

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Alexandra Gredová

Extraribosomální funkce ribosomálních proteinů
Extraribosomal functions of ribosomal proteins

Bakalářská práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Petr Folk, CSc.

Praha, 2020

Poděkování:

Tímto bych ráda poděkovala mému školiteli, panu doc. RNDr. Petru Folkovi, CSc. za odborné vedení bakalářské práce, a hlavně za laskavý a velice empatický přístup ve vztahu ke mně. Také bych ráda poděkovala mé rodině a zejména babičce za příjemné zázemí a podporu.

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, srpen 2020

Alexandra Gredová

Abstrakt

Význam ribosomálních proteinů není relevantní pouze z hlediska umožnění proteosyntézy, jejich funkce se projevují i mimo kontext ribosomu ve smyslu extraribosomálních funkcí. Tato práce je zaměřena především na extraribosomální funkce proteinů vyšších eukaryot. Konkrétněji rozebírá tři ribosomální proteiny, L13a, L22 a S3, které ilustrují několik zajímavých aspektů extraribosomálních funkcí. Přehledně shrnuje mechanismy působení těchto proteinů a jejich projevy na různých úrovních genové exprese.

Klíčová slova: extraribosomální funkce, L13a, L22, S3, p53, NF – κ B, sestřih

Abstract

Ribosomal proteins are important not only because they enable proteosynthesis, but also because of their functions outside of ribosome - in their extraribosomal functions. This thesis is mainly focused on the extraribosomal functions of higher eukaryotic ribosomal proteins. Specifically, it analyzes three ribosomal proteins, L13a, L22, and S3, which illustrate several aspects of extraribosomal functions. It discusses the mechanisms of action of these proteins and how they affect various levels of gene expression.

Key words: extraribosomal function, L13a, L22, S3, p53, NF – κ B, splicing

Seznam zkratek

40S	malá ribosomální podjednotka
5'TOP	5'-terminal oligopyrimidine
60S	velká ribosomální podjednotka
8-oxoG	8-oxoguanin
AGC	cAMP-dependentní proteinkináza A/G/C
AK	aminokyselina
AP	apurinický/apyrimidinický
APE1	apurinická/apyrimidinická endonukláza
ATF6	aktivační transkripční faktor 6
ATPáza	ATP fosfohydroláza
BER	system oprav vystřizžením báze
BMP	bone morphogenetic protein
CCL11	C-C motif chemokine 11
CCL22	C-C motif chemokine 22
Cdk5	cyklin-dependentní kináza 5
DAPK	death-associated protein kinase 1
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ds3	ribosomální protein S3 octomilky
EBER1	Epstein-Barr virus-encoded RNA 1
eIF	eukaryotický iniciační faktor 1
EPRS	glutamyl-prolyl-tRNA syntetáza
ER	endoplazmatické retikulum
ERK1/2	extracellular signal-regulated kinase
GAIT	interferonem gamma aktivovaný inhibitor translace
GAPDH	glyceraldehyd- 3-fosfát dehydrogenáza
GTP	guanosintrifosfát
GTPáza	GTP fosfohydroláza
hnRNP-A1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
hOGG1	8-oxoguanin DNA-glykosyláza
hS3	lidský ribosomální protein S3

HSC	hematopoetické kmenové buňky
Hsp70	protein tepelného šoku 70
IFN- γ	interferon gamma
I κ B	inhibitor jaderného faktoru kappa B
IKK	kináza inhibitor jaderného faktoru kappa B
IL	interleukin
IRE1	inositol-requiring enzyme 1
IRES	vnitřní místo pro vstup ribozomu
KH	K homologie
Mdm2	Mouse double minute 2 homolog
Miz1	Myc-Interacting Zinc Finger Protein 1
MMP1	matrixová metaloproteináza 1
mRNA	mediátorová RNA
MSC	multiaminoacyl tRNA synthetase complex
NER	systém oprav vystřížením nukleotidů
NF – κ B	jaderný faktor-kappa B
NLS	jaderný lokalizační signál
NSAP1	NS1-associated protein 1
PABP	poly-A vazebný protein
PERK	protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase
PNKP	polynukleotid kináza-fosfatáza
RHD	Rel homologická doména
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku
RP	ribosomální protein
rRNA	ribosomální RNA
RSV	respirační syncytiální virus
Runx1	Runt-related transcription factor 1
TGF β	transforming growth factor beta
Tom70	translocase of the outer membrane 70
tRNA	transferová RNA

UPR	unfolded protein response
UTR	nepřekládaná terminální oblast
VAIT	virem aktivovaný inhibitor translace
ZIPK	zipper interacting protein kinase

Obsah

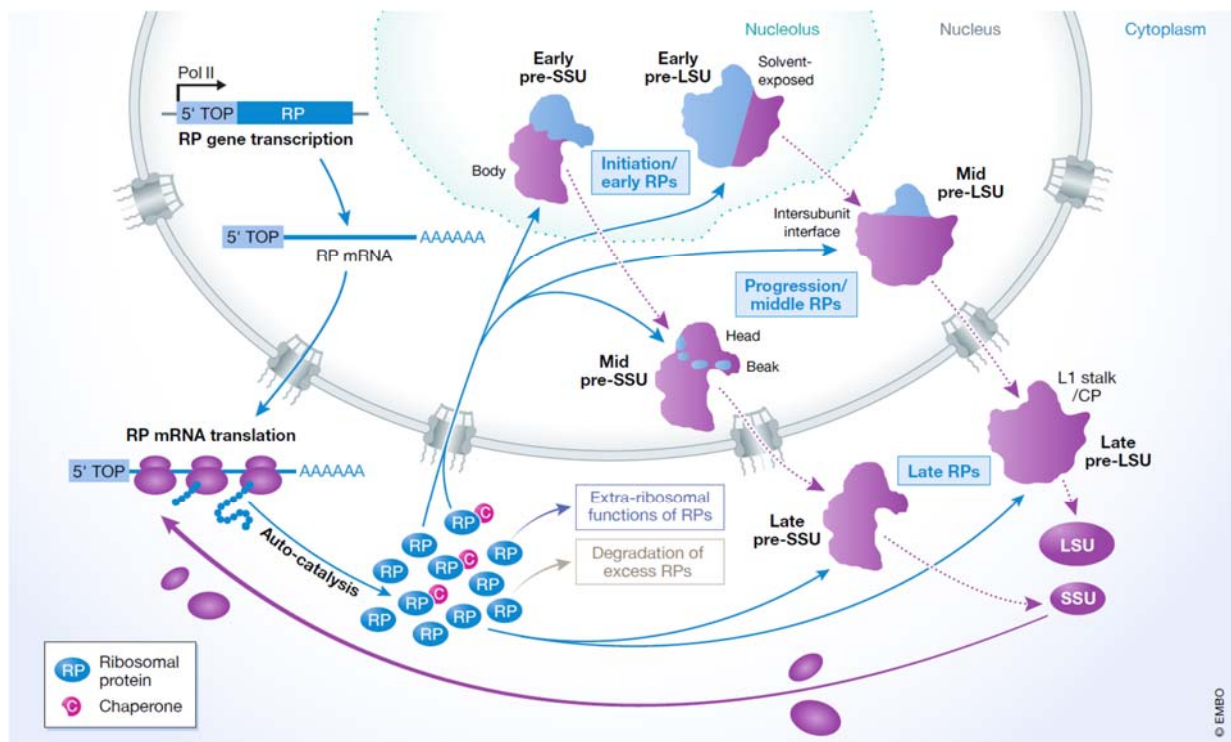
1. Úvod	1
2. Extraribosomální funkce ribosomálních proteinů	3
3. Funkce L13a v transkript-selektivní inhibici translace.....	4
4. Extraribosomální funkce L22	8
4.1. L22 jako modulátor účinnosti translace	9
4.2. L22 jako koregulátor systému p53-MDM2.....	9
4.3. L22 jako inhibitor sestřihu	11
4.4. Vliv vazby L22 na EBER1	12
5. Extraribosomální funkce S3.....	13
5.1. Role S3 v mechanismu opravy vystřížením báze.....	13
5.2. S3 v regulaci transkripce.....	17
6. Závěrečná diskuse	20
7. Seznam literatury	Chyba! Záložka není definována.

