

# Riboszóma és fehérjeszintézis – egy élőkövület az RNS-világból

Szakdolgozat  
Biológia alapszak  
Biológus szakirány

készítette:  
**Székelyi Zsuzsanna**

témavezető:  
Dr. Kun Ádám  
tudományos főmunkatárs  
Növényrendszertani, Ökológiai és Elméleti Biológiai Tanszék

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM  
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR  
BIOLÓGIAI INTÉZET



BUDAPEST, 2013.

## Tartalomjegyzék

Riboszóma és fehérjeszintézis – egy élőkövület az RNS-világból.....	1
Bevezetés.....	3
A kezdetek.....	6
A riboszóma térszerkezete.....	10
Ribozim.....	16
Mit keres az RNS a riboszómában?.....	16
Az RNS feladata, és a riboszómális fehérjék szerepe.....	16
A riboszóma evolúciója.....	19
A végső feladat, a fehérjeszintézis.....	27
Következtetések.....	30
Összefoglalás.....	31
Summary.....	32
Referenciák:.....	33
László L, Csikós Gy., Kovács A. L., Pálfia Zs., Zboray G., Molnár K., 2012. Fénymikroszkópia, Zboray G., Molnár K., Szöveti és sejtszintű vizsgálati módszerek – ELTE TTK Biológiai Intézet, Budapest.....	34
Ábrák:.....	34

## **Bevezetés**

A riboszóma egy univerzális sejtalkotó, ami központi szerepet játszik az élő szervezetekben nélkülözhetetlen fehérjeszintézis folyamatában. Nagy mennyiségben, akár több tízezres számban előfordul a sejtekben membránkötött vagy szabad állapotban. Minden riboszómát két alegység alkot. Ezek méretükben és funkciójukban is különböznek egymástól. Méretük leírására a Svedberg egységet használják, és szedimentációs tulajdonságuk, azaz ülepedési sebességük alapján különítik el őket. (Calisto B. M., 2011., Krupkin, 2011.)

A kis- és nagyalegység egymáshoz viszonyított molekulatömege 1:2 arányban oszlik meg, mindkét alegység 60%-át RNS teszi ki, a többi 40%-ot fehérje alkotja. A kisalegységnek a genetikai kód hű átíródásában van nagy szerepe, ezenkívül transláció iniciációjában is részt vesz, és szelektálja a már lefordított fehérjevázakat. Az aminosavak közti peptidkötés kialakításának katalízisét a nagyalegység végzi, ezzel hosszabbítja a proteinszintézisben újonnan szintetizálódott fehérjét. (Williamson, 2009., Krupkin, 2011.)

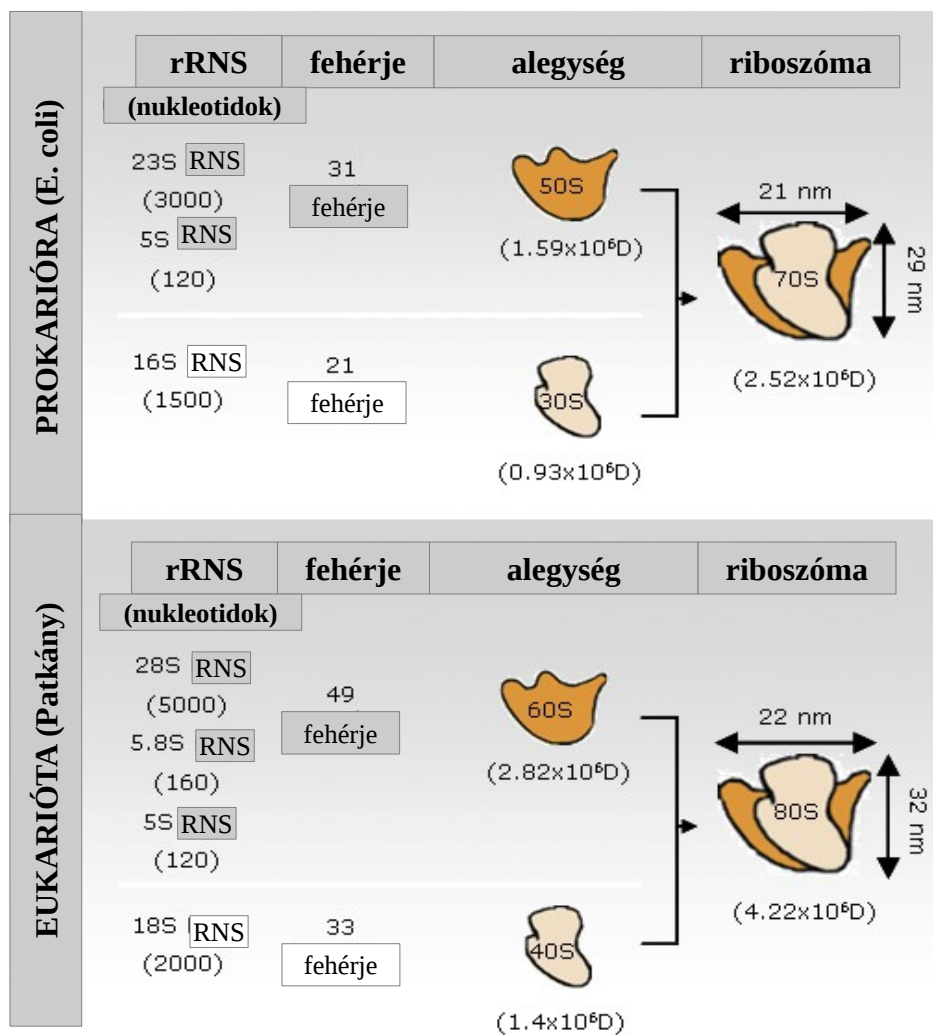
Az előzőek tükrében a prokarióták riboszómájának két része a 30S kisalegység, és az 50S nagyalegység. A teljes bakteriális riboszóma 70S méretű. Eukarióták 80S riboszómájának két alegysége 40S és 60S arányban oszlik meg (*1. ábra*). A bakteriális riboszóma mérete ~2,5 MDa, az eukarióta riboszóma nagyobb, kb. 4MDa, utóbbit több komponens alkotja, ennek köszönhetően biokémiai folyamatai is komplexebbek. (Calisto B. M., 2011., Williamson, 2009., Krupkin, 2011.)

A nukleinsavakból álló genetikai információ aminosavakra való átírása a transláció folyamata. A transláció ténylegesen a riboszóma három tRNS kötőhelyén megy végbe. Az ehhez szükséges genetikai információt az mRNS (messenger RNS) juttatja el a riboszómáig, a fehérjéket alkotó aminosavakat pedig a tRNS (transfer RNS) szállítja (Calisto B. M., 2011., Krupkin, 2011.).

A riboszómán három kötőhely található a tRNS számára, ezek mindkét egységen együtt vannak jelen. Az A- (aminoacil/akceptor) kötőhely fogja meg a tRNS-t, a P- (peptidil) helyen történik az aminosavak kapcsolása, az E- (exit) kötőhely pedig a kilépés helye. A folyamat energiáját a guanozin-trifoszfát (GTP) biztosítja (Calisto B. M., 2011., Krupkin,

2011.).

A riboszóma szerkezetének és funkciójának érdekessége a magas RNS tartalmában rejlik. Ezen sejtalkotó legfőbb feladata, a fehérjeszintézis ehhez a molekulatípushoz köthető, ami ellentmond az általános szabálynak, miszerint a katalitikus folyamatok fehérjetermészetű enzimek segítségével mennek végbe. A riboszómális RNS-nek ez a fajta sajátossága sok kérdést vetett, és vet még ma is fel, a kutatók célkeresztjébe állítva ezzel a riboszómát. (Calisto B. M., 2011.)



**1. ábra:** A prokarióta (felül) és eukarióta (alul) alegységek összehasonlítása. Az ábra feltünteti az alegységeket alkotó rRNS-ek S értékeit, azok hosszát az őket felépítő nukleotidok számával, ill. az alegységekhez kötődő fehérjék számát is. (Calisto B. M., 2011.)

## ***A kezdetek***

Az emberiséget mindig is érdekelte a saját, és más élőlények testének felépítése. A tudomány fejlődésével, és a mikroszkópia megjelenésével lehetőség nyílt belelátni testünkbe, sejtjeinkbe. (Puglisi, 2009.)

Az 1950-es '60-as évek molekuláris-biológiájában meghatározó jelentőségű volt a riboszóma felfedezése, és annak génexpresszióban játszott szerepének leírása. A riboszómát mint sejtalkotót első alkalommal George E. Palade román sejtbiológus írta le 1955-ben, funkciója ekkor még ismeretlen volt. Ezt követően az '50-es '60-as években robbanásszerűen megnőtt a riboszómával kapcsolatos kutatások és azok eredményeinek száma. (Puglisi, 2009.)

Crick még a felfedezés évében tisztázta, hogy a riboszóma kisalegységén lévő trinukleotid a genetikai kód bázispárjaiból származó templátot felhasználva vesz részt a polipeptidlánc képzésében. Rákövetkező évben Palade és Siekeritz leírták, hogy a megszintetizálódott riboszómák (egy része) a endoplazmatikus retikulumban lokalizálódik. Az endoplazmatikus retikulum, vagy röviden csak ER egy, a sejt belsejében lévő összefüggő membránsturktúra, amelynek többek között olyan fontos biológiai folyamatokban van számottevő szerepe mint a lipidanyagcsere, vagy a fehérjeszintézis. 1958-ban Hoagland és Zamecnik felfedezte az aminosavakat kovalensen kötő „soluble” (oldódó) vagy sRNS-t, mai nevén tRNS-t. (Ramakrishnan, 2009.)

A riboszómával kapcsolatos kutatásoknak a kezdetén már az is tisztázódott, hogy ez a sejtalkotó minden fajban két reverzibilisen disszociálható egységből áll (Watson 1958, és Chao 1974). Ekkorra már az alegységek funkciói is kezdtek letisztulni, úgymint, hogy a kisalegység közvetíti a kapcsolatot az mRNS és a tRNS között, ami végül meghatározza a kész fehérjék szekvenciáját. A nagyalegység pedig a proteinlánc kialakulását megvalósító peptidkötések kialakulását katalizálja. (Moore és Steitz, 2002.)

