

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Speciální chemicko-biologické obory
Molekulární biologie a biochemie organismů



Bakalářská práce

Vliv modifikací rRNA na syntézu proteinů
Impact of the rRNA modifications on protein synthesis

Eliška Kročová

Školitel: RNDr. Martin Pospíšek Ph.D.

Praha, 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne

Podpis

Poděkování patří mému školiteli RNDr. Martinu Pospíškovi Ph.D. za pomoc a cenné rady při psaní této práce. Dále bych ráda poděkovala mému nejbližšímu okolí za podporu.

Abstrakt

Ribosom je supramolekulární útvar, který zprostředkovává syntézu veškerých buněčných proteinů a je tedy nezbytný pro její život. To, že jsou některé nukleotidy ribosomální RNA modifikovány je známo už čtyřicet let. Teprve v dnešní době se však daří hlouběji studovat, jak jsou jednotlivé modifikace syntetizovány i to, jaký je jejich vliv na vznik a funkci ribosomu. Některé konkrétní nukleotidové modifikace mají význam při vzniku ribosomu (například $m^1\text{acp}^3\Psi1191$ SSU), u některých byl pozorován vliv na správnou funkčnost ribosomu (například Um2921, Gm2922, $\Psi2923$ LSU, $m^1\text{acp}^3\Psi1191$ SSU). Většina modifikovaných nukleotidů v eukaryotní rRNA je rozpoznávána malými jadéřkovými RNA (snoRNA). Několik málo nukleotidů je však rozpoznáváno a následně modifikováno specifickými proteiny. Tyto proteiny hrají i zásadní roli ve zrání ribosomu. Předložená práce přehledně shrnuje současné znalosti o úloze nukleotidových modifikací v ribosomální RNA při vzniku, zrání a funkci ribosomu.

Klíčová slova: rRNA, methylace, pseudouridylace, zrání ribosomu, translace

Abstract

A ribosome is a supramolecular structure, which mediates synthesis of all cellular proteins, and therefore is essential for cell life. The fact, that some nucleotides of ribosomal RNA are modified, is known for forty years. However only recently, successful deeper studies on how the individual modifications are synthesized and what is their effect on ribosome synthesis and function appear. Some particular nucleotide modifications are important for the ribosome formation (like $m^1\text{acp}^3\Psi1191$ SSU), some others influence proper function of the ribosome (e.g. Um2921, Gm2922, $\Psi2923$ LSU, $m^1\text{acp}^3\Psi1191$ SSU). Majority of modified nucleotides in eukaryotic rRNA is being recognized by small nucleolar RNA (snoRNA). Few nucleotides is, however, recognized and subsequently modified by specific proteins. These proteins also play crucial role in ribosome maturation. In thesis presented, current knowledge on the role of ribosomal RNA nucleotide modifications during their formation and maturation, and on their function is summarized and overviewed.

Key words: rRNA, methylation, pseudouridylation, ribosome biogenesis, translation

Seznam použitých zkratk:

aa-tRNA	aminoacyl-transfer RNA	tRNA nesoucí aktivovanou aminokyselinu
C/D snoRNA		rodina snoRNA zprostředkovávající metylaci nukleotidu
H/ACA		rodina snoRNA zprostředkovávající konverzi uridinu na pseudouridin
LSU	large ribosomal subunit	velká podjednotka ribosomu
mRNA	messenger RNA	mediátorová RNA
peptidyl-tRNA		tRNA nesoucí peptidyl
RNA	ribonucleic acid	ribonukleová kyselina
rRNA	ribosomal RNA	ribosomální RNA
snoRNA	small nucleolar RNA	malá jadéřková RNA
snoRNP	small nucleolar RNA-protein complex	malý jadéřkový ribonukleoproteinový komplex
SSU	small ribosomal subunit	malá podjednotka ribosomu
tRNA	transfer RNA	transferová RNA
Ψ	pseudouridine	pseudouridin

Obsah

Český a anglický abstrakt.....	4
Seznam použitých zkratk:.....	5
1. Úvod.....	7
2. Vliv modifikací ribosomální RNA na rychlost buněčného růstu.....	9
3. Úloha modifikací při vzniku ribosomu.....	10
3.1. Dvojitá funkce snR10 a U14.....	10
3.2. Kontrola správně upraveného ribosomu pomocí modifikací rRNA.....	11
3.3. Nep1p je důležitý jako sestavující faktor.....	11
3.4. Dim1p dimethyláza je potřebná pro správnou úpravu pre-rRNA.....	12
3.5. Bud23 methyláza hrající roli při transportu malé podjednotky ven z jádra.....	13
4. Vliv modifikací na funkčnost ribosomu.....	13
4.1. Dekódující centrum.....	14
4.1.1. Hypermodifikovaný m ¹ acp ³ Ψ1191:.....	15
4.2. Šroubovice 69.....	15
4.3. Peptidyltransferázová doména.....	16
4.3.1. Ψ2923.....	17
4.3.2. Um2921 a Gm2922.....	18
4.4. Prst A místa.....	18
5. Úloha modifikací rRNA při působení inhibitorů translace.....	19
6. Závěr.....	21
Seznam použité literatury.....	22
Příloha.....	25

1. Úvod

Ribosom je jedním z nejdůležitějších makromolekulárních komplexů v buňce. Jeho úkolem je syntetizovat proteiny podle mRNA předlohy. Kromě mRNA interaguje také s tRNA přinášející jednotlivé aminokyseliny, se vznikajícím peptidovým řetězcem a s dalšími translačními faktory. Ribosom je tvořen z jedné třetiny proteiny a ze dvou třetin RNA. Proteiny se vyskytují převážně na povrchu a vyplňují prázdná místa mezi jednotlivými doménami RNA. Naproti tomu jádro ribosomu je tvořeno RNA. V blízkosti ribosomální RNA probíhají jednotlivé kroky syntézy proteinů. Interakce jednotlivých faktorů s ribosomem je zajišťována ribosomální RNA. Terciální struktura ribosomální RNA je silně konzervována u všech známých organismů, tedy u bakterií, archaea a eukaryot. Dále se u všech známých organismů na ribosomální RNA vyskytují modifikované nukleotidy. K modifikacím nukleotidů dochází během zrání ribosomu na pre-rRNA. Nukleotidové modifikace ribosomální RNA můžeme rozdělit do tří hlavních skupin. První je konverze uridinu na pseudouridin (Obr. 1). Druhou skupinou je methylace hydroxylové skupiny na uhlíku 2' pozici ribosy. Do třetí skupiny patří různé typy modifikace bází, nejčastěji dochází k methylacím bází.

Mechanismus vzniku modifikací se u bakterií a eukaryot liší. U bakterií jsou modifikace prováděny specifickými bílkoviny. U eukaryot dochází k nukleotidovým modifikacím pomocí RNA-proteinového komplexu. Specifické rozpoznání nukleotidu, který má být modifikován, má za úkol snoRNA. Děje se tak pomocí párování bází mezi snoRNA a rRNA. Dále snoRNA přináší proteinový komplex, který provádí samotnou modifikaci nukleotidu. U archaea je mechanismus modifikace nukleotidů podobný jako u eukaryot. U eukaryot byly klasifikovány dvě hlavní rodiny pomocných snoRNA, C/D rodina snoRNA (Obr. 2) a H/ACA rodina snoRNA (Obr. 2). C/D snoRNA je součástí RNA-proteinového komplexu provádějícího methylaci nukleotidu. Protein zodpovědný za methylaci nukleotidu je fibrillarín (Nop1p) (Tollervey *et al.* 1993). Molekuly RNA patřící do rodiny H/ACA snoRNA přinášejí enzymatický komplex k uridinům, které budou modifikovány na pseudouridin. Samotnou katalytickou reakci provádí Cbf5 protein, dyskerin (Zebarjadian *et al.* 1999). Pomocné snoRNA rozpoznávají jedno, dvě nebo tři místa, kde dochází k modifikaci nukleotidu. Některé nukleotidové modifikace ribosomální RNA v *Saccharomyces cerevisiae* jsou prováděny proteiny, které mají kromě katalytické funkce i úlohu ve vyhledávání specifického nukleotidu jako u bakterií.

Jaký význam mají modifikace nukleotidů na chemické vlastnosti RNA? Methylace hydroxylové skupiny vázané k C2' ribosy mění prostorové uspořádání nukleotidu. Také dochází k snížení polaritě vazby a celá oblast kolem 2'-O se stává hydrofobnější. Methylace

C2'hydroxyly tak ve svém důsledku snižuje pravděpodobnost hydrolytického štěpení přilehlé fosfodiesterové vazby. Při změně uridinu za pseudouridin dochází k vytvoření jiných možností párování bází. Pseudouridin může tvořit tři vodíkové můstky oproti uridinu, který vytváří pouze dva. Zmíněná modifikace způsobuje též změny ve vrstvení bází (tzv. „stacking“).

Cílem této práce je zpracovat známé informace o vlivu nukleotidových modifikací ribosomální RNA na funkci eukaryotního ribosomu. Úloha modifikací eukaryotní ribosomální RNA je nejlépe prostudována u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, proto se i má práce zaměřila zejména na tento modelový organismus. Pro sjednocení jsem číslování nukleotidů ribosomální RNA převzala z kvasinkové snoRNA databáze dostupné z [www: <http://people.biochem.umass.edu/sfournier/fournierlab/snornadb/main.php>](http://people.biochem.umass.edu/sfournier/fournierlab/snornadb/main.php) (Piekná-Przybylska *et al.* 2007).