1. Úvod

Ribosomy jsou vysoce organizované ribonukleoproteinové komplexy, které zprostředkují syntézu proteinů. Savčí eukaryotické ribosomy tvoří velká podjednotka (60S) složená z 5S rRNA, 5.8S rRNA, 28S rRNA a přibližně 47 ribosomálních proteinů (RP), zatímco malou podjednotku (40S) tvoří 18S rRNA a asi 33 RP (Doudna & Rath, 2002). rRNA molekuly katalyzují tvorbu peptidových vazeb mezi jednotlivými aminokyselinami (AK) nově vznikajícího proteinového řetězce (Cech, 2000). RP interagují s rRNA a formují tak katalytická centra, zajišťují správný průběh translace. RP mají funkci i při samotné biogenezi a maturaci ribosomů. RP jsou významné jak z hlediska tvorby jednotlivých přechodných stádií vývoje obou podjednotek (O'Donohue et al., 2010), tak z hlediska stabilizace jejich finální konformace. Začlenění RP do fází maturace ribosomálních podjednotek lidských buněk je schematicky znázorněno na obrázku 1. Biogeneze ribosomů začíná v jadérku transkripcí prekurzorů rRNA prostřednictvím polymerázy I a III (Doudna & Rath, 2002). Polymeráza III syntetizuje 5S rRNA, zatímco polymeráza I syntetizuje prekurzor 47S rRNA. Tento prekurzor se postupně modifikuje a upravuje v jadérku a nukleoplasmě exoribonukleázami a endoribonukleázami na finální podobu 5.8S rRNA, 25S rRNA a 18S rRNA. Během zpracování prekurzoru 47S rRNA dochází k jadernému transportu RP syntetizovaných v cytoplasmě polymerázou II (obrázek 1) (Bohnsack & Bohnsack, 2019). RP postupně asociují s rRNA a formují její stabilní funkční strukturu. RP, které asociují s ranými prekurzory 40S jsou S3a, S4, S5, S6, S8, S11, S13, S14, S16, S23 a S24 (na obrázku 1 označeny „Body“). RP, které se začlení do prekurzorů 40S ve střední fázi maturace jsou S9, S3 a S21 (na obrázku 1 označeny „Head“, „Beak“). V pozdní fázi maturace asociují s prekurzorem 40S RP S2, S10, S17, S19, S26 a S29 (O'Donohue et al., 2010). L3, L4, L6, L7, L7a, L14, L17, L18, L26, L32, L35 a L35a, které se nacházejí v 60S na straně vystavené rozpouštědлу jsou asociovány v rané fázi prekurzoru 60S (na obrázku 1 označeny „Solvent-exposed“). Naopak P0, L3, L5, L8, L9, L13, L13a, L18a, L19, L27, L30, L31, L34, L35, L36, L37 a L37a, které utvářejí stranu rozhraní 60S jsou začleněny do prekurzoru ve střední fázi maturace 60S (na obrázku 1 označeny „Intersubunit interface“) (Nicolas et al., 2016). Pevnost vazby RP v rámci ribosomu se postupem zrání ribosomálních podjednotek se zvyšuje. Protože biogeneze ribosomů a translace jsou komplikované procesy, které vyžadují maximální přesnost a koordinovanost, je nutná účast mnoha dalších pomocných molekul jako jsou

helikázy, GTPázy, ATPázy, kinázy a endonukleázy (Bohnsack & Bohnsack, 2019; Fromont-Racine et al., 2003).

Syntéza RP je přísně regulovaný proces. RP jsou syntetizovány v nadbytku oproti jejich požadovanému množství. Nezačleněné RP jsou ubiquitinovány a následně degradovány proteasomy (Lindström, 2009). Ostatní volné RP, které mají být inkorporovány do ribosomu, jsou v cytoplasmě asociovány se chaperony. Kvůli vysokému obsahu bazických AK v RP jsou tyto RP náchylné k nespécifickým interakcím se záporně nabitými molekulami. Vazbou chaperonů na RP je zastíněn náboj RP. V buňkách existuje skupina chaperonů, která se specificky váže na volné RP (Pillet et al., 2017). Jedním z důvodů, díky kterému buňky obratlovců synchronizují expresi jednotlivých molekul účastnících se biogeneze ribosomu, je obsah sekvence 5'TOP (5'-terminal oligopyrimidine) v 5'UTR mRNA RP a dalších přídatných proteinů (Bohnsack & Bohnsack, 2019; Iadevaia et al., 2014)



Obrázek 1 - Schéma znázorňuje syntézu RP v buňce člověka, jež jsou postupně začleněny do maturujících ribosomálních podjednotek. Plnými modrými šipkami je naznačeno, kam se RP postupně translokují v rámci buňky. Fialovými šipkami je znázorněna maturace jednotlivých podjednotek a jejich následná funkce v translaci v cytoplasmě. Růžové C znázorňuje specifické chaperony, které vážou jednotlivé RP procházející přes jadernou membránu do maturačních stádií podjednotek ribosomu. Obrázek byl převzat z (Bohnsack & Bohnsack, 2019).

2. Extraribosomální funkce ribosomálních proteinů

Funkce RP nejsou omezeny pouze na oblast translace a biogeneze ribosomů. U mnoha RP byly objeveny funkce extraribosomální. Extraribosomálními funkcemi se myslí takové funkce, které nesouvisí s translací či s ribosomy. Jedná se o funkce, kdy RP prostřednictvím vazby na jinou molekulu figuruje v nějakém molekulárním procesu. RP díky vysokému obsahu bazických AK elektrostaticky interagují s nukleovými kyselinami (Warner & McIntosh, 2009). RP vázající RNA, ať už pre-mRNA, mRNA či nekódující RNA, ovlivňují regulaci genové exprese na několika úrovních v souvislosti s transkripcí, sestřihem a stabilitou mRNA (Bhavsar et al., 2010). Některé RP tak regulují svoji vlastní expresi. Např. lidský protein S14 ovlivní svou expresi vazbou na 5' konec vlastní mRNA (Tasheva & Roufa, 1995). Také vysoká hladina lidského proteinu S13 negativně reguluje sestřih jeho vlastní pre-mRNA, kvůli vazbě S13 v blízkosti sestřihového místa intronu 1 (Malygin et al., 2007). RP ovšem dokážou tvořit vazbu i s jinými proteiny, transkripčními faktory či enzymy a jsou schopny regulovat jejich aktivitu a tím metabolismus buňky. Sám RP také může mít katalytickou funkci například po navázání na DNA. Později v textu se budeme podrobně zabývat funkcí S3 v rámci oprav poškozené DNA (J. Kim et al., 1995). Extraribosomální působení RP může mít dopad na zastavení buněčného cyklu nebo může způsobit buněčnou apoptózu (Bhavsar et al., 2010). Extraribosomální funkce byly potvrzeny u RP vyskytujících se v buňkách nižších i vyšších eukaryot. Jeden z prvních přehledných článků shrnujících extraribosomální funkce publikovala Ira Woolová (Wool, 1993; Wool R. G. Landes-in press). Na základě představ, že formy života založené na RNA byly evolučně původní (Higgs & Lehman, 2015) se předpokládá, že primordiální ribosomy byly složeny pouze z rRNA a RP postrádaly. Proteiny se staly součástí ribosomů později, kdy se vyvinuly specificky pro funkci v ribosomu nebo se staly jeho součástí jako již existující peptidy s etablovanou funkcí („extraribosomální“) (Lupas & Alva, 2017; Wool, 1996). Warner a McIntosh navrhli tři kritéria, která by měl RP splnit, aby mohly jeho „přidatné“ funkce být klasifikovány jako extraribosomální. Takový RP by měl 1) interagovat s molekulou, která nenáleží ribosomu, či není zapojena do translace a biogeneze ribosomu, 2) důsledek této interakce by měl mít vliv na nějakou pozorovatelnou změnu v rámci buňky a 3) a jeho funkce mimo ribosom by měla být prokazatelná (Warner & McIntosh, 2009).

3. Funkce L13a v transkript-selektivní inhibici translace

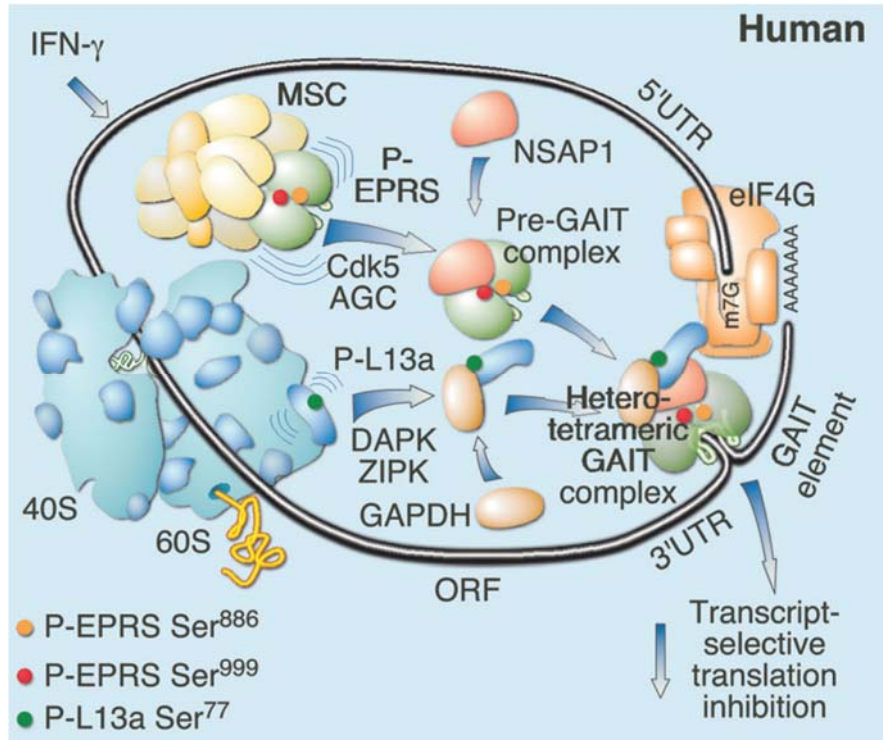
Jedním z ribosomálních proteinů s extraribosomální funkcí je L13a, protein 60S. Primární strukturu tohoto proteinu u člověka tvoří 203 AA, sekvence je znázorněna na obrázku 2. Na rozdíl od homologu L13a v kvasince (L16 dle staré nomenklatury, uL13 dle nové nomenklatury (Ban et al., 2014)), není funkce L13a u savců esenciální pro biogenezi ribosomů ani pro translaci. Zdá se ale, že L13a je v savčích buňkách vyžadován pro metylaci pre-rRNA 47S. Methylace pre-rRNA je významná pro translaci některých mRNA, které obsahují IRES (internal ribosome entry site). L13a tak nepřímo aktivuje syntézu těchto mRNA (Chaudhuri et al., 2007).

```
MAEVQVLVLD  GRGHLLGRLA  AIVAKQVLLG  RKVVVVRCCEG  INISGNFYRN  KLKYLAFLRK  
RMNTNPSRGP  YHFRAPSRIF  WRTVRGMLPH  KTKRGQAALD  RLKVFDGIPP  PYDKKKRMVV  
PAALKVVRLK  PTRKFAYLGR  LAHEVGWKYQ  AVTATLEEKR  KEKAKIHYRK  KKQLMRLRKQ  
AEKNVEKKID KYTEVLKTHG LLV
```

