

STRESZCZENIE

Funkcjonowanie wszystkich żywych komórek jest zależne od precyzyjnego dostrojenia ekspresji genów i biosyntezy białek. Rybosomy, maszyny molekularne stanowiące centra translacji, były kiedyś uważane za niezmienną siłę napędową produkcji białek. Jednak badania z ostatnich lat wskazują, że rybosomy biorą aktywny udział w regulacji procesu translacji, między innymi przez wpływ na kontrolę inicjacji translacji, szybkości elongacji czy selektywności translacji mRNA. Dzieje się tak przez obecność subpopulacji rybosomów, różniących się składem rRNA i białek, ich modyfikacjami oraz stechiometrią białek. W tej publikacji skupiliśmy się na przybliżeniu tematu heterogeniczności rybosomów u eukariontów, wynikającej ze zmian w stechiometrii białek rybosomalnych oraz wykorzystania różnych paralogów białek.

WPROWADZENIE

Rybosomy odkryto w latach 50. XX wieku. Wtedy też zaobserwowano małe różnice w ich wielkości i kształcie i z tego powodu postulowano o ich heterogeniczności. Jednym ze zwolenników tej teorii był Francis Crick, współodkrywca molekularnej struktury DNA. W 1958 roku zaproponował model zwany "hipotezą jeden gen – jeden rybosom – jedno białko". Został on jednak bardzo szybko odrzucony. Przez lata dominował zatem pogląd o niezmiennej, jednolitej populacji rybosomów w organizmie. Dopiero rozwój technik (przede wszystkim wzrost rozdzielczości) wykorzystywanych w badaniu rybosomów, takich jak ilościowa spektrometria mas i kriomikroskopia elektronowa (ang. *cryogenic electron microscopy*, cryo-EM), spowodował ponowne zainteresowanie heterogenicznością tych rybonukleoprotein przeszło dekadę temu [1,2].

Rybosomy występują u organizmów prokariotycznych, jak i eukariotycznych, w cytoplazmie, na siateczce śródplazmatycznej, a także wewnątrz organelli. Są odpowiedzialne za biosyntezę białek w procesie translacji. Swoją funkcję spełniają dzięki dwóm podjednostkom rybosomowym (małej i dużej podjednostce), zbudowanym z rybosomalnych białek (ang. *ribosomal protein*, RP) i RNA (rRNA). Rybosomy są w wysokim stopniu niejednorodne, dzięki czemu mogą odgrywać dominującą rolę w regulacji translacyjnej. Wpływają na kontrolę inicjacji translacji, selektywność translacji mRNA, czy kontrolę szybkości elongacji translacji [1,3]. Regulacja translacji mRNA jest szczególnie istotna w procesach rozwojowych, takich jak embriogeneza, neurogeneza, spermatogeneza, a także oogeneza [3]. Utrata heterogeniczności rybosomów i/lub dysfunkcja białka rybosomalnego ma wpływ na proteom komórkowy i może powodować choroby, w tym rybosomopatie bądź nowotwory [4].

STRUKTURA RYBOSOMU

Podczas gdy kompletne struktury krystaliczne mniej złożonych rybosomów prokariotycznych są stale rozwiązywane począwszy od 2001 roku [5–8], jedynym organizmem eukariotycznym, dla którego znana jest struktura atomowa rybosomu, są jednokomórkowe drożdże *Saccharomyces cerevisiae* [9,10] (Ryc. 1). Rybosomy eukariotyczne różnią się wielkością od 3,3 MDa w drożdżach jednokomórkowych do 4,4 MDa u ludzi [11]. Zarówno u drożdży, jak i u ludzi mała podjednostka 40S składa się z 33 białek rybosomalnych i jednego rybosomalnego RNA, 18S rRNA [12,13]. Duża podjednostka 60S zawiera odpowiednio 46 RP u drożdży i 47 RP u ludzi, a także trzy różne rRNA: 5S, 5,8S i 25S u drożdży oraz 5S, 5,8S i 28S u ludzi [14]. Główne różnice w wielkości rybosomów między eukariontami wynikają przede wszystkim z obecności sekwencji wstawionych w rRNA oraz utraty lub obecności niektórych białek rybosomalnych [12,14]. Uderzające jest to, że pomimo niezwykle wysokiego zachowania funkcji rybosomów, tylko 34 RP są wspólne dla prokariotów i eukariontów [11].

mgr inż. Piotr Jerzy Pietras¹✉,

lic. Katarzyna Kamińska²,

lic. Sebastian Pęcherz²,

Julia Sobkowiak²,

dr hab. Kamilla Grzywacz¹,
prof. ICHB PAN

¹Institut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

²Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

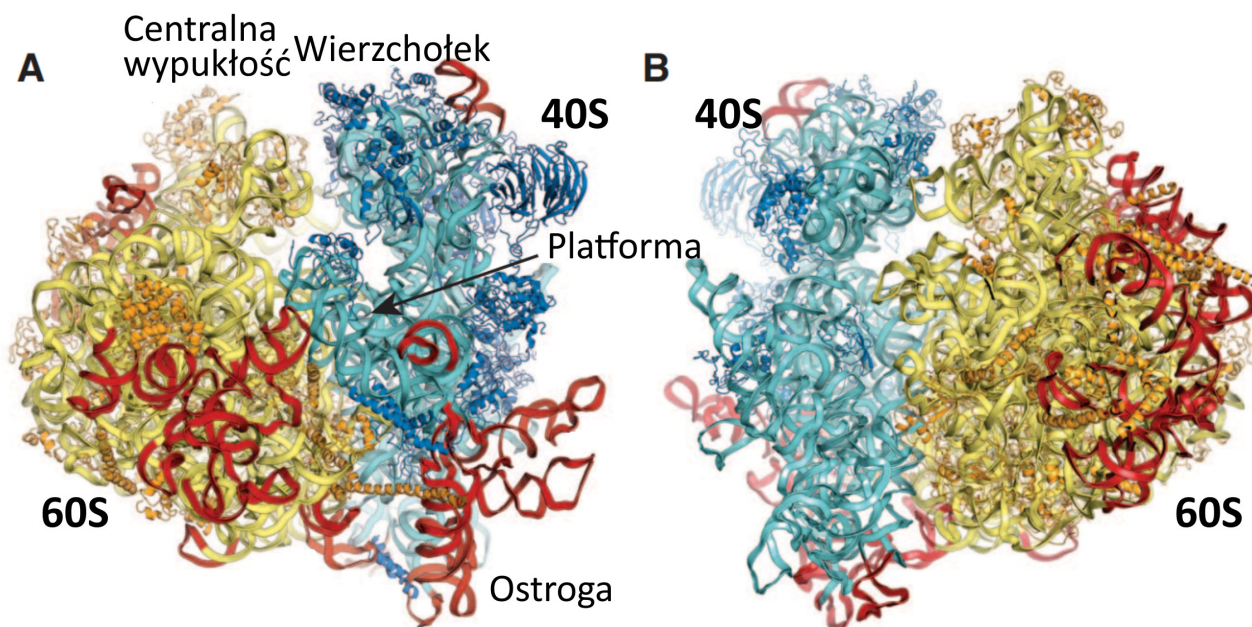
https://doi.org/10.18388/pb.2021_467

✉ autor korespondujący: ppietras@ibch.poznan.pl

Słowa kluczowe: heterogeniczność rybosomów, białka rybosomalne, paralogi, regulacja translacji

Wykaz skrótów: cryo-EM – kriomikroskopia elektronowa; DBA – Niedokrwistość Diamonda-Blackfana; ESC – embrionalne komórki macierzyste; HOX – geny homeoboksove; HSC – krwiotwórcze komórki macierzyste; IRES – wewnętrzne miejsca wiązania rybosomu; RP – białko rybosomalne; RPL – białko dużej podjednostki rybosomu; RPS – białko małej podjednostki rybosomu

Podziękowania: Praca powstała dzięki finansowaniu projektu naukowego „Zmiany w składzie białek rybosomalnych i w oddziałujących z rybosomami krótkich niekodujących RNA w *Saccharomyces cerevisiae* w odpowiedzi na stres środowiskowy” przez Narodowe Centrum Nauki (nr projektu UMO-2017/27/B/NZ1/01416).



