

Charakterystyka rybosomów polimorficznych pod względem rRNA

STRESZCZENIE

Przez długi czas rybosomy postrzegano jako niezróżnicowane kompleksy tworzone przez cząsteczki RNA i białka, których jedynym zadaniem było przeprowadzanie procesu translacji. Badania prowadzone na przestrzeni ostatnich kilku lat pokazały zupełnie nowe oblicze tych skomplikowanych maszyn molekularnych. Rybosomy mogą wybierać cząsteczki mRNA, które będą podlegały translacji, wpływając w ten sposób na kształt proteomu. Opiszano rybosomy zróżnicowane pod względem składu białkowego i sekwencji rRNA, których populacje są zaangażowane w odpowiedź na stres, wirulencję i antybiotykowrażliwość. W tej pracy przedstawiono opisane i potencjalne funkcje rybosomów zawierających polimorfizmy w cząsteczkach rRNA oraz czynniki ograniczające rozwój badań w tej dziedzinie.

WPROWADZENIE

Cechą wszystkich żywych komórek jest zdolność do wydajnego i precyzyjnego przetwarzania informacji zawartej w genomie na funkcjonalne białka. Proces translacji katalizuje rybosom, jedna z najstarszych ewolucyjnie maszyn molekularnych, którą tworzą białka i cząsteczki RNA (rybosomalne RNA, rRNA). Za odkrywcę rybosomu uważa się biologa George Palade, który w 1955 roku obserwując komórki pod mikroskopem elektronowym zauważył duże cytoplazmatyczne makromolekuły. Postulował ich zróżnicowanie pod względem wielkości i kształtu, jednak nie mógł go udowodnić, ze względu na ograniczenia wynikające z niewystarczającej rozdzielczości ówczesnych mikroskopów [1].

Odkrycie Palade zainspirowało wielu badaczy, w tym Francis Cricka, który sformułował teorię głoszącą, że każde białko jest produkowane przez specjalnie do tego przystosowany rodzaj rybosomów, a cząsteczki rybosomalnego RNA służą w tym procesie jako matryca. W komórce miały zatem funkcjonować populacje rybosomów zróżnicowanych pod względem wielkości i kształtu cząsteczek rRNA. Pogląd ten szybko został odrzucony, a dalsze badania prowadzone przez Francis Cricka, Sydney Brennera i ich współpracowników doprowadziły do odkrycia matrycowego RNA i powiązania go z produkcją białek w rybosomach [2-3]. Same rybosomy uznano za niezróżnicowane maszyny molekularne, których jedyną funkcją jest wiązanie mRNA oraz produkcja białek [3]. Dwie dekady później [4-5], na podstawie doświadczeń przeprowadzonych na modelach bakteryjnych, opisano procesy dekodowania mRNA, translacji oraz tworzenia wiązania peptydowego, które są katalizowane przez rybosom. Procesy te okazały się uniwersalne w świecie organizmów [6], nawet pomimo znacznych różnic w strukturach rybosomów prokariotycznego i eukariotycznego [7], co pasowało do teorii o niezróżnicowanej naturze rybosomów.

Dopiero odkrycie paralogów białek rybosomalnych oraz modyfikacji chemicznych cząsteczek rRNA na nowo otworzyło dyskusję na temat różnorodności tych odpowiedzialnych za translację makromolekuł [5-6]. Historia zatoczyła koło. Niezbitych dowodów na istnienie niejednorodnych strukturalnie rybosomów dostarczyły badania prowadzone przy użyciu mikroskopii elektronowej, która od czasu Palade przeszła rewolucję technologiczną. Wykorzystując techniki mikroskopii krioelektronowej (cryo-EM) i spektrometrię mas potwierdzono istnienie zróżnicowanych rybosomów pod względem wielkości, kształtu i składu białkowego [10].

Zdecydowana większość informacji dotyczących polimorficznych rybosomów odnosi się do ich zmienności na poziomie białkowym. Jest ona tematem wielu prac zarówno eksperymentalnych jak i przeglądowych. Źródłami tej heterogenności są mutacje w białkach rybosomalnych, różnice w poziomie ekspresji poszczególnych paralogów tych białek ich ubikwitynacja lub fosforylacja [11]. Dla kontrastu temat niejednorodności rybosomów na poziomie rRNA traktowa-

mgr Agnieszka Czarnocka-Cieciura^{1, 2}✉

¹Laboratorium Biologii RNA, Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie
²Instytut Genetyki i Biotechnologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

https://doi.org/10.18388/pb.2021_440

✉ autor korespondujący: aczarnocka-cieciura@iimcb.gov.pl

Słowa kluczowe: rRNA, rybosom, rDNA, populacje rybosomów

Podziękowanie: Praca powstała podczas realizacji projektu badawczego 2017/27/N/NZ2/01321 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

ny jest marginalnie, a w niektórych środowiskach naukowych wciąż budzi sceptycyzm. W tej pracy przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat zróżnicowania rybosomów pod względem cząsteczek rRNA oraz ich wpływ na funkcjonowanie komórki. Omówiono również czynniki ograniczające rozwój badań naukowych na tym polu.