Obrázek 2- Sekvence lidského proteinu L13a. Žlutě jsou vyznačeny předpokládané sekvence NLS1 (nuclear localization signal 1) a NLS2 (nuclear localization signal 2) (Kour et al., 2019), červeně je vyznačen Ser77, jehož fosforylací je L13a uvolněn z ribosomu, modře je vyznačena sekvence esenciální pro správnou funkci GAIT (IFN- γ activated inhibitor of translation). Sekvence L13a byla převzata z databáze UniProt (accession no.:**P35268**).

Supramolekulárním komplexem GAIT (IFN- γ activated inhibitor of translation) imunitní buňky myeloidní linie selektivně inhibují translaci vybraných mRNA. Jedná se o heterotetramer složený z ribosomálního proteinu L13a (Barsanjit Mazumder et al., 2003), NSAP1 (NS1-associated protein 1, pouze v lidských buňkách), GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) a EPRS (Glutamyl-prolyl-tRNA synthetase) (Barsanjit Mazumder & Fox, 1999; Prabha Sampath et al., 2004). GAIT-komplex se vyznačuje afinitou k mRNA obsahující tzv. element GAIT. Jedná se o úsek zaujímající sekundární strukturu v podobě vlásenky, tvořené přibližně 29 nukleotidy. Jeho stavba byla popsána na 3'UTR mRNA ceruloplasminu (P. Sampath et al., 2003) a byla identifikována u mnoha dalších mRNA interagujících s komplexem GAIT, včetně mRNA pro DAPK (Death-Associated Protein Kinase 1) a ZIPK (Zipper interacting protein kinase; také známá jako Death-Associated Protein Kinase 3) (Mukhopadhyay et al., 2008), chemokinů CCL11 a CCL22 (Vyas et al., 2009).

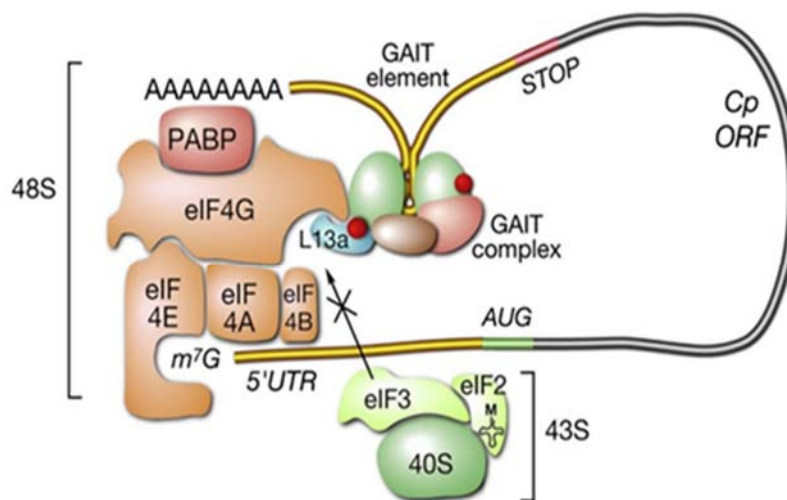
Jak již z názvu komplexu vyplývá, IFN- γ je molekulou, která stimuluje buňku k tvorbě GAIT. Funkční cyklus komplexu GAIT je znázorněn na obrázku 3. MSC (multiaminoacyl tRNA synthetase complex) katalyzuje přiřazení AK k příslušné tRNA. Jednou z jeho podjednotek je EPRS, která k tRNA^{Glu/Pro} váže kyselinu glutamovou nebo prolin (Cerini et al., 1991). V důsledku vazby IFN- γ na receptor jsou spuštěny fosforylační reakce, které jsou zakončeny fosforylací Ser886 a Ser999 EPRS. Tyto modifikace způsobí uvolnění EPRS z MSC a umožní následnou vazbu EPRS na NSAP1, další komponentu GAIT. NSAP1 se mimo jiné podílí na maturaci mRNA. Společně tak EPRS-NSAP1 utváří raný komplex GAIT (Abul Arif et al., 2009). EPRS je zodpovědný za vazbu komplexu GAIT na element GAIT v mRNA (Prabha Sampath et al., 2004). NSAP1 inhibuje tuto vazbu překrytím vazebného místa vyskytujícího se na EPRS. Inhibice prostřednictvím NSAP1 je znemožněna změnou konformace GAIT po navázání zbylých komponent (Jia et al., 2008). IFN- γ se zpožděním 16h stimuluje monocyty ke spuštění další fosforylační kaskády. Ta je zprostředkována DAPK, která následně aktivuje ZIPK. L13a, který se nachází na povrchu 60S, je fosforylován ZIPK na Ser77 (Mukhopadhyay et al., 2008). Tento krok je nezbytný pro uvolnění L13a z vazby k ribosomu (Barsanjit Mazumder et al., 2003), ale není esenciální pro následnou funkci komplexu GAIT, protože podle nedávných studií byla zjištěna přetrvávající funkce komplexu GAIT navzdory absence úseku L13a obsahujícího Ser77. Předpokládá se ovšem, že pro funkci komplexu GAIT je nezbytný výskyt oblasti L13a zahrnující AK Tyr149-Val203, a to zejména Arg169, Lys170, Lys171 (Kour et al., 2019). GAPDH interaguje s volným fosforylovaným L13a a zajišťuje jeho stabilizaci v cytoplazmě (Jia et al., 2012). Vazbou L13a-GAPDH na EPRS-NSAP1 se po změně konformace odkrývá vazebné místo elementu GAIT a utváří se tak aktivovaný heterotetramerický GAIT.



Obrázek 3- Znárodnění funkčního cyklu komplexu GAIT v lidských buňkách. IFN- γ stimuluje aktivaci Cdk5 (Cyclin dependent kinase 5) a AGC (cAMP-dependent protein kinase A/G/C), které fosforylují EPRS (EPRS zbarven zeleně, fosforylovaný Ser886 představuje oranžová tečka, fosforylovaný Ser999 představuje červená tečka). Modifikovaný EPRS opouští MSC a váže se na NSAP1 (NSAP1 zbarven oranžově). Ser77 proteinu L13a v ribosomu je fosforylovaný prostřednictvím fosforylační kaskády DAPK-ZIPK, což způsobí uvolnění L13a z ribosomu (L13a zbarven modře, fosforylovaný Ser77 představuje zelená tečka). Modifikovaný L13a se váže na GAPDH a následně společně s EPRS-NSAP1 utváří funkční komplex GAIT (A. Arif et al., 2012).