2. Vliv modifikací ribosomální RNA na rychlost buněčného růstu

Jedním z hlavních pozorovaných jevů při studiu úlohy modifikace ribosomální RNA je rychlost buněčného růstu. Mezi nukleotidové modifikace ovlivňující buněčný růst patří například pseudouridin 1191 na 18S rRNA, který je navíc ještě dále modifikován, viz Obr. 1 a kapitola 3.3. Při delecí snoRNA molekuly, která zprostředkovává konverzi uridinu na pseudouridin na pozici 1191 SSU, došlo ke snížení růstu kultury oproti kontrolní kultuře rostoucí při stejných podmínkách (Liang *et al.* 2009). Význam tohoto hypermodifikovaného nukleotidu rozebírám podrobněji v kapitole 4.1.1. Dalším příkladem je Ψ 2923 na 25S rRNA. Delece snoRNA zprostředkovávající jeho modifikaci vedla ke zpomalení buněčného růstu o 37% a prodloužení lag fáze, tedy dobu potřebnou pro adaptaci buňky na nové prostředí, o 20% oproti kontrolnímu kmeni (King *et al.* 2003). Esguerra a kolektiv (Esguerra *et al.* 2008) v jejich komplexní práci testovali chování dvaceti kmenů s deletovanými C/D snoRNA ve velkém počtu různých prostředí. Mezi testované faktory patřily látky ovlivňující signalizaci, DNA syntézu, DNA opravy a glykosylaci. Také zde testovali odpověď na buněčný stres vyvolaný změnou redoxního prostředí, výskytem toxických kovů a koncentrací iontů odlišnou od fyziologických podmínek. Sledováním změny buněčného růstu oproti kontrole za těchto podmínek získali obrovské množství dat. Samozřejmě získali obrovské množství dat. Konkrétně u kmenů s chybějící modifikací Um2347 LSU, Cm1639 SSU nebo Am2946 LSU byl pozorován největší defekt v buněčném růstu. V případě kombinací většího počtu modifikací lze obecně říci, že čím je větší počet chybějících modifikací, tím větší jsou změny pozorované na růstu buněčné kultury. Jedna z výjimek byla pozorována při studiu úlohy pseudouridinů v oblasti prstu A místa. Kdy kultura se třemi chybějícími pseudouridiny (na pozici 1004, 1042, 1052 LSU) rostla pomaleji, než kultura s pěti chybějícími pseudouridiny (986, 1004, 1042, 1052, 1056 LSU) (Piekna-Przybylska *et al.* 2008). Odpověď pro vysvětlení tohoto jevu bychom měli hledat nejspíše ve struktuře pseudouridinu a jejího vlivu na celou oblast. Tím chci říci, že například chybějící 3 pseudouridiny mohou mít destabilizující efekt a absence dalších 2 modifikací uridinu na pseudouridin opět pozmění strukturu, která ve výsledku může vést k částečné stabilizaci celé smyčky. Ve většině studií, zabývajících se modifikacemi ribosomální RNA a jejich vlivem na buňku, byla pozorována změna buněčného růstu kmenů s delecí většího počtu snoRNA. Zpomalení buněčného růstu je pravděpodobně reakcí na změnu konkrétních procesů v buňce oproti kontrolní kultuře.

3. Úloha modifikací při vzniku ribosomu

Jelikož k modifikacím nukleotidů rRNA dochází během zrání ribosomu, je velice pravděpodobné, že snoRNA nebo celé snoRNP komplexy, ale i modifikované nukleotidy mají vliv na úspěšné vytvoření funkčního ribosomu. Tato oblast, úlohy jednotlivých modifikací a jejich zprostředkovatelů na zrání ribosomu, je v dnešní době intenzivně studována.

3.1. Dvojitá funkce snR10 a U14

Bylo zjištěno, že některé snoRNA zprostředkovávají štěpení ribosomální RNA a modifikaci nukleotidů. Sem patří snR10 z rodiny H/ACA snoRNA a U14 z rodiny C/D snoRNA (pro přehled Nazar 2004). Molekula U14 se podílí na methylovaní cytosinu na pozici 414 18S RNA a na štěpení molekuly pre-rRNA. Molekula snR10 přináší modifikační aparát k nukleotidu na pozici 2923 LSU, kde dochází ke konverzi uridinu na pseudouridin. Dále má molekula snR10 úlohu při štěpení pre-rRNA. Dá se tedy říci, že snR10 vytváří určité přemostění mezi oběma podjednotkami a může propojovat zrání obou podjednotek. Do jaké míry je toto propojení důležité pro vznik ribosomu se zatím nevím. Další otázkou je, jaký je vztah mezi oběma funkcemi molekuly snR10? Doména zodpovědná za modifikaci nukleotidu se nachází na 3' vlásence a upravující doména se nachází na 5' vlásence. Konkrétně u 5' struktury je důležitý sedmi-nukleotidový úsek, který se vyskytuje v bublině 5' vlásenky. Jestliže byl vložen jeden nukleotid do 3' vlásenky došlo k narušení úprav pre-rRNA, ale ne znemožnění modifikace nukleotidu. Již v dřívější práci bylo zjištěno, že Ψ 2923 nemá vliv na úpravu 18S RNA (King *et al.* 2003). V další práci Liang a kolektiv (Liang *et al.* 2010) vytvořili kmen *Saccharomyces cerevisiae*, který obsahoval hybridní snoRNA molekulu. Tato molekula obsahovala 5' oblast z snR10 a 3' oblast z snR36 (H10/36). Molekula snR36 a hlavně její doména v 3' oblasti je zodpovědná za modifikaci Ψ 1187 SSU. U tohoto kmene nebyly pozorovány změny v úpravě 18S rRNA oproti přírodnímu kmeni. Z těchto dat můžeme říci, že pro zrání ribosomu je důležitý výskyt obou struktur v rámci jedné molekuly. To ukazují výsledky z pokusu, kdy do jednoho kmene byla vnesena jak hybridní molekula H10/36, tak i hybridní molekula složená z 5' konce z snR36 a 3' konce snR10 obsahující jeden nukleotid v bublině 3' vlásenky navíc. Vložení jednoho nukleotidu v této oblasti, snižuje schopnost buňky štěpit pre-rRNA. U takto upraveného kmene nebyl pozorován vliv na zrání ribosomu. K podobným závěrům můžeme dojít i u molekuly U14, kde při testování byla provedena modifikace buď ve struktuře zodpovědné za střížení ribosomální RNA, nebo v doméně účastnící se methylovaní C414 SSU. Tento zásah neměl význam

pro buněčný růst, ale při kombinaci obou mutací došlo ke zhoršení růstu (Liang and Fournier 1995).

3.2. Kontrola správně upraveného ribosomu pomocí modifikací rRNA

Další otázkou může být, zda modifikace mohou být pro buňku ukazatelem správně upraveného ribosomu. Na tuto otázku se snažili najít odpověď Song a Nazar (Song and Nazar 2002). Pro transformaci buněk *Schizosaccharomyces pombe* použili plazmidy obsahující rDNA, kde 5,8S rRNA byla označena neutrální značkou pro možnost detekce a odlišení od chromozomální 5,8S rRNA. Dále plazmidy obsahovaly gen pro 25S rRNA, který obsahoval konkrétní mutaci nukleotidu vyskytujícího se v peptidyl-transferázovém centru. Tímto Song a Nazar zamezili modifikaci konkrétního nukleotidu. Pomocí kontrolního plazmidu obsahujícího rDNA s nemutovanou 25S rRNA a označenou 5,8S rRNA zjistili, že 50% veškeré ribosomální RNA je právě plazmidová rRNA. U jedné kultury pozorovali pokles výskytu plazmidové rRNA na 25% z celkového množství ribosomální RNA. Tato kultura měla mutované nukleotidy, které nejsou tak konzervované a nevyskytující se přímo v peptidyl-transferázovém centru ribosomu. U ostatních kultur pozorovali značný pokles množství plazmidové rRNA. Song a Nazar vyloučili možnost inhibice syntézy rRNA a inhibice úprav pre-rRNA. Jejich výsledky je vedly k závěru, že úbytek značené 5,8S rRNA byl dán značnou nestabilitou vzniklé mutované plazmidové rRNA. Zajímavé je, že i když buňka nasyntetizuje přibližně o 50% více ribosomální RNA, která je poté pravděpodobně degradována, se nevyčerpá nadbytečnou syntézou a její schopnost růstu zůstává nezměněna. Úlohou modifikovaných nukleotidů v peptidyl-transferázovém centru ribosomu je pravděpodobně ochrana nukleové kyseliny před nukleázami ať už přímo, nebo jako zajištění asociace s ribosomálními proteiny. Proč tedy mluvím o mechanismu kontroly kvality ribosomu? Jestliže nedojde k modifikacím na daném místě je rRNA degradována. U této práce bych chtěla upozornit na fakt, že na danou nestabilitu RNA může mít vliv záměna bází, když ve většině případů nahrazovali pyrimidin za purin a naopak, kdy podle mě dochází k velkým strukturním změnám v rámci dané oblasti. Song a Nazar netestovali zablokování modifikace jiným způsobem, například částečnou delecí snoRNA.