POLIMORFIZM W SEKWENCJI NUKLEOTYDOWEJ RRNA

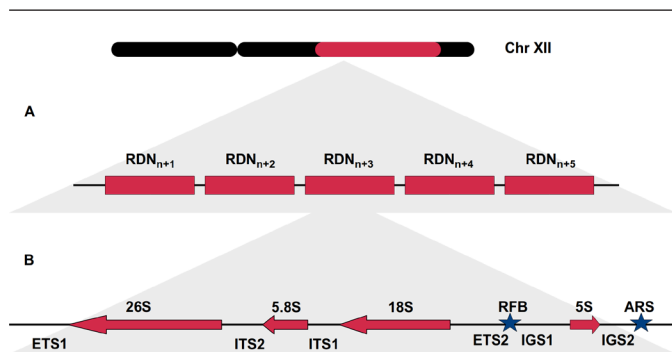
LICZNE KOPIE RDNA I ICH POLIMORFIZM

Cząsteczki RNA budują funkcjonalny trzon rybosomu. W jego skład wchodzi trzy lub cztery cząsteczki RNA – 5S, 23S i 16S rRNA u organizmów prokariotycznych lub 5S, 18S, 5,8S i 28S rRNA u eukariotów. Ze względu na duże zapotrzebowanie komórki na rRNA [12], wyrażające je geny (rDNA) są obecne w genomach w wielu kopiach (Ryc. 1). Badania prowadzone z wykorzystaniem fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (ang. *fluorescence in situ hybridisation*, FISH) [13] pozwoliły na zmapowanie rDNA loci na chromosomach kilku tysięcy gatunków pochodzących z różnych gałęzi drzewa życia. Okazało się, że w procesie ewolucji liczba kopii i lokalizacja rDNA podlegała licznym zmianom [10-11], a u niektórych organizmów (w tym człowieka) geny kodujące 5S rDNA wyodrębniły się tworząc własne locus. Geny kodujące rybosomalne RNA mogą znajdować się również na pozachromosomalnych kolistych cząsteczkach DNA, które w warunkach stresu wykazują zdolność do wbudowywania się w macierz rDNA obecną na chromosomie [16].

Geny kodujące rRNA tworzą na chromosomach zgrupowania powtórzeń (macierze rDNA), których budowa jest cechą gatunkową. Wewnątrz każdego powtórzenia geny kodujące cząsteczki rRNA są rozdzielone odcinkami niekodującymi (Ryc. 1). Ze względu na swoje właściwości, macierze rDNA pozostają – nawet dla organizmów modelowych – ostatnimi niezekwencjonowanymi rejonami genomów. Niewiele możemy powiedzieć na temat ich organizacji wewnętrznej, polimorfizmu między powtórzeniami, czy nawet dokładnej liczby kopii genów. Powszechna jest koncepcja głosząca, że powtórzenia rDNA wykazują znikomy polimorfizm, ze względu na działanie mechanizmu ewolucji równoległej [17], który dąży do unifikacji sekwencji wszystkich kopii w macierzy. Jak dotąd nie ma żadnej rzetelnie otrzymanej sekwencji macierzy rDNA. Do większości badań porównawczych wykorzystywane są nieliczne sekwencje pojedynczych powtórzeń rDNA zdeponowane w publicznych repozytoriach. Dla większości gatunków otrzymano jedynie pojedyncze sekwencje genów kodujących rybosomalne RNA, a i te często są niekompletne. Próby sekwencjonowania całych macierzy rDNA jak dotąd nie przyniosły oczekiwanych rezultatów [18].

POLIMORFIZM rRNA A POPULACJE RYBOSOMÓW W ORGANIZMACH PROKARIOTYCZNYCH

U bakterii rDNA występuje w postaci kilku do kilkunastu operonów, których liczba zależy od wielkości genomu [19]. To, że polimorfizm w kopiach rDNA występuje i ma swoje odzwierciedlenie w populacjach rybosomów, pokazano na przykładzie bakterii *Escherichia coli*. W odpowiedzi na



Rycina 1. Struktura locus zawierającego geny kodujące rybosomalne RNA dla drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Macierz rDNA znajduje się na dłuższym ramieniu chromosomu XII. (A) Powiększenie przedstawiające organizację powtórzeń tandemowych rDNA (RDN-n). Pojedyncze powtórzenie rDNA ma długość 9,1 kb. (B) Szczegółowy widok pojedynczego powtórzenia rDNA. 26S, 5.8S, 18S, 5S – geny kodujące cząsteczki rRNA, ARS – miejsce inicjacji replikacji rDNA, RFB – miejsce wiązania białka regulatorowego Fob1; ETS1-2, ITS1-2, IGS1-2 – obszary odcinków międzygenowych

ograniczenie w dostępie do składników odżywczych bakterie te zwiększają ekspresję konkretnego operonu (*rrnH*), zawierającego polimorfizmy w genie kodującym 16S rRNA. Rybosomy, w których skład wchodzi cząsteczki 16S-*rrnH*, modulują ogólną odpowiedź komórki na stres. Bakterie posiadające ten typ rybosomów wykazują większą ruchliwość, odporność na czynniki bakteriostatyczne oraz wydajniej formują biofilm [17]. Do podobnych wniosków doszły Kathrin Leppke i Maria Barna badając translację u bakterii *Vibrio vulnificus*. W komórkach poddanych warunkom szoku cieplnego lub głodu, populacja rybosomów zawierających wariant 16S-*rrnI* (I-rybosomy) wykazywała skłonność do wybierania cząsteczek mRNA kodujących białka związane z reakcją na stres. I-rybosomy rozpoznawały i preferencyjnie tłumaczyły mRNA wyrażające izomerazę triozofosforanową (*tpiA*) i białko szoku cieplnego *hspA*. I-rybosomy okazały się również niezbędne w procesie wirulencji, co pokazano na modelu mysim [21].