GAIT inhibuje iniciační krok translace cílové skupiny mRNA (Kapasi et al., 2007). Při iniciaci translace závislé na přítomnosti 7-methylguanosenové čepičky (m⁷G) na 5' konci mRNA dochází k nasednutí komplexu eukaryotického iniciačního faktoru 4F (eIF4F). Jedná se o komplex vázající se na 5' konec mRNA, jehož součástí jsou proteiny eIF4A, eIF4B, eIF4E a eIF4G. Komplex eIF4F má afinitu k poly(A)-vazebnému proteinu (PABP), který interaguje s mRNA na jejím 3' konci. Vazbou eIF4F a PABP dochází k cirkularizaci celého supramolekulárního komplexu. Vznik takového uspořádání je kritickým krokem pro následující iniciaci translace (Jackson et al., 2010). Jedna z podjednotek eIF4F, protein eIF4G, je zodpovědný za navázání pre-iniciačního komplexu 43S na translatovanou mRNA. 43S tvoří 40S, proteiny eIF1, eIF1A, eIF3, pravděpodobně eIF5 a ternární komplex eIF2-GTP-Met-tRNA_i^{Met} (Hinnebusch & Lorsch, 2012). Vysokou afinitou eIF3 k eIF4G tak za normálních podmínek vzniká pre-iniciační komplex 48S, zásadní pro zahájení samotné translace (Jackson et al., 2010). Pokud je v buňce stimulována

tvorba komplexu 48S, jak je znázorněno na obrázku 4. L13a je zodpovědný za vazbu C- konce eIF4G. Cirkularizace supramolekulárního komplexu je esenciální pro přiblížení L13a vyskytujícího se na 3' konci a eIF4G setrvávajícího na 5' konci transkriptu. Vazba L13a na ostatní molekuly v komplexu GAIT mění konformaci L13a tak, aby se odkryla jeho vazebná doména pro eIF4G (Abul Arif et al., 2009). Dochází ke kompetici mezi L13a a výše zmíněným eIF3 vzhledem k tomu, že vazebná místa pro tyto proteiny na eIF4G se překrývají. Je tak zabráněno tvorbě 48S, tedy i následnému zahájení translace (Kapasi et al., 2007).



Obrázek 4 – Znázornění vazby komplexu GAIT na transkript obsahující element GAIT. Vazba eIF3 (komponenty pre-iniciačního komplexu 43S) na eIF4G je inhibována GAIT. Následně je zamezena tvorba pre-iniciačního komplexu 48S. Obrázek byl převzat ze studie Kapasiové a spolupracovníků (Kapasi et al., 2007).

Existence komplexu GAIT je významná zejména v makrofázích a monocytech (P. Sampath et al., 2003; Prabha Sampath et al., 2004), kde je tak v přítomnosti endotoxinů umožněna regulace syntézy prozánětlivých molekul, chemokinů. Tím je dosahováno prevence chronického zánětu, na základě poznatku ze studie Poddara a spolupracovníků (Poddar et al., 2013).

L13a se podílí na ochranném mechanismu proti množení partikulí Respiračního syncytiálního viru (RSV). I v tomto případě L13a inhibuje translaci, a to sice proteinu M, jehož přítomnost je pro RSV limitující. L13a je komponentou komplexu VAIT (Respiratory syncytial virus-activated inhibitor of translation), jehož přesná kompozice není dosud známa. Komplex VAIT svou vazbou na sekundární strukturu v 3'UTR mRNA proteinu M (která je obdobná elementu GAIT)

4.1. L22 jako modulátor účinnosti translace

Hladina L22-like je v buňce regulována právě L22 samotným. Exprese paralogu L22-like je za normálních podmínek v buňkách fibroblastů několikanásobně nižší než exprese L22. Důvodem je schopnost L22 vázat sekundární strukturu mRNA L22-like, která tvoří vlásenku. L22 inhibuje translaci mRNA L22-like, a tak snižuje hladinu L22-like v buňce. Přesný mechanismus dosud nebyl objasněn. Rpl22^{-/-} Rpl22-like^{+/+} buňky postrádají schopnost této regulace, koncentrace L22-like je u nich tedy vyšší (O'Leary et al., 2013).

L22 interaguje s 5'UTR mRNA Smad1 a inhibuje tak translaci proteinu Smad1. Vzhledem ke své sekvenční podobnosti s L22 se může L22-like kompetitivně vázat na 5'UTR mRNA Smad1. Vazba L22-like na 5'UTR mRNA Smad1 má nicméně odlišný efekt než vazba L22. L22-like umožní syntézu Smad1 proteinu. V práci Zhanga a spolupracovníků je zmíněna rozdílná sekvence na N- a C- koncích paralogů L22 a L22-like. Díky různorodosti těchto sekvencí by mohla být umožněna tvorba různých supramolekulárních komplexů. Kompozice těchto komplexů by následně rozhodovala o expresi Smad1 na posttranskripční úrovni (Zhang et al., 2013).

Smad1 je součástí signalizační dráhy zprostředkované BMP (Bone morphogenetic protein). Aktivací proteinů rodiny Smad (včetně Smad1) je aktivován transkripční faktor Runx1 (Run-related transcription factor 1), který zajišťuje správný vývoj hematopoetických kmenových buněk (HSC) (M. J. Chen et al., 2009). Signální dráha BMP se tedy uplatňuje ve vývoji HSC. L22 a L22-like se svými extraribosomálními funkcemi podílejí na procesech krvetvorby prostřednictvím regulace syntézy Smad 1. Působení L22 a L22-like se projevuje v různých stádiích vývoje krevních buněk (Zhang et al., 2013). L22 je důležitý především v brzlíku ve vývoji T lymfocytů (Anderson et al., 2007), zatímco L22-like je vyžadován v brzkých stádiích hematopoézy odehrávajících se v oblasti mezodermu aorta-gonády-mezonefros (Zhang et al., 2013).

4.2. L22 jako koregulátor systému p53-MDM2

L22 stabilizuje p53 vazbou a následnou inhibicí Mdm2 (Murine double minute 2) (Cao et al., 2017). C- konec Mdm2 má aktivitu E3 ubikvitinligázy a dokáže indukovat degradaci p53 pomocí polyubikvitinace tohoto tumor-supresorového proteinu (Hayon & Haupt, 2002). Hladina p53

je za normálních podmínek v buňce přísně kontrolována. Pokud dojde k narušení biogeneze ribosomů, stoupne hladina volných RP a některé z nich, například L11, regulují koncentraci p53 právě prostřednictvím inhibice Mdm2 aktivity (Lohrum et al., 2003; Y. Zhang et al., 2003). V buňkách osteosarkomu L22 interaguje s L11 a L5 prostřednictvím své C- koncové domény. N- koncová doména L22 v komplexu L22-L11-L5 váže středovou kyselou doménu Mdm2 a mění konformaci Mdm2, která nemůže vázat p53 do svého katalytického centra (Cao et al., 2017). V důsledku toho je p53 stabilizován. Mutace pro gen L22 byly nalezeny v rakovinných buňkách několika typů tkání, které syntetizovaly funkční p53. Výsledky Cao a spolupracovníků podporují názor, že L22 může fungovat jako tumorový supresor (Cao et al., 2017). Nezávisle na výše uvedených efektech byl pozorován inhibiční efekt vazby L22 na translaci mRNA genu pro p53 (Solanki et al., 2016). Tento efekt se nicméně manifestuje na specifickém typu buněk (viz níže) a není dosud vyjasněno, jak je zprostředkován na molekulární úrovni.

V práci Rashkovanové a spolupracovníků byla popsána v pre-T lymfocytech (prekurzor $\alpha\beta$ a $\gamma\delta$ linií T lymfocytů) indukce exprese L22 vazbou Miz1 (Myc-Interacting Zinc Finger Protein 1) na promotor genu L22. Delece Miz1 vedla k nárůstu inkorporace mRNA p53 do polysomů (Rashkovan et al., 2014). U pre-T lymfocytů dochází k rekombinaci genů kódujících pre-TCR receptory, což naruší integritu DNA (Hoffman et al., 1996). V kroku přesmyků genů proto musí být zajištěn mechanismus kontrolující hladinu p53. Efekt L22 na koncentraci p53 ale nebyl prokázán v práci Rashkovanové a spolupracovníků na molekulární úrovni (Rashkovan et al., 2014).

V práci Solanki a spolupracovníků (Solanki et al., 2016; Anderson et al., 2007) byl studován efekt ztráty L22 v širším kontextu. Autoři na jedné straně ukázali, že L22 váže mRNA p53, a že absence L22 vede k nárůstu hladin mRNA genu pro p53. Nenašli ale vysvětlení, proč by k takovému efektu mělo docházet pouze selektivně v subpopulaci T lymfocytů ($\alpha\beta$) a nikoli i v ostatních buňkách. Na základě dalších výsledků argumentují, že deficit L22 vede k hyperindukci odpovědi v rámci stresu endoplazmatického retikula (ER), v důsledku čehož dochází k indukci p53 právě v $\alpha\beta$ T lymfocytech (Solanki et al., 2016). Mechanismus, jakým by měl L22 modulovat odpověď v rámci stresu ER, ale zůstává zatím neobjasněn.