3.3. Nep1p je důležitý sestavující faktor

Nep1 protein je zodpovědný za metylaci pseudouridinu 1191 na pozici N1. Tato

methyltransferáza je specifická a vyžaduje aktivitu snR35, která modifikuje uridin 1191 na pseudouridin. Bylo zjištěno, že Nep1 protein je pro buňku důležitý nejen jako methyltransferáza, ale i jako protein důležitý pro sestavení ribosomu. Nep1p interaguje se šroubovicí 31, kde metyluje pseudouridin 1191, a se šroubovicí 42, kde hraje důležitou roli jako chaperon (Thomas *et al.* 2011). Mutace glycinu za aspartát na pozici 86 Nep1 proteinu způsobuje lidský Bowen-Conradi syndrom. Tato mutace byla podrobněji studována jak v kvasinkové buňce, tak i v savčí buňce a bylo zjištěno, že nemá vliv na methyltransferázovou aktivitu proteinu *in vitro*, ale že mutovaný Nep1^{D86G} protein se nedostává do jadérka (Meyer *et al.* 2011).

3.4. Dim1p je dimethyláza potřebná pro správnou úpravu pre-rRNA

Studium úlohy velice konzervované struktury m⁶₂A1771 a m⁶₂A1772 na 3' konci 18S rRNA neukázalo zásadní vliv na funkci ribosomu. Přesto je tento proces modifikace rRNA velice zajímavý a ráda bych se o něm zmínila. První zajímavostí je, že tyto dvě sousední modifikace jsou zajišťovány dimethylázou Dim1p. Dim1p má jak katalytickou aktivitu, tak i schopnost specificky rozpoznat dané nukleotidy. Za druhé, bylo zjištěno, že dimethylace je postradatelná pro translaci *in vivo*, ale je potřebná pro translaci *in vitro*. Dále při této studii byla prokázána zvýšená citlivost kmenů, obsahujících mutované alely genu pro Dim1p, na aminoglykosidová antibiotika (paromomycin a neomycin B). Lafontaine a kolektiv (Lafontaine *et al.* 1998) použili 10 alel, které obsahovaly od 1 do 6 substitucí. Tyto alely byly vneseny do buněčné kultury *S. cerevisiae*. U všech kultur bylo pozorováno nahromadění 22S pre-rRNA a různá úroveň snížení množství 18S rRNA. Nejvýraznější nahromadění 22S pre-rRNA bylo pozorováno u pěti kmenů. K nahromadění 22S pre-rRNA dochází, jestliže není pre-rRNA střižena na pozicích A₁ a A₂. V této situaci dochází k alternativnímu střížení 33S pre-rRNA na pozici A₃. Vzniká 27S pre-rRNA, která je dále normálně upravena na konečnou 25S rRNA, a 22S pre-rRNA, která už dále není upravována. Dále Lafontaine a kolektiv potvrdili dřívější studii (Brand *et al.* 1977), ve které se tvrdí, že k modifikaci m⁶₂A1771 a m⁶₂A1772 dochází později během zrání ribosomu. Zjistili, že k methyloci páru adenosinů dochází nejdříve na 20S pre-rRNA. Je tedy velice pravděpodobné, že defekt v methyloci nukleotidů nemusí být propojený s úlohou Dim1p při štěpení pre-rRNA. To částečně potvrzují výsledky fenotypu jedné alely. Za přirozených podmínek u tohoto kmene nebyly zjištěny chyby ve zrání ribosomu, ale množství modifikací bylo velice nízké. Jinak řečeno, správné střížení rRNA a vznik 18S rRNA jsou nezávislé na modifikaci páru adenosinů. Dále si Lafontaine a jeho kolegové položili otázku, zda bude Dim1p potřebný při syntéze ribosomu, když transkripci rDNA provádí DNA-dependetní-RNA-polymeráza II. Na plazmidu

před rDNA vložili PGK promotor. V takovémto případě Dim1p nebyl potřebný. Pravdou ale je, že syntéza rRNA z PGK promotoru nemůže plně zastoupit syntézu rRNA pomocí polymerázy I, protože transkripce polymerázy I je mnohem silnější, než transkripce z PGK promotoru. Příčinou správného syntetizování ribosomu může být fakt, že s RNA-polymerázou II asociují jiné hnRNP proteiny, tudíž je možné, že úlohu Dim1p při zrání ribosomu nahrazuje jiný protein.

Jakou má tedy Dim1p úlohu během zrání ribosomu? V případě funkčního Dim1p dochází k jeho navázání na pre-rRNA v časně fázi syntézy ribosomu a ostatní složky upravujícího aparátu mohou reagovat pravděpodobně na změnu konformace a pokračovat v úpravách rRNA.

3.5. Bud23 methyláza hraje roli při transportu malé podjednotky ven z jádra

Jedním z posledních modifikovaných nukleotidů, u kterých nebylo známo, jak k modifikaci dochází, je nukleotid G1575 na 18S rRNA, kde je methylován dusík na pozici 7. White a kolektiv (White *et al.* 2008) zjistili, že tento nukleotid je modifikován Bud23 methylázou. Znemožnění modifikace G1575 pomocí delece oblasti asociující s rRNA nebo substituce G1575 za adenosin nemá vliv na rychlost růstu kultury. Pokud ale Bud23 protein úplně chybí má to za následek zpomalení rychlosti buněčného růstu. Při analýze celkového složení 40S, 60S a 80S se v kmeni *bud23Δ* objevily změny oproti přírodnímu kmeni. Došlo ke snížení celkového množství 80S, k rapidnímu navýšení 60S a ke snížení 40S. Tyto výsledky ukazují na špatné zrání 40S podjednotky ribosomu. Při podrobnějších studiích autoři zjistili, že 18S rRNA vzniká ve velmi malém množství. Je více možností, kterými může být tento defekt způsoben. Může být ovlivněn transport malé podjednotky z jádra do cytoplazmy, nebo zpracování 20S rRNA anebo nestabilita 18S rRNA v cytoplazmě. Pomocí několika metod zjistili, že Bud23 má úlohu při transportu pre-40S podjednotky ribosomu. Protože Bud23 nemá jaderný exportní signál, jeho úloha bude nejspíše v přilákání a asociaci proteinů zodpovědných za transport malé podjednotky.

4. Vliv modifikací na funkčnost ribosomu

Některé funkční struktury ribosomu obsahují nukleotidové modifikace konzervované jak v eukaryotech, tak i v bakteriích. Patří sem dekódující oblast malé podjednotky, šroubovice 69 (H69), peptidyltransferázová doména a prst A místa vyskytující se ve velké podjednotce.

4.1. Dekódující centrum

Dekódující centrum interaguje s mRNA i s tRNA, zprostředkovává interakci mezi kodónem a antikodónem a také hraje úlohu při translokaci tRNA. Ribosom *Saccharomyces cerevisiae* v této oblasti obsahuje 5 2'-O-methylací a 3 pseudouridiny, z nichž jeden je navíc methylován na dusíku na pozici 1 a na pozici 3 je přidána 3-amino-3-karboxypropylová skupina ($m^1\text{acp}^3\Psi$). Čtyři modifikace se nacházejí v A místě (Um578, Gm1271, Ψ 1187, Gm1428), dvě modifikace se nacházejí v P místě ($m^1\text{acp}^3\Psi$ 1191, Cm1639) a dvě v E místě (Ψ 999, Cm1007). Sedm z těchto osmi modifikací se vyskytuje i u člověka, chybí analog k methylaci Cm1007. U *E. coli*, kde je úloha modifikací lépe prostudována, bylo zjištěno, že $m^4\text{Cm1402}$ (odpovídající u *S. cerevisiae* Cm1639) je v kontaktu s mRNA (Rinke-Appel *et al.* 1993) a že chybění N^4 -methylové skupiny má za následek zvýšení výskytu zahájení translace na AUU kodónu (Kimura and Suzuki 2010). U nukleotidů vyskytujících se v dekodující oblasti byl testován jejich vliv na účinnost ribosomu, měřením množství začleněného ^{35}S -methioninu v celkovém množství proteinů (Liang *et al.* 2009). Výsledné změny oproti kontrolnímu kmeni mohou být zapříčiněny změnou množství ribosomů v buňce nebo změnou výkonnosti ribosomu. Viditelné změny byly pozorovány u kmene s chybějící hypermodifikací $m^1\text{acp}^3\Psi$ 1191, kde docházelo ke snížení množství začleněného ^{35}S -methioninu oproti kontrole. Ke snížení docházelo i u dalších kmenů, ve kterých chyběl $m^1\text{acp}^3\Psi$ 1191 v kombinaci s dalšími nukleotidy ($m^1\text{acp}^3\Psi$ 1191, Cm1639; $m^1\text{acp}^3\Psi$ 1191, Cm1639, Gm1428). Další testovanou vlastností je přesnost ribosomu. Testovalo se jak pročení stop kodónu (UAG), tak posun ribosomu ve čtecím rámci o +1 a o -1 (Baudin-Baillieu *et al.* 2009). Zvýšená četnost pročení stop kodónu byla pozorována u kmene s chybějící modifikací na pozici Cm1639 a u kmene s chybějícími modifikacemi na pozici $m^1\text{acp}^3\Psi$ 1191, Cm1639, Gm1428. U šesti ze čtrnácti kmenů byl pozorován častější posun ve čtecím rámci o +1 oproti kontrolnímu kmeni. Mezi tyto kmeny patřil kmen s chybějící modifikací $m^1\text{acp}^3\Psi$ 1191. Ostatní pět kmenů, u kterých se vyskytla tato chybovost, obsahovaly modifikaci Cm1639 ať už samotnou, nebo v kombinaci s chyběním jiných modifikací z A nebo P místa. U kmene s chybějícími modifikacemi v E místě byla pozorována menší chybovost oproti kontrole. Při testování chybovosti ribosomu v posunu ve čtecím rámci o -1 byly pozorovány podobné výsledky jako u +1 posunu. Jediná větší odchylka byla zaznamenána u kmene s chybějícími modifikacemi v E místě, kdy se tento kmen choval stejně jako kontrolní kmen. Výsledky naznačují, že některé modifikace jsou pro ribosom a jeho funkci důležité, např. $m^1\text{acp}^3\Psi$ 1191 a Cm1639. Zároveň se zde projevuje poziční efekt, kdy při chybění více modifikací a jejich kombinací dostávají autoři odlišné výsledky u testování aktivity i přesnosti ribosomu. Tyto rozdíly v chování ribosomu mohou být zapříčiněny změnami ve struktuře ribosomu.