Polimorficzny rRNA jest uważany za jeden z najważniejszych z czynników zaangażowanych w wytwarzanie oporności na leki. Cząsteczki antybiotyków przyłączają się do zachowanych ewolucyjnie rejonów rRNA (np. helisa 44 w 16S rRNA, domena V w 23S rRNA), które zawierają miejsca katalityczne niezbędne w procesie translacji. W badaniach przeprowadzonych na *Mycobacterium smegmatis* rDNA poddano mutagenезie, a następnie szczepy bakteryjne zawierające różne mutacje w operonach rDNA (a zatem różne warianty rRNA) wystawiono na działanie antybiotyków. Zaobserwowano wyraźne różnice w oporności. Zmiany konformacji przestrzennej rRNA oraz mutacje nukleotydów wchodzących w interakcje z cząsteczkami antybiotyków chroniły rybosomy bakteryjne przed zatrzymaniem translacji [22]. Na szczególną uwagę zasługują nukleotydy obecne w 23S rRNA w pozycjach 2058 i 2059. Te dwie adenozyiny znajdujące się na powierzchni ściany tunelu (w dużej podjednostce rybosomu) wchodzi w interakcje z cząsteczkami antybiotyków makrolidowych. Gdy cząsteczka takiego antybiotyku zwiąże się z rybosomem, blokuje wyjście z tunelu, uniemożliwiając powstanie długiego polipeptydu, co prowadzi do zatrzymania translacji [23]. Zamiana adenozyiny na guanozynę w pozycjach 2058 i 2059 skutkuje znacznym zmniejszeniem powinowactwa cząsteczek antybio-

tyku do ściany tunelu, co ogranicza liczbę zablokowanych rybosomów [22]. Zachowanie w genomie zróżnicowanych pod względem sekwencji nukleotydowej operonów rDNA, oraz zdolność do zmian składu populacji rybosomów jest dla bakterii korzystne, zwłaszcza w niestabilnych lub nieprzychylnych warunkach środowiska.

POLIMORFIZM rRNA A POPULACJE RYBOSOMÓW W ORGANIZMACH EUKARIOTYCZNYCH

U eukariontów geny kodujące rybosomalne RNA występują w postaci macierzy powtórzeń liczących od kilkudziesięciu do kilku tysięcy kopii. Wielkość powtórzenia rDNA i lokalizacja macierzy na chromosomach są cechami specyficznymi gatunkowo [14]. Polimorfizm w organizmach jądrowych jest lepiej opisany pod względem zmian w liczbie powtórzeń wewnątrz macierzy niż różnorodności ich sekwencji nukleotydowej. O ile niewielka zmienność liczby kopii rDNA jest naturalną cechą obserwowaną w populacjach [19-20], to znaczące delecje genów kodujących rRNA wpływają na długość życia komórek, ich podziały i odpowiedź na stres [26]. U ludzi liczbę kopii rDNA powiązano z ekspresją genów i zawartością mitochondriów w komórce [27]. rDNA loci bierze też udział w epigenetycznej regulacji chromatyny w jądrze [28], a jego struktura jest poważnie zaburzona w komórkach nowotworowych [29]. Eukariotycznym organizmem modelowym wykorzystywanym do badania rDNA i rRNA są drożdże piekarnicze *Saccharomyces cerevisiae*. Gatunek ten posiada jedną macierz rDNA zlokalizowaną na dłuższym ramieniu chromosomu XII, która liczy około 150 kopii. Jednak nawet dla tego organizmu, mimo licznych prób, nie otrzymano pełnego i rzetelnego złożenia sekwencji rDNA [25-27].

Wewnętrzny polimorfizm kopii rDNA pozostaje nieopisany, jednak dostępne uśrednione złożenia powtórzeń rDNA wskazują na istnienie różnic pomiędzy poszczególnymi powtórzeniami [18]. Podejście to wykorzystano w badaniach polimorfizmu rRNA u myszy i człowieka. Na podstawie dostępnych odczytów mapujących do powtórzenia rDNA stworzono profile substytucji nukleotydowej. Następnie wyizolowane z komórek mysich i ludzkich aktywne translacyjnie rybosomy strawiono proteolitycznie, a oczyszczone rRNA poddano sekwencjonowaniu. Odczytami otrzymanymi z sekwencjonowania rybosomalnego RNA przeszukano bazę odczytów pochodzących z sekwencjonowania rDNA. Znalaziono wiele par rRNA-rDNA wykazujących znaczną homologię. Na tej podstawie opracowano metodę szacowania wewnątrzgatunkowej zmienności rDNA i rRNA. Przeprowadzone badania udowodniły istnienie populacji zróżnicowanych pod względem rRNA rybosomów w komórkach człowieka i myszy. Zachowywane ewolucyjnie polimorficzne pozycje w rRNA znaleziono w helisie h16 rybosomu ludzkiego, która kontaktuje się z obszarami rRNA odpowiedzialnymi za inicjację translacji oraz w helisie H38 tworzącej wypukłość centralną rybosomu, zawierającą miejsce P transferazy peptydylowej. Ponadto liczne polimorfizmy zaobserwowano w elementach mostków (łączyjących podjednostki rybosomu) i w miejscach wiązania białek rybosomalnych, które pośredniczą w ich tworzeniu. Co więcej, poziomy ekspresji poszczególnych wariantów rRNA różni się pomiędzy tkankami [32].