Az '50-es évek tudósainak egyáltalán nem volt meglepő, hogy a riboszóma tartalmaz fehérjét, hiszen ez katalizálja a proteinszintézist. Ebben az időszakban már tudott volt ugyanis, hogy a különböző biokémiai folyamatokat katalizáló enzimek tulajdonképpen fehérjék. Ami a meglepetést okozta a szakmabelieknek, hogy a riboszóma RNS-t is

tartalmaz. Ennek magyarázatára három különböző hipotézist állítottak fel. (Moore és Steitz, 2002.)

Az első elképzelés szerint az RNS egy olyan anyag szerepét tölti be a riboszómában, ami meghatározza a riboszóma által készített fehérje szekvenciáját. A második elmélet szerint az RNS egyfajta katalizátorként működő strukturális állványt alkot, amin a fehérjeszintézis apparátusai gyűlnek össze. A harmadik hipotézis az mondta ki, hogy az RNS közvetlenül járul hozzá a proteinszintézis katalitikus folyamataihoz. A második hipotézist nem tartották reálisnak, ugyanis nem volt evolúciós értelme. A harmadik elméletet aggasztónak vélték, hiszen kétségben vonták a doktrínát, miszerint az enzimek nem mások, mint fehérjék. Amikor az mRNS 1960 körüli felfedezése véget vetett az első elmélet sikerének, a harmadik teória került előtérbe. Azt, hogy az RNS-nek valóban van kémiai katalitikus aktivitása, csupán a 1980-as években fedezték fel (Kun, 2011), funkcionális fontossága pedig csak mára lett egyértelmű. (Moore és Steitz, 2002.)

A riboszómában lévő nagy mennyiségű RNS felfedezését követően a korai '60-as évekig sikerült kidolgozni a transzláció folyamatának vázát. Ekkorra már világossá vált, hogy az „soluble” RNS néven megismert tRNS meghatározó szerepet játszik a fehérjeszintézisben, ezzel megerősödtek az addigi kutatási eredmények, miszerint a riboszóma a fehérjék szintézisének helye. Bár az mRNS feladata és működése még nem volt teljes mértékben ismert, mégis annak feltárásában elért eredmények elegendőek voltak ahhoz, hogy rámutassanak a genetikai kód fehérjeszintézisben játszott meghatározó szerepére. (Puglisi, 2009.)

A riboszóma-kutatásban nagy áttörést hozó '70-es évek egyik hatalmas találmánya az elektronmikroszkóp (EM) volt (Puglisi, 2009). Ez a műszer soha addig nem látott részletességgel engedett bepillantást a sejt belsejébe. A hagyományos fénymikroszkópok 200-220 nm-es képfelbontása határt szab alkalmazhatóságuknak. Előzőek szerint a ~200 nm-nél közelebbi képpontok a fénymikroszkóp legjobb nagyításánál sem különíthetők el egymástól. A sejtalkotók jelentős része a nm-es mérettartományba esik (a prokarióta riboszóma pl. megközelítőleg 20 nm átmérőjű (1. ábra)). Ezek vizsgálatára már jóval nagyobb felbontóképességre van szükség, ami viszont az Abbe-képlet értelmében függ a megvilágító fénysugár hullámhosszától ( $\lambda$ ). Minél kisebb a hullámhossz, annál jobb a feloldóképesség.

$$d_{\min} = \frac{0.612\lambda}{n \sin \omega}$$

A képletben a  $d_{\min}$  a felbontási határt jelenti, azt a minimális távolságot, amit a mikroszkóp már két különálló képpontként érzékel, és képez le. Az  $n$  a tárgy és az objektív lencséje közti közeg törésmutatója. Ez a közeg általában a levegő, de 60-szoros nagyítás felett a képalkotási hibák kiküszöbölése érdekében immerziós olajat szoktak használni, aminek törésmutatója egyezik a lencse törésmutatójával. Az  $\omega$  a lencse félnyílásszögére utal. A képletben látható  $n \sin \omega$  összefüggés az úgynevezett numerikus apertúrát (NA) adja meg, ami alapvetően meghatározza a lencse fényerejét és felbontóképességét. (László L., 2012.)

A fénymikroszkóp limitált képfelbontó képességével együtt járó probléma kiküszöbölésére rendkívül jó megoldást nyújt az elektronnyaláb alkalmazása. Ennek hullámhossza alacsonyabb a látható fény hullámhosszától, és fordítottan arányos az elektronok sebességével. Tehát minél nagyobb sebességű elektronnyalábbal sikerül „megvilágítani” a mintánkat, annál nagyobb felbontásban láthatjuk. (László L., 2012.)

Ezekben az időkben leírásra került a riboszóma kétdimenziós struktúrája, és még a háromdimenziós szerkezetéről is született egy alacsonyabb felbontású kép. Az első háromdimenziós EM felvételt Jim Lake készítette a riboszómáról 1976-ban. A '70-es évek biokémiai kutatásában elért eredmények valóban csodálatosak voltak, de a riboszómastruktúra maradéktalan feltárása még megoldásra várt. (Williamson, 2009., Puglisi, 2009., Ramakrishnan, 2009.)

A pontos szerkezet feltárásához röntgendiffrakciót kellett volna alkalmazni, de ennek a módszernek az egyik nehéz lépése a megfelelő egykristály készítése a vizsgálandó anyagból. Ada Yonath, aki végül sikeresen készítette el az első háromdimenziós szerkezetfeltárást a riboszóma egy részéről, a Magyar Tudományak így nyilatkozott:

Egy biciklibaleset következtében hónapokig nem tudott laboratóriumi munkát végezni, viszont annál több ideje volt olvasni. Egy jegesmedvékről szóló cikk, miszerint ezek az állatok képesek hibernálni magukat, miközben elcsomagolják riboszómáikat, hónapokra megőrizve azok épségét és működőképességét felkeltette Ada érdeklődését. Ez adta Yonath-nak az ötletet, hogy a Holt-tenger vidékére menjek kutatócsoportjával

baktériumokat izolálni. Találtak is egy törzset, amiből sikerült riboszómakristályokat nyerni. A kikristályosított riboszómát aztán röntgenkristallográfiának vetette alá, amivel sikerült megállapítani annak háromdimenziós szerkezetét. (Gimes, 2012.) Egész pontosan a *Geobacillus stearothermophilus* riboszómájának 50S alegységét sikerült megvizsgálniuk. Néhány évvel később Ada és munkatársai által *Haloarcula marismortui*-ből kinyert 50S riboszómakristályokat 3 Å felbontásban sikerült láthatóvá tenni (Böhlen). A *H. marismortui* egy olyan archeális szervezet, ami a magas sókoncentrációjú Holt-tengerben képes megélni. 1987-ben Marina Garber csapatának sikerült *Thermus thermophilus* törzsből izolálni mind a 30S, mind a 70S riboszómális alegységet. (Trakhanov, 1987)



## ***A riboszóma térszerkezete***

A riboszóma struktúrájának leírása három kutatócsoportnak köszönhető. Ada E. Yonath, Thomas A. Steitz, és Venkatamaran Ramakrishnan eredményeit 2009-ben Nobel-díjjal jutalmazták. (Ramakrishnan, 2010)

A kutatás kezdő lökését Ada 1980-as riboszómakristályosításban elért eredményi adták meg. Yonath rámutatott arra, hogy alacsony hőmérsékleten képesek biológiai kristályok képződni a mintát károsító jégkristályok kialakulása nélkül. (Ramakrishnan, 2010)

Bár Yonath sikerén felbuzdulva a riboszómaszerkezet maradéktalan feltárásához mindhárom kutató a röntgenkrisztallográfiára támaszkodott, ami a kristályos állapotban lévő riboszóma struktúrájának atomi szinten való vizsgálatát teszi lehetővé, a kinyert kristályok néhány tekintetben nagy kihívásokat jelentettek. A megfelelő vizsgálat egyik kritériuma a rendelkezésre álló kristályok megfelelő minősége, a másik pedig a kristályokon történő fázisdiffrakció kiküszöbölése. Erre a problémára Steitz talált megoldást, aminek köszönhetően ez a fajta cryo-krisztallográfiás eljárás manapság már rutinszerűen alkalmazható makromolekulák strukturális vizsgálataira. (Moore és Steitz, 2002.)