V $\alpha\beta$ T lymfocytech s deficitem L22 byla zaznamenána vyšší aktivita PERK (Protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase), vyšší koncentrace p53 a pozastavená diference buněk

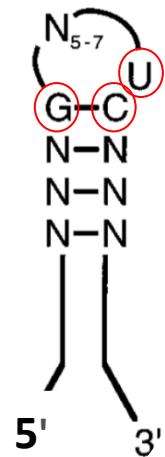
(Anderson et al., 2007; Solanki et al., 2016). PERK, IRE1 (Inositol-requiring kinase 1) nebo ATF6 (Activating transcription factor 6) jsou tři signalizační dráhy zahajující stresovou odpověď ER – UPR (Unfolded protein response). UPR je aktivována v důsledku intenzivní proliferace a syntézy proteinů při β -selekcí v $\alpha\beta$ T lymfocytech (β -selekcí je kontrolní bod, při němž jsou rozpoznány $\alpha\beta$ T lymfocyty, ve kterých došlo ke správnému přesmyku genů kódujících pre-TCR receptory (Klein et al., 2014)). Na základě aktivace UPR jsou syntetizovány chaperony, molekuly podílející se na proteasomální degradaci a molekuly inhibující syntézu nových proteinů, které obnoví homeostázu ER (Rozpědek et al., 2016). Po inhibici signální dráhy PERK dochází ke snížení koncentrace p53 a k obnově diferenciací Rpl22^{-/-} $\alpha\beta$ T lymfocytů (Solanki et al., 2016). V pokusu byly Rpl22^{+/+} buňky vystaveny uměle navozenému stresu thapsigarginem (Solanki et al., 2016). Thapsigargin je chemická látka známá jako inhibitor Ca²⁺ ATPázy v ER (Thastrup et al., 1989). Narušení funkce ATPázy vyvolá stres ER a aktivuje odpověď UPR v podobě spuštění signální dráhy PERK (Rozpědek et al., 2016). I v tomto případě byla vyšší aktivita PERK, vyšší hladina p53 a pozastavená diferenciací detekovatelná pouze u linie $\alpha\beta$ T lymfocytů. To vypovídá o tom, že k selektivní vyšší koncentraci p53 a inhibici diferenciací v $\alpha\beta$ T lymfocytech dochází na základě selektivního zesílení stresu ER pouze v $\alpha\beta$ T lymfocytech. V Rpl22^{-/-} buňkách vystavených thapsigarginu byla navíc zaznamenána vysoká účinnost translace. Po zvýšení hladiny L22 se účinnost syntézy proteinů snížila. L22 se pravděpodobně podílí na ustálení homeostázy ER prostřednictvím inhibice syntézy nových proteinů (Solanki et al., 2016).

4.3. L22 jako inhibitor sestřihu

Vazba proteinů L22 a L22-like protichůdně reguluje sestřih primárního transkriptu Smad2. L22 a L22-like se vážou na sekundární strukturu v podobě vlásenky v intronu 8 pre-mRNA Smad2. Vlášenska obsahuje tři esenciální nukleotidy, které jsou zásadní pro vazbu L22. Jedná se o nukleotidy GC-U (Zhang et al., 2017). Tato sekvence je nalézána i u dalších RNA, na které se L22 váže, jako EBER1 (Dobbelstein & Shenk, 1995). Obecná struktura vlásenky s vyznačenými nukleotidy je znázorněna na obrázku 6. Vazba obou RP L22 a L22-like na Smad2 je umožněna vysokou sekvenční homologií těchto RP. Vazba L22 na vlášensku pre-mRNA Smad2 způsobí přeskočení exonu 9, který následuje intron 8 s navázaným L22 (buňky embrya *Dania pruhovaného*). L22 při vazbě pre-mRNA Smad2 interaguje s hnRNP1-A1 (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1). Jedná se o RNA vazebnou molekulu hrající roli v metabolismu

mRNA (Geuens et al., 2016), která usnadňuje navigaci L22 k místu alternativního sestřihu. hnRNP-A1 rozeznává úsek bohatý na G obsažený v exonech, které nejsou zahrnuty v sestřižené mRNA. Výsledkem kooperace L22-hnRNP1-A1 je špatně sestřižená mRNA Smad2, která je translatována do nestabilní formy proteinu Smad2. V buňkách myších embryí nebyla potvrzena interakce mezi L22 a hnRNP1-A1, ale přeskočení exonu 7 a 8 vazbou L22 na pre-mRNA Smad2 ano (buňky embrya myši). Naopak vazba L22-like na vlásenku intronu pre-mRNA Smad2 způsobí zahrnutí následujícího exonu a syntézu funkčního Smad 2 (Zhang et al., 2017).

Obrázek 6- Znárodnění vlásenky vyskytující se ve struktuře mRNA Smad2 a v EBER1. Červeně je zvýrazněn vzorec nukleotidů GC-U, které jsou esenciální pro vazbu L22. Obrázek byl převzat (Dobbelstein & Shen, 1995; Yong Zhang et al., 2017).



Protein Smad2 je nezbytnou komponentou signální dráhy Nodal/TGF- β . Mimo jiné se signalizace Nodal/TGF- β podílí na správném průběhu gastrulace a tvorby anterior-posteriorní osy (Schier & Shen, 2000). Vliv vazby proteinů L22 a L22-like na sestřih pre-mRNA Smad2 je pozorovatelný ve fázi gastrulace. V tomto vývojovém stádiu jsou detekovatelné vysoké hladiny L22 a L22-like v jádru, kde se vážou na pre-mRNA Smad2. Po ukončení gastrulace se hladina L22 a L22-like v jádru opět sníží (Zhang et al., 2017).

4.4. Vliv vazby L22 na EBER1

Virus Epstein-Baarové je herpetický DNA-virus původně izolovaný z buněk Burkittova lymfomu (Epstein et al., 1963). Napadení buněk tímto virem se vyznačuje lokalizací malé nekódující RNA EBER1 (Epstein-Barr virus-encoded RNA 1- EBER1) v nukleoplasmě společně s ribosomálním proteinem L22 (Howe & Steitz, 1986; Toczycki et al., 1994). Již dříve zmíněné RNA-vazebné sekvence L22 tvořené AK 80-84 a 88-93 jsou obě zodpovědné za vazbu EBER1 (Houmani & Ruf, 2009). EBER1 obsahuje až tři vazebná místa pro L22, která tvoří sekundární strukturu vlásenky (obrázek 6)(Fok et al., 2006). L22 se po vazbě na exprimovaný EBER1 translokuje nevratně z jádérka do nukleoplazmy (Houmani et al., 2009). Roli L22 ve spojení s EBER1 není plně porozuměno, ale zdá se, že tato interakce přispívá ke zvýšení produkce viru a k větší proliferaci u buněk Burkittova lymfomu (Houmani et al., 2009).

5. Extraribosomální funkce S3

Lidský ribosomální protein S3 (hS3), součást 40S, tvoří esenciální složku ribosomu. Jeho primární struktura je tvořena 243 AK, sekvence hS3 je znázorněna na obrázku 7. Homology tohoto proteinu se nacházejí jak u bakterií a archeí, tak u nižších eukaryot. V rámci rodiny S3 je konzervována zejména středová sekvence proteinu, kterou obklopují variabilní N-terminální a C-terminální konce. Jedná se homologní doménu KH, která je složena přibližně z 70 AK. Tato doména má díky obsahu bazických AK vysokou afinitu k nukleovým kyselinám. Protein S3 dále obsahuje sekvenci NLS na N- konci (Wan et al., 2007). S3 se uplatňuje především v iniciačním kroku translace (Graifer et al., 2014). Lokalizace S3 v rámci 40S umožňuje proteinu podílet se na formování vstupního místa ribosomu pro translatovanou mRNA (Molotkov et al., 2006; Passmore et al., 2007). Extraribosomální funkce S3 jsou zprostředkovány hlavně interakcí tohoto RP s jiným proteinem.