Rybosomy eukariotyczne, podobnie jak ich prokariotyczne odpowiedniki, mogą wykazywać zróżnicowaną odporność na działanie antybiotyków aminoglikozydowych. Do rDNA drożdży *S. cerevisiae* wprowadzono mutacje, które u bakterii ograniczały przyłączanie się cząsteczek antybiotyków do rybosomalnego RNA. Otrzymano żywe szczepy drożdżowe, zawierające w pełni funkcjonalne rybosomy. Pokazano, że nawet pojedyncze podstawienie nukleozydu może zmniejszyć wrażliwość komórek na paromomycynę i G-418, jednocześnie wywołując wrażliwość na streptomycynę [33]. Ten rodzaj ochrony przed antybiotykami może być zachowany ewolucyjnie, jednak to, czy w komórkach eukariotycznych naturalnie występują rybosomy zawierające badane mutacje, wymaga weryfikacji.

W 1988 roku trzech badaczy z uniwersytetu w Pensylwanii korzystając z technik hybrydyzacji kwasów nukleinowych odkryło pięć rejonów cząsteczki 28S rRNA, w których występuje zmienność w sekwencji nukleotydowej [34]. Co ważne, substytucje nukleotydowe znajdowały się w odcinkach segmentów ekspansyjnych, które w strukturach III-rzędowych tworzą obszary zlokalizowane na powierzchni cząsteczek rRNA lub pętli (ang. *expansion loops*) wyeksponowane na zewnątrz białkowego płaszcza rybosomu. U eukariontów pojedyncze powtórzenie rDNA jest dużo dłuższe niż u bakterii, ponieważ w czasie ewolucji rybosomów eukariotycznych doszło do wydłużania cząsteczek rRNA poprzez dodanie nukleotydów w określonych obszarach insercji (segmentach ekspansyjnych, ang. *expansion segments*, ES). Mutacje te doprowadziły do zwiększenia masy rybosomu i wzrostu złożoności jego struktury trzeciorzędowej [35]. Dzięki badaniom strukturalnym wyróżniono, w zależności od gatunku, około 40 takich obszarów w rRNA dużej podjednostki rybosomu i około 12 w rRNA małej podjednostki. Segmenty ekspansyjne są najmniej zachowanymi ewolucyjnie obszarami rybosomu [36], a obecne w nich mutacje nie wpływają bezpośrednio na translację [37], jednak w rybosomach młodszych ewolucyjnie organizmów mogą one przyjmować dodatkowe funkcje.

Szczególnie duży rozrost odcinków ekspansyjnych obserwujemy u ssaków, zwłaszcza u naczelnych. Analiza sekwencji pętli ekspansyjnych obecnych zarówno w 18S jak i 28S rRNA wykazała, że ich 7-15-sto nukleotydowe fragmenty wykazują znaczące podobieństwo sekwencji nukleotydowej do fragmentów większości ludzkich cząsteczek mRNA. Wyniki te sugerują, że pętle ekspansyjne mogą wchodzić w interakcje z cząsteczkami mRNA, na przykład tymi związanymi z retikulum endoplazmatycznym. Na szczególną uwagę zasługują tu pętle ES7, ES15 i ES27 wyeksponowane na zewnątrz dużej podjednostki rybosomu. Pętle te są najdłuższe u naczelnych, i spośród innych odcinków ekspansyjnych wyróżnia je również zdecydowanie wyższa zawartość par GC. Polimorfizmy odkryte w pętlach ekspansyjnych mogą determinować pulę mRNA, z którą rybosom wchodzi w interakcje [38].

Wydłużanie cząsteczek rRNA u organizmów eukariotycznych zaowocowało również powstaniem nowych miejsc interakcji rRNA-białko. W młodszych ewolucyjnie organizmach doszło do zwiększania liczby białek rybosomo-

malnych. Jednak do rybosomu mogą się przelotnie wiązać różne białka (np. białka biorące udział w formowaniu dojrzających rybosomów, białka regulatorowe), które określa się zbiorczo mianem „rybo-interaktomu”. Polimorfizmy obecne w obszarach rRNA wyeksponowanych do cytoplazmy mogą definiować skład rybo-interaktomu i determinować funkcje danej populacji rybosomów. Zaobserwowano, że rybo-interaktom różni się między rybosomami związanymi z retikulum endoplazmatycznym, a tymi obecnymi w cytozolu [39].

Rybosomy nie tylko syntetyzują łańcuch peptydowy, ale również nadzorują pierwsze etapy fałdowania produkowanych białek. Dane otrzymane dzięki wykorzystaniu techniki cryo-EM pokazały, że łańcuch polipeptydowy może ulegać fałdowaniu w czasie translacji [40], wewnątrz długiego na 80–100 Å, a szerokiego na 10–20 Å tunelu wyjęcia polipeptydu, znajdującego się w dużej podjednostce rybosomu. Tworzą się tam pierwsze struktury drugorzędowe, takie jak alfa helisy, a ich formowanie odbywa się przy udziale domen rRNA i białek budujących tunel. Przebieg fałdowania zależy od wielkości i stabilności fałdowanej domeny oraz kształtu tunelu, który może się różnić pomiędzy poszczególnymi populacjami rybosomów [41].