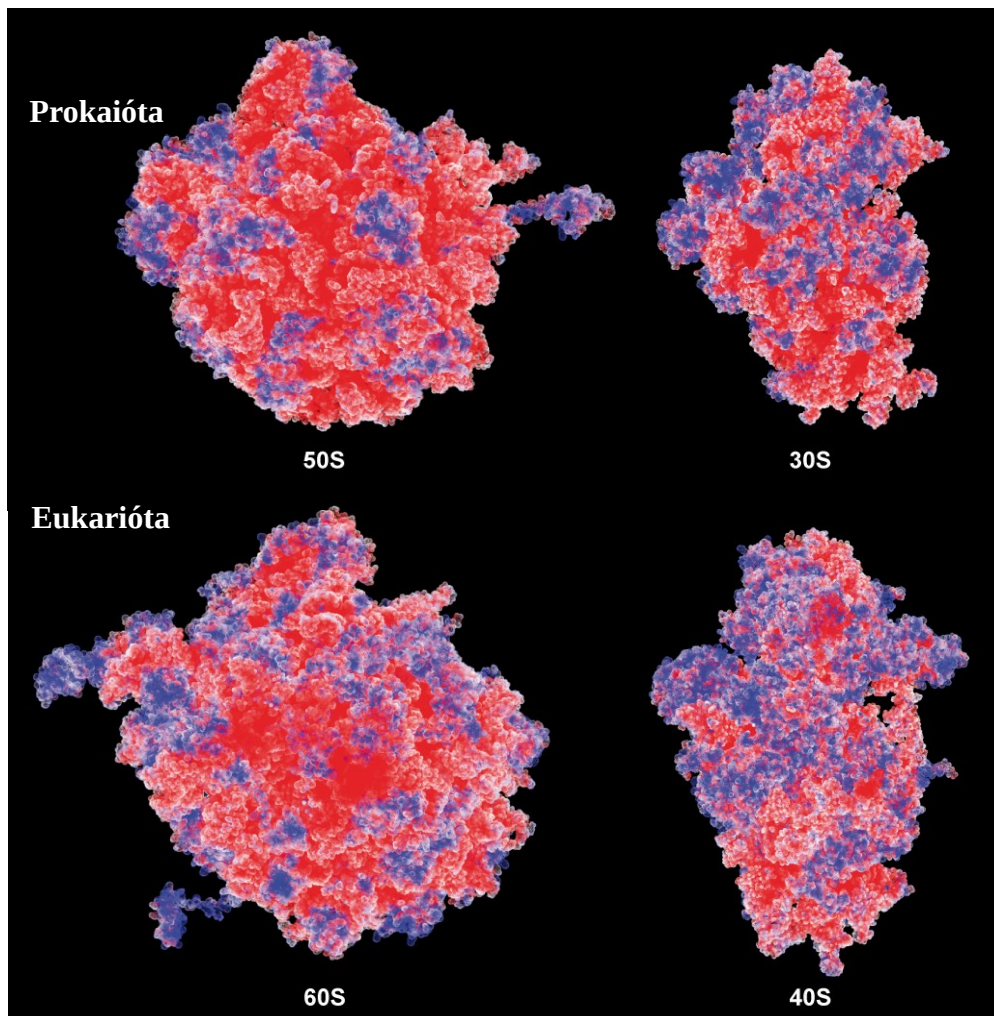
Ezt követően, 1995-ben Steitz kutatócsoportjával nekifogott a riboszóma nagyalegységének szerkezetének feltárásához, mialatt Ramakrishnan a kisalegység szerkezetének leírásán munkálkodott. Ramakrishnan krisztallográfiás kutatása a 30S riboszóma struktúrájának leírásában nagymértékben hozzájárult a teljes riboszómaszerkezet, és a fehérjeszintetizáló apparátus megértéséhez. (Moore és Steitz, 2002, Ramakrishnan 2010.)

Háromjuk munkásságát, és a riboszóma-kutatásban elért jelentős eredményeiket az alábbi táblázat foglalja össze:

**1. táblázat A riboszóma szerkezetfeltárásának története. (Kumar, 2010. alapján)**

<b>Nagy áttörések a riboszóma-krisztallográfiában</b>
<b>1980</b> – Yonath első alkalommal izolál sikerrel kristályos 30S riboszómális alegységet <i>G. stearothermophilus</i> -ból. Steitz és mti. megoldást találnak a „fázis problémára”.
<b>1991</b> – Yonath és kollaboránsai közzéteszik a <i>H. marismortui</i> 50S alegységének 3 Å felbontású struktúráját.
<b>1999</b> – A sugárzási károsodást minimalizáló cryo-krisztallográfia alkalmazása a riboszóma-kutatásban.  Steitz leírja a <i>H. marismortui</i> 50S alegységét 5 Å-ös felbontásban.  <i>T. thermophilus</i> 30S alegységének 5,5 Å felbontású szerkezetének leírása Ramakrishnan által, majd Yonath 4,5 Å-ös felbontása.
<b>2000</b> – Steitz 2,4 Å-ös felbontású szerkezetbecslést ad a <i>H. marismortui</i> 50S riboszómájáról.  <i>T. thermophilus</i> 30S alegységének 3 Å-ös felbontású szerkezetének leírása Ramakrishnantól, amit Yonath 3,2 Å felbontású szerkezetanalízise pontosított.
<b>2001</b> – Yonath leírja a <i>Deinococcus radiodurans</i> 50S riboszómális alegységének magas felbontású struktúráját, ami alkalmas volt a bakteriális riboszóma célzott antibiotikumos kezelésére.  Noller és mti. leírást adnak a <i>T. thermophilus</i> 70S alegységének szerkezetéről 5,5 Å-ös felbontásban, Cate és mti. pedig az <i>E. coli</i> -éről 3,5 Å-ös felbontásban.

A bakteriális és az eukarióta szervezet riboszómái az általános hasonlóságok mellett határozott különbségeket mutatnak (2. ábra). Mindkét rendszer struktúrájára igaz, hogy két eltérő méretű alegység alkotja a szervezet összes riboszómáját. Ezek az egységek funkcionális egészet alkotnak. A két egység között a fizikai kapcsolatot fehérje típusú, úgynevezett hidak (bridge) teremtik meg, és ezek tartják egységben a részeket. A riboszómák külső felszínét borító fehérjeburok a belső, RNS típusú, maggal van kölcsönhatásban, ezek stabilizálják a riboszóma szerkezetét. (Puglisi, 2009., Ben-Shem, 2011., Ban, 2000.)



**2. ábra:** A prokarióta (felül) és az eukarióta (alul) riboszóma térszerkezetének összehasonlítása. A nagy- (balra), és a kisalegység (jobbra) külön ábrázolva. (Ben-Shem, 2011.)

Az előzőekben említett RNS-ek, és fehérjék evolúciós koruk alapján megkülönböztethetők egymástól. A konzervált régiók az eukariótákban is változatlanul jelenlévő területeket jelentenek (Ben-Shem, 2011.). Ilyen erősen konzervált régió például a riboszóma közepén található RNS típusú erősen konzervált, harmadlagos kölcsönhatásokat tartalmazó mag (Ramakrishnan, 2009.), amit riboszómális vagy rRNS-nek neveznek. Erre a magra jellemző a sajátos katalitikus RNS aktivitás (Moore és Steitz 2002), tehát a ribozim funkció is konzervált tulajdonság.

A riboszóma funkcionális és strukturális központjában a három tRNS-kötőhely található:

A-, P-, és E-kötőhely. A- és P-hely együtt adják a genetikai kód dekódolásáért felelős aktív helyet, ahol a fehérjeszintézis zajlik. A kötőhelyek nem lokalizálhatóak a riboszóma kis-, vagy nagyalegységén, mindkettőben jelen vannak, átnyúlnak egyikből a másikba. Ismert formájukat ténylegesen a két alegység kapcsolódásakor veszik fel. Ez a három kötőhely képezi a riboszóma funkcionális magját, kémiai RNS-típusú molekulák. (Calisto B. M., 2011., Krupkin, 2011., Nissen, 2000., Wilson és Cate, 2012.)

Az E – kötőhely mellett, hogy képes kötni a tRNS-t, kapcsolatban van mind a kis-, mind a nagyalegységgel, tulajdonképpen azok között helyezkedik el. Ezenkívül jelentős biokémiai bizonyítékok vannak annak igazolására, hogy az E-kötőhely allosztérikus kapcsolatban áll az A-kötőhellyel. A kutatások szerint, a Bacteriák és Archeák 50S alegységei alapvető hasonlóságokat mutatnak. A két domén E-kötőhelye azonban eltér egymástól. Az Archeák riboszómális nagyalegységén található egy L44e-nek nevezett fehérje, ami kölcsönhatásban van az E-tRNS-kötőhellyel. Ez a protein a Bacteriákból hiányzik, aminek eredményeképpen a kötődő tRNS CCA vége másféleképpen tud elhelyeződni az E-kötőhelyen. (Moore és Steitz, 2002., Fox, 2010.)

A prokarióta riboszóma 70S, kisalegysége 30S, nagyalegysége 50S. Mindkét alegység szerkezetében a két jelentős szerepet játszó molekulatípus az RNS, és a fehérje. A bakteriális 30S kisalegység egy 16S RNS részből, és további 21 db fehérjéből áll. Az alegység teljes atomi szerkezetét *T. thermophilus*-ból izolált kristály alapján sikerült leírni (Trakhanov, 1987). Különös jellemzője a 30S kisalegységnek, hogy a szomszédos riboszóma 16S RNS-ének egy karja belesüllyed az alegység P-kötőhelyébe. Ezen a struktúrán való visszakapcsolás teszi lehetővé a kodon-antikodon kapcsolat megteremtését. (Puglisi, 2009., Ben-Shem, 2011., Ramakrishnan, 2009., Ban, 2000.)

Prokarióták kisalegységének struktúráján elkülönítenek egy head és egy body régiót. Ahol ez a kettő találkozik, ott található a fehérjét is tartalmazó dekódoló központ. Ez a centrum teremti meg a kapcsolatot az mRNS és a tRNS között, olvassa az mRNS szekvenciáját, és kontrollálja a kodon-antikodon kapcsolatokat. (Schlunzen, 2000., Moore és Steitz, 2002.)

A bakteriális riboszóma nagyalegysége két RNS-típusú részt tartalmaz, az 5S, és a 23S RNS-t, amikhez 31 db fehérje kapcsolódik. A belső RNS mag külső felszínét konzervált fehérjék díszítik. Az 50S alegység egy komplex, domének nélküli struktúra, benne

található a erősen konzervált tisztán RNS alkotta peptidil-transzferáz központ, azaz a PTC. A peptidil-transzferáz reakció egy univerzális nukleotidokat tartalmazó hasadékban megy végbe. A PTC működése független a környezeti feltételektől, képes nem-kódolt peptidek előállítására is, és számos funkciója még mindig ismeretlen. A PTC megfeleltethető egy primitív szintetikus gépezet maradékával, ezért ezt a központot sokszor csupán csak protoriboszómaként emlegetik. Az 50S alegység szerkezetének megismerése megerősítette az RNS központi szerepét az élet eredetében. (Calisto B. M., 2011., Williamson, 2009., Puglisi, 2009., Moore és Steitz, 2002., Ban, 2000., Nissen, 2000.)

A bakteriális riboszóma tovább létezik egy úgynevezett faktor-kötő központ, amin a fehérjeszintézis alatt a zavartalan működéshez szükséges faktorok lokalizálódnak. Ide kötnek pl. a GTP-áz aktivitású elongációs faktorok, és a különböző G-proteinek. Ennek a régióknak a szerkezete és működése még kevésbé ismert, ami biztos, hogy nem konzervált struktúra. (Moore és Steitz, 2002.)