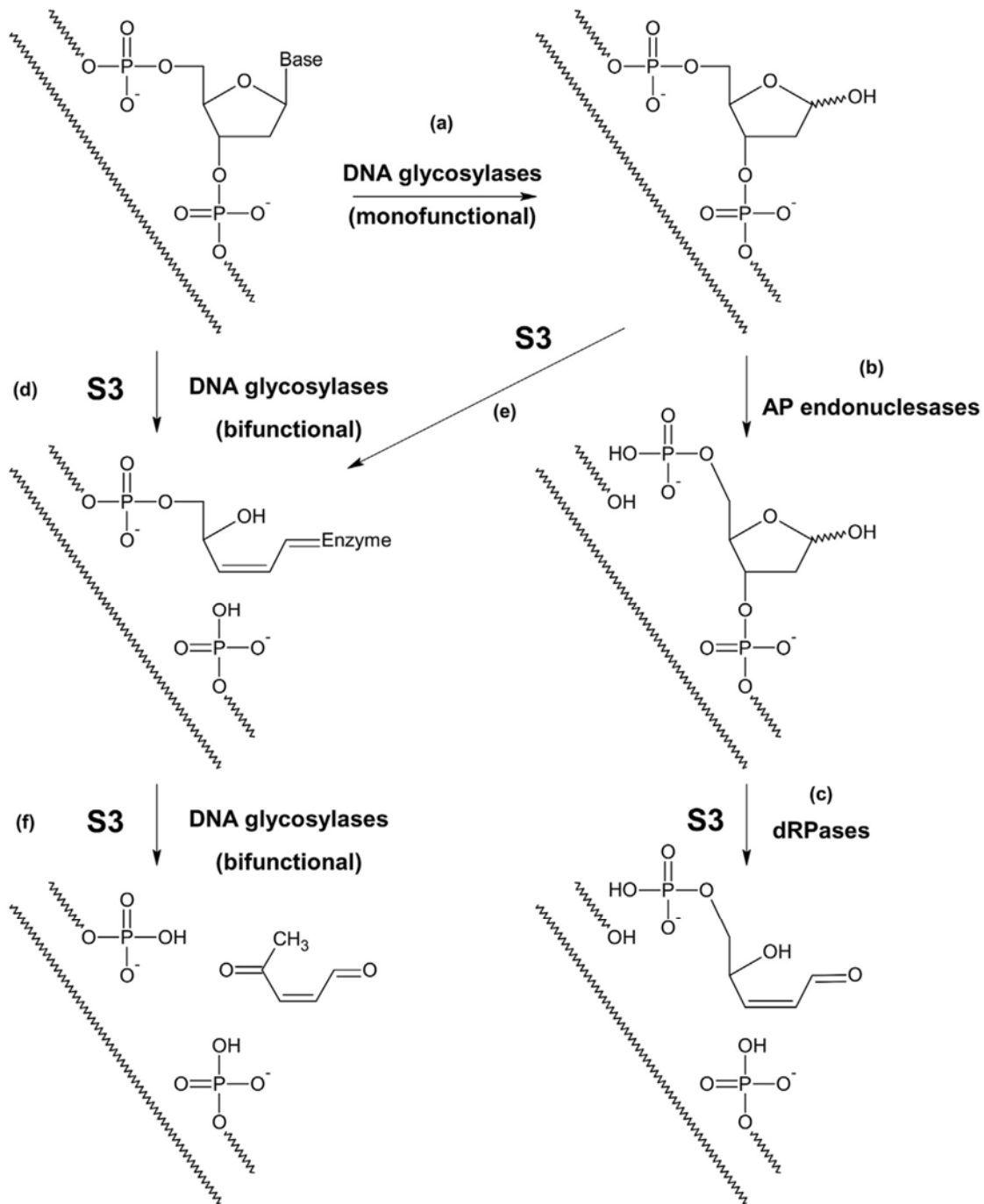
MAVQISKKRK FVADGIFKAE LNEFLTRELA EDGYSGVEVR VTPTRTEIII LATRTQNVLG EKGRRIRELT
AVVQKRFGFP EGSVELYAEK VATRGLCAIA QAESLRYKLL GGLAVRRACY GVLRFIMESG
AKGCEVVVSG KLRGQRAKSM KFVDGLMIHS GDPVNYVDT AVRHVLLRQG VLGIKVKIML
PWDPTGKIGP KKPLPDHVS I VEPKDEILPT TPISQKGGK PEPPAMPQPV PTA

Obrázek 7- Sekvence lidského proteinu hS3. Žlutě je vyznačena předpokládaná sekvence NLS; zelená barva označuje doménu KH; fialově jsou vyznačeny AK Tyr42 a Ser209, jejich fosforylace je esenciální pro translokaci hS3 do jádra. Sekvence S3 byla převzata z databáze UniProt (accession no.: **P23396**)

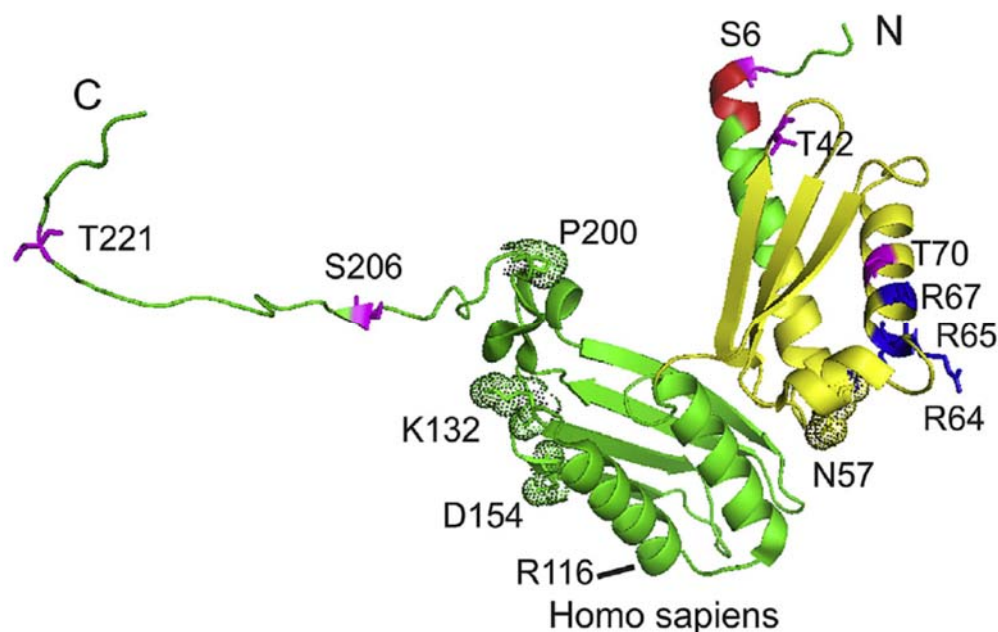
5.1. Role S3 v mechanismu opravy vystřižením báze

Extraribosomální aktivita proteinu S3 v lidských buňkách (hS3) byla popsána v oblasti oprav poškozené DNA (J. Kim et al., 1995). Poškozená DNA v buňce je opravena na základě druhu a rozsahu poškození. Poškození jako je dimerizace bází, které naruší konformaci DNA šroubovice, je opraveno systémem oprav vystřižením nukleotidů (nucleotide excision repair – NER). Komplexy enzymů odstraní rozsáhlejší jednovláknový úsek DNA obsahující dimer bází. Vzniklá mezera je doplněna polymerázou o nové nukleotidy a následně ligována. Oprava jednonukleotidového poškození, které nenaruší konformaci DNA, je zajištěna systémem oprav vystřižením báze (base excision repair – BER) (Krokan & Bjørås, 2013). ROS (reactive oxygen species), které vznikají jako vedlejší produkt metabolických reakcí, narušují díky své reaktivitě stabilitu a funkci molekul (Y.-J. Kim & M. Wilson III, 2011). Jedním z produktů oxidace prostřednictvím ROS je 8-oxoguanin (8-oxoG). Tento purin může být párován s adeninem, což

neodpovídá párování bází podle Hoogsteena (Krokan & Bjørås, 2013). Mechanismus BER se podílí na opravě tohoto modifikovaného nukleotidu. DNA-glykosyláza váže a ohýbá DNA tak, aby došlo ke změně konformace nukleotidu s poškozenou bází a k natočení této báze do aktivního centra DNA-glykosylázy (Y.-J. Kim & M. Wilson III, 2011). Monofunkční DNA-glykosylázy hydrolyticky přeruší vazbu mezi bází a cukrem kostry DNA (obrázek 8- reakce a). Odštěpením báze vzniká apurinické/apyrimidinické (AP) místo. AP-endonukleáza hydrolyzuje fosfodiesterovou vazbu na 5' konci místa AP (obrázek 8- reakce b). Zbývající deoxyribóza-5'-fosfát je odštěpen aktivitou deoxyribóza-5'-fosfát-lyázy, která je u člověka součástí polymerázy β (obrázek 8- reakce c). Vzniklou mezeru doplní polymeráza β o nový nepoškozený nukleotid. V buňce se vyskytují i glykosylázy s bifunkční aktivitou. 8-oxoguanin-DNA-glykosyláza (hOGG1) je příkladem bifunkční DNA-glykosylázy, která v jádře katalyzuje opravu míst s 8-oxoG (Y.-J. Kim & M. Wilson III, 2011; Krokan & Bjørås, 2013). Tento enzym odštěpí modifikovanou bázi a katalyzuje β eliminační reakci či sled dvou eliminačních reakcí (β , δ) výsledkem kterých je přerušení fosfodiesterových vazeb kostry DNA (obrázek 8- reakce d, f). Blokující skupiny na 3' konci musejí být následně odstraněny enzymy APE1 (Apurinic/apyrimidinicendonuclease 1) nebo PNKP (Polynucleotidekinase-phosphatase), které připraví vhodný substrát DNA s -OH skupinou na 3' konci zlomu, tak aby mohlo být poškození opraveno polymerázou. BER je ukončen ligací DNA (Y.-J. Kim & M. Wilson III, 2011)(Graifer et al., 2014).



Obrázek 8- Znárodnění opravy poškozené DNA, která je katalyzována monofunkční DNA-gykosylázou (a); bifunkční DNA-glykosylázou katalyzující β , δ eliminační reakci (d,f)- obrázek (d) znázorňuje Schiffovu bázi protein-DNA; AP-endonukleázou (b); β polymerázou (c) (Graifer et al., 2014).



Obrázek 9 – Znázornění lidského proteinu hS3. Žlutá barva značí KH-doménu, červenou barvou je značen NLS; fialově jsou označeny AK, které mohou být fosforylované – pro translokaci hS3 do jádra je významná fosforylace Tyr42; Asn57 v hS3 odpovídá Gln59 v dS3, absence Gln u hS3 je důvodem toho, že hS3 postrádá aktivitu bifunkční glykosylázy; vyznačený Lys132 je esenciální pro vazbu hS3 na 8-oxoG. Obrázek byl převzat z (Graifer et al., 2014).