Polimorfizm nukleotydowy rRNA jest źródłem różnorodności populacji rybosomów, zarówno w komórkach prokariotycznych jak i eukariotycznych. Jednak nie wszystkie mutacje obecne w genach kodujących rRNA są korzystne dla rybosomu. Nawet pojedyncza zmiana może utrudnić, na przykład, inicjację translacji [42] lub całkowicie ją uniemożliwić [43]. Prawdopodobieństwo pojawienia się takiej mutacji jest wyższe u organizmów posiadających wiele kopii rDNA. Produkcja nowych rybosomów jest procesem bardzo obciążającym energetycznie dla komórki. By ograniczyć marnowanie zasobów, komórki eukariotyczne wytworzyły systemy regulacji aktywności poszczególnych powtórzeń rDNA, np. poprzez ich epigenetyczne wyciszenie [44]. Szacuje się, że jedynie połowa dostępnych w genomie kopii genów kodujących cząsteczki rRNA jest aktywna transkrypcyjnie. Czy zatem wyciszone kopie zawierają mutacje niepożądane? Niekoniecznie. Istnieje mechanizm otwierania epigenetycznie zamkniętych kopii w odpowiedzi na stres lub delecję rDNA [21,40]. Jest on pod wieloma względami podobny do obserwowanego u bakterii procesu aktywacji poszczególnych operonów rDNA pod wpływem określonych warunków zewnętrznych.

OGRANICZENIA W BADANIACH RÓŻNORODNOŚCI RYBOSOMÓW

OGRANICZENIE W BADANIACH POLIMORFIZMU SEKWENCJI RRNA I RDNA

Istnieje wiele czynników ograniczających badanie zróżnicowania rybosomów pod względem budujących je cząsteczek rRNA. Bezpośrednie sekwencjonowanie wyizolowanego z rybosomów RNA jest trudne technicznie i obciążone dużym ryzykiem otrzymania błędnych wyników, ze względu na silnie ustrukturyzowanie i liczne modyfikacje chemiczne cząsteczek rRNA. Żadna z opracowanych dotychczas metod sekwencjonowania RNA nie jest przystosowana do radzenia sobie z kilkoma różnymi rodzajami mo-

dyfikacji chemicznych nukleotydów naraz, a w rybosomach eukariotycznych występuje aż 10 różnych typów takich modyfikacji [46]. Innym podejściem do badania różnorodności cząsteczek RNA wchodzących w skład rybosomów jest badanie sekwencji kodujących je genów. Jednak na tym polu od lat 80 ubiegłego wieku nie poczyniono praktycznie żadnego postępu. Brakuje algorytmów pozwalających na składowanie sekwencji repetytywnych oraz metod pozwalających na badanie struktury macierzy rDNA.

Krótkoodczytowe metody sekwencjonowania (np. Illumina) nie nadają się do sekwencjonowania sekwencji repetytywnych, w których powtarzająca się jednostka jest dłuższa niż średnia długość odczytu. Długość pojedynczego powtórzenia rDNA waha się między 8 000 a 13 000 nt. Przeprowadzone próby sekwencjonowania macierzy rDNA tymi metodami zaowocowały jedynie otrzymaniem uśrednionej sekwencji powtórzenia rDNA. Metody te są jednak użyteczne przy szacowaniu wewnętrznego polimorfizmu kopii rDNA i wyznaczaniu obszarów wykazujących wyższą zmienność [47].

Wykorzystanie długoodczytowych technik sekwencjonowania (np. SMRT PacBio i Oxford Nanopore) również nie pozwoliło na otrzymanie pełnej sekwencji macierzy rDNA – istniejące metody budowania przyrównań nie pozwalają na otrzymanie *de-novo* sekwencji dużych, repetytywnych obszarów genomu. Większość powszechnie wykorzystywanych algorytmów nie radzi sobie ze składowaniem odczytów zawierających długie powtórzenia o bardzo podobnej sekwencji [48]. Ponadto, izolując wielocząsteczkowe DNA potrzebne do długoodczytowych sekwencjonowań gubiona jest pula powtórzeń rDNA występujących na pozachromosomalnych kolistych cząsteczkach DNA [49], przez co otrzymujemy obraz polimorfizmu jedynie dla kopii znajdujących się na chromosomach.

OGRANICZENIA W BADANIACH STRUKTURALNYCH RYBOSOMÓW

Istnieje wiele różnych metod pozwalających na badanie składu białkowego rybosomów (spektrometria mas), ich kształtu (kriomikroskopia elektronowa) i położenia w komórce (kriotomografia elektronowa). Jednak odtworzenie kształtu całego rybonukleinowego szkieletu rybosomu jest kłopotliwe. Nawet w wysokorozdzielczych strukturach rybosomów brakuje wielu pętli rRNA wyeksponowanych na zewnątrz białkowego płaszczka [50]. Dzieje się tak dlatego, że pętle te są bardzo mobilne, co uniemożliwia rekonstrukcję ich struktury przestrzennej przy użyciu dostępnych technik biologii strukturalnej.