Az eukarióta kis- és nagyalegység térbeli elrendeződésében markáns különbségek láthatóak. A bakteriális alegységekhez hasonlóan az eukarióta egységekben is egy központi RNS mag található, amit kívülről számos konzervatív és eukarióta-specifikus fehérjeláncok burkolnak. Az eukariótaspecifikus tulajdonságok alatt elsősorban a felszínen megjelenő, kizárólag eukariótákra jellemző fehérjerégiókat értjük. Ezen régiók fehérjei nagyon jól megkülönböztethetőek a prokariotikus, vagy konzervált felszíni régióktól. Méretük és egyéb egyedi vonásaik alapján, mint például a cinkujj, az eukarióta fehérjék határozottan elkülöníthetőek a prokarióta fehérjéktől, amiket pedig a jellemző oldalláncaik szerint lehet szinte tökéletesen azonosítani. (Ben-Shem, 2011.) A teljes 80S riboszóma részei a 40S kisalegység, és a 60S nagyalegység. A 40S rész áll egy 18S RNS típusú alkotóból, és 33 db fehérjéből. A stabil szerkezet megtartása itt is a fehérjék szerepe. A nagyalegység 5S régióján található egy kidudorodás, vagy CP (central protuberance), ez köti, és hangolja össze a két alegységet, a 40S rész feji részén át. További kontaktpontokat alkotnak a hidak. (Ben-Shem, 2011.).

A riboszóma kisalegységének felszínén lévő fehérjék közül néhány hozzájárulhat a transzlokáció hűségéhez. Ilyen fehérje például az S2, az S5, az S8, vagy az S12 jelű protein. Ezekből a fehérjékből megközelítőleg fél tucat már a régmúltba is a riboszóma felületének adott helyén lokalizálódott. Az evolúció során ezek a proteinek funkcionálisan

összehangolódtak, egy komplex folyamat finomhangolására specializálódva. Ez a folyamat nem más, mint a riboszóma dekódoló mechanizmusa, ami a fehérjeszintézis pontosságának alapja. A dekódoló központ mellett, hogy pontosan olvassa az mRNS által szállított információt, megakadályozhat nemkívánatos kapcsolatokat a nagyalegységgel, vagy az iniciációs faktorokkal. A transláció során nagyalegységgel való kapcsolatot egy RNS-gazdag helyen lévő S12-es nevű fehérje teremti meg. (Schlunzen, 2000.)

Az előzőekből is látszik, hogy az ősi, minimális, a szükségszerű feladatot ellátni képes struktúrára fokozatosan pakolódtak a rendszer finomítására szolgáló egységek. Az eukarióta riboszóma elődjéhez képest rengeteg eukariótaspecifikus felszíni régióval rendelkezik. Ez az építkezés ahhoz vezetett, hogy az eukarióta riboszóma tömege mintegy 40%-al nagyobb a bakteriális riboszóma tömegénél. A Bacteria szerelvény molekulatömege megközelítőleg 2,5 MDa, míg az eukariotikus szerelvény molekulatömege 4 MDa-t tesz ki. (Ben-Shem, 2011., Krupkin, 2011.)

## **Ribozim**

### ***Mit keres az RNS a riboszómában?***

Az élő szervezetek egyik nélkülözhetetlen és igen sokrétű molekulatípusai a fehérjék. Ezek közvetítik többek között a genomunkban meghatározott külsőkre jellemző sajátosságokat, vagy a bennünk lezajló biokémiai folyamatokat. A fehérjék szervezetünkben termelődnek, viszont építőköveit a külső környezetünkből kell felvennünk. A szervezetbe bekerült aminosavak a bélrendszerből felszívódva a sejtekbe jutnak, ahol tRNS molekulákhoz kapcsolódnak, majd a fehérjeszintézis során beépülnek a fehérjeláncba. Mindebből látszik a riboszóma és biokémiai folyamatainak nélkülözhetetlen szerepe. (Cech, 2003.)

A riboszóma szerkezetének kialakításában, mint már láttuk, fehérje- és RNS-típusú molekulák egyaránt részt vesznek. Bár a riboszóma tömegét nagyobb részben az RNS teszi ki, a bakteriális riboszómában ez az arány mégis csupán három darab RNS molekulát jelent, amíg a fehérjetípusú alkotók száma meghaladja az ötvenet. A nagyszámú fehérjemolekula ellenére a riboszóma aktív helyét paradox módon kizárólag RNS alkotja (Nissen, 2000). A riboszómális RNS-t emiatt a sajátos, fehérjeenzimekhez hasonló katalitikus aktivitással bíró tulajdonsága miatt nevezik ribozimnek. (Calisto B. M., 2011., Cech, 2003.)

Úgy tűnik, hogy az ősi RNS alkalmas volt a genetikai információ hordozására, és emellett biokémiai folyamatok katalitikus felszínén is szolgált (Kun 2011) Kezdetben még szubsztrátjai is RNS molekulák voltak, majd az egyre nagyobb számban megjelenő, és elterjedő aminosavakhoz alkalmazkodva egy, a peptidkötés kialakításáért felelős gépezetté, és ezzel együtt a fehérjeszintézis központi molekulájává vált. (Krupkin, 2011., Cech, 2003.)

### ***Az RNS feladata, és a riboszómális fehérjék szerepe***

A riboszóma fehérjetípusú alkotói főleg annak felszínén helyezkednek el. Egyes elméletek szerint az evolúció során később megjelenő fehérjék megpróbálták leváltani a riboszóma katalitikus szerepét. A riboszóma fehérjeszintézisben évmilliók óta betöltött szerepe kémiai érvekkel is alátámasztható. Egy RNS-világban a riboszóma szubsztrátjai szintén RNS-ek voltak, úgy mint az aminoacil-tRNS, vagy az mRNS. Egy RNS molekula jól alkalmazható



bázispárok, bázishármasok, vagy egyéb reakciókon keresztül más RNS molekulák azonosítására. (Cech, 2003.)

Az RNS-en lévő fehérjék közül néhánynak igen szokatlan, kígyó-szerű szerkezete van, ezeknek nem alakult ki a térszerkezetüket adó harmadlagos struktúrájuk, sőt, sokszor még a H-hidak kialakította másodlagos szerkezetük is hiányzik, mint például az  $\alpha$ -hélix, vagy a  $\beta$ -lemez. Ennek a szerkezeti egyszerűségnek, és egyben érdekességnek feltehetően ezen fehérjék és az rRNS-ek között kialakított kölcsönhatás az oka. Bár a riboszómán végbemenő folyamatokat az RNS-ek katalizálják, a fehérjék szerepe sem elhanyagolható. Kutatások szerint, ha csökkentjük a riboszómán lévő fehérjék számát, nem feltétlenül tapasztalunk érdemi változásokat annak működésében. Viszont ha teljesen kiirtjuk a proteineket a riboszóma felszínéről, akkor megszűnnek az rRNS-en végbemenő reakciók. Mivel a katalitikus folyamatokhoz a fehérjéknek nincs közük, ezért ezt a jelenséget azzal magyarázzák, hogy fehérjék mintegy támaszt alkotva stabilizálják, és orientálják az egyébként igen laza szerkezetű rRNS-t, segítve ezzel annak működését. (Cech, 2003.)

Michael Yarus 1995-ben (Welch, 1995), a riboszóma ribozim jellegének felfedezése előtt, olyan kísérletet végzett, amellyel RNS-RNS interakciót mutatott be a translációs kötőhelyeken. Kísérletében a riboszóma működését egy inhibitor alkalmazásával vizsgálta. Ez az inhibitor a transláció folyamatának nukleofil támadása során keletkező tetrahedrál intermediérral volt analóg. Az inhibitor képes kötni egy puromicin molekulához, ami tulajdonképpen egy aminosavat tartalmazó tRNS analóg, és képes még kapcsolódni a CCA szekvenciához. A így kialakult CCA-foszfát-puromicin molekula a peptid-transzferáz aktivitás inhibitorának felel meg, és a CCA szekvencián keresztül tulajdonképpen képes kötni önmagát a nagyalaegységhez. Yarus kísérletével bebizonyította, hogy ez a molekula fehérje jelenléte nélkül kötődik egy tisztán RNS típusú régióhoz, ami alátámasztja a riboszóma ribozim jellegét.

A riboszóma mai létének, és nagyfokú konzerváltságának egyik igen meggyőző magyarázata annak szerkezetében rejlik. A fehérjeszintézis folyamata igen komplex, a fehérjelánc építőköveit össze kell gyűjteni, a szintézis helyére kell szállítani. Ehhez gyors mozgású mobilis molekulákra van szükség, és egy olyan rendszerre, ami hatékonyan tudja befogadni ezeket az alkotókat, hatékonyan tudja őket egymáshoz csatolva láncá formálni, és mindemellett a genetikai kód hűségét is meg tudja tartani. Ezeket a feladatokat az RNS



különböző változataival mind képes ellátni. A tRNS felelős az aminosavak begyűjtéséért, megkötéséért, a tRNS amino-acilációja az amino-acil-tRNS szintetáz enzimek végzik. A tRNS és az mRNS bázishármasokon (triplet) keresztül felismerik egymást, és kapcsolódnak, az mRNS bázissorrendje megegyezik a DNS kódoló szálának bázissorrendjével. Maga az rRNS pedig nagymértékű konformációs változásaival lehetővé teszi mind az mRNS, mind pedig a tRNS megkötését, és azok dinamikus mozgását. Ezek a mozgások és képességek (és még ezeken kívül számos másik) mind együtt szükségesek a fehérjeszintézis zavartalan lebonyolításáért. (Cech, 2003.)

A riboszóma működésének tökéletessége abból is látszik, hogy évmilliókon keresztül ellenállt az evolúciós nyomásnak, és mindenfajta környezetváltozás ellenére megtartotta stabilitását. A riboszómában található rRNS különlegessége abból fakad, hogy egy olyan alkotóját képezi a fehérjeszintézisnek, ami az aminosavakat összekapcsoló peptidkötés katalitikus felületéül szolgál. Az RNS molekulák nagy változatossága, és olyan specifikus tulajdonságaik, mint például a genetikai információhordozás képessége tökéletesen alkalmassá tesznek egy RNS típusú rendszert a fehérjeszintézisre. Mindezekből látszik, hogy az rRNS egy, a prebiotikus-világból fennmaradt ribozim, évmilliók túlélője, egy élőkövület az RNS-világból. (Krupkin, 2011.)