Rycina 1. Struktura krystaliczna rybosomu 80S *S. cerevisiae* z zaznaczonymi strukturalnymi punktami orientacyjnymi (na podstawie [9]). (A) Widok od strony miejsca E wiązania tRNA. (B) Widok od strony miejsca A wiązania tRNA. Białka rybosomalne oznaczone są kolorem ciemnoniebieskim (podjednostka 40S) i ciemnożółtym (podjednostka 60S). Rybosomalne RNA oznaczono kolorem jasnoniebieskim (w 40S) i jasnożółtym (w 60S). Sekwencje wstawione w rRNA oznaczono na czerwono. Punkty orientacyjne obejmują: centralną wypukłość w 60S oraz wierzchołek, platformę i ostrogę w 40S.

Warto w tym miejscu wspomnieć, że w związku z rozwiązywaniem struktur rybosomów przez wiele grup badawczych, z wielu organizmów i niekiedy w jednakowym niemalże czasie, w wielu przypadkach przypisywano identyczne nazwy białkom rybosomalnym z różnych gatunków, które nie są spokrewnione pod względem struktury i funkcji. Stąd, po roku 2010, zaproponowano ujednoliconą nomenklaturę białek rybosomalnych [15], którą będziemy się posługiwać w niniejszym artykule. Ponieważ białka rybosomalne z *Escherichia coli* zostały jako pierwsze wyizolowane i w pełni zsekwencjonowane oraz są obszernie opisane w literaturze, w obowiązującej nomenklaturze RP, domyślna nazwa dla każdego białka występującego w konserwowanym rdzeniu rybosomu to nazwa bakteryjna. Białka znalezione w rybosomach ze wszystkich trzech domen mają przedrostek „u” (od „uniwersalne”), po którym następują ich nazwy z *E. coli*. Białka bakteryjne bez homologów eukariotycznych (lub z archeonów) oznaczają się przedrostkiem „b” (od „bakterie”). Podobnie białka rybosomalne archeonów pozbawione homologów zarówno w rybosomach eukariotycznych, jak i rybosomach prokariotycznych mają być identyfikowane przez przedrostek „a” (od „archeonony”). Te eukariotyczne białka rybosomalne, które nie mają homologów u bakterii, oznaczane są przy użyciu przedrostka „e” (od „eukarioty”).

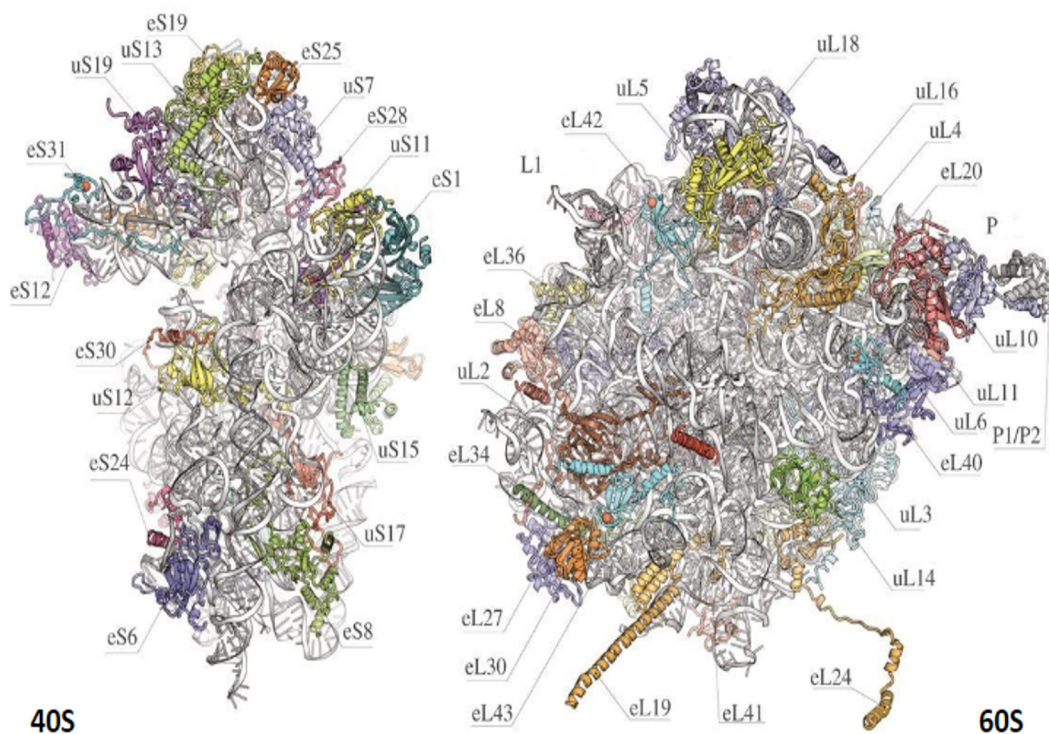
W rybosomie *S. cerevisiae* występuje 79 białek (Ryc. 2), każde w jednej kopii, oprócz słupka białek P (4 kopie) [5,6]. Rybosom 80S drożdży zawiera 46 białek specyficznych dla eukariotów (18 w podjednostce 40S, 28 w podjednostce 60S, Ryc. 2). Piętnaście RP małej podjednostki i 19 RP dużej podjednostki posiada swoje homologi w rybosomie bakteryjnym i są to białka stanowiące rdzeń rybosomu.

STECHEIOMETRIA BIAŁEK RYBOSOMALNYCH

Powszechnie uważa się, że rybosomy mają ustaloną stechiometrię białek rdzeniowych, jednak ostatnie liczne badania sugerują ich zmienny skład. W badaniu z 2018 roku, grupa naukowców z Uniwersytetu Stanforda dokonała pomiaru częstości występowania 15 z 80 rdzeniowych białek rybosomalnych w polisomach pochodzących z mysich embrionalnych komórek macierzystych (ang. *mouse embryonic stem cells*, mESC). Okazało się, że spośród badanych białek aż 6 wykazuje cechy substechiometryczne, a 4 z nich występują wyłącznie na 60–70% mysich polisomów. Wyniki te jednoznacznie wskazują na istnienie rybosomów pozbawionych przynajmniej jednego z białek rdzeniowych [1].