Ribosomální protein hS3 má aktivitu lyázy a podílí se na mechanismu BER. Předpokládá se, že hS3 katalyzuje β -eliminální reakci, při které se na nukleotidu AP rozštěpí fosfodiesterová vazba mezi 3'C deoxyribózy a fosfátem (obrázek 8- reakce e, c) (J. Kim et al., 1995). hS3 má vysokou afinitou k nukleotidům AP (J. Kim et al., 1995) a pro jeho funkci v opravě DNA je nutný transport tohoto proteinu do jádra. Experimentálně byla prokázána změna lokalizace hS3 z cytoplazmy do jádra po vystavení buněk peroxidu vodíku. Translokace hS3 nastává po fosforylaci jeho AK Tyr42 (obrázek 9) prostřednictvím aktivované kinázy ERK1/2 (Extracellular signal-regulated kinase) (Yadavilli et al., 2007). Opravná aktivita hS3 se projevuje i v mitochondriích (Y. J. Kim et al., 2013). hS3 interaguje s Hsp70 (Heat shock protein 70) a lokalizuje do vnitřní membrány mitochondrie po zvýšení koncentrace ROS či činidel inhibujících oxidativní fosforylaci jako je rotenon. Translokuje do mitochondrie pomocí interakce své N-koncové domény s cytoplasmatickou doménou Tom70 (Translocase of the outer membrane) (Y. J. Kim et al., 2013).

hS3 váže nukleotidy obsahující 8-oxoG (Hegde et al., 2004a). Pro vznik vazby mezi hS3 a 8-oxoG je esenciální Lys132 hS3 (obrázek 8) (Hegde et al., 2006). Afinita hS3 k 8-oxoG je vyšší

než afinita hOGG1, i přesto, že hS3 na rozdíl od hOGG1 postrádá aktivitu glykosylázy (Hegde et al., 2001)(Hegde et al., 2004a). V experimentu byl hS3 inkubován s DNA obsahující 8-oxoG přednostně před přidáním hOGG1. Štěpení glykosidické vazby mezi bází a cukrem po přidání hOGG1 nebylo účinné. Důvodem byla sterická zábrana způsobená navázaným hS3 na 8-oxoG (Hegde et al., 2004b). hS3 má ovšem schopnost interagovat s hOGG1. Tato interakce posílí enzymatickou aktivitu hOGG1. Zdá se tedy, že pro účinné přerušení glykosidické vazby je tedy nezbytná interakce hS3 a hOGG1 před interakcí hS3 s 8-oxoG (Hegde et al., 2004b).

Zajímavá odlišnost byla objevena v případě proteinu S3 u octomilky (dS3). dS3 má vlastnosti bifunkční glykosylázy (obrázek 8- reakce d, f). Štěpí glykosidickou vazbu mezi bází a cukrem a mechanismem β -eliminační reakce přeruší vazbu mezi 3'C deoxyribózy a fosfátem. dS3 je na rozdíl od lidského ortologu také schopen katalyzovat δ -eliminační reakci, jejímž výsledkem je mezera v kostře DNA tvořená odstraněním nukleotidu (J. Kim et al., 1995; Wilson et al., 1993). Důvodem rozdílné katalytické aktivity proteinů dS3 a hS3 je AK Gln59 obsažená v dS3, která je v hS3 nahrazena Asn (obrázek 9) (Hegde et al., 2001).

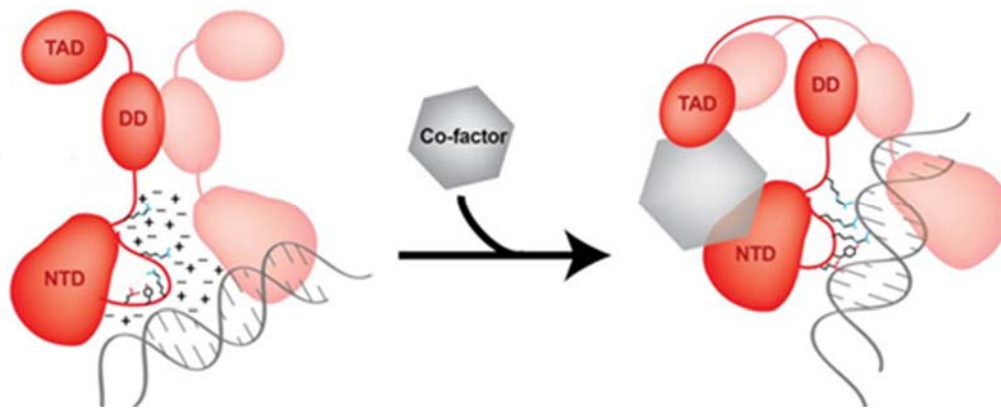
Endonukleázová aktivita hS3 je pozorovatelná při opravě cyklobutanových pyrimidinových dimerů v buňkách vystavených UV záření (Kim et al., 1995). hS3 může ovlivnit expresi matrixové metaloproteinázy-1 (MMP1) (Yang et al., 2019). MMP1 významně podporuje degradaci kolagenu v buňkách vystavených UV záření (Dong et al., 2008). Zvýšenou syntézou úseku 144-189 AK hS3, zodpovědného za endonukleázovou aktivitu, byla v buňkách vystavených UV záření výrazně snížena exprese MMP1. hS3 působí proti degradaci kolagenu, nicméně přesný molekulární mechanismus nebyl zatím objasněn (Yang et al., 2019).

5.2. S3 v regulaci transkripce

S3 je součástí signální dráhy transkripčních faktorů NF- κ B (Nuclear Factor-kappa B). Aktivace dráhy NF- κ B souvisí s imunitní odpovědí a odpovědí buněk na vystavení stresu. Komplexy NF- κ B jsou vytvářeny homo- nebo heterodimery složenými z transkripčních faktorů obsahujících DNA-vazebnou doménu (RHD – Rel homology domain; p50, p52, p65, RelB nebo c-Rel) a případně RHD a inhibiční doménu (p105, p100). Komplexy mohou být komplementovány dalšími molekulami. Variabilita kompozice komplexu NF- κ B umožňuje velmi specifickou regulaci aktivity genů. Většina komplexů NF- κ B je v nestimulovaných buňkách lokalizována v cytoplazmě ve své neaktivní formě. Komplexy jsou blokovány asociací

s inhibitory, proteiny I κ B, které stíní NLS dimerů NF- κ B. Po stimulaci receptorů spřažených s dráhou NF- κ B dochází k aktivaci kinázy I κ B (IKK), která sestává z jedné regulační a dvou kinázových podjednotek. IKK fosforyluje I κ B, který je následně ubiquitinován a degradován v proteasomu. NF- κ B s odhaleným NLS tak může translokovat do jádra, kde se specificky váže na úseky κ B v oblastech enhancerů cílových genů (Mulero et al., 2019; Pires et al., 2018).

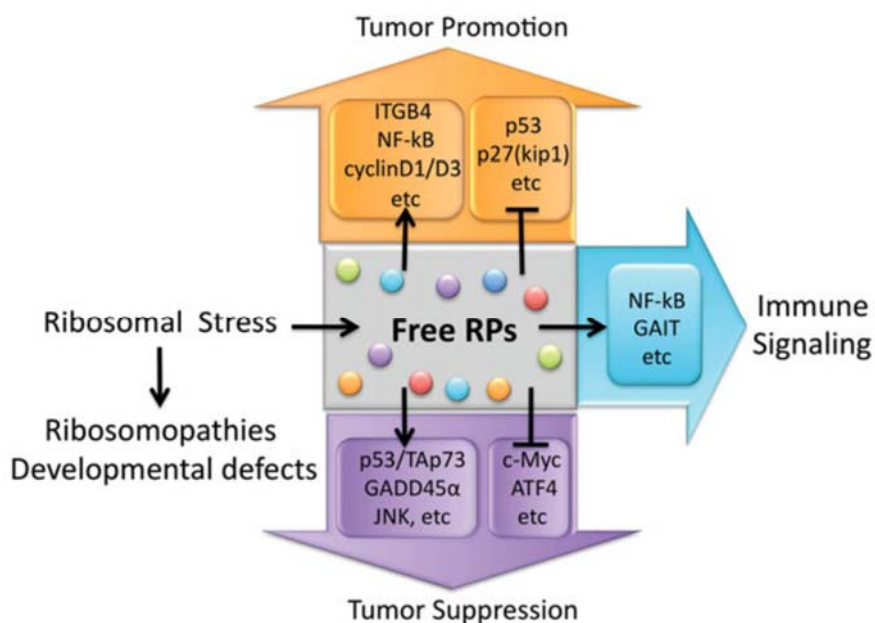
S3 zvyšuje selektivitu komplexu NF- κ B tak, že funguje jako jeho koaktivátor. Vazba S3 může měnit konformaci či vzájemné uspořádání podjednotek komplexu. Přítomnost S3 v komplexu může stínit působení iontů z roztoku a tím zvyšovat afinitu RHD k DNA (obrázek 10) (Mulero et al., 2019). Za klidových podmínek je S3 v cytoplazmě vázán prostřednictvím inhibičního I κ B- α na p65 (Stanborough et al., 2014). Po stimulaci buněčných receptorů a následné degradaci I κ B- α disociují molekuly p65 a S3 a nezávisle na sobě jsou translokovány do jádra. Nezávislá translokace S3 a p65 poukazuje na fakt, že S3 není esenciální pro přemístění komplexu NF- κ B do jádra (Wan et al., 2007). Translokace S3 do jádra vyžaduje fosforylaci jeho C- koncové AK Ser209 (na obrázku 7 vyznačen fialově) prostřednictvím IKK β . Transport S3 do jádra je zajištěn importinem α , který rozpoznává NLS S3 (na obrázku 7 vyznačen žlutě) (Wan et al., 2011). Prostřednictvím přechodné vazby domény KH proteinu S3 (na obrázku 7 vyznačena zeleně) na N- koncovou doménu p65 se v jádře stává S3 součástí transkripčně aktivního komplexu p65-p65-S3. S3 také asociuje s heterodimerem p65-p50, zřejmě opět vazbou na p65 (Wan et al., 2007). Tyto komplexy NF- κ B se vážou na regulační oblasti cílových genů prostřednictvím RHD. S3 tak nepřímo aktivuje transkripci cílových genů. Mezi geny, jejichž transkripce je závislá na aktivaci NF- κ B s navázaným S3 patří například gen pro interleukiny IL-2 a IL-8 nebo také gen pro inhibitor I κ B - α (Wan et al., 2007).