## ***A riboszóma evolúciója***

A ma élő összes szervezet egy valaha élt közös őstől származik. Ezt az egysejtűt a szakma csak LUCA néven emlegeti, ami az angol „last universal common ancestor” kifejezés mozaikszava, magyar jelentése „utolsó univerzális közös ős”. A LUCA-ban lezajló translációs folyamatok sok résztvevőből állhattak, komplexitásuk univerzális lehetett, utalva arra, hogy a fehérjeszintézis eme folyamata már a LUCA előtti időkben is igen fejlett volt. Hogy valójában mi volt a LUCA előtti időkben, azt nem egyszerű megválaszolni. Annyi biztos, hogy a PTC, illetve a tRNS egyértelműen a pre-LUCA-ból származik. (Fox, 2010.)

A modern riboszóma a fehérjeszintézis katalizálásáért felelős molekuláris gépezet, a peptidkötés kialakítása azonban nem biztos, hogy mindig ehhez a struktúrához volt kötve. A peptidkötés spontán módon nem tud létrejönni, ehhez előtte aktiváció kell. Lehetséges, hogy aktivált aminosavak létrejöttek prebiotikus körülmények között, de fehérje enzimek spontán létrejötte és evolúciója erősen vitatható (Vasas, 2011.). Így a fehérjék és a fehérje szintézis eredetét valahol máshol kell keresnünk.

Az élet keletkezésével kapcsolatos legáltalánosabban elfogadott elmélet szerint az első élő rendszerekben mind az információhordozás és a katalízis funkcióját RNS molekulák töltötték be (Kun, 2011.). Az RNS molekulák, az intramolekuláris hidrogénhidak révén kialakuló összetett térszerkezetüknek és oldalcsoportjaiknak köszönhetően enzimeként is működhetnek. Ez az enzimefunkció maradt meg a riboszómában is (Moore and Steitz, 2002.). A riboszóma magja minden bizonnyal a fehérjeszintézis előtről, az RNS-világból eredeztethető (Fox, 2010.). A riboszóma PTC régiójában nem találunk fehérjéket, a szerkezetét  $Mg^{2+}$  interakciók stabilizálják. A  $Mg^{2+}$  ionok fontos szerepet töltenek be szinte minden ismert ribozim működésében.

A PTC szerkezete az élőlények körében, ideértve a prokariótákat, eukariótákat és a bennük lévő mitokondriumokat is, általánosan közel szimmetrikus. A PTC mindkét fele összhangban van a két tRNS-kötőhellyel. Nagy meglepetést okozott a kutatók számára, hogy a riboszóma aszimmetrikus szerkezetében egy szinte tökéletes szimmetriával rendelkező struktúrát találtak. Ezt a furcsaságot három faj, az *Escherichia coli*, a *Haloarcula marismortui*, és a *Deidococcus radiodurans* vizsgálatai során fedezték fel

(Krupkin, 2011., Fox, 2010.). A PTC szokatlan struktúrájának a megőrződése, és a kivételesen magas, 95% feletti szekvekciakonzervációja is arra enged következtetni, hogy ez a régió egy korábbi világ maradványa (Calisto B. M., 2011., Krupkin, 2011., Fox, 2010.).

Az, hogy az RNS-világ mennyire fejlett lehetett még nem teljesen tisztázott. Biokémiai akadálya nem ismert, hogy akár a mai anyagcserével összevethető összetettséggű reakcióhálózatokat katalizáljanak ribozimek. Vannak akik, például Fox (2010.), a mellett érvelnek, hogy az RNS-világ sohasem fejlődött tovább a 20-50 nukleotidos oligomerekből álló ribozimeken, amelyekbe egy replikáz nem fér bele. Ezen állítást leginkább az RNS függő RNS polimeráz hiányára alapozzák.

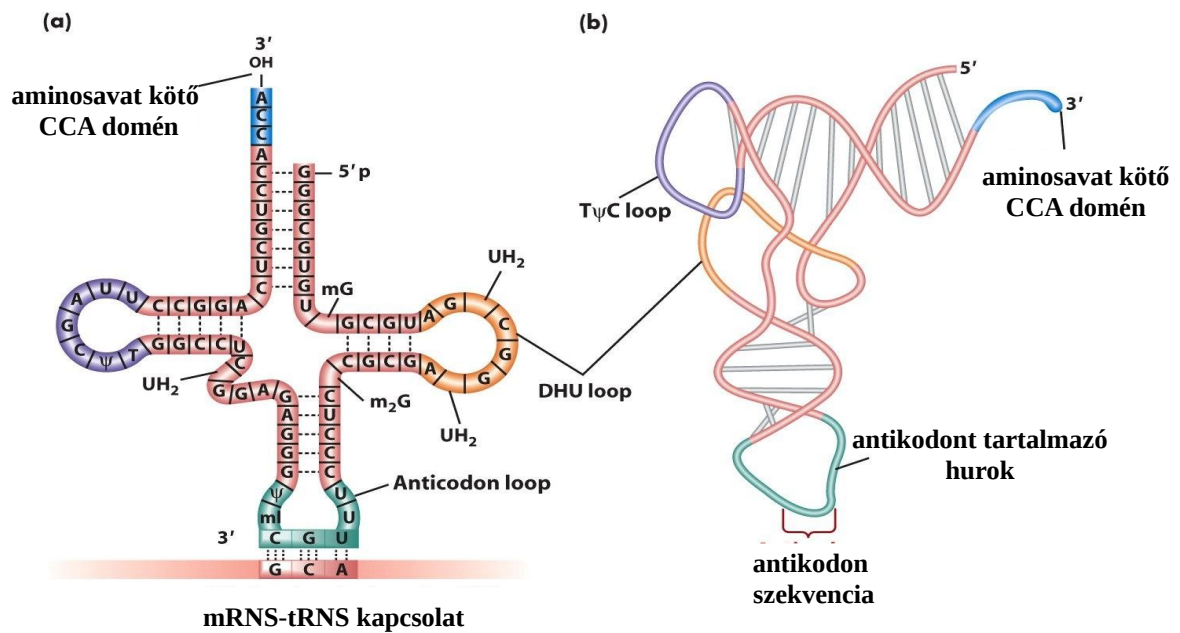
Az összetett RNS-világot feltételezők szerint a fehérjeszintézis felé vezető evolúciós úton az első lépés minden bizonnyal a genetikai kód kialakulása volt (Szathmáry és Maynard Smith, 2000.). Ez a lépés már egy anyagcseréjében összetett RNS-világban jött létre, amelyben RNS alapú, RNS polimeráz már létezett, s hosszabb RNS szállak másolása, sőt egész kromoszómák másolása is lehetséges volt. Az aminosavak úgy jöhettek a képbe, hogy önmagukban is képesek a ribozimok katalitikus képességét tovább javítani, s egy kisebb, RNS fogantyúhoz kapcsolva koenzimként működhetnek. Ez az RNS fogantyú lehetett a tRNS őse, amelyből duplikációk által a tRNS mai formája kialakult (Tamura, 2011).

A másik elmélet szerint, amely csak igen kezdetleges ribozimeket feltételez, replikáció nélkül (bár például Kun (2011) szerint elengedhetetlen ennek az enzimfunkciónak a korai kialakulása) az ősriboszóma feladata az aminosavak egymáshoz fűzése volt, viszont nem mRNS templáton, csak összevissza. Az így keletkező struktúráatlan fehérjék a szerkezet stabilitásában részt vehettek, ezzel javítva a ribozimek működőképességét. Ez a gondolatmenet rámutat, hogy bár a jelenkori szervezetekben a D-izomerű cukorral rendelkező királis rRNS és tRNS molekulák a fehérjeszintézis során szintén királis L-aminosavakból felépülő fehérjéket készítenek, de a D izomert is képes kötni. A mostani világban az enantioszelektivitás fontos a fehérjék harmadlagos szerkezetének kialakításánál, ugyanis a kevert kiralitású aminosavak nemkívánatosak az alfa-hélixek, és béta-lemezek felépítésében. A mai fehérjékben a D-izomer tipikusan csekély számban van jelen, a kizárólagosság valószínűleg kiralitás-szelekció eredménye. Az ősi fehérjeszintetizáló

apparátus szignifikánsan kevésbé lehetett kiralitás-specifikus, mint a ma működő rendszer (Fox, 2010.). A különböző peptidek a rendszerben kevert kiralitással voltak jelen, de a szintézis folyamata már a korai szakaszban is az L-izomerű ribózt preferálta, visszaszorítva ezzel a D-izomer jelentőségét. (Fox, 2010.)

Az elmélet továbbvitelében a riboszóma keletkezése összefonódik a tRNS evolúciójával. A riboszóma magját két kis RNS, a PTC RNS, és tRNS alkotja. A fehérjeszintetizáló rendszerben a peptidkötés kialakulásának feltétele a PTC és a tRNS közti kapcsolat létrejötte (Fox, 2010., Tamura, 2011.). Mindkét RNS hossza kevesebb mint 100 nukleotid, azaz talán egy kezdetleges RNS-világot feltételezve is létrejöhettek (csak hogyan örökíthették tovább magukat replikáz nélkül?). Továbbá a mai PTC-t két darab L-formájú domén alkotja, a tRNS jellemző térszerkezete szintén L alakú. A PTC két egysége külön-külön hasonló méretű, mint egy darab tRNS molekula. Feltételezhetően az egykori proto-tRNS egy duplikációval az evolúció során egy minihélixet formált. Ez a minihélix aztán tovább evolválódott, egyes molekulák egymással kapcsolatba lépve a PTC riboszómális RNS kialakítása felé vezető úton indultak el, mások pedig funkcionális tRNS-é alakultak. (Tamura, 2011.)