Kolejne opisane doświadczenia dostarczyły informacji na temat międzygatunkowych i wewnątrzgatunkowych różnic w składzie rybosomalnych białek i rRNA. Wśród badanych organizmów znalazły się między innymi myszy, drożdże, muchówki, Danio przegowane, a także ludzkie linie komórkowe [3,16,17]. Obok modyfikacji rRNA, koncepcja heterogeniczności rybosomów, wynikająca również z braku obecności niektórych RP lub ich modyfikacji, stawała się coraz bardziej zasadna. Zmiany w składzie lub budowie białek rybosomalnych nie zawsze skutkują różnicami w funkcjonowaniu całego rybosomu. Jeśli jednak rearanżacje składu RP objawiają się odmiennymi sposobami regulacji translacji mRNA przez różne populacje rybosomów w tych samych komórkach lub na konkretnym etapie rozwoju, mówimy o specjalizacji rybosomów [1,2]. Z tego powodu w ostatnim czasie coraz większym zainteresowaniem obdarzono badania nad rybosomami wyjaśniające wpływ zmian o charakterze stechiometrycznym RP na selektywność wobec określonych grup mRNA, a także na rolę jaką RP spełniają w regulacji translacji. Proces ten może być ustalany po-

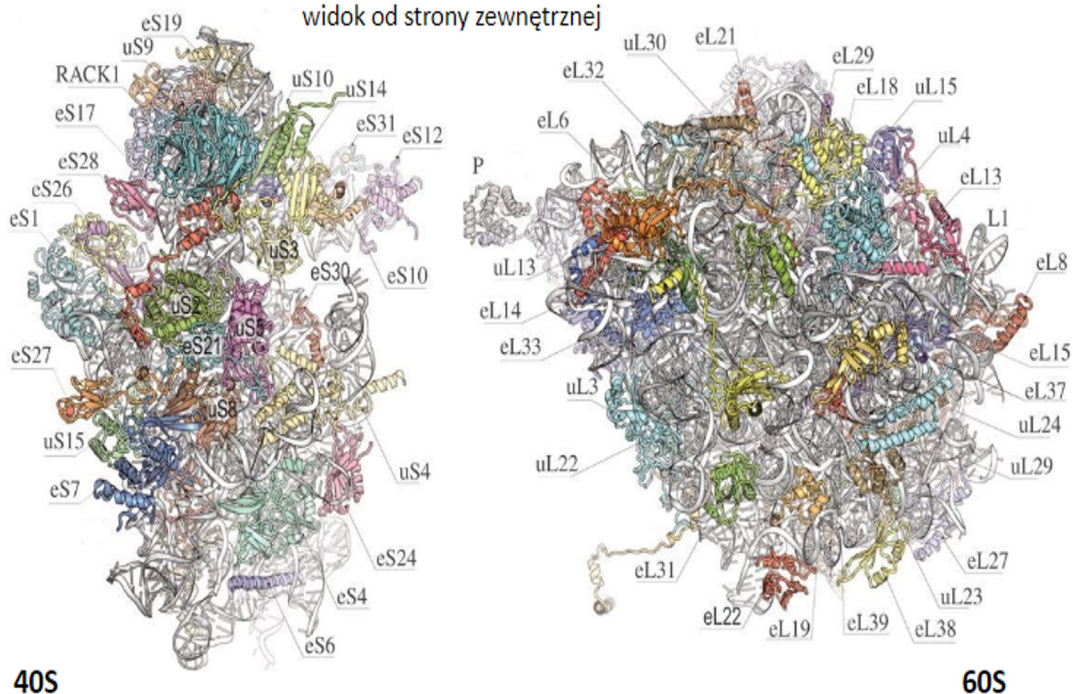
widok od strony oddziaływania podjednostek



40S

60S

widok od strony zewnętrznej



40S

60S

Rycina 2. Architektura podjednostek rybosomu z oznaczonymi białkami (na podstawie [9]). Białka rybosomów ze wszystkich trzech domen mają przedrostek „u”. Białka specyficzne dla eukariotów mają przedrostek „e”. Przedstawiono widok od strony oddziaływania podjednostek oraz widok od strony zewnętrznej rybosomu.

przez mechanizmy molekularne związane między innymi z rekrutacją podjednostek rybosomowych do regionów niepodlegających translacji (ang. *untranslated region*, UTR) oraz otwartych ramek odczytu (ang. *open reading frame*, ORF), rozpoznawaniem kodonu stop, czy parowaniem zasad miRNA/lncRNA-mRNA, a także mechanizmami wpływa-

jącymi na szybkość poszczególnych faz biosyntezy białek [3,18].

Badania przeprowadzone na drożdżach piekarskich (*Saccharomyces cerevisiae*) wykazały, że zawartość RP w rybosomach jest zależna od źródła węgla w pożywkach ho-

dowlanych. Analiza rybosomów drożdży hodowanych na pożywce o niższym stężeniu glukozy ujawniła większą ilość monosomów (obserwowaną jako wyższy pik absorpcji podczas profilowania polisomowego), dlatego spodziewa się, że zmienne warunki dostępności węgla przyczyniają się do różnego składu białkowego rybosomów i odmiennej regulacji translacyjnej [19,20].

Niekorzystnym skutkiem zmian stechiometrycznych w RP może być powstawanie poważnych wad rozwojowych. Przykładem takich aberracji są różnego stopnia zaburzenia oczu, tułowia, a także mózgu u *Danio* pęgowanego (*Danio rerio*), wywołane wyłączeniem 19 białek rybosomalnych z rybosomów z 21 testowanych podczas badania. Okazuje się więc, że zmiany w składzie białek rybosomów mogą generować zmienne fenotypy komórkowe [21,22].

Istotnymi badaniami w kontekście możliwych anomalii fizycznych generowanych przez zmiany w białkach rybosomalnych są te przeprowadzone na Myszy domowej (*Mus musculus*). Wykazano, że niedobór białka RPL24/eL24 powoduje hamowanie syntezy białek i proliferacji komórek. Wynikiem takich zmian może być skręcony ogon u badanych organizmów, a także polidaktylia przedosiowa – wada genetyczna, która u człowieka skutkuje obecnością dodatkowego kciuka [21,23]. Z kolei delecja RPL38/eL38 u *M. musculus* powoduje poważne zaburzenia neuronalne, a więc upośledzony wzorec szkieletowy, skutkujący przekształceniem przodu pierwszego kręgu lędźwiowego w kręg piersiowy. Następtwem tej modyfikacji jest obecność 14, a nie 13 żeber. Brak białka RPL38/eL38 objawia się utratą zdolności do translacji podzbioru mRNA homeoboksowych (HOX) – krytycznych regulatorów nadzorujących morfologię osiową szkieletu, przy jednoczesnym braku zmian globalnego procesu translacji. Obecność tego białka jest więc konieczna do przeprowadzenia translacji mRNA HOX. Analiza sekwencji RNA w regionie 5'-UTR HOX ujawniła także specyficzne struktury przypominające wewnętrzne miejsca wiązania rybosomu (ang. *internal ribosome entry site*, IRES). Wspomagają one rekrutację rybosomalną przez RPL38/eL38 [3,24,25]. Istnieją przesłanki, iż przyciąganie specyficznych rybosomów do 5'-UTR wielu komórkowych IRES, na przykład takich znajdujących się w protoonkogenach c-Myc, może zależeć od zawartości w rybosomach białka RPS25/eS25 [3, 26]. To samo białko spełnia funkcje kontrolne inicjacji translacji wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV), infekującego komórki ludzkie [3,27].