4.1.1. Hypermodifikovaný m¹acp³Ψ1191:

Syntéza hypermodifikovaného pseudouridinu probíhá postupně. Nejprve dochází ke konverzi uridinu na pseudouridin pomocí snR35, dále je dusík na pozici 1 methylován Nep1 proteinem. Poslední krok, přidání 3-amino-3-karboxypropylové (acp) skupiny na dusík na pozici 3, probíhá až v cytoplazmě a pokud vím, není znám jeho enzymatický aparát. Při deleci snR35 bylo zjištěno, že nedochází k úpravě 20S pre-rRNA na 18S rRNA. Jestli má na tento defekt vliv snR35, nebo enzymy uplatňující se v následných modifikačních krocích, anebo samotný hypermodifikovaný nukleotid je otázkou. Úloha snR35 při úpravě rRNA byla vyloučena. I když nedochází ke konverzi uridinu na pseudouridin, je na N3 přidána acp skupina. Skutečnost, že k úpravě 18S rRNA dochází až poté, co je hypermodifikace dokončena, ukazuje na úlohu právě tohoto hypermodifikovaného nukleotidu při úpravě 18S rRNA. Tato skutečnost může mít vliv na výsledky měření množství začleněného ³⁵S-methioninu v celkovém množství proteinů.

4.2. Šroubovice 69

Šroubovice 69 se nachází v doméně IV velké podjednotky. Společně se šroubovicí 44 z malé podjednotky, se kterou H69 interaguje, tvoří mezipodjednotkový most označovaný B2a. Dále H69 interaguje s D smyčkou tRNA v A místě i P místě (Yusupov *et al.* 2001). Modifikace v této doméně jsou značně konzervované, v *E. coli* se nacházejí tři Ψ, v *S. cerevisiae* jsou čtyři Ψ a jedna 2'-O-methylace (Obr. 5), v lidské H69 se nachází pět Ψ a jedna 2'-O-methylace. U *E. coli* bylo zjištěno, že mutace Ψ1917, u *S. cerevisiae* je analogem Ψ2258 a u lidského H69 je analogem Ψ3733, za cytosin má silný inhibiční efekt na translaci (Liiv *et al.* 2005). Dá se tedy očekávat, že i u eukaryot budou mít analogické modifikace určitý vliv na funkci ribosomu. Ψ2258 a Ψ2260 je modifikován snR191 a její delece ovlivňuje rychlost buněčného růstu u *S. cerevisiae* (Badis *et al.* 2003).

Při testování účinnosti translace, měřené opět pomocí ³⁵S-methioninu, byly pozorovány změny u kmene, kde chybělo tři a více modifikací (Liang *et al.* 2007). Tento jev ukazuje na spolupráci modifikovaných nukleotidů a také tyto výsledky korelují se změnou rychlosti růstu daných kmenů. Dále také testovali kmene pomocí bicistronní mRNA na pročitání stop kodónu. Vzniklý fúzní protein, značící pročení stop kodónu, detekovali pomocí western-blotu. U kmene s chybějícími modifikacemi na pozici Am2256, Ψ2264 a Ψ2266 byl fúzní protein detekován ve velkém množství. Zvláštní je, že v jiné práci (Baudin-Baillieu *et al.* 2009), kdy byly také

testovány různé kombinace chybějících modifikací na schopnost pročíst stop kodón a schopnost posunout se ve čtecím rámci buď o +1, nebo o -1 pozici, nebyla tato chybovost translace u kmene s chybějícími modifikacemi na pozici Am2256, Ψ2264 a Ψ2266 pozorována. Pravdou je, že zde byla použita jiná metoda pro testování vlivu modifikací na přesnost translace. Dále zde byly testovány čtyři kmeny s jednotlivě deletovanými snoRNA molekulami, pro modifikace Am2256, Ψ2264, Ψ2266 a kmen s chybějícími Ψ2258 a Ψ2260, které jsou modifikovány jednou snoRNA molekulou. U všech čtyřech kmenů bylo pozorováno snížení pročitání stop kodónů oproti kontrolnímu kmeni. Vliv na posun ve čtecím rámci jak o +1, tak i o -1 byl pozorovatelný pouze ve dvou kmenech, v jednom s chybějící modifikací Ψ2266 a ve druhém s chybějícími modifikacemi na pozici Ψ2258 a Ψ2260, v obou případech docházelo k méně častému výskytu této události oproti kontrole. Na základě těchto výsledků bychom se mohli zeptat, proč se zde dané modifikace vyskytují. Za předpokladu, že jsou tyto výsledky správné, bych hledala odpověď ve vlivu modifikací na stabilitu struktury. U kmenů s chybějícími modifikacemi se projevila zvýšená citlivost na aminoglykosidové antibiotikum, neomycin (Liang *et al.* 2007). U lidského H69 a *E. coli* H69 byl testován vliv modifikací na stabilitu šroubovice 69 (Sumita *et al.* 2005). Testované parametry byly teplota tání a hodnoty změny standardní volné energie. Sumita a jeho kolektiv zjistili, že pseudouridiny v lidské i *E. coli* šroubovici 69 mají stabilizující účinek.

4.3. Peptidyltransferázová doména

Peptidyltransferázová doména se nachází na 25S rRNA a interaguje s akceptorovým ramenem tRNA v A i P místě a aminokyselinovými zbytky. Dá se tedy předpokládat, že modifikované nukleotidy, vyskytující se v této oblasti, mohou mít vliv na syntézu proteinů. V peptidyltransferázové doméně se vyskytuje 6 pseudouridinů a 6 2'-O-methylací (Obr. 6). Do této doby byla studována úloha šesti pseudouridinů (Ψ2826, Ψ2865, Ψ2880, Ψ2923, Ψ2944, Ψ2975) a dvou 2'-O-methylací (Um2921, Gm2922). V práci (Baxter-Roshek *et al.* 2007) studovali úlohu těchto nukleotidů na citlivost k antibiotikům, na chyby v posunu ve čtecím rámci, na špatné začlenění aminokyseliny a na pročení stop kodónů (UAA, UAG, UGA). Tyto vlastnosti byly testovány pomocí vektoru obsahující gen pro Renilla luciferázu a gen pro světluškovou luciferázu. Renilla luciferáza slouží jako kontrola. Světlušková luciferáza může být syntetizována pouze v případě, že dojde ke studované chybě. Chyby v posunu na čtecím rámci byly pozorovány pouze u kmene s chybějícími dvěma modifikacemi Um2921 a Gm2922, kdy došlo k častějšímu posunu ve čtecím rámci o -1 oproti kontrolnímu kmeni. Pravděpodobnost posun ve čtecím rámci o +1 u tohoto kmene byla jen nepatrně zvýšena. Největší změny byly

pozorovány u kmenů testovaných na pročení stop kodónů. K častějšímu pročení všech třech stop kodónů docházelo u kmene s chybějícím pseudouridinem na pozici 2865. Naopak u čtyř kmenů s chybějící modifikací na pozici Ψ 2923, Ψ 2944, Ψ 2975 nebo Um2921 a Gm2922 došlo k méně častému výskytu pročení stop kodónu oproti kontrolnímu kmeni. K zvláštnímu jevu došlo u testovaného stop kodónu UAG, kdy u kmene s chybějící modifikací na pozici Ψ 2975 bylo pozorováno zvýšení výskytu pročení stop kodónu. U kmene s chybějícími modifikacemi na pozici Ψ 2826 a Ψ 2880 byl také pozorován zvýšený výskyt pročení UAG stop kodónu. Další sledovanou vlastností byla začlenění nesprávné aminokyseliny. Pozorovaly se dvě možnosti, buď zařazení aminokyseliny lišící se v kodónu na pozici 3, anebo v zařazení aminokyseliny s úplně se odlišujícím kodónem. U kmene s chybějící modifikací na pozici Ψ 2923 došlo v obou případech k častějšímu začlenění špatné aminokyseliny. U kmene s chybějící modifikací Um2921 a kmene s chybějícími modifikacemi na pozici Um2921 a Gm2922 došlo častějšímu zařazení aminokyseliny s kodónem lišícím se na pozici 3. U kmene s chybějící modifikací na pozici Ψ 2865 se častější zařazení aminokyseliny vyskytlo u nepodobného kodónů. Dva kmeny byly podrobněji testovány na afinitu k tRNA a na rychlost přenosu peptidylu. Jak u kmene s chybějící modifikací na pozici Ψ 2865 tak u kmene s chybějícími modifikacemi na pozici Um2921 a Gm2922 byla pozorována vyšší afinita k aa-tRNA než u kontrolního kmene. Afinita k peptidyl-tRNA byla stejná jak u pozměněných kmenů, tak i u kontrolního kmene. Rychlost přenosu peptidylu byla u obou kmenů vyšší než u kontrolního kmene. Tyto výsledky ukazují na důležitost některých modifikovaných nukleotidů během translace.