A tRNS-t is két domén alkotja. Az egyik L-forma rövidebb karján található, aminosavakat vagy a peptidláncot kötő CCA szekvenciát tartalmazza. A hosszabb karon, a másik doménon egy antikodont tartalmazó régió van, illetve egy hurok, ami megteremti a kapcsolatot az mRNS-el (3. ábra). Itt megint van némi vita az irodalomban, van aki a CCA régió ősiségét feltételezi, s vannak, akik az antikodont tartalmazó régió ősiségét. Az előbbi támogatói az elképzelést arra a tényre építik, hogy a CCA domén készséggel köt aminosavakat a „minihélixet” formáló tRNS-hez. Maga az aminoaciláció enzim és ribozim segítségével is végbemehet. Mai tudásunk szerint, amikor az a bizonyos „minihélix” beépül a nagyalegységbe, akkor ő maga vesz részt a peptidkötés kialakításában. (Fox, 2010.)

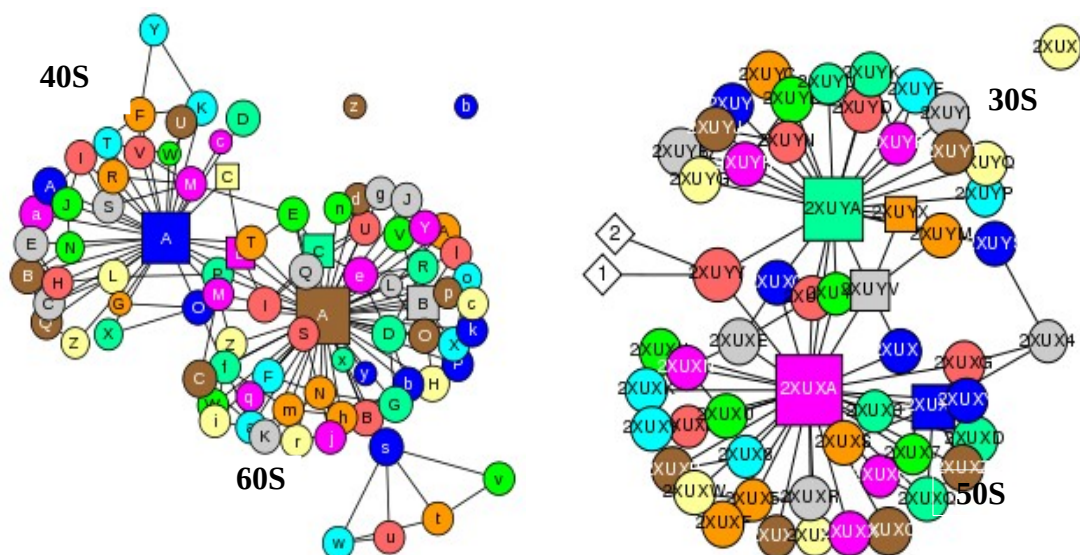


**3. ábra:** A tRNS szerkezete. Az *a)* kép jelöli a tRNS-ben lévő bázispárosításokat, és az mRNS-el való kapcsolatot a bázishármasok alapján, illetve a 3' végén lévő CCA szekvenciát, ami az aminosavakat köti. A *b)* képen a tRNS térszerkezete látható. (<http://barleyworld.org>)

Érdekes, hogy mindkét tRNS eredet elmélet szerint a két domén önmagában is elegendő volt a tRNS feladatainak ellátásához. A rövidebb, egyszeres doménű molekulát egyszerűbb lehetett előállítani, mint egy némileg nagyobb méretekkel rendelkező, bonyolultabb szerkezetű, több doménes tRNS-t (Fox, 2010.). Ennek fényében felmerül a kérdés, hogy mégis hogyan tudnak az olyan nagy komplexitással bíró struktúrák, mint a modern tRNS-ek, vagy a PTC RNS létrejönni, egy konkrétan működő RNS-replikáz nélkül. Erre két magyarázatot vetett fel Fox (2010.). A lóhere alakú tRNS-nél megfigyelték, hogy direkt duplikációval is létrejöhet és így végső szerkezete kialakítható a megfelelő *stem loop* struktúrák ligációjával. Ennek bizonyítására a kutatók az összes ma látható terciér tRNS kölcsönhatást létre tudták hozni két megfelelő *stem loop* összeligálásával. Az RNS-ek előállításának másik módja a kisméretű fragmentumok hibridizációja, aminek eredményeképpen kis szakaszokból felépülő nagy RNS molekulát kapunk. Ezek a kis fragmentumok a „nick” nevet kapták. Az élővilágban ligációs tRNS előállításra példa az Archea doménbe tartozó *Nanoarchaeum equitans*, aminek különböző tRNS-ei ligációval alakítják a teljes tRNS-t. Az *Euglena gracillis* nevű eukarióta ribszómális nagyalegsége

14 RNS fragmentumból áll össze (Fox, 2010.).

A riboszóma evolúciója során, egyre komplexebb struktúrák jelentek meg. Kialakult az tRNS mai formája és a PTC RNS jelenlegi megjelenése. A PTC a mai riboszómákban egy univerzálisan konzervált struktúráként jellemezhető. Tisztán RNS típusú, katalitikus aktivitású régió (Moore és Steitz, 2002.), a nagyalegység A-, és P-kötőhelyét foglalja magába, s mint később látni fogjuk, az elongáció reakciói ebben az úgynevezett peptidil-transzferáz központban mennek végbe. Térszerkezetét egyetlen egybefüggő, hatalmas, magába visszaforduló RNS-szál alkotja. Mivel fehérjét egyáltalán nem tartalmaz, működésének alapja ez az egy RNS-molekula. A másodlagos struktúra elemzése azt mutatják, hogy a nagyalegység RNS-ét hat domén építi fel, s az V. doménhez kapcsolva foglal helyet a PTC. A különböző távoli régiók közti összeköttetések információkat adhatnak a történeti időzítésekről (4. ábra). Az idősebb régióknak több idejük volt kapcsolatokat kiépíteni, integrálni a struktúrában. Ezen idős régiók átfedései kirajzolnak egy minimális, ősi magot. A kapcsolatok feltérképezése alapján a nagyalegység IV., V., és II. doménjei egyaránt nagyon öregnek minősülnek, de közülük a II. domén a legidősebb. Az interakciók szerint a PTC régió szintén tekintélyes evolúciós korról bír. (Fox, 2010.)



**4. ábra:** Bal oldalon az eukarióta riboszóma kapcsolatrendszere látható, az ábra jobb oldalán pedig a prokarióta riboszómáé. A színes téglalapok RNS-típusú molekulákat jelölnek, a körök egy-egy fehérjével azonosak. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Az előzőekből az látszik hogy az RNS esszenciálisan csak minimális változékonyságú régiókból épül fel. Ez alól a GTPáz régió mutat kivételt, ugyanis ez a fehérjeszintézis alatt konformációs változásokon megy keresztül, így nincs kölcsönhatásban más régiókkal. A GTPáz nagyalagységhez való hozzáadása a LUCA időszak végére tehető. A rendszer ezzel az enzimmel való kiegészítése lehetővé tette, hogy a riboszóma egy aktivált folyamatok ellenőrzésére, és direkt mozgásra képes mechanikus munkát végző molekuláris méretű struktúra legyen. (Fox, 2010.)

Az mRNS mai formájának kialakulása egy „rögzítési” RNS-el vette kezdetét. Ebből később egy templat-RNS evolválódott, végül pedig az mRNS. A kisalegység őse feltehetőleg a pre-LUCA időszakból származik. (Fox, 2010.)

A poszt-LUCA-ba forduló időig a riboszóma evolúciójának jelentős része már lezajlott. A riboszóma finomítására szolgáló utolsó lépések közé tartozik az E-kötőhely létrejötte, illetve az L1 fehérjével való kibővülése. A riboszóma A-, és P-tRNS-kötőhelye fehérjekapcsolataikból ítélve evolúciósan ősbib az E-helynél, az E-kötőhely feltehetően poszt-LUCA eredetű. A kutatók az E-, és P-kötőhelyet tüzetesebben átvizsgálva a protein-RNS mimikri figyelemre méltó példáját tárták fel. A P-hely tRNS-e interakcióban van a kisalegység H30 nevezetű hélix-struktúrájával, és hasonló kapcsolat figyelhető meg az E-kötőhely és egy S7 nevű protein között. (Schluenzen és mtsai., 2000., Fox, 2010.)

Ha a kezdetekben a primitív riboszóma csupán RNS-t tartalmazott és a bioszintézis folyamata csupán két tRNS molekulát kívánt meg, név szerint az A- és P-kötőhelyet, akkor lehet, hogy az S7 a riboszóma felszínével kontaktusba kerülve új funkciót kölcsönzött egy régiójának, kialakítva ezzel az E-kötőhelyet. Ezzel együtt harmadik tRNS-kötő pozícióvá evolválódott. Az S7 fehérje változásai finomíthatták az E-kötőhelyet, ami aztán asszisztálhat az újonnan szintetizálódott fehérjelánc poszt-transzlokációs kilépéséhez a riboszómából. (Schluenzen és mtsai., 2000.)

A fentebb vázolt evolúciós út, minél közelebb kerülünk a jelenhez, annál több evidenciát mutat. Korai szakaszai még megosztják a tudós társadalmat, itt főleg a riboszómával foglalkozók által elővezetett elméletre összpontosítottam. Az összetett RNS-világot feltételezők szerint a riboszóma későn jelent meg, amikor az RNS-világ készen állt, hogy átadja helyét az RNS-fehérje világnak. Az RNS-világ és a kezdetleges riboszóma közötti

evolúciós út körüli tisztázatlanságoktól függetlenül két dolog biztosnak tűnik: (1) A biokémiai reakciókat ma alapvetően fehérjék végzik, ez alól általánosságban csak az rRNS kivétel. Bár ismerünk más, természetes RNS enzimeket (ribozimeket) is, azok taxonómiai eloszlása korlátozott. Bár mesterséges szelekcióval rengeteg fajta ribozimot létrehoztak, s így az RNS-ek katalitikus repertoárja bizonyítottan széles (Lilley, 2011.), az aminosavak változatosabb oldalláncai többféle fehérje szerkezet és kémiai környezet kialakítására ad lehetőséget. A fehérje enzimek nagyobb katalitikus aktivitása és szélesebb enzimátikus repertoárja magyarázza, hogy milyen szelekciós nyomás vezetett elterjedésükhöz a ribozimek rovására. (2) A riboszóma minden élő szervezetben jelen van, s mindegyikben az RNS rész végzi a peptidil transzfert. Magjának szerkezete és működése az RNS-világ végétől, minden bizonnyal jóval a LUCA előttől változatlan.