Różne typy komórek charakteryzują się specyficznym wzorcem ekspresji białek rybosomalnych. Wnioski te wyciągnięto na podstawie badań sekwencji RP w mysich i ludzkich tkankach, w komórkach krwiotwórczych i ludzkich liniach komórek nowotworowych. Okazało się, że brak lub wzmóżona ekspresja wielu białek rybosomalnych powoduje powstawanie specyficznego fenotypu nowotworowego [19,28]. Na przykład, mutacje wiążące się z utraceniem funkcji jednego allelu genu kodującego białka RPS5/uS7, RPS14/uS11 i RPS28/eS28 wpływają hamująco na różnicowanie embrionalnych komórek macierzystych (ang. *embryonic stem cells*, ESC), przy czym nie upośledzają ich samoodnawiania. ESC osiągają także dość wysoki stosunek ilości monosomów do polisomów. Tłumaczono, że taki

stan zwiększa zdolność regulacji translacji przez rybosomy [19,29]. Dowiedziono także, że częste mutacje białek rybosomalnych RPL5/uL18 i RPL10/uL16 związane z utratą pewnych funkcji w procesie nowotworowym, powiązane są ze wzbogaceniem puli monosomów w mRNA, z kolei obecność i zwiększona ekspresja RP przyczyniających się do powstania nowotworów, takich jak RPL30/eL30, RPS20/uS10 i RPL39/eL39, powoduje wzbogacenie puli polisomów. Oba te mechanizmy sprzyjają wzrostowi komórek rakowych [3,19,30]. Ponadto, wiele polisomów pochodzących z różnych linii komórek nowotworowych wyróżnia się podobnym składem pod względem białek rybosomalnych [31].

Niezwykle ważnym aspektem są także ludzkie zaburzenia neurorozwojowe, rybosomopatie, a więc jednostki chorobowe związane z mutacjami genów kodujących białka rybosomalne oraz białka wspomagające proces powstawania rybosomów. Zakłócenia składu specyficznych populacji rybosomów mogą powodować poważne choroby. Jedną z nich jest niedokrwistość Diamonda-Blackfana (DBA), objawiająca się niewydolnością szpiku kostnego, na skutek zaburzonego różnicowania krwiotwórczych komórek macierzystych. Uważa się, że za chorobę mogą odpowiadać mutacje występujące w aż 15 białek rybosomalnych, między innymi RPS19/eS19, RPS24/eS24, RPS17/eS17, RPL5/uL18, RPL11/uL5 i RPL35A/eL33 [1, 32, 33]. Podejrzewa się również, że ten rodzaj niedokrwistości może być wywołany zmniejszoną zawartością funkcjonalnych rybosomów na skutek mutacji białkowych. To z kolei mogłoby wpłynąć na szybkość procesu translacji i defekty komórkowe. Rozwój DBA nie wymaga mutacji we wszystkich białkach rybosomalnych. Wykazano, że zmniejszenie ekspresji jednego białka, RPS19/eS19, powoduje opisywaną chorobę, poprzez wpływ na syntezę specyficznych białek [34]. Także inne białka rybosomalne, RPS7/eS7 oraz RPS26/eS26, ulegające mutacjom w niedokrwistości Diamonda-Blackfana, okazały się substechiometryczne. Dzięki temu rybosomy ulegają specjalizacji i powodują wiele wad wrodzonych charakterystycznych dla komórek tego typu zaburzenia [35]. Wśród nich mogą znaleźć się wady kończyn, nieprawidłowości rozwojowe serca, niewydolność wzrostu, a nawet predysponowanie do rozwoju nowotworów. Brak białka RPSA/uS2 skutkuje asplenią – wrodzonym brakiem śledziony lub ustaniem jej funkcji [36], a mutacje w RPL21/eL21 mogą doprowadzić do utraty włosów. Do poważnych objawów klinicznych powiązanych z chorobą DBA należy także małogłowie spowodowane utratą funkcji RPL10/uL16. Kilka rodzajów mutacji tego białka powoduje zaburzenia ze spektrum autyzmu [3,37,38].

Przykłady białek rybosomalnych omawianych w niniejszej pracy, przyczyniających się do heterogeniczności rybosomów eukariotycznych zostały zebrane w tabeli 1.

PARALOGI BIAŁEK RYBOSOMALNYCH

Znaczna część rybosomalnych białek obecnych u niższych, a także wyższych eukariontów takich jak: Żaba szponiasta (*Xenopus laevis*) [39], muszka owocowa (*Drosophila melanogaster*) [40], *M. musculus* [16] lub nicienie *Caenorhabditis elegans* [41], jest kodowana przez paralogi, odznaczające się

Tabela 1. Przykłady białek rybosomalnych przyczyniających się do heterogeniczności rybosomów eukariotycznych.

Białko	Organizm	Heterogeniczność	Objawy
RPL3/uL3	<i>M. musculus</i>	Paralog	Wzrost mięśni szkieletowych
	<i>H. sapiens</i>	Paralog	Migotanie przedsionków
RPL5/uL18	<i>H. sapiens</i>	Stechiometria	Wpływ na ilość monosomów/polisomów Niedokrwistość Diamonda-Blackfana
RPL7/uL30	<i>S. cerevisiae</i>	Paralog	Oporności na lek staurosporynę Pączkowane
RPL10/uL16	<i>H. sapiens</i>	Stechiometria	Wpływ na ilość monosomów/polisomów Niedokrwistość Diamonda-Blackfana Małogłowie Autyzm
	<i>M. musculus</i>	Paralog	Spermatogeneza
RPL12/uL11	<i>S. cerevisiae</i>	Paralog	Pączkowanie
RPL22/eL22	<i>D. rerio</i>	Paralog	Rozwój układu krwiotwórczego
	<i>S. cerevisiae</i>	Paralog	Odporność na stres oksydacyjny Pączkowanie
RPL24/eL24	<i>M. musculus</i>	Stechiometria	Skręcony ogon Polidaktylia przedosiowa
RPL30/eL30	<i>H. sapiens</i>	Stechiometria	Wpływ na ilość monosomów/polisomów
RPL38/eL38	<i>M. musculus</i>	Stechiometria	Upośledzony wzorzec szkieletowy
RPL39/eL39	<i>H. sapiens</i>	Stechiometria	Wpływ na ilość monosomów/polisomów
	<i>M. musculus</i>	Paralog	Spermatogeneza
RPS5/uS7	<i>M. musculus</i>	Stechiometria	Hamujący wpływ na różnicowanie
	<i>D. melanogaster</i>	Paralog	Rozwój oocytu
RPS7/eS7	<i>H. sapiens</i>	Stechiometria	Niedokrwistość Diamonda-Blackfana
RPS14/uS11	<i>M. musculus</i>	Stechiometria	Hamujący wpływ na różnicowanie
RPS15A/uS8	<i>D. melanogaster</i>	Paralog	Utrzymanie macierzystych linii germinalnych
RPS18/uS13	<i>S. cerevisiae</i>	Paralog	Pączkowanie
RPS19/eS19	<i>H. sapiens</i>	Stechiometria	Niedokrwistość Diamonda-Blackfana
	<i>D. melanogaster</i>	Paralog	Utrzymanie macierzystych linii germinalnych Różnicowanie w germarium jajnika
RPS20/uS10	<i>H. sapiens</i>	Stechiometria	Wpływ na ilość monosomów/polisomów
RPS25/eS25	<i>H. sapiens</i>	Stechiometria	Kontrola inicjacji translacji wirusa HCV
RPS26/eS26	<i>H. sapiens</i>	Stechiometria	Niedokrwistość Diamonda-Blackfana
RPS28/eS28	<i>M. musculus</i>	Stechiometria	Hamujący wpływ na różnicowanie
RPSA/uS2	<i>H. sapiens</i>	Stechiometria	Asplenia