PODSUMOWANIE

Odkrycie polimorficznych rybosomów jest ważnym krokiem w zrozumieniu funkcjonowania komórek. Zróżnicowane pod względem sekwencji rRNA i składu białkowego rybosomy biorą aktywny udział w reakcji na zmiany zachodzące w ich otoczeniu poprzez regulowanie puli transkryptów, które podlegają procesowi translacji. Ponadto, ich populacja może ulegać zmianom pod wpływem czynników środowiskowych, zwiększając w ten sposób szanse komórki na przetrwanie. Obszar dla nowych badań nad wyspe-

czajizowanymi rybosomami jest bardzo szeroki. Obejmuje udział populacji rybosomów zawierających określone zestawy polimorfizmów w cyklu komórkowym, różnicowaniu tkanek i ontogenezie. Zmienność rozkładu populacji rybosomów może być również istotnym czynnikiem odpowiedzialnym za rozwój nowotworów, ponieważ wysoki polimorfizm w rRNA jest jedną z cech charakterystycznych dla komórek rakowych. Innym ciekawym kierunkiem badań jest opisanie funkcji rybosomów zawierających mutacje wpływające na wydajność i prędkość translacji. Dalszy rozwój mikroskopii elektronowej może umożliwić nie tylko lepsze zbadanie zróżnicowania strukturalnego rybosomów (z uwzględnieniem pętli ekspansywnych), ale również na określenie lokalizacji poszczególnych ich typów w komórce.