Obrázek 10- Hypotetický model funkce koaktivátoru při vazbě homodimeru p65-p65 na DNA. Odstíny červené jsou označeny podjednotky homodimeru p65-p65 (TAD – trans-aktivační doména, DD – dimerizační doména, NTD – koncová N doména); šedě je označen koaktivátor. Obrázek byl převzat z (Mulero et al., 2019).

NF- κ B se podílí na regulaci exprese genů vyvolávajících imunitní odpověď (Wan et al., 2007) a je proto cílem mnoha patogenů. Genom *E. coli* O157:H7 obsahuje oblasti nazývané ostrovy patogenity, které jsou konzervovány mezi enteropatogeny. V těchto oblastech jsou kódovány proteiny, které jsou sekretovány do buněk hostitele. Mezi tyto proteiny patří kinázy NleH1 a NleH2, které vyvazují S3 v napadených buňkách (nezávisle na kinázové aktivitě) a tím tlumí aktivaci signálního systému NF- κ B. NleH regulují aktivitu komplexů NF- κ B obsahujících p65 i p50 proteiny prostřednictvím vazby NleH1 a NleH2 na S3. Důsledek vazby efektorových proteinů na S3 je odlišný, přesto, že primární struktury NleH1 a NleH2 jsou identické z 84 % (Gao et al., 2009). Vazba NleH1 na S3 interferuje s fosforylací Ser209 S3 proteinu, který tak nemůže translokovat do jádra (Wan et al., 2011). Hromadí se proto v cytoplazmě, v důsledku čehož je inhibována signalizace NF- κ B. Vliv vazby NleH2 na S3 nebyl plně objasněn. Zdá se ovšem, že i další molekuly mohou hrát roli v regulaci S3 pomocí NleH2 (Gao et al., 2009).

6. Závěrečná diskuse



Obrázek 11 – Funkce ribosomálních proteinů uvolněných z ribosomů při ribosomálním stresu (jadérovém stresu). Ribosomální proteiny mohou fungovat v signalizaci projevující se jak v podpoře růstu nádorů (oranžová šipka; indukce a aktivace **ITGB4** - Integrin Subunit Beta 4, **NF-κB** a **cyklinu D1/D3**; inhibice **p53** a **p27** - Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B), tak v potlačení růstu nádorů (fialová šipka; aktivace nebo stabilizace **p53**, **TAp73** - tumor protein p73, **GADD45α** - Growth arrest and DNA damage inducible alpha, **JNK** - C-Jun N-terminal kinase; inhibice nebo inaktivace **c-Myc** a **ATF4**), nebo v imunitní odpovědi (modrá šipka; aktivace a tvorba **NF-κB** a **GAIT**). Poruchy spojené s mutací/deleci v genech ribosomálních proteinů se mohou projevit jako různé choroby, včetně ribosomopatií. Obrázek a informace v legendě byly převzaty z práce Zhou a spolupracovníků (Zhou et al., 2015).

Extraribosomální funkce RP se projevují v řadě oblastí buněčných regulací, od regulace funkce proteinu až po regulaci transkripce, sestřihu nebo translace. Podstatou mechanismů, kterými RP působí mimo ribosom, je vazba RP na jiný protein, RNA, DNA, komplex protein-RNA nebo komplex protein-DNA. Příklad vazby RP na jiný protein lze ilustrovat na S3 jakožto součásti NF-κB, který je vázaný IκB (Gao et al., 2009). Tato vazba způsobí blokaci NLS, a tudíž blokaci translokace transkripčního faktoru v závislosti na působení signálu. Důsledek vazby RP na RNA může být různý v závislosti na typu RNA. Vazba se projeví v post-transkripční regulaci genové exprese. Názorným příkladem je vazba L22 na vlásenku pre-mRNA a následná blokáce sestřihu (Zhang et al., 2017), či vazba L22 na mRNA, která může ovlivnit translaci (O’Leary et al., 2013;

Solanki et al., 2016; Zhang et al., 2013). Příklad vazby RP na komplex protein-RNA se dá demonstrovat na L13a v rámci komplexu GAIT, který vazbou na mRNA inhibuje translaci (P. Sampath et al., 2003). Vazba RP na komplex protein-DNA, jako je opět příklad vazby S3 na NF- κ B - DNA (Wan et al., 2007), může zvýšit afinitu DNA-vazebné domény pro DNA, protože stíní přístup iontů z roztoku a mění tak elektrostatické podmínky (Mulero et al., 2019). Vazba RP může mít nejen efekt regulační, ale i katalytický. Pokud je RP vyvázán do prostředí, může se podílet na reakci díky vlastní enzymatické aktivitě. Například S3 po vazbě na poškozená místa v DNA funguje jako lyáza (J. Kim et al., 1995). Kromě vlastní enzymatické aktivity S3 může potencovat enzymatickou aktivitu hOGG1 a zvyšovat tak její afinitu k místům AP (Hegde et al., 2004b). Aby mohly tyto RP působit extraribosomálně, musí existovat mechanismus, kterým je za určitých podmínek zajištěna jejich dostupnost v buňce. V odpověď na jadérový stres vyvolaný nejrůznějšími podněty (UV záření, γ záření, porucha v syntéze RP, rRNA, pomocných faktorů biogeneze, mutace proteinů zapojených v biogenezi ribosomu a import/export RP nebo podjednotek ribosomu) dochází k inhibici signalizace mTOR (Mammalian target of rapamycin) zodpovědné za stimulaci translace a biogeneze ribosomu. Výsledkem inhibice mTOR je zastavení inkorporace RP do ribosomů a následný nárůstu volných RP (Pfister, 2019). RP mohou být také za určitých podmínek uvolněny z vazby na ribosom, jak je tomu například u L13a. Ten je po vazbě IFN- γ na receptor fosforylován a vyvázán z ribosomálního komplexu (Mukhopadhyay et al., 2008; Wan et al., 2007). Ke kumulaci volných RP tedy dochází nespecificky nebo specificky. Efekty RP na úrovni buněčných procesů jako je transkripce či translace mohou mít komplexní projevy v průběhu ontogenze, při vzniku nádorů, nebo mohou naopak působit při jejich potlačení (Zhou et al., 2015). Tyto efekty zprostředkované RP se mohou projevovat ve specifických buněčných typech, přesto, že RP jsou komponenty přítomné ve všech buňkách. Vhodnou ilustrací je role L22 v rámci modulace stresové odpovědi ER specificky ve vývoji linie $\alpha\beta$ T lymfocytů (Solanki et al., 2016; Anderson et al., 2007). Detailní mechanismus toho, proč je efekt L22 přísně specifický, není dosud objasněn. Významným podílem projevů vyvolaných jadérovým stresem je efekt vazby RP na systém p53-Mdm2, který je zodpovědný za regulaci průchodu buněčným cyklem v odpověď na stres. Řada RP byla nalezena v interakcích se systémem p53-Mdm2 včetně proteinů S7, L5, L11, L22, L23 a L26 (Cao et al., 2017; D. Chen et al., 2007; Dai et al., 2004; Marechal et al., 1994; Takagi et al., 2005). Tyto RP jsou po vazbě Mdm2 nebo mRNA p53 zodpovědné za stabilizaci nebo syntézu tumorsupresoru p53. Vazba ribosomálního proteinu S13 na mRNA genu pro tumorový

supresor p27 může naopak vyvolat inhibici jeho funkce v potlačení růstu nádorů a projevit se tak v tumorigenezi (Guo et al., 2011).

Detailní poznání extraribosomálních funkcí je důležité pro pochopení toho, jak souvisí regulace růstu a translace s ochrannými mechanismy při působení různých typů stresů, které jsou klíčové ve všech mnohobuněčných organismech. To je významné i pro porozumění procesům vzniku nádorů.