4.3.1. Ψ 2923

Ψ 2923 se vyskytuje v A-smyčce peptidyltransferázové domény. Tato modifikace je prováděna snoRNP komplexem za účasti molekuly snR10, která přivádí celý komplex k danému místu. Jak už jsem se zmínila dříve, snR10 má velkou úlohu na zrání ribosomu. V práci (King *et al.* 2003) bylo sledováno množství začlenění ^{35}S -methioninu u kvasinkových kmenů se všemi šesti chybějícími pseudouridiny a u kvasinkového kmene s chybějící modifikací na pozici Ψ 2923. U kultury s chybějící modifikací na pozici Ψ 2923 docházelo ke snížení množství začleněného ^{35}S -methioninu o 40% oproti kontrolní kultuře. U kultury s chybějícími všemi zmíněnými pseudouridiny došlo dokonce ke snížení množství začleněného ^{35}S -methioninu o 75%. Dále vytvořili modifikovaný kmen, u kterého byla znemožněna pouze modifikace nukleotidu na pozici 2923 a funkce pro zrání ribosomu byla zachována. Takto upravený kmen také testovali na účinnost translace pomocí ^{35}S -methioninu. I zde bylo pozorováno snížení

množství začlenění ³⁵S-methioninu přibližně o 20%. V další studii, zabývající se úlohou Ψ2923, (Rakauskaite and Dinman 2008) byla provedena mutace na pozici 2923 uridinu za cytosin. U takto upraveného kmene byl pozorován vliv na stabilitu A-smyčky. Ψ2923 chrání nukleotidy Gm2922, U2949, A2779, A2780, A3048, A3049 před spontánním střížením jednovláknové RNA. Dále pak v této studii byla testována afinita k aa-tRNA a peptidyl-tRNA. Bylo pozorováno zvýšení hodnoty disociační konstanty více než dvakrát oproti kontrolnímu kmeni pro afinitu k peptidyl-tRNA, tedy se snížila afinita k peptidyl-tRNA. Z těchto výsledků je zřejmé, že kromě úlohy snR10 na zrání ribosomu má modifikace na pozici Ψ2923 význam ve stabilitě a funkci ribosomu.

4.3.2. Um2921 a Gm2922

Modifikace vyskytující se v trinukleotidu Um2921, Gm2922 a Ψ2923 v A-smyčce peptidyltransferázové domény se vyskytují už i v bakteriích. Um2921 je modifikován snoRNP komplexem za účasti molekuly snR52 a Gm2922 je modifikován Spb1 proteinem. Tyto modifikace jsou důležité pro funkci ribosomu, jak už bylo zmíněno dříve. Zajímavostí, která byla objevena ve studiích (Bonnerot *et al.* 2003; Lapeyre and Purushothaman 2004) je, že Spb1 protein může nahradit deletovanou snR52 a modifikovat U2921. To, že si buňka vyvinula dva mechanismy na modifikaci nukleotidu U2921, může ukazovat na důležitost této modifikace na funkci ribosomu.

4.4. Prst A místa

Prst A místa je tvořen šroubovicí 38 (H38) v doméně II velké podjednotky a je součástí mezipodjednotkového mostu B1a. Sousedními strukturami jsou šroubovice 37 a 39, které se vyskytují na bázi šroubovice 38 a které mohou mít vliv na pohyb H38. Šroubovice 38 svým vrcholem interaguje s tRNA v A místě a dále také interaguje s 5S rRNA. V *Saccharomyces cerevisiae* šroubovice 38 obsahuje 7 Ψ, šroubovice 37 obsahuje 2 Ψ a šroubovice 39 obsahuje 1 Ψ a 1 2'-O-methylaci. Baudin-Baillieu a kolektiv (Baudin-Baillieu *et al.* 2009) (Obr. 7) testovali různé kombinace chybějících modifikací v H38 na pročitání stop kodónu a na posun ve čtecím rámci o +1 nebo o -1. Výraznější změny v chování oproti přírodnímu kmeni nebyly pozorovány. Pouze u kmene s chybějící modifikací na pozici Ψ1042 a u kmene s chybějícími modifikacemi na pozici Ψ960 a Ψ986 bylo pozorováno nepatrné snížení chybovosti v posunu ve čtecím rámci o +1. Tyto výsledky ukazují, že modifikace v H38 nemají velký vliv na přesnost ribosomu. V

další práci Piekna-Przybylska a kolektiv (Piekna-Przybylska *et al.* 2008) sledovali úlohu modifikací v této oblasti na účinnost translace, pomocí měření množství začleněného ³⁵S-methioninu. U kmene s chybějícími modifikacemi na pozici Ψ1004, Ψ1042, Ψ1052 bylo pozorováno snížení translační aktivity přibližně o 20% při 30°C a při 11°C bylo snížení translační aktivity přibližně o 25% oproti kontrole. U kmene s chybějícími modifikacemi na pozici Ψ986, Ψ1004, Ψ1042, Ψ1052, Ψ1056 bylo pozorováno snížení translační aktivity o 7% při 30°C a při 11°C o 13%. Tyto výsledky korelují se snížením rychlosti buněčného růstu těchto kmenů, jak bylo již dříve uvedeno. Snížení schopnosti translace při nižší teplotě může ukazovat na úlohu modifikovaných nukleotidů v rámci stability ribosomu.

5. Úloha modifikací rRNA při působení inhibitorů translace

Při studiu úlohy modifikací ribosomální RNA při translaci byl sledován vliv modifikací rRNA na citlivost ribosomu k translačním inhibitorům. Pro testování úlohy modifikací rRNA byla použita tato antibiotika:

Anisomycin – váže se do A místa peptidyltransferázové domény

Neomycin – váže se do dekodujícího centra malé podjednotky

Paromomycin – váže se do dekodujícího centra malé podjednotky

Sparsomycin – působí v peptidyltransferázové doméně v P místě

Zvýšená citlivost na antibiotikum anisomycin byla pozorována u kmenů s chybějící modifikací na pozici Um1269, Um2347, Am2640 (Esguerra *et al.* 2008) a u kmene s chybějícími dvěma modifikacemi na pozicích Um2921 a Gm2922 (Baxter-Roshek *et al.* 2007). Citlivost na antibiotikum neomycin byla pozorována u kmene s chybějící modifikací na pozici Ψ2923 (King *et al.* 2003). Dále citlivost na neomycin byla testována u kmenů s chybějícími modifikacemi ve šroubovici 69. Kmeny s chybějícími modifikacemi v oblasti smyčky šroubovice 69 vykazovaly zvýšenou citlivost na antibiotikum neomycin. Oproti tomu kmeny s chybějícími modifikacemi v oblasti stonku šroubovice 69 zvýšenou citlivost na neomycin nevykazovaly (Liang *et al.* 2007). Z těchto výsledků můžeme usuzovat, že modifikace vyskytující se ve smyčce šroubovice 69 jsou důležité pro rezistenci k neomycinu. Modifikace rRNA v oblasti dekodujícího centra byly testovány na citlivost na antibiotikum neomycin. Klíčovou roli zde hraje hypermodifikovaný m¹acp³Ψ1191, kdy kmeny s chybějícími modifikacemi v A nebo P místě dekodujícího centra v kombinaci s chybějící modifikací m¹acp³Ψ1191 prokazovaly zvýšenou citlivost na neomycin

(Liang *et al.* 2009). U antibiotika paromomycin byla pozorována zvýšená citlivost u kmene s chybějící modifikací na pozici Ψ 2923 (Rakauskaite and Dinman 2008). U posledního antibiotika, sparsomycinu, byla pozorována zvýšená citlivost u kmene s chybějící modifikací na pozici Ψ 2923 (Rakauskaite and Dinman 2008), u kmene s chybějící modifikací na pozici Ψ 2865 a u kmene s chybějícími modifikacemi na pozicích Ψ 2826 a Ψ 2880 (Baxter-Roshek *et al.* 2007). Změny v citlivosti kmenů s chybějícími modifikacemi na některá antibiotika oproti kontrolnímu kmeni mohou být způsobeny změnou ve struktuře ribosomu při chybění modifikací ribosomální RNA.