## ***A végső feladat, a fehérjeszintézis***

A riboszóma központi szerepet játszik az élő organizmusok biokémiájában. Ez a sejtalkotó végzi a szervezet fehérjéinek szintézisét. A négyféle nukleinsavból felépülő genetikai kód szekvenciája húszféle aminosavat tartalmazó fehérjelánccá fordítódik le. Ez a folyamat a DNS-ben tárolt információ lefordításának megfelelően a transláció nevet kapta. (Calisto B. M., 2011.) A folyamatban, fő komponensként, a riboszóma mellett az mRNS és a tRNS-ek vesznek részt.

A riboszómális alegységek a sejtben, ha nem megy végbe rajtuk a fehérjeszintézis, nem komplexet alkotva vannak jelen, hanem disszociált állapotban. A részek a fehérjeszintézis kezdetekor kapcsolódnak egymáshoz. (Moore és Steitz, 2002.)

A dupla-szálú DNS egyik szála hordozza általában az információt (egyes baktériumokban és vírusokban mindkét szél hordozhat információt). Az információs szállal azonos mRNS (eukariótákban a pre-mRNS) a komplementer szál átírásával kapható. Eukariótákban a pre-mRNS-ből az intronok kivágásával kapjuk a végső, érett mRNS szálát. Az mRNS tripletjei hordozzák a szintetizálódó fehérje szekvencia sorrendjére vonatkozó információt. (Moore és Steitz, 2002.)

A transláció másik igen fontos szereplője a tRNS, ami az mRNS bázis-tripletjeivel korrespondáló antikodon szekvenciát tartalmaz, továbbá magán hordozza az antikodon szekvenciának megfelelő aminosavat. A lefordítás alapját képező genetikai kódot az aminoacil-tRNS szintetáz enzimek "tudják". Ezek az enzimek rakják fel a megfelelő aminosavat a megfelelő tRNS-re, így biztosítva a genomban kódolt információ pontos lefordíthatóságát. (Moore és Steitz, 2002)

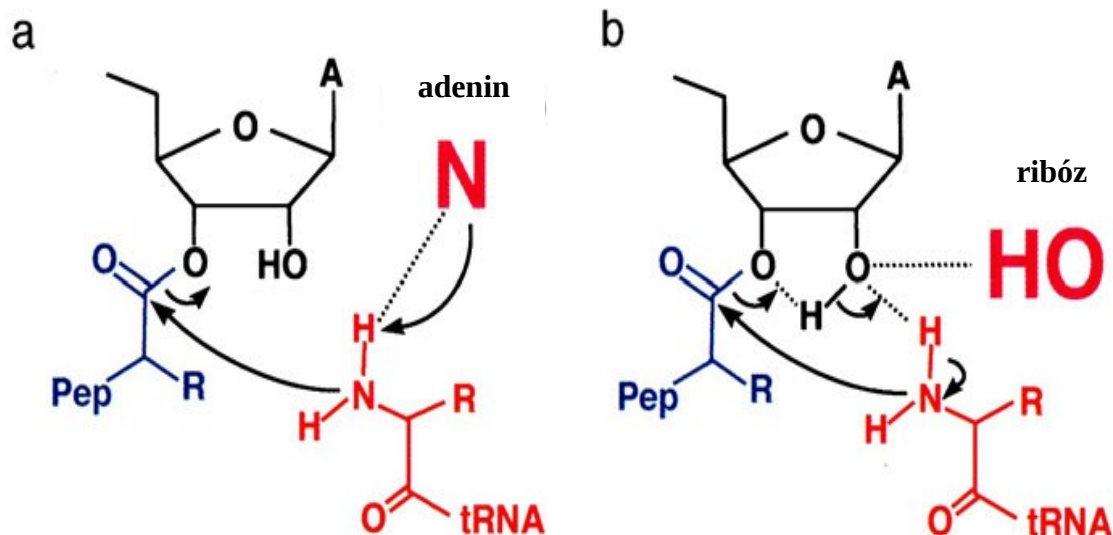
A riboszómális alegységek a fehérjeszintézis előtt a sejtben disszociált állapotban vannak jelen, s csak a fehérjeszintézis kezdetekor kapcsolódnak egymáshoz. Az mRNS kódjának olvasása 5' – 3' irányba halad, az aminosav polimer építése a N-terminálistól a C-terminális felé zajlik. (Moore és Steitz, 2002.)

A transláció három részfolyamatból tevődik össze: Az iniciáció, mint neve is mutatja a szintézis kezdeti lépését adja meg, iniciálja a folyamatot. Prokariótákban az mRNS START-kodonja előtt nagyjából 5-9 nukleotiddal található a 7 nukleotidból álló jellegzetes

AGGAGGU Shine-Dalgarno szekvencia (SD, szerepére John Shine, és Lynn Dalgarno tett javaslatot), ami az antikodon szekvenciájával kötésben segíti az iniciációs-kodon körüli preiniciációs komplex kialakulását. (Nakagawaa, 2010.)

Eukariótákban az iniciáció másképp zajlik. A kisalegységhez kapcsolódik egy metionin aminosavat tartalmazó aminoacil-tRNS molekula. Aminoacil-tRNS-ből egy-egy sejtből rengeteg van, alapvető szubsztrátja a translációnak. Eltérő szekvenciákkal rendelkeznek, viszont molekulatömegük, másodlagos struktúrájuk (egy-egy oldalágakban levő kisebb eltérésekkel), és L alakú harmadlagos szerkezetük megegyezik. Ezek a tRNS-ek hordozzák magukon a fehérjéket felépítő aminosavakat. A kisalegység és tRNS kapcsolódását követően a komplex találkozik az mRNS szállal, és reakcióba lép vele. A kapcsolat az L alakú (kettős hélix) aminoacil-tRNS struktúra hosszabb szárának disztális végén lévő antikodon szekvencia, és az mRNS kodon szekvenciája között jön létre. A fehérjeszintézis kezdő START kodonja minden esetben a metionin aminosavat (Met) kódoló AUG bázishármas. Az aminosav és a tRNS közti kötést az aminoacil-tRNS-szintetáz katalizálja, észter kötés kialakításával. Ha a metionint hordozó tRNS sikeresen hozzáköt egy mRNS START-kodonjához, akkor a riboszóma kisalegysége asszociál a nagyalegységgel. Ez a kölcsönhatás az L-formájú tRNS rövidebb karjának disztális végén lévő CCA szekvenciának köszönhető. Ekkor kezdődik meg a tényleges fehérjeszintézis. (Moore és Steitz, 2002., Nakagawaa, 2010.)

A transláció második szakasza az elongáció. Ebben a szakaszban újabb és újabb aminosavakat tartalmazó tRNS molekulák lépnek be a komplexbe, amik ha komplementerek az mRNS bázishármasaival, folyamatában hozzákötnek a proteínlánchoz. Az aminosavak polimerizációja tulajdonképpen a riboszóma P-kötőhelyén történik, folyamatát elongációs faktorok segítik. A riboszómában bent lévő tRNS-en lévő aminosav központi alfa-C-atomja felé a második, belépő tRNS aminosavjának aminocsoportja nukleofil támadást intéz (5. ábra). Kölcsönhatásuk következménye egy tetrahedrális karbonil-C intermedier, amit egy oxianion stabilizál. Ebben az állapotban H<sup>+</sup>-mozgás történik az új, A-helyen lévő tRNS aminosavja felől a régi, P-helyen kötött tRNS irányába. Ezek a reakciók az előzőekben már említett PTC-ben mennek végbe a nagyalegységen. (Moore és Steitz, 2002., Nissen, 2000., Nakagawaa, 2010.)



**5. ábra:** A nukleofil támadás mechanizmusa. Az ábrán jól látszik, ahogy az újonnan belépő aminosav (piros) aminocsoportja támadást indít a már bent lévő aminosav (kék)  $\alpha$ -szénatomja felé. (Tamura, 2011.)

A folyamat következő lépéseként a P-n lévő tRNS deacilálódik, és továbblép az E-kötőhelyre, ahol kilép a rendszerből. Az aminosavak egymáshoz kapcsolódnak, hosszabbítva ezzel a fehérjeláncot. Ahogy felszabadul a P-hely, az A-helyen kötött tRNS továbblép a P-kötőhelyre, a riboszóma pedig három nukleotiddal továbbhúzza az mRNS-t, szabaddá téve ezzel az A-kötőhelyet egy újabb tRNS belépéséhez. Mindeközben a fehérjelánc hosszabbítását elongációs faktorok szabályozzák. (Moore és Steitz, 2002., Nissen, 2000.)

A harmadik, végső szakasz a termináció. Az mRNS szálon háromféle úgynevezett STOP-kodon egyike szerepel, ezek a szintézis végét jelentik. Amikor a riboszóma egy ilyen STOP-ot kódoló bázishármashoz ér, megakad, egyik tRNS antikodonja sem komplementer ezzel a triplettel. Ekkor egy terminációs faktor köt a riboszómához. Ez megváltoztatja az aktív hely konformációját, és segíti az újonnan szintetizálódott polipeptidlánc leválását a riboszómáról. A folyamat befejeztével az alegységek disszociálnak. A kisalegység újratöltődik metionint tartalmazó tRNS-el, a szintézisben rész vevő partikuláris fehérjék pedig visszatérnek kiindulási helyükre, lehetővé téve ezzel egy új transzláció folyamat kezdetét. Az újonnan szintetizálódott fehérjelánc egy kb. 100 Å széles alagúton keresztül távozik a riboszómából a nagyalegységen. A fehérjeszintézis energiaigényét a guanozintrifoszfát bontása fedezi. (Calisto B. M., 2011., Puglisi, 2009.)