wysokim podobieństwem sekwencji. Obecnie zjawisko to jest najlepiej poznane w linii wiodącej *S. cerevisiae*. Początkowo twierdzono, że występowanie paralogicznych genów białek rybosomalnych u drożdży jest wynikiem podwojenia genomu, które miało miejsce we wczesnym etapie ewolucji, a w późniejszym czasie uległo utrwaleniu. Nieco odmienny punkt widzenia przedstawili jednak Marcet-Houben i Gabaldón, którzy w odniesieniu do drożdży zasugerowali, że na pierwszym etapie musiało dojść do skrzyżowania dwóch

blisko spokrewnionych gatunków, a natomiast samo podwojenie genomu wynikało z konieczności przywrócenia płodności [42–44].

Dotychczas prowadzone badania, mające na celu określenie roli poszczególnych paralogów białek rybosomalnych, m. in. w drożdżach, amebach, muchach oraz kręgowcach, wykazały, że pary paralogów RP w większości miały odmiennie, a często nawet przeciwne wzorce ekspresji, a co

za tym idzie, cechowały się odmiennymi, specyficznymi funkcjami [45–47]. Ponadto, zgromadzone jak dotąd dane transkryptomyczne oraz proteomiczne potwierdzają specyficzność tkankową i funkcjonalną znacznej części analizowanych paralogów [3]. Nawiązuje do tego „ kod rybosomalny”, czyli opracowany model specyficzności paralogu, który zakłada, że różne paralogi rybosomalnych białek są w stanie regulować odmiennie procesy fizjologiczne [48]. W związku z tym w komórkach mogą występować różne subpopulacje rybosomów, cechujące się odmiennym składem paralogu RP.

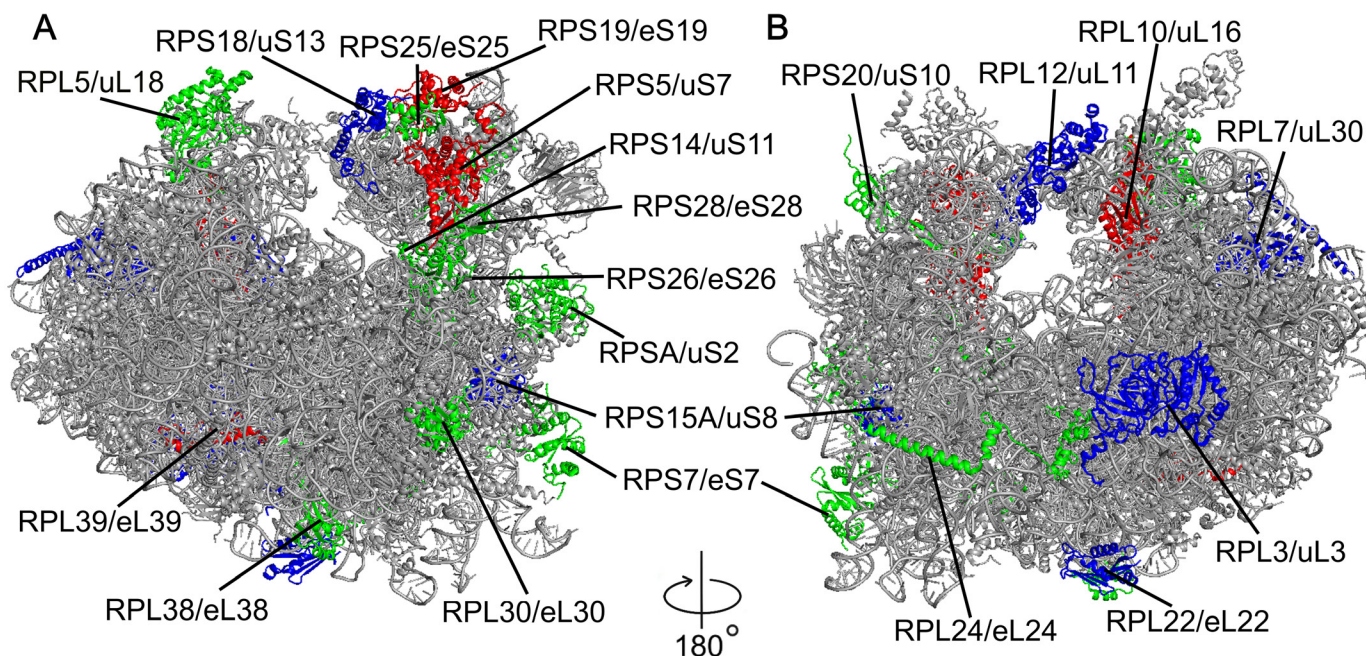
Przykładowo, u gryzoni ekspresję specyficzną dla jąder wykazują RPL10L/uL16L i RPL39L/eL39L, co może świadczyć o potencjalnym mechanizmie specjalizacji rybosomów podczas spermatogenezy [3,49]. Co więcej, wykazano, że paralogi RPL39/eL39 oraz RPL39L/eL39L są konieczne do przebiegu spermatogenezy u myszy. Natomiast w przypadku delecji RPL39L/eL39L zaobserwowano spadek proliferacji komórek macierzystych spermatogoniów, zniekształcenie wici plemników oraz mitochondriów, co ostatecznie przyczyniło się do zmniejszenia płodności u samców. Przedstawione dane jednoznacznie wskazują, że utrzymanie proteostazy jest niezwykle istotne dla prawidłowego przebiegu spermatogenezy [50].

Z kolei inne badania wykazały specyficzność tkankową paralogu RPL3L/uL3L dla tkanki mięśni poprzecznie prążkowanych, a w szczególności dla mięśni szkieletowych, gdzie RPL3L/uL3L pełni rolę w regulacji ich wzrostu [51]. Co więcej w mięśniu szkieletowym, a także w ludzkim sercu zlokalizowano najwyższy poziom RNA dla paralogu RPL3L/uL3L, którego mutacja została powiązana ze zwiększonym ryzykiem migotania przedsionków [52].