6. Závěr

Studium významu modifikací ribosomální RNA je na počátku, avšak už nyní byla prokázána významná úloha některých modifikovaných nukleotidů ribosomální RNA na funkci ribosomu, například hypermodifikovaný $m^1\text{acp}^3\Psi1191$, Um2921, Gm2922 a $\Psi2923$. Velice zajímavý je fakt, že si eukaryotní buňka ponechala u některých nukleotidů rRNA modifikační mechanismu založený na specifických proteinech tak, jak je tomu u všech modifikací nukleotidů ribosomální RNA u bakterií. Proč tomu tak je, když tento způsob modifikace nukleotidů rRNA je energeticky náročnější? V *Saccharomyces cerevisiae* jsou využívány tyto specifické proteiny: Bud23p, Dim1p, Nep1p a Spb1p. U všech těchto proteinů byla zjištěna kromě jejich modifikační aktivity i jiná úloha, ve většině případů velice důležitá pro vznik funkčního ribosomu.

Momentálně jsou intenzivně studovány modifikace ribosomální RNA vyskytující se ve funkčně důležitých oblastech ribosomu a jejich přímý vliv na translaci. Avšak studovány by měly být nejen tyto modifikované nukleotidy. Také se u eukaryot zatím nestudoval vztah mezi modifikacemi nukleotidů ribosomální RNA a translačními faktory. U *E. coli*, kde je vliv modifikací rRNA na syntézu proteinů lépe prostudován, bylo zjištěno, že modifikace $m^2\text{G966}$ a $m^5\text{C967}$ jsou důležité pro vazbu iniciačního faktoru 3 (Saraiya *et al.* 2008). V loňském roce se na konferenci „Translation control“ v New Yorku objevily abstrakty zabývající studií vlivu modifikací nukleotidů ribosomální RNA na čepičce nezávislé translaci (Basu *et al.* 2010, Bellodi *et al.* 2010a, Bellodi *et al.* 2010b, Thompson *et al.* 2010). Jednou z dalších otázek, která je v počátcích studia, je vztah mezi poruchou Dyskeratosis congenita a modifikacemi nukleotidů rRNA, tato práce byla také prezentována na loňské konferenci v New Yorku (Jack *et al.* 2010). Do okamžiku zkompletování a odevzdání mé práce, nebyly studie prezentované na loňské konferenci publikovány. Možností, kterými se studium modifikací ribosomální RNA může zabývat, je stále hodně. Věřím, že získaných informací v této oblasti bude přibývat.

Seznam použité literatury

Badis, G., Fromont-Racine, M., Jacquier, A. (2003): A snoRNA that guides the two most conserved pseudourine modifications within rRNA confers a growth advantage in yeast. *RNA*, Vol. 9: 771-779

Baudin-Baillieu, A., Farbet, C., Liang, X., Piekna-Przybylska, D., Fournier, M. J., Rousset, J. P. (2009): Nucleotide modification in three functionally important regions of the *Saccharomyces cerevisiae* ribosome affect translation accuracy. *Nucleic Acids Research*, Vol. 37, No. 22: 7665-7677

Basu, A., Chaudhuri, S., Das, P., Gaccioli, F., Komar, A. A., Hatzoglou, M., Mazumder, B. (2010): Disruption of rRNA methylation attenuates the activity of certain cellular, but not viral IRES. *Abstracts of papers presented at the 2010 meeting on TRANSLATION CONTROL*; 6

Baxter-Roshek, J. L., Petrov, A. N., Dinman, J. D. (2007): Optimization of ribosome structure and function by rRNA base modification. *PloS ONE*, Issue 1, e174

Brand, R. C., Klootwijk, J., van Steebergen, T. J. M., de Kok, A. J., Planta, R. J., (1977): Secondary methylation of yeast ribosomal precursor RNA. *European Journal of Biochemistry*, 75(1): 311-318

Bellodi, C., Kopmar, N., Ruggero, D. (2010a): A translational switch between cap- to IRES-mediated translation relies on rRNA modifications during oncogene-induced senescence. *Abstracts of papers presented at the 2010 meeting on TRANSLATION CONTROL*; 111

Bellodi, C., Krasnykh, O., Haynes, N., Theodoropoulou, M., Montanaro, L., Contreras, A., Ruggero D. (2010b): rRNA modifications regulate cellular IRES-mediated translation through the 48S pre-initiation complex assembly, which is required for tumor suppression. *Abstracts of papers presented at the 2010 meeting on TRANSLATION CONTROL*; 38

Bonnerot, C., Pintard, L., Lutfalla, G. (2003): Functional redundancy of Spb1p and a snR52-dependent mechanism for the 2'-O-ribose methylation of a conserved rRNA position in yeast. *Molecular Cell*, Vol. 12: 1309-1315

Decatur, W. A. and Fournier, M. J. (2002): rRNA modification and ribosome function. *Trends in Biochemical Sciences*, Vol. 27, No. 7: 344-351

Esguerra, J., Warringer, J., Blomberg, A. (2008): Functional importance of individual rRNA 2'-O-ribose methylations revealed by high-resolution phenotyping. *RNA*, Vol. 14: 649-656

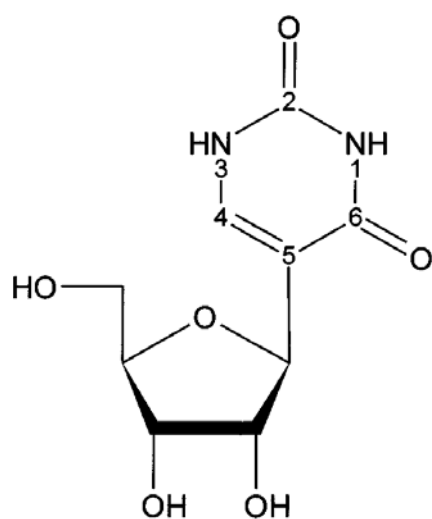
Filipowicz, W., Pelczar, P., Pogacic, V., Dragon, F. (1999): Structure and biogenesis of small nucleolar RNAs acting as guides for ribosomal RNA modification. *Acta Biochimica Polonica*, Vol. 46, No. 2

Jack, K., Meskauskas, A., Bellodi, C., Kopmar, N., Krashykh, O., Landry, D. M., Dean, A. M., Thompson, S. R., Ruggero, D., Dinman, J. D. (2010): Global rRNA pseudouridylation defects affect ribosomal ligand binding and translational fidelity from yeast to humans. *Abstracts of papers presented at the 2010 meeting on TRANSLATION CONTROL*; 5

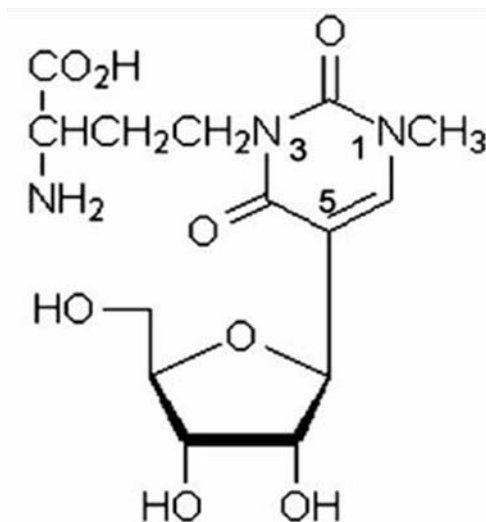
- Kimura, S., Suzuki, T. (2010): Fine-tuning of the ribosomal decoding center by conserved methyl-modifications in the *Escherichia coli* 16S rRNA. *Nucleic Acids Research*, Vol. 38, No. 4: 1341-1352
- King, T. H., Liu, B., McCully, R. R., Fournier M. J. (2003): Ribosome structure and activity are altered in cells lacking snoRNPs that form pseudouridines in the peptidyl transferase center. *Molecular Cell*, Vol. 11: 425-435
- Lafontaine, D. J., Preiss, T., Tollervey, D. (1998): Yeast 18S rRNA dimethylase Dim1p: a quality control mechanism in ribosome synthesis? *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 18, No. 4: 2360-2370
- Lapeyre, B. and Purushothaman, S. K. (2004): Spb1p-direct formation of Gm2922 in the ribosome catalytic center occurs at a late processing stage. *Molecular Cell*, Vol. 16: 663-669
- Liang, W. Q. and Fournier, M. J. (1995): U14 base-pairs with 18S rRNA: a novel snoRNA interaction required for rRNA processing. *Genes & Development* 9: 2433-2443
- Liang, X., Liu, Q., Fournier, M. J. (2009): Loss of rRNA modifications in the decoding center of the ribosome impairs translation and strongly delays pre-rRNA processing. *RNA*, Vol. 15: 1716-1728
- Liang, X., Liu, Q., Fournier, M. J. (2007): rRNA modifications in an intersubunit bridge of the ribosome strongly affect both ribosome biogenesis and activity. *Molecular Cell*, Vol. 28: 965-977
- Liang, X., Liu, Q., Liu, Q., King, T. H., Fournier, M. J. (2010): Strong dependence between functional domains in a dual-function snoRNA infers coupling of rRNA processing and modification events. *Nucleic Acid Research*, Vol. 38, No. 10: 3376-3387
- Liiv, A., Karitkina, D., Maiväli, Ü., Remme, J. (2005): Analysis of the function of *E. coli* 23S rRNA helix-loop 69 by mutagenesis. *BMC Molecular Biology*, 6:18
- Mengel-Jorgensen, J. and Kirpekar, F. (2002): Detection of pseudouridine and other modifications in tRNA by cyanoethylation and MALDI mass spectrometry. *Nucleic Acid research*, Vol. 30, No. 23
- Meyer, B., Wurm, J. P., Kötter, P., Leisegang, M. S., Schilling, V., Buchhaupt, M., Held, M., Bahr, U., Karas, M., Heckel, A., Bohnsack, M. T., Wöhnert, J., Entian, K. D. (2011): The Bowen-Conradi syndrome protein Nep1 (Emg1) has a dual role in eukaryotic ribosome biogenesis, as an essential assembly factor and in the methylation of Ψ1191 in yeast 18S rRNA. *Nucleic Acid Research*, Vol. 39, No. 4: 1526-1537
- Nazar, R. N. (2004): Ribosomal RNA processing and ribosome biogenesis in eukaryotes. *Life*, 56(8): 457-465
- Piekna-Przybylska, D., Decatur, W. A., Fournier, M. J. (2007): New bioinformatic tools for analysis of nucleotide modification in eukaryotic rRNA. *RNA*, Vol. 13: 305-312
- Piekna-Przybylska, D., Przybylski, P., Baudin-Baillieu, A., Rousset, J. P., Fournier, M. J. (2008): Ribosome performance is enhanced by a rich cluster of pseudouridines in the A-site finger region of the large subunit. *Journal of biological chemistry*, Vol. 283, No. 38: 26026-26036