## ***Következtetések***

A földi élet kialakulása egy hosszú és máig feltáratlan folyamat. Nehéz ugyan elképzelni, hogyan alakulhat élővé az élettelen, de az biztos hogy a mai bonyolult felépítésű, komplex biokémiai folyamatokat igénylő szervezetek apró, mikroszkopikus nagyságrendű molekulákból nőttek ki magukat. Ezek közül a kisméretű struktúrák közül sokan túlélték a környezeti viszontagságokat, a folyamatos változásokat, és még a ma élő szervezetekben is jelen vannak. A riboszóma is ezek közé a molekulák közé tartozik.

Egy valaha volt RNS-világban prebiotikus körülmények között a nukleinsavak felépítéséhez szükséges építőkövek már hozzáférhetőek voltak. Ezek kezdetben rövid RNS molekulákká állhattak össze, majd oligonukleotidot képezve makromolekulákká alakultak, végül pedig kialakultak a katalitikus aktivitással rendelkező prebiotikus gépezetek. Egyikük, a riboszóma a fehérjeszintézis apparátusává fejlődött, és hatékonyságának, illetve stabilitásának köszönhetően, még ma is ez a sejtalkotó felelős az élő rendszerek számára nélkülözhetetlen fehérjék előállításáért.

Riboszómával kapcsolatos kutatások már az '50-60-as években is folytak, de a szerkezetének megismeréséből fakadó nagy eredmények csak a közelmúltban születtek meg. Bár a riboszóma prebiotikus eredete már nem kérdéses, és már struktúráját is szinte maradéktalanul sikerült leírni, egyes régiók, mint például a PTC funkcióinak feltárása még várat magára, és szintén a jövő kutatóira vár még a riboszóma különböző evolúciós elméleteinek letisztázása, és egy egységes kép megalkotása.

## **Összefoglalás**

A riboszóma, mint egy univerzális sejtalkotó központi szerepet játszik az élő szervezetekben, feladata a fehérjeszintézis, más néven a transzláció. A transzláció során a DNS-ben kódolt genetikai információ fordítódik le aminosavak nyelvére, ezzel fehérjéket képezve.

A riboszómát két alegység alkotja, ezeket üledései sebességük alapján különböztetik meg egymástól. Ez alapján a prokarióták 70S riboszómájának két alegysége a 30S kisalegység és az 50S nagyalegység. Eukariótákban a 80S riboszómát egy 40S és egy 60S egység alkotja. Ez utóbbi riboszómatípus mérete és tömege is nagyobb az előbbinél, biokémiai folyamatai komplexebbek, felépítésében több alkotó vesz részt. Mindkét alegységre igaz, hogy tömegük 60%-át RNS alkotja, a maradék 40%-ot fehérje teszi ki.

A riboszómában három kötőhely alakult ki a tRNS számára, ezek rendre az A- (aminoacil), P- (peptidil), és E- (exit, azaz kilépés) tRNS-kötőhelyek. Ezek a kötőhelyek nem lokalizálhatóak a riboszóma egyik vagy másik alegységére, a transzláció kezdetekor a két alegység asszociálásával veszik fel teljes formájukat, és mindkét alegységen egyszerre jelen vannak.

A fehérjeszintézis során a kisalegység magához köti az mRNS-t, a tRNS-ek pedig aminosavakat szállítanak a riboszómába. Az aminosavak közti peptidkötés kialakulását a riboszóma aktív helye katalizálja, ezt a régiót peptidil-transzferáz központnak nevezik, rövidítve PTC. A PTC egy igen erősen konzervált katalitikus aktivitású rRNS struktúra, ribozim. Minden bizonnyal a PTC az ősi RNS-világból származó prebiotikus kémiai kötések kialakító apparátus maradványa, ami még mindig jelen van minden mai riboszómában is.

## ***Summary***

The ribosome is a cellular particle which plays a central role in all living organisms. Ribosome is the site of protein synthesis. In this process the genetic information is decoded into proteins. Ribosomes catalyze the formation of peptide bonds between amino acids, and thus form the peptide chains through the process called translation.

A ribosome is composed of two subunits, a large and a small, which differ in their sedimentation properties: In prokaryotes, the 70S ribosome is divided into the 30S and 50S subunits, while in eucaryotes, the 80S ribosome is composed of the 40S and the 60S subunits. Eukaryotic ribosomes are larger and contain more components, and show more complex processes. In both subunits, about 60% of the mass corresponds to RNA, and 40% to proteins.

Ribosomes have three binding sites for tRNA molecules: the A- (aminoacyl), P- (peptidyl) and E- (exit) sites. The three binding sites are not located on either of the subunits. They are formed, when the otherwise dissociated ribosome associate for protein synthesis.

During translation the small subunit bond the mRNA molecule, and tRNAs carry amino acids to the ribosome. The peptide bond is formed in the ribosome active site, namely in the peptidyl transferase center (PTC). It is a highly conserved region probably originating from the RNA world. PTC is an RNA and acts as a ribozyme, it's prebiotic machine for chemical bonding which is still functioning within all contemporary living being's ribosome.

## Referenciák:

- 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 Å resolution. Science* **289**, 905-920.
- Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G. & Yusupov, M. 2011 *The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. Science* **334**, 1524-1529.
- Calisto, B. M. & Fita, I. 2011 *The race to resolve the atomic structures of the ribosome. On the Nobel Prize in Chemistry awarded to Venkatraman Ramakrishnan, Thomas A. Steitz, and Ada E. Yonath. Contributions to Science* **7**, 125-130.
- Cech, T. R. 2000 *Structural biology. The ribosome is a ribozyme. Science* **289**, 878-879.
- Fox, G. E. 2010 *Origin and evolution of the ribosome. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2**.
- Gimes, J. 2012 *Szenvedély és kíváncsiság - Gimes Júlia beszélgetése Ada Jonattal. Magyar Tudomány* **5**, 614-616.
- Krupkin, M., Matzov, D., Tang, H., Metz, M., Kalaora, R., Belousoff, M. J., Zimmerman, E., Bashan, A. & Yonath, A. 2011 *A vestige of a prebiotic bonding machine is functioning within the contemporary ribosome. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **366**, 2972-2978.
- Kumar, V., Badve, A., Das, S., Ghosh, S. & Bandopadhyay, R. 2010 *The 2009 Nobel Prize in chemistry: for studies of the structure and function of the ribosome. International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology* **1**, 95-103.
- Kun, Á. 2011 *Az RNS-világ. Természet Világa* **142**, 455.
- László L, Csikós Gy., Kovács A. L., Pálfia Zs., Zboray G., Molnár K., 2012. *Fénymikroszkópia, Zboray G., Molnár K., Szövettani és sejtbológiai vizsgálómódszerek – ELTE TTK Biológiai Intézet, Budapest*
- Lilley, D. M. J. 2011 *Mechanisms of RNA catalysis. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **366**, 2910-2917.
- Moore, P. B. & Steitz, T. A. 2002 *The involvement of RNA in ribosome function. Nature* **418**, 229-235.
- Nakagawa, S., Niimura, Y., Miura, K.-i. & Gojobori, T. 2010 *Dynamic evolution of translation initiation mechanisms in prokaryotes. Proceedings of the National Academy of Sciences.*
- Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B. & Steitz, T. A. 2000 *The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. Science* **289**, 920-930.

- Puglisi, J. D. 2009 Resolving the elegant architecture of the ribosome. *Molecular Cell* **36**, 720-723.
- Ramakrishnan, V. 2010 Unraveling the Structure of the Ribosome (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition* **49**, 4355-4380.
- Schluzen, F., Tocilj, A., Zarivach, R., Harms, J., Gluehmann, M., Janell, D., Bashan, A., Bartels, H., Agmon, I., Franceschi, F. & Yonath, A. 2000 Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 Å resolution. *Cell* **102**, 615-623.
- Szathmáry, E. & Maynard Smith, J. 2000 *A földi élet regénye*. Budapest: Vince Kiadó
- Tamura, K. 2011 Ribosome evolution: Emergence of peptide synthesis machinery. *Journal of Biosciences* **36**, 921-928.
- Trakhanov, S. D., Yusupov, M. M., Agalarov, S. C., Garber, M. B., Ryazantsev, S. N., Tischenko, S. V. & Shirokov, V. A. 1987 Crystallization of 70 S ribosomes and 30 S ribosomal subunits from *Thermus thermophilus*. *FEBS Letters* **220**, 319-322.
- Vasas, V., Fernando, C., Santos, M., Kauffman, S. & Szathmary, E. 2012 Evolution before genes. *Biology Direct* **7**, 1.
- Welch, M., Chastang, J. & Yarus, M. 1995 An inhibitor of ribosomal peptidyl transferase using the transition-state analogy. *Biochemistry* **34**, 385-390.
- Williamson, J. R. 2009 The ribosome at atomic resolution. *Cell* **139**, 1041-1043.
- Wilson, D. N. & Doudna Cate, J. H. 2012 The structure and function of the eukaryotic ribosome. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **4**.

## Ábrák:

1. **ábra:** Calisto, B. M. and Molecular, I. F. 2011. *The Race to Resolve the Atomic Structures of the Ribosome on the Nobel Prize in Chemistry awarded to Venkatraman Ramakrishnan, Thomas A. Steitz, and Ada E. Yonath*. - *Contributions to Science* **7**: 125./Fig.: 3.
2. **ábra:** Ben-Shem A., de Loubresse N. G., Melnikov S., Jenner L., Yusupova G., Yusupov M., 2011. *The Structure of the Eukaryotic Ribosome at 3.0 Å Resolution* - *Science* doi: 10.1126/science.1212642 , Fig.: S5.
3. **ábra:** <http://barleyworld.org/sites/default/files/figure-09-10.jpg>
4. **ábra:** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, *Localization of the Small Subunit Ribosomal Proteins Into a 5.5 a Cryo-em MAP of Triticum Aestivum Translating 80S Ribosome, és tRNA Translocation on the 70s Ribosome: the Post- Translocational Translocation Intermediate Ti(post)*



5. **ábra:** Tamura K. 2011. *Ribosome evolution: Emergence of Peptide Synthesis Machinery* – *J. Biosci* 36: 3./Fig.: 2.