W przypadku badań na zarodkach *Danio* pęgowanego zauważono, że paralogi RPL22/eL22 i RPL22L1/eL22L1 pełnią zasadniczą i ograniczoną tkankowo rolę w trakcie rozwoju układu krwiotwórczego [28]. RPL22L1/eL22L1 promuje ekspresję genu *Smad1*, a także powstanie krwiotwórczych komórek macierzystych (ang. *hematopoietic stem cells*, HSC), przeciwnie do roli RPL22/eL22, który wykazuje działanie hamujące na ekspresję *Smad1* i powstanie HSC. W związku z tym krytycznym, odrębnym oraz antagonicznym udziałem paralogów w tworzeniu się HSC, obserwujemy rozwój limfocytów T pod wpływem działania RPL22L1/eL22L1 oraz zahamowanie jako efekt działania RPL22/eL22 [53].

Badania przesiewowe skoncentrowane na interferencji RNA u *Drosophila* uwiarygodniły, że paralogiczne białka rybosomalne są niezwykle ważne na różnych etapach rozwoju oocytów. Funkcje paralogów RP obejmują utrzymanie macierzystych linii germinalnych (RPS15Ab/uS8b i RPS19b/eS19b), a także wczesne różnicowanie w germarium jajnika (RPS19a/eS19a), co sugeruje, że rybosomy przeprowadzają translację różnych pul mRNA. Również pary paralogów RPS5a/uS7a i RPS5b/uS7b zostały precyzyjnie opisane u *D. melanogaster* jako pełniące odmiennie funkcje podczas rozwoju oocytów. RPS5a ulega ekspresji w komórkach pęcherzyka otaczającego linię zarodkową, a RPS5b jest obecny w komórkach linii zarodkowej [3].

Wystawienie drożdży *S. cerevisiae* na stres prowadzi do modyfikacji stosunku ekspresji paralogów, poprzez represję ekspresji głównego paralogu, a to z kolei skutkuje zwiększeniem puli rybosomów posiadających drugi paralog [54]. Skład rybosomów, jak i translacja ulega modyfikacji pod



Rycina 3. Lokalizacja białek rybosomalnych przyczyniających się do heterogeniczności rybosomów eukariotycznych. Przedstawiono strukturę krystaliczną rybosomu 80S *S. cerevisiae* (na podstawie [6]). (A) Widok od strony miejsca E wiązania tRNA. (B) Widok od strony miejsca A wiązania tRNA. Białka rybosomalne powodujące heterogeniczność rybosomów oznaczono kolorem niebieskim (paralogi), zielonym (zmiany stechiometryczne) oraz czerwonym (paralogi i zmiany stechiometryczne). Pozostałe białka rybosomalne oraz rRNA oznaczono kolorem szarym.

wplywem ekspozycji na leki. Duplikacja genów może mieć zastosowanie jako mechanizm adaptacji do czynników stresowych, który poprzez zróżnicowany poziom ekspresji paralogów RP moduluje globalny proteom. Przykładowo, dla pary RPL7A/uL30A i RPL7B/uL30B optymalną biogenezę rybosomów i wzrost komórek zapewnia hipoacetylowany dominujący paralog RPL7A/uL30A, który sprzyja translacji mRNA z krótkimi otwartymi ramkami odczytu. Do uzyskania optymalnej oporności na lek staurosporynę, konieczny jest hiperacetylowany RPL7B/uL30B, który zwiększa translację długich otwartych ramek odczytu [55]. W badaniu poświęconym wrażliwości drożdży na stres oksydacyjny wykryto wzrost ekspresji paralogu RPL22A/eL22A. Dodatkowo, wyniki jednoznacznie potwierdziły, że brak paralogu RPL22A/eL22A przyczyniał się do zwiększonej wrażliwości na nadtlenek wodoru, wskazując na jego znaczącą rolę w odpowiedzi na stres oksydacyjny [56].

Odkryto, że rybosomy zawierające białka RPL7A/uL30A, RPL22A/eL22A, RPL12A/uL11A oraz RPS18B/uS13B regulują translację ASH1, białka odgrywającego kluczową rolę w bezpłciowym rozmnażaniu, pączkowaniu. Regulacyjnych funkcji tych RP nie mogą natomiast spełnić właściwe im paralogi [3,48].

Lokalizację omawianych białek rybosomalnych przyczyniających się do heterogeniczności rybosomów eukariotycznych przedstawiono na rycinie 3.

PODSUMOWANIE

Regulacja translacji poprzez zmiany składu białek rybosomalnych spełnia istotną rolę dla funkcjonowania wielu komórek i tkanek. Dodatkowo, zależnie od rodzaju tkanki oraz warunków, komórki posiadają zdolność zmiany składu rdzeniowych białek rybosomów, modulując w ten sposób wydajnością translacji specyficznych mRNA. Aktualnym wyzwaniem dla rozwoju nauki w kontekście heterogeniczności rybosomów wpływającej na ich specjalizację, jest problem z ograniczoną możliwością bezpośredniego wykrywania swoistości interakcji między konkretnymi białkami rybosomalnymi a specyficznymi pulami mRNA. Wyniki badań wskazują podobne efekty regulatorowe różnych zmian struktury dla wielu białek rybosomalnych. Ważnym celem najnowszych badań z pewnością stanie się także próba odkrycia które części białek rybosomalnych są niezbędne do rozpoznawania preferencyjnych mRNA oraz czy wiązanie RP z odpowiednim transkryptem zmienia strukturę całościową rybosomu. Związanie mRNA może bowiem spowodować dodatkową rearanżację białkową, w jeszcze lepszy sposób dostosowującą translację do specyficznych mRNA. Jedna zmiana w składzie białkowym może powodować kolejne w obrębie danego rybosomu. Delecja RPS25/eS25 powoduje wzrost paralogu RPL22L1/eL22L1 kosztem RPL22/eL22. Podczas gdy większość paralogów RP jest bardzo podobna na poziomie sekwencji, ludzkie RPL22/eL22 i RPL22L1/eL22L1 są dość rozbieżne i w zależności od porównywanych izoform są w 50–70% identyczne [57].