- Rakauskaite, R., Dinman, J. D. (2008): rRNA mutants in the yeast peptidyltransferase center reveal allosteric information networks and mechanisms of drug resistance. *Nucleic Acids Research*, Vol. 36, No. 5: 1497-1507
- Rinke-Appel, J., Jünke, N., Brimacombe, R., Dokudovskaya, S., Dontsova, O., Bogdanov, A. (1993): Site-directed cross-linking of mRNA analogues to 16S ribosomal RNA; a complete scan of cross-links from all positions between '+1' and '+16' on the mRNA, downstream from the decoding site. *Nucleic Acids Research*, Vol. 21, No. 12: 2853-2859
- Saraiya, A. A., Lamichhane, T. N., Chow, Ch. S., SantaLucia, J. J., Cunningham P. R. (2008): Identification and role of functionally motifs in the 970 loop of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA. *Journal of Molecular Biology* 376: 645-657
- Thomas, S. R., Keller, Ch. A., Szyk, A., Cannon, J. R., LaRonde-LeBlanc, N. A. (2011): Structural insight into the functional mechanism of Nep1/Emg1 N1-specific pseudouridine methyltransferase in ribosome biogenesis. *Nucleic Acid Research*, Vol. 39., No. 6: 2445-2457
- Thompson, S. R., Landry, D. M., Hertz, M. I., Dean, A. M. (2010): The ribosome contribution to IRES-mediated translation: RPS25 and rRNA pseudouridines. *Abstracts of papers presented at the 2010 meeting on TRANSLATION CONTROL*; 324
- Tollervey, D., Lehtonen, H., Jansen, R., Kern, H., Hurt, E. C. (1993): Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly. *Cell*, Vol. 72: 443-457
- Song, X., Nazar, R. N. (2002): Modification of rRNA as a 'quality control mechanism' in ribosome biogenesis. *FEBS Letters* 523: 182-186
- Sumita, M., Desaulniers, J. P., Chang Y. Ch. (2005): Effects of nucleotide substitution and modification on the stability and structure of helix 69 from 28S rRNA. *RNA*, Vol. 11: 1420-1429
- White, J., Li, Z., Sardana, R., Bujnicki, J. M., Marcotte, E. M., Johnson, A. W. (2008): Bud23 methylates G1575 of 18S rRNA and is required for efficient nuclear export of pre-40S subunits. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 28, No. 10: 3151-3161
- Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T. N., Cate, J. H. D., Noller H. F. (2001): Crustal structure of the ribosome at 5.5 Å Resolution. *Science* Vol. 292: 883-896
- Zebarjadian, Y., King, T., Fournier, M. J., Clarke, L., Carbon, J. (1999): Point mutations in yeast CBF5 can abolish in vivo pseudouridylation of rRNA. *Molecular and Cellular Biology*, 19(11): 7461-7472

Příloha



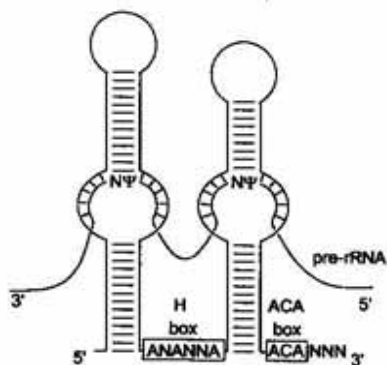
Pseudouridine



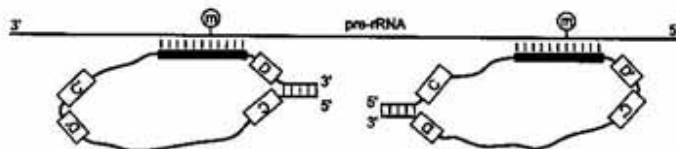
m1acp3Ψ

Obr. 1: Vlevo je zobrazena struktura pseudouridinu s očíslovanými atomy pyrimidinového kruhu (Mengel-Jorgensen and Kirpekar 2002). Vpravo je struktura hypermodifikovaného pseudouridinu (Liang *et al.* 2009).