PIŚMIENNICTWO

- Palade G, Arch A, Locke M, Locke E (1975) Intracellular Aspects of the Process of Protein Synthesis Published by : American Association for the Advancement of Science Stable. *Science* 189: 347-358
- Gros F, Hiatt H, Gilbert W, Kurland CG, Risebrough RW, Watson JD (1961) Unstable Ribonucleic Acid Revealed by Pulse Labelling of *Escherichia Coli*. *Nature* 190: 581-585
- Brenner BD, Jacob F, Meselson DM (1957) An Unstable Intermediate Carrying Information From Genes To Ribosomes for Protein Synthesis. *Nature* 190: 576-581
- Acids N, Towbin H, Elson D (1978) A photoaffinity labelling study of the messenger RNA-binding region of *Escherichia coli* ribosomes. *Nucleic Acids Res* 5: 3389-3407
- Holschuh K, Bonin J, Gassen H G (1980) Mechanism of Translocation: Effect of Cognate Transfer Ribonucleic Acids on the Binding of AUG onto 70S Ribosomes. *Biochemistry* 19: 5857-5864
- Woese CR, Gutell R, Gupta R, Noller HF (1983) Detailed analysis of the higher-order structure of 16S-like ribosomal ribonucleic acids. *Microbiol Rev* 47: 621-669
- Bernier CR, Petrov AS, Kovacs NA, Penev PI, Williams LD (2018) Translation: The universal structural core of life. *Mol Biol Evol* 35: 2065-2076
- Whittle CA, Krochko JE (2009) Transcript profiling provides evidence of functional divergence and expression networks among ribosomal protein gene paralogs in *Brassica napus*. *Plant Cell* 21: 2203-2219
- Weijers D, Franke-van Dijk M, Vencken RJ, Quint A, Hooykaas P, Offringa R (2001) An Arabidopsis minute-like phenotype caused by a semi-dominant mutation in a ribosomal protein S5 gene. *Development* 128: 4289-4299
- Samir P, Browne CM, Rahul, Sun M, Shen B, Li W, Frank J, Link AJ (2018) Identification of Changing Ribosome Protein Compositions using Mass Spectrometry. *Proteomics* 18: e1800217
- Genuth NR, Barna M (2018) The Discovery of Ribosome Heterogeneity and Its Implications for Gene Regulation and Organismal Life *Mol Cell* 71: 364-374
- Porokhovnik L, Gerton JL (2019) Ribosomal DNA-connecting ribosome biogenesis and chromosome biology. *Chromosome Res* 27: 1-3
- Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 2934-2938
- Sochorová J, Garcia S, Gálvez F, Symonová R, Kovařík A (2018) Evolutionary trends in animal ribosomal DNA loci: introduction to a new online database. *Chromosoma* 127: 141-150
- Roy V, Monti-Dedieu L, Chaminade N, Siljak-Yakovlev S, Aulard S, Lemeunier F, Montchamp-Moreau C (2005) Evolution of the chromosomal location of rDNA genes in two *Drosophila* species subgroups: *ananassae* and *melanogaster*. *Heredity (Edinb)* 94: 388-395
- Nelson JO, Watase GJ, Warsinger-Pepe N, Yamashita YM (2019) Mechanisms of rDNA Copy Number Maintenance. *Trends Genet* 35: 734-742
- Gibbons JG, Branco AT, Godinho SA, Yu S, Lemos B (2015) Concerted copy number variation balances ribosomal DNA dosage in human and mouse genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 112: 2485-2490.
- James SA, O'Kelly MJ, Carter DM, Davey RP, van Oudenaarden A, Roberts IN (2009) Repetitive sequence variation and dynamics in the ribosomal DNA array of *Saccharomyces cerevisiae* as revealed by whole-genome resequencing. *Genome Res* 19: 626-635
- Rastogi R, Wu M, Dasgupta I, Fox GE (2009) Visualization of ribosomal RNA operon copy number distribution. *BMC Microbiol* 9: 208
- Kurylo CM, Parks MM, Juetter MF, Zinshteyn B, Altman RB, Thibado JK, Vincent CT, Blanchard SC (2018) Endogenous rRNA Sequence Variation Can Regulate Stress Response Gene Expression and Phenotype. *Cell Rep* 25: 236-248
- Leek K, Barna M (2019) An rRNA variant to deal with stress. *Nat Microbiol* 4: 382-383
- Akshay S, Berteau M, Hobbie SN, Oettinghaus B, Shcherbakov D, Böttger EC, Akbergenov R (2011) Phylogenetic sequence variations in bacterial rRNA affect species-specific susceptibility to drugs targeting protein synthesis. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 4096-4102
- Hansen JL, Ippolito AJ, Ban N, Nissen P, Moore PB, Steitz TA (2020) The structures of four macrolide antibiotics bound to the large ribosomal subunit. *Struct Insights into Gene Expr Protein Synth* 10: 525-536
- Goto M, Sube A, Mikashima S, Kaneda M, Shibata H, Kanda N (2011) Polymorphism of rRNA gene loci in the dog. *J Vet Med Sci* 73: 475-477
- Xu J, Xu Y, Yonezawa T, Li L, Hasegawa M, Lu F, Chen J, Zhang W (2015) Polymorphism and evolution of ribosomal DNA in tea (*Camellia sinensis*, Theaceae). *Mol Phylogenet Evol* 89: 63-72
- Kwan EX, Foss EJ, Tsuchiyama S, Alvino GM, Kruglyak L, Kaerberlein M, Raghuraman MK, Brewer BJ, Kennedy BK, Bedalov A (2013) A Natural Polymorphism in rDNA Replication Origins Links Origin Activation with Calorie Restriction and Lifespan. *PLoS Genet* 9: e1003329
- Gibbons JG, Branco A T, Yu S, Lemos B (2014) Ribosomal DNA copy number is coupled with gene expression variation and mitochondrial abundance in humans. *Nat Commun* 5: 4850
- Paredes S, Maggert KA (2009) Ribosomal DNA contributes to global chromatin regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 17829-34
- Valori V, Tus K, Laukaitis C, Harris DT, LeBeau L, Maggert KA (2019) Human rDNA copy number is unstable in metastatic breast cancers. *Epigenetics* 15: 85-1060
- Giordano F, Aigrain L, Quail MA, Coupland P, Bonfield JK, Davies RM, Tischler G, Jackson DK, Keane TM, Li J, Yue JX, Liti G, Durbin R, Ning Z (2017) De novo yeast genome assemblies from MinION, PacBio and MiSeq platforms. *Sci Rep* 7: 3935.
- Gopalakrishnan R, Winston F (2019) Whole Genome Sequencing of Yeast Cells. *Curr Protoc Mol Biol* 128: 1-18
- Parks MM, Kurylo CM, Dass RA, Bojmar L, Lyden D, Vincent CT, Blanchard SC (2018) Variant ribosomal RNA alleles are conserved and exhibit tissue-specific expression. *Sci Adv* 4: eaao0665
- Chernoff YO, Vincent A, Liebman SW (1994) Mutations in eukaryotic 18S ribosomal RNA affect translational fidelity and resistance to aminoglycoside antibiotics. *EMBO J* 13: 906-913.
- Gonzalez IL, Sylvester JE, Schmickel RD (1988) Human 28S ribosomal RNA sequence heterogeneity. *Nucleic Acids Res* 16: 883-893
- Petrov AS, Gulen B, Norris AM, Kovacs NA, Bernier CR, Lanier KA, Fox GE, Harvey SC, Wartell RM, Hud NV, Williams LD (2015) History of the ribosome and the origin of translation. *Proc Natl Acad Sci USA* 112: 15396-15401
- Petrov AS, Bernier CR, Hsiao C, Norris AM, Kovacs NA, Waterbury CC, Stepanov VG, Harvey SC, Fox GE, Wartell RM, Hud NV, Williams LD (2014) Evolution of the ribosome at atomic resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 10251-10256
- Kuo BA, Gonzalez IL, Gillespie DA, Sylvester JE (1996) Human ribosomal RNA variants from a single individual and their expression in different tissues *Nucleic Acids Res* 24: 4817-4824