PIŚMIENNICTWO

- Genuth NR, Barna M (2018) The Discovery of Ribosome Heterogeneity and Its Implications for Gene Regulation and Organismal Life. *Mol Cell* 71:364–374.
- Emmott E, Jovanovic M, Slavov N (2019) Ribosome Stoichiometry: From Form to Function. *Trends Biochem Sci* 44:95–109
- Norris K, Hopes T, Aspden JL (2021) Ribosome heterogeneity and specialization in development. *WIREs RNA* 12(4), e1644
- Gerst JE (2018) Pimp My Ribosome: Ribosomal Protein Paralogs Specify Translational Control. *TIG* 34:832–845
- Korostelev A, Trakhanov S, Laurberg M, Noller HF (2006) Crystal Structure of a 70S Ribosome-tRNA Complex Reveals Functional Interactions and Rearrangements. *Cell* 126:1065–1077
- Schuwirth BS, Borovinskaya MA, Hau CW, Zhang W, Vila-Sanjurjo A, Holton JM, Cate JHD (2005) Structures of the Bacterial Ribosome at 3.5 Å Resolution. *Science* 310:827–834
- Selmer M, Dunham CM, Murphy FV, Weixlbaumer A, Petry S, Kelley AC, Weir JR, Ramakrishnan V (2006) Structure of the 70 S Ribosome Complexed with mRNA and tRNA. *Science* 313:1935–1942
- Yusupov MM, Yusupova GZ, Baucom A, Lieberman K, Earnest TN, Cate JHD, Noller HF (2001) Crystal Structure of the Ribosome at 5.5 Å Resolution. *Science* 292:15
- Ben-Shem A, Jenner L, Yusupova G, Yusupov M (2010) Crystal Structure of the Eukaryotic Ribosome. *Science* 330:1203–1209
- Ben-Shem A, de Loubresse NG, Melnikov S, Jenner L, Yusupova G, Yusupov M (2011) The Structure of the Eukaryotic Ribosome at 3.0 Å Resolution. *Science* 334:7
- Melnikov S, Ben-Shem A, Garreau de Loubresse N, Jenner L, Yusupova G, Yusupov M (2012) One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nat Struct Mol Biol* 19:560–567
- Klinge S, Voigts-Hoffmann F, Leibundgut M, Ban N (2012) Atomic structures of the eukaryotic ribosome. *Trends Biochem Sci* 37:189–198
- Rabl J, Leibundgut M, Ataide SF, Haag A, Ban N (2011) Crystal Structure of the Eukaryotic 40S Ribosomal Subunit in Complex with Initiation Factor 1. *Science* 331:8
- Klinge S, Voigts-Hoffmann F, Leibundgut M, Arpagaus S, Ban N (2011) Crystal Structure of the Eukaryotic 60S Ribosomal Subunit in Complex with Initiation Factor 6. *Science* 334:9
- Ban N, Beckmann R, Cate JH, Dinman JD, Dragon F, Ellis SR, Lafontaine DL, Lindahl L, Liljas A, Lipton JM, McAlear MA, Moore PB, Noller HF, Ortega J, Panse VG, Ramakrishnan V, Spahn CM, Steitz TA, Tchorzewski M, Tollervey D, Warren AJ, Williamson JR, Wilson D, Yonath A, Yusupov M (2014) A new system for naming ribosomal proteins. *Curr Opin Struct Biol* 24:165–169
- Hebras J, Krogh N, Marty V, Nielsen H, Cavaillé J (2020) Developmental changes of rRNA ribose methylations in the mouse. *RNA Biol* 17:150–164
- Krogh N, Jansson MD, Häfner SJ, Tehler D, Birkedal U, Christensen-Dalsgaard M, Lund AH, Nielsen H (2016) Profiling of 2'-O-Me in human rRNA reveals a subset of fractionally modified positions and provides evidence for ribosome heterogeneity. *Nucleic Acids Res* 44:7884–7895
- Tahmasebi S, Amiri M, Sonenberg N (2019) Translational Control in Stem Cells. *Front Genet* 9:709
- Slavov N, Semrau S, Airoidi E, Budnik B, van Oudenaarden A (2015) Differential Stoichiometry among Core Ribosomal Proteins. *Cell Rep* 13:865–873
- Vaidyanathan PP, Zinshteyn B, Thompson MK, Gilbert WV (2014) Protein kinase A regulates gene-specific translational adaptation in differentiating yeast. *RNA* 20:912–922.
- Li D, Wang J (2020) Ribosome heterogeneity in stem cells and development. *J Cell Biol* 219:e202001108
- Uechi T, Nakajima Y, Nakao A, Torihara H, Chakraborty A, Inoue K, Kenmochi N (2006) Ribosomal Protein Gene Knockdown Causes Developmental Defects in Zebrafish. *PLoS ONE* 1:e37

