunu molekul tRNA v ribozomu z místa A do místa P, posunu mRNA, spřažení hydrolyzy GTP s těmito pochody atd., tak daleko nejsme. Triviální otázky, jako jak molekula tRNA přeruší a znovu vytvoří kontakt s ribozomem, když se posouvá téměř o 50 Å z jednoho do druhého místa, zůstávají nezodpovězeny. Jak nezávisle říkají V. Ramakrishnan a H. Noller, k úplnému objasnění molekulární dynamiky pochodů translace v atomovém rozlišení potřebujeme umět natočit souvislý film v tomto rozlišení, zatím však máme spíše jen jednotlivé obrázky. Nasazení všech moderních přístupů krystalografických a kryoelektronmikroskopických, kinetických analýz, zobrazovacích technik ke sledování jedné molekuly a dále počítačových simulací molekulární dynamiky na atomových strukturálních modelech bude vysoce žádoucí. (Ačkoli by se v současnosti zdálo, že pro simulace bude ribozom se svými 2 640 000 atomy zcela nespokojitelné sousto, taková simulace — vůbec největší ve světě — už překvapivě probíhá v Los Alamos Nat. Laboratories v USA.) Vzhledem k ústřední úloze, kterou má translace v biologii, by se to jistě mělo vyplatit. Především je to jedinečná příležitost, jak dobře rozjetou studii nějakého biochemického stroje dotáhnout jako první až blízko nebo do samotného konce.

## Interakce klíště–hostitel

### I. Sání krve a přenos patogenů

Tereza Matějovská

Ze známých infekčních nemocí patří k nejzávažnějším ty, které jsou přenášeny vektory z kmene členovců (*Arthropoda*). Na člověku parazitují a přenášejí na něj různá onemocnění zástupci dvou tříd členovců: hmyzu (*Insecta*, především komáři — *Culicidae*) a pavoukoců (*Arachnida*), nejvíce zástupci podřádu klíšťat (*Ixodida*). Ten se dále dělí na čeledi *Ixodidae* (klíšťata), *Argasidae* (klíšťáci) a *Nuttallidae* (blíže Živa 2002, 2: 73–76).

Příjem potravy (sání krve) ektoparazitů je ztížen faktem, že hostitel má účinné mechanismy, jak zabránit ztrátě krve a tedy i nasátí. Na druhé straně sliny ektoparazitů obsahují širokou škálu biologicky aktivních látek, které umožňují obranné mechanismy hostitele obejít. V dlouhodobé koevoluci parazit–hostitel se strategie obranných molekul jak na straně parazita, tak na straně hostitele neustále vyvíjejí a otázka zní: kdo bude úspěšnější, hladovějící parazit, nebo obratlovec, který se snaží ztrátě krve zabránit?

Všechny druhy klíšťat sají krev svých hostitelů, ale jen 10 % z celkového počtu (k dnešnímu dni asi 899 druhů) má schopnost přenášet patogenní organismy — viry, bakterie a prvoky — na člověka. Všechny patogeny se do klíštěte dostanou během sání na infikovaném hostiteli a při následujícím sání se přenášejí skrze slinné žlázy na dalšího hostitele. Z klíšťáků přenášejí nemoci na člověka jen rod *Ornithodoros*, hlavními vektory patogenů jsou především klíšťata.

K nejznámějším virovým infekcím přenášeným klíšťaty patří klíšťová encefalitida se třemi podtypy (evropská, východní a sibiřská) způsobená virem TBE (Tick Borne Encephalitis) z čel. *Flaviviridae*, do které patří i původci dalších onemocnění — pro větší přehlednost uvádíme podrobnosti v tabulce (tab. 1). Z dalších virových čeledí je třeba jmenovat *Reoviridae*, *Bunyaviridae* a *Asfarviridae*.

Nejznámějším zástupcem bakteriálních onemocnění přenášených klíšťaty (tab. 2)

je lymfská borelióza způsobená spirochetami komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato (prokazatelně typy *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, *B. garinii* a *B. valaisiana*). Klíšťata dále přenášejí např. bakterie způsobující tularémii (*Francisella tularensis*), intracelulární bakterie z čel. *Rickettsiaceae* a další choroby, které opět přibližuje podrobněji tabulka.

V neposlední řadě je třeba uvést parazitární onemocnění z kmene *Apicomplexa* (nejznámějším zástupcem je původce malárie — rod *Plasmodium*). Z těchto nemocí je známá babesióza a teilerióza. Babesióza je závažné a smrtelné onemocnění jak člověka (*Babesia microti*), tak i skotu (*B. divergens* a *B. bovis*) a přenášejí ho klíšťata rodů *Ixodes*, *Rhipicephalus*, *Hyalomma* (viz obr.) a *Amblyomma*. Teilerióza (*Theileria parva*) se vyskytuje především u ovcí a dobytka v celé Africe, vektory jsou klíšťata rodu *Rhipicephalus*.

V České republice patří k nejzávažnějším onemocněním přenášeným klíšťaty klíšťová encefalitida (Živa 2001, 4: 150–152) a lymfská borelióza, jejichž vektorem je klíště obecné *Ixodes ricinus* (viz obr.).

#### Sání krve klíšťaty

Úspěšný příjem potravy je životně důležitý pro dokončení vývojového cyklu klíštěte, přežití a nakladiení vajíček samicíčkou. Na druhé straně, tělo hostitele je během sání vystaveno poškození kůže, zánětlivé reakci a možnému přenosu patogenů. Pomocí chelicer klíštěte dochází k průniku sacího orgánu — hypostomu do kůže hostitele, což má za následek poškození epidermálních a dermálních buněk včetně místních