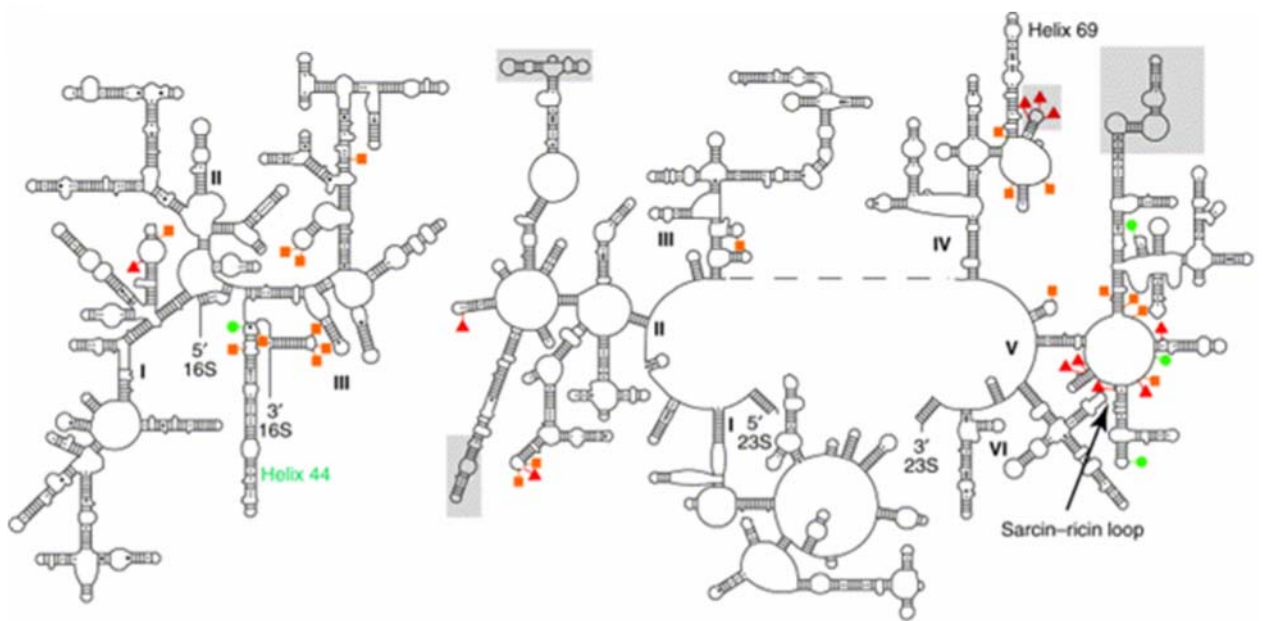
H/ACA snoRNAs



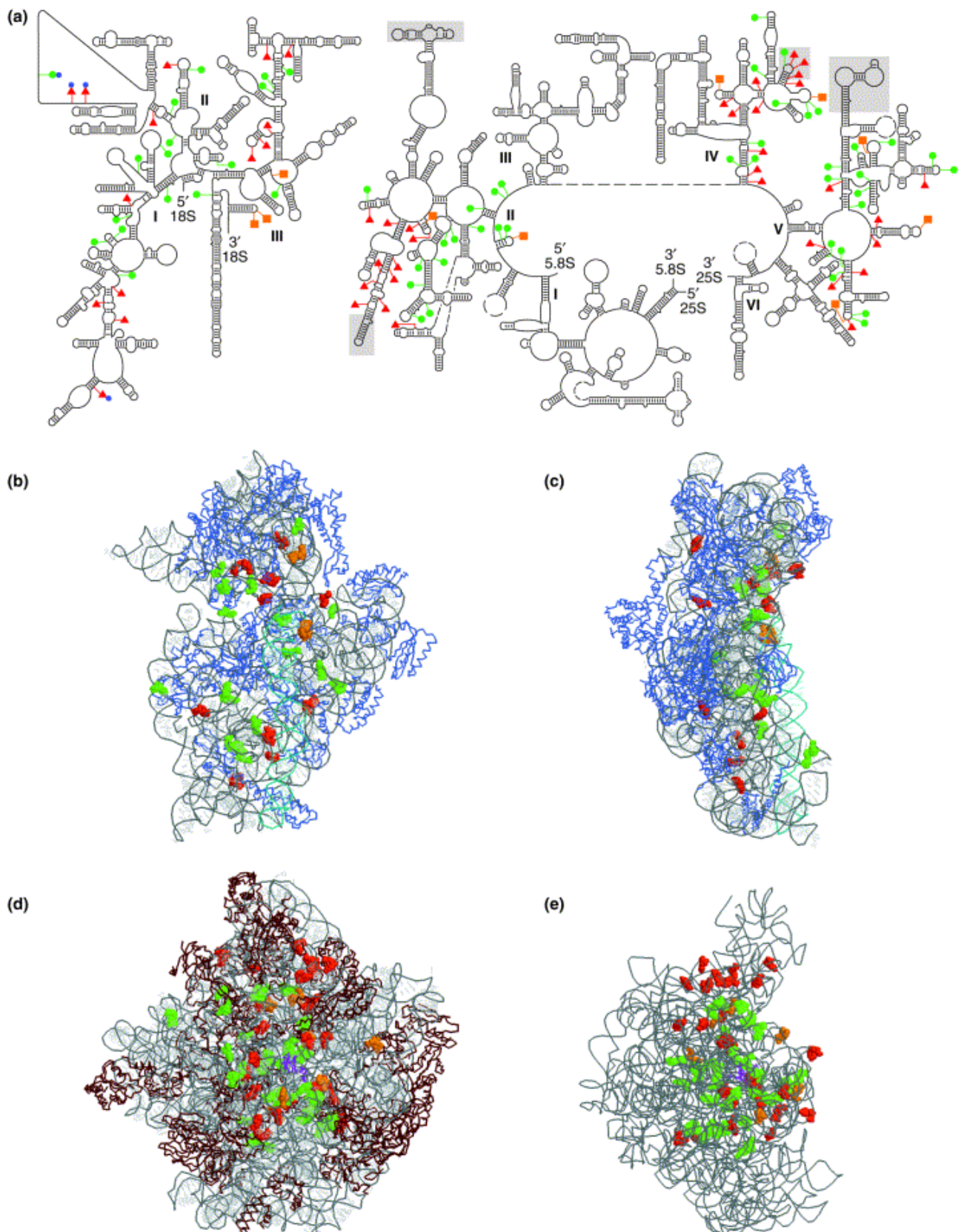
C/D snoRNAs



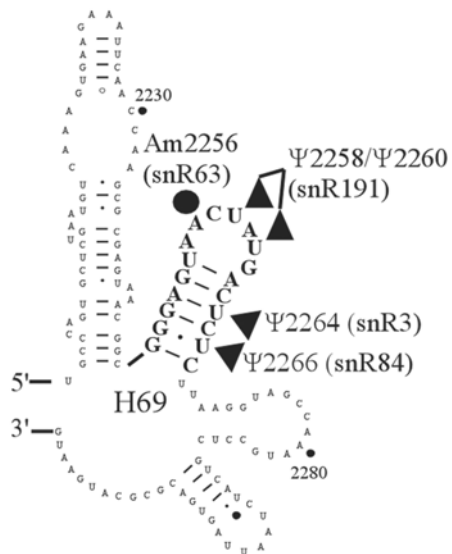
Obr. 2: Obecná struktura snoRNA z rodiny H/ACA (vlevo) a z rodiny C/D (vpravo). Dále je zde znázorněno párování s molekulou pre-rRNA a místo, kde dochází k modifikaci nukleotidu (Filipowicz *et al.* 1999).



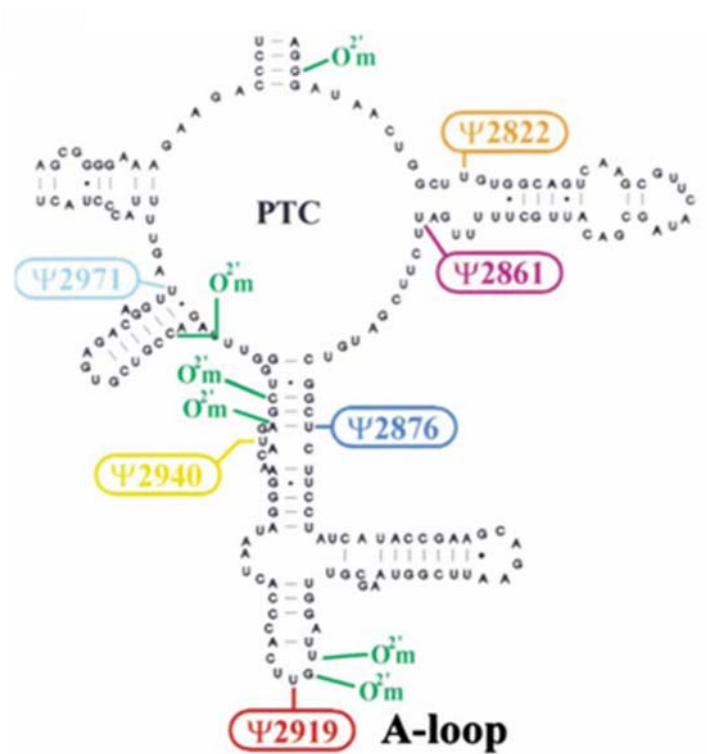
Obr. 3: Schéma zobrazující pozici modifikovaných nukleotidů ribosomální RNA u *E. coli*. Červený trojúhelník zobrazuje pozice pseudouridinů, zelený kruh 2'-O-methylaci a oranžový čtverec zobrazuje pozice různých typů modifikací bází (Decatur and Fournier, 2002).



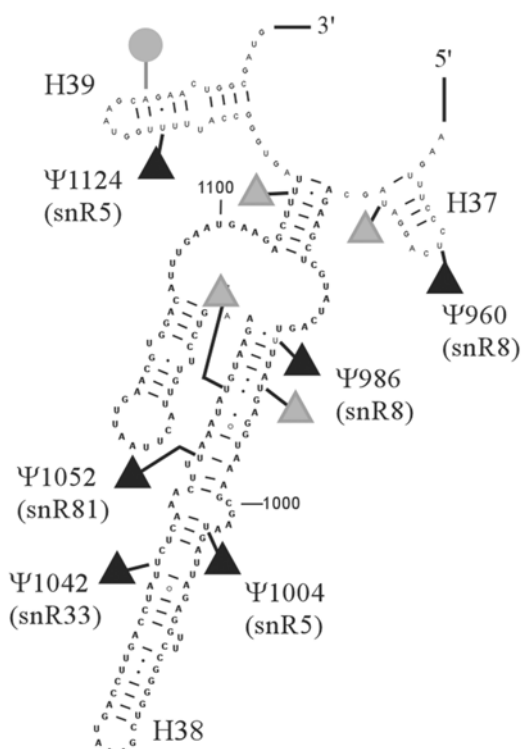
Obr. 4: Rozložení modifikovaných nukleotidů 18S rRNA a 25S rRNA v sekundární (a) a terciární struktuře (b-e) kvasinkového ribosomu. Pseudouridiny jsou vyznačeny červenými trojúhelníky, 2'-O-methylace jsou zobrazeny zelenými kruhy a ostatní typy modifikací jsou označeny oranžovými čtverci. Dva pohledy na malou ribozomální podjednotku. RNA kostra je vybarvena šedě a ribozomální proteiny jsou modré (b, c). Dva pohledy na velkou podjednotku ribosomu. RNA kostra je šedá a ribozomální proteiny hnědé (d, e) (Decatur and Fournier, 2002).



Obr. 5: Schéma ukazující pozice modifikovaných nukleotidů vyskytujících se v oblasti šroubovice 69 v kvasinkové ribozomální RNA. Pseudouridiny jsou označeny trojúhelníky a 2'-O-methylace je vyznačena kruhem (Baudin-Baillieu *et al.* 2009).



Obr. 6: Schéma ukazující pozice modifikovaných nukleotidů vyskytující se v peptidyltransferázové doméně velké podjednotky v *Saccharomyces cerevisiae* (King *et al.* 2003). Číslování je zde o 2 pozice posunuto nazpět oproti této práci.



Obr. 7: Schéma zobrazující pozice modifikací v oblasti prstu A místa u *Saccharomyces cerevisiae*. Trojúhelníky zobrazují pseudouridiny, kruh označuje 2'-O-methylaci (Baudin-Baillieu *et al.* 2009).