23. Oliver ER, Saunders TL, Tarlé SA, Glaser T (2004) Ribosomal protein L24 defect in Belly spot and tail (*Bst*), a mouse *Minute*. *Development* 131:3907–3920
24. Kondrashov N, Pusic A, Stumpf CR, Shimizu K, Hsieh AC, Xue S, Ishijima J, Shiroishi T, Barna M (2011) Ribosome-Mediated Specificity in Hox mRNA Translation and Vertebrate Tissue Patterning. *Cell* 145:383–397
25. Xue S, Tian S, Fujii K, Kladwang W, Das R, Barna M (2015) RNA regulons in Hox 5' UTRs confer ribosome specificity to gene regulation. *Nature* 517:33–38
26. Hertz MI, Landry DM, Willis AE, Luo G, Thompson SR (2013) Ribosomal Protein S25 Dependency Reveals a Common Mechanism for Diverse Internal Ribosome Entry Sites and Ribosome Shunting. *Mol Cell Biol* 33:1016–1026
27. Landry DM, Hertz MI, Thompson SR (2009) RPS25 is essential for translation initiation by the *Dicistroviridae* and hepatitis C viral IRESs. *Genes Dev* 23:2753–2764
28. Guimaraes JC, Zavolan M (2016) Patterns of ribosomal protein expression specify normal and malignant human cells. *Genome Biol* 17:236
29. Fortier S, MacRae T, Bilodeau M, Sargeant T, Sauvageau G (2015) Haploinsufficiency screen highlights two distinct groups of ribosomal protein genes essential for embryonic stem cell fate. *Proc Natl Acad Sci USA* 112:2127–2132
30. Lawrence MS, Stojanov P, Mermel CH, Robinson JT, Garraway LA, Golub TR, Meyerson M, Gabriel SB, Lander ES, Getz G (2014) Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature* 505:495–501
31. Reschke M, Clohessy JG, Seitzer N, Goldstein DP, Breitkopf SB, Schmolze DB, Ala U, Asara JM, Beck AH, Pandolfi PP (2013) Characterization and Analysis of the Composition and Dynamics of the Mammalian Riboproteome. *Cell Rep* 4:1276–1287
32. Boria I, Garelli E, Gazda HT, Aspesi A, Quarello P, Pavesi E, Ferrante D, Meerpohl JJ, Kartal M, Da Costa L, Proust A, Leblanc T, Simansour M, Dahl N, Frömberg A-S, Pospisilova D, Cmejla R, Beggs AH, Sheen MR, Landowski M, M. Buros C, M. Clinton C, J. Dobson L, Vlachos A, Atsidaftos E, Lipton JM, Ellis SR, Ramenghi U, Dianzani I (2010) The ribosomal basis of diamond-blackfan anemia: mutation and database update. *Hum Mutat* 31:1269–1279
33. Danilova N, Gazda HT (2015) Ribosomopathies: how a common root can cause a tree of pathologies. *Dis Model Mech* 8:1013–1026
34. Horos R, Ijspeert H, Pospisilova D, Sendtner R, Andrieu-Soler C, Taksken E, Nieradka A, Cmejla R, Sendtner M, Touw IP, von Lindern M (2012) Ribosomal deficiencies in Diamond-Blackfan anemia impair translation of transcripts essential for differentiation of murine and human erythroblasts. *Blood* 119:262–272
35. Shi Z, Fujii K, Kovary KM, Genuth NR, Röst HL, Teruel MN, Barna M (2017) Heterogeneous Ribosomes Preferentially Translate Distinct Subpools of mRNAs Genome-wide. *Mol Cell* 67:71–83.e7
36. Bolze A, Mahlaoui N, Byun M, Turner B, Trede N, Ellis SR, Abhyankar A, Itan Y, Patin E, Brebner S, Sackstein P, Puel A, Picard C, Abel L, Quintana-Murci L, Faust SN, Williams AP, Baretto R, Duddridge M, Kini U, Pollard AJ, Gaud C, Frange P, Orbach D, Emile J-F, Stephan J-L, Sorensen R, Plebani A, Hammarstrom L, Conley ME, Selleri L, Casanova J-L (2013) Ribosomal Protein SA Haploinsufficiency in Humans with Isolated Congenital Asplenia. *Science* 340:976–978
37. Brooks SS, Wall AL, Golzio C, Reid DW, Kondyles A, Willer JR, Botti C, Nicchitta CV, Katsanis N, Davis EE (2014) A Novel Ribosomopathy Caused by Dysfunction of RPL10 Disrupts Neurodevelopment and Causes X-Linked Microcephaly in Humans. *Genetics* 198:723–733
38. Kampen KR, Sulima SO, Verbelen B, Girardi T, Vereecke S, Rinaldi G, Verbeeck J, Op de Beek J, Uyttebroeck A, Meijerink JPP, Moorman AV, Harrison CJ, Spincemaille P, Cools J, Cassiman D, Fendt S-M, Vermeersch P, De Keersmaecker K (2019) The ribosomal RPL10 R98S mutation drives IRES-dependent BCL-2 translation in T-ALL. *Leukemia* 33:319–332
39. Shigeoka T, Koppers M, Wong HH-W, Lin JQ, Cagnetta R, Dwivedy A, de Freitas Nascimento J, van Tartwijk FW, Ströhl F, Cioni J-M, Schaeffer J, Carrington M, Kaminski CF, Jung H, Harris WA, Holt CE (2019) On-Site Ribosome Remodeling by Locally Synthesized Ribosomal Proteins in Axons. *Cell Rep* 29:3605–3619.e10
40. Mageeey CM, Ware VC (2019) Specialized eRpl22 paralogue-specific ribosomes regulate specific mRNA translation in spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. *MBoC* 30:2240–2253
41. Cenik ES, Meng X, Tang NH, Hall RN, Arribere JA, Cenik C, Jin Y, Fire A (2019) Maternal Ribosomes Are Sufficient for Tissue Diversification during Embryonic Development in *C. elegans*. *Dev Cell* 48:811–826.e6
42. Wolfe KH, Shields DC (1997) Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* 387:708–713
43. Hu X, Jiang S, Xu F, Zeng C, Wang X, Liu W, Cheng A, Ma C, Gao N, Zhao Y, Dai J, Zhao G (2022) Engineering and functional analysis of yeast with a monotypic 40S ribosome subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 119:e2114445119
44. Wolfe KH (2015) Origin of the Yeast Whole-Genome Duplication. *PLoS Biol* 13:e1002221
45. Shi Z, Barna M (2015) Translating the Genome in Time and Space: Specialized Ribosomes, RNA Regulons, and RNA-Binding Proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 31:31–54
46. Dinman JD (2016) Pathways to Specialized Ribosomes: The Brussels Lecture. *J Mol Biol* 428:2186–2194
47. Xue S, Barna M (2012) Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:355–369
48. Komili S, Farny NG, Roth FP, Silver PA (2007) Functional Specificity among Ribosomal Proteins Regulates Gene Expression. *Cell* 131:557–571
49. Sugihara Y, Honda H, Iida T, Morinaga T, Hino S, Okajima T, Matsuda T, Nadano D (2010) Proteomic Analysis of Rodent Ribosomes Revealed Heterogeneity Including Ribosomal Proteins L10-like, L22-like 1, and L39-like. *J Proteome Res* 9:1351–1366
50. Zou Q, Yang L, Shi R, Qi Y, Zhang X, Qi H (2021) Proteostasis regulated by testis-specific ribosomal protein RPL39L maintains mouse spermatogenesis. *iScience* 24:103396
51. Chaillou T, Kirby TJ, McCarthy JJ (2014) Ribosome Biogenesis: Emerging Evidence for a Central Role in the Regulation of Skeletal Muscle Mass: RIBOSOME BIOGENESIS IN SKELETAL MUSCLE. *J Cell Physiol* 229:1584–1594
52. Thorolfsson RB, Sveinbjornsson G, Sulem P, Nielsen JB, Jonsson S, Halldorsson GH, Melsted P, Ivarsdottir EV, Davidsson OB, Kristjansson RP, Thorleifsson G, Helgadóttir A, Gretarsdóttir S, Norddahl G, Rajamani S, Torfason B, Valgardsson AS, Sverrisson JT, Tragante V, Holmen OL, Asselbergs FW, Roden DM, Darbar D, Pedersen TR, Sabatine MS, Willer CJ, Løchen M-L, Halldorsson BV, Jonsdóttir I, Hveem K, Arnar DO, Thorsteinsdóttir U, Gudbjartsson DF, Holm H, Stefansson K (2018) Coding variants in RPL3L and MYZAP increase risk of atrial fibrillation. *Commun Biol* 1:68
53. Zhang Y, Duc A-CE, Rao S, Sun X-L, Bilbee AN, Rhodes M, Li Q, Kappes DJ, Rhodes J, Wiest DL (2013) Control of Hematopoietic Stem Cell Emergence by Antagonistic Functions of Ribosomal Protein Paralogs. *Dev Cell* 24:411–425
54. Ghulam MM, Catala M, Abou Elela S (2020) Differential expression of duplicated ribosomal protein genes modifies ribosome composition in response to stress. *Nucleic Acids Res* 48:1954–1968.
55. Malik Ghulam M, Catala M, Reulet G, Scott MS, Abou Elela S (2022) Duplicated ribosomal protein paralogs promote alternative translation and drug resistance. *Nat Commun* 13:4938
56. Chan CTY, Pang YLJ, Deng W, Babu IR, Dyavaiah M, Begley TJ, DeDon PC (2012) Reprogramming of tRNA modifications controls the oxidative stress response by codon-biased translation of proteins. *Nat Commun* 3:937
57. Johnson AG, Flynn RA, Lapointe CP, Ooi YS, Zhao ML, Richards CM, Qiao W, Yamada SB, Couthous J, Gitler AD, Carette JE, Puglisi JD (2020) A memory of eS25 loss drives resistance phenotypes. *Nucleic Acids Res* 48(13):7279–7297

Ribosome heterogeneity as a new element of translation regulation

Piotr Jerzy Pietras¹✉, Katarzyna Kamińska², Sebastian Pęcherz², Julia Sobkowiak², Kamilla Grzywacz¹

¹Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, Poznań

²Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University, Poznań

✉ppietras@ibch.poznan.pl

Keywords: ribosome heterogeneity, ribosomal proteins, paralogs, regulation of translation

ABSTRACT

All living cells depend on the fine-tuning of gene expression and protein biosynthesis. Ribosomes, the molecular machines at the center of translation, have been previously considered the invariable driving force of protein production. However, recent studies indicated that the ribosomes are actively involved in the regulation of translation, influencing the control of translation initiation, the elongation speed, and the mRNA translation selectivity. This is due to the presence of subpopulations of the ribosomes, which differ in rRNAs and protein composition, their modifications and protein stoichiometry. In this publication, we focused our attention on the ribosomal heterogeneity in eukaryotes, which results from the changes in the stoichiometry of the ribosomal proteins and the existence of protein paralogs.

HETEROGENICZNOŚĆ RYBOSOMÓW