38. Parker MS, Balasubramaniam A, Sallee FR, Parker SL (2018) The expansion segments of 28S Ribosomal RNA extensively match human messenger RNAs. *Front Genet* 9: 1-13
39. Simsek D, Barna M (2017) An emerging role for the ribosome as a nexus for post-translational modifications. *Curr Opin Cell Biol* 45: 92-101
40. Liutkute M, Samatova E, Rodnina MV (2020) Cotranslational Folding of Proteins on the Ribosome. *Biomolecules* 10: 97
41. Zhao J, Qin B, Nikolay R, Spahn CMT, Zhang G (2019) Translatomics: The global view of translation. *Int J Mol Sci* 20: 212
42. Nemoto N, Singh CR, Udagawa T, Wang S, Thorson E, Winter Z, Ohira T, Li M, Valásek L, Brown SJ, Asano K (2010) Yeast 18S rRNA Is directly involved in the ribosomal response to stringent AUG selection during translation initiation. *J Biol Chem* 285: 32200-32212
43. Nemoto N, Udagawa T, Chowdhury W, Kitabatake M, Shin BS, Hirai-shi H, Wang S, Singh CR, Brown SJ, Ohno M, Asano K (2013) Random mutagenesis of yeast 25S rRNA identify bases critical for 60S subunit structural integrity and function. *Translation* 1: e26402
44. Srivastava RR, Srivastava RR, Ahn SH (2016) The Epigenetic Pathways to Ribosomal DNA Silencing. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 80: 545-63
45. Mansisidor A, Molinar TJ, Srivastava P, Dartis DD, Pino Delgado A, Blitzblau HG, Klein Hochwagen A (2018) Genomic Copy-Number Loss Is Rescued by Self-Limiting Production of DNA Circles. *Mol Cell* 72: 583-593
46. Taoka M, Nobe Y, Yamaki Y, Sato K, Ishikawa H, Izumikawa K, Yamauchi Y, Hirota K, Nakayama H, Takahashi N, Isobe T (2018) Landscape of the complete RNA chemical modifications in the human 80S ribosome. *Nucleic Acids Res* 46: 9289-9298
47. Ganley ARD, Kobayashi T (2007) Highly efficient concerted evolution in the ribosomal DNA repeats: Total rDNA repeat variation revealed by whole-genome shotgun sequence data. *Genome Res* 17: 184-191
48. Tørresen OK, Star B, Mier P, Andrade-Navarro MA, Bateman A, Jarnot P, Gruca A, Grynberg M, Kajava AV, Promponas VJ, Anisimova M, Jakobsen KS, Linke D (2019) Tandem repeats lead to sequence assembly errors and impose multi-level challenges for genome and protein databases. *Nucleic Acids Res* 47: 10994-11006
49. Møller HD, Parsons L, Jørgensen TS, Botstein D, Regenber B (2015) Extrachromosomal circular DNA is common in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 112: E3114-E312
50. Armache JP, Jarasch A, Anger AM, Villa E, Becker T, Bhushan S, Jossinet F, Habeck M, Dindar G, Franckenberg S, Marquez V, Mielke T, Thomm M, Berninghausen O, Beatrix B, Söding J, Westhof E, Wilson DN, Beckmann R (2010) Cryo-EM structure and rRNA model of a translating eukaryotic 80S ribosome at 5.5-A resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 19748-19753
51. Srivastava R.R., Srivastava R.R., Ahn S.H. (2016) The Epigenetic Pathways to Ribosomal DNA Silencing. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR, 80: 545-63
52. Mansisidor A., Molinar T. J., Srivastava P., Dartis D.D., Pino Delgado A., Blitzblau H.G., Klein Hochwagen A. (2018) Genomic Copy-Number Loss Is Rescued by Self-Limiting Production of DNA Circles. *Mol. Cell* 72: 583-593
53. Taoka M., Nobe Y., Yamaki Y., Sato K., Ishikawa H., Izumikawa K., Yamauchi Y., Hirota K., Nakayama H., Takahashi N., Isobe T. (2018) Landscape of the complete RNA chemical modifications in the human 80S ribosome. *Nucleic Acids Res.* 46: 9289-9298
54. Ganley A.R.D., Kobayashi T. (2007) Highly efficient concerted evolution in the ribosomal DNA repeats: Total rDNA repeat variation revealed by whole-genome shotgun sequence data. *Genome Res.* 17: 184-191
55. Tørresen O.K., Star B., Mier P., Andrade-Navarro M.A., Bateman A., Jarnot P., Gruca A., Grynberg M., Kajava A.V., Promponas V.J., Anisimova M., Jakobsen K.S., Linke D. (2019) Tandem repeats lead to sequence assembly errors and impose multi-level challenges for genome and protein databases. *Nucleic Acids Research.* 47: 10994-11006
56. Møller H.D., Parsons L., Jørgensen T.S., Botstein D., Regenber B. (2015) Extrachromosomal circular DNA is common in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112: E3114-E312
57. Armache J.P., Jarasch A., Anger A.M., Villa E., Becker T., Bhushan S., Jossinet F., Habeck M., Dindar G., Franckenberg S., Marquez V., Mielke T., Thomm M., Berninghausen O., Beatrix B., Söding J., Westhof E., Wilson D.N., Beckmann R. (2010) Cryo-EM structure and rRNA model of a translating eukaryotic 80S ribosome at 5.5-A resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107: 19748-19753

rRNA as a source of ribosomes variability and their non-translational functions

Agnieszka Czarnocka-Cieciura^{1, 2}✉

¹Laboratory of RNA Biology - ERA Chairs Group, International Institute of Molecular and Cell Biology in Warsaw

²Institute of Genetics and Biotechnology, Faculty of Biology, University of Warsaw

✉corresponding author: aczarnocka-cieciura@iimcb.gov.pl

Keywords: rRNA, ribosome, rDNA, ribosome populations

SUMMARY

Ribosomes are macromolecular complexes responsible for translation. During last few years our understanding of their role in the cell was changed. Discoveries showing their variability in the protein composition and rRNA sequence suggested that they can play an active role in the gene regulation, selecting mRNA molecules to be translated and affecting the shape of the proteome. Populations of polymorphic ribosomes are involved in the stress response, virulence and antibiotic sensitivity. Here, I discuss the described and potential functions of ribosomes containing polymorphisms in rRNA molecules, as well as factors limiting the development of research in this field.

