



Katarzyna Rolle

**Badanie struktury niekodujących RNA
na przykładzie DsrA RNA *Escherichia coli***

Poznań 2006

BIBLIOTEKA
INSTYTUTU CHEMII BIOORGANICZNEJ
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
ul. Noskowskiego 12/14
61-704 POZNAŃ

D-148

Wszystkim, którzy przyczynili się do powstania tej pracy

serdecznie dziękuję

Pani Prof. dr hab. Mirosławie Z. Barciszewskiej składam podziękowania za opiekę naukową,
cenne rady udzielane podczas przygotowania niniejszej pracy oraz okazaną życzliwość

Panu Prof. dr hab. Janowi Barciszewskiemu dziękuję za nieustanny doping naukowy oraz
niezwykle stymulujące rozmowy

Pani Dr Elizie Wyszko dziękuję za nieustającą i wszechstronną pomoc, na którą zawsze
mogłam liczyć, przekazaną wiedzę i ogromną życzliwość

Panu Prof. dr hab. Ryszardowi Kierzkowi oraz mgr Annie Ciesielskiej dziękuję za możliwość
wykonania badań termodynamicznych oraz okazaną pomoc

Współpracownikom:

Agnieszce Fedoruk - Wyszomirskiej

Małgorzacie Giel - Pietraszuk

Iwonie Gawrońskiej

Mirosławie Jura

Monice Nowak

Elżbiecie Wieczorek

Maciejowi Szymańskiemu

Markowi Żywickiemu

za miłą atmosferę oraz okazaną pomoc

Szymonowi i całej naszej rodzinie za nieustające wsparcie i wiarę we mnie...

Wieloletnia, stabilna praca w tej samej firmie

Wieloletnia praca

Wieloletnia, stabilna praca w tej samej firmie

Wieloletnia, stabilna praca w tej samej firmie

Wieloletnia, stabilna praca w tej samej firmie

Wieloletnia, stabilna praca w tej samej firmie

Wieloletnia praca

Wieloletnia praca

Wieloletnia praca

Wieloletnia praca

Wieloletnia praca

Wieloletnia praca

Wieloletnia praca

Wieloletnia praca

Wieloletnia praca

Wieloletnia praca

Wieloletnia praca

1. WSTĘP I CEL PRACY	3
1.1. CEL PRACY	5
WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY	7
2. OPRACOWANIE LITERATUROWE.....	9
UDZIAŁ ncrRNA W KOMÓRKOWYCH PROCESACH REGULACYJNYCH	9
2.1. Funkcje regulatorowych RNA.....	12
2.2. Bakteryjne RNA	19
2.3. Regulacja poziomu ncRNA	26
2.4. Białko Hfq	29
2.5. Struktury ncRNA	34
2.6. Poszukiwanie genów dla ncRNA	35
3. WYNIKI BADAŃ WŁASNYCH I Dyskusja.....	38
3.1. Analiza komputerowa.....	41
3.2. Analiza struktury DsrA RNA za pomocą specyficznych rybonukleaz	46
3.3. Hydroliza RNazą H	50
3.4. Hydroliza DsrA RNA za pomocą deoksyrybozymów	52
3.5. Otrzymywanie kompleksów DsrA RNA i białka Hfq.....	54
3.5.1. Ekspresja i oczyszczanie białka Hfq	54
3.5.2. Topografia kompleksów DsrA RNA z białkiem Hfq.....	56
3.5.3. Analiza kompleksów DsrA RNA - Hfq przy pomocy rodnika hydroksylowego... 57	
3.5.4. Analiza kompleksów DsrA RNA – Hfq metodą hydrolizy indukowanej jonami ołowiu	59
3.6. Badanie kompleksów DsrA RNA z kinetyną, 8-oxo-dG, adeniną i guaniną	62
3.6.1. Analiza kompleksu DsrA RNA z 8-oxo-dG.....	63
3.6.2. Analiza kompleksu DsrA RNA z kinetyną	65
3.6.3. Analiza kompleksu DsrA RNA – Hfq w obecności kinetyny	68
3.6.4. Analiza kompleksów DsrA RNA z adeniną i guaniną	69
3.6.5. Analiza termodynamiczna kompleksów.....	69
4. PODSUMOWANIE.....	76
5. MATERIAŁY I METODY	77
5.1 Wykaz ważniejszych materiałów stosowanych w pracy	77
5.1.1 Odczynniki	77
5.1.2. Szczepy <i>E. coli</i>	78
5.1.3. Pożywki i bufony	78
5.2. Metody rozdzielania i analizy kwasów nukleinowych oraz białka.....	80
5.2.1. Elektroforetyczny rozdział RNA w denaturujących żelach poliakryloamidowych	80

.....	1. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1. OPRACOWANIE	1
.....	1.1.1. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.2. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.3. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.4. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.5. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.6. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.7. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.8. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.9. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.10. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.11. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.12. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.13. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.14. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.15. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.16. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.17. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.18. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.19. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.20. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.21. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.22. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.23. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.24. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.25. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.26. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.27. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.28. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.29. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.30. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.31. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.32. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.33. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.34. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.35. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.36. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.37. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.38. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.39. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.40. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.41. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.42. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.43. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.44. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.45. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.46. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.47. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.48. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.49. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.50. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.51. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.52. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.53. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.54. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.55. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.56. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.57. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.58. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.59. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.60. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.61. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.62. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.63. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.64. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.65. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.66. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.67. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.68. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.69. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.70. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.71. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.72. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.73. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.74. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.75. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.76. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.77. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.78. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.79. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.80. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.81. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.82. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.83. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.84. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.85. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.86. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.87. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.88. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.89. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.90. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.91. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.92. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.93. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.94. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.95. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.96. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.97. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.98. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.99. WYKAZ PRAC	1
.....	1.1.100. WYKAZ PRAC	1

5.2.2. Elektroforetyczny rozdział białek w żelu poliakrylamidowym z SDS.....	80
5.2.3. Elektroforetyczny rozdział kompleksów RNA- białko w żelach agarozowych.....	81
5.2.4. Identyfikacja białek w żelach i roztworze	81
5.2.5. Identyfikacja RNA w żelach	81
5.3. Transformacja komórek kompetentnych <i>E. coli</i>	82
5.3.1. Przygotowanie komórek kompetentnych <i>E. coli</i>	82
5.3.2. Przygotowanie konstruktów z sekwencją DsrA RNA.....	82
5.3.3. Transformacja bakterii plazmidowym DNA	83
5.4. Transkrypcja <i>in vitro</i> DsrA RNA	83
5.5. Znakowanie DsrA RNA przy końcu 5' i 3'	83
5.6. Nadprodukcja i oczyszczanie białka Hfq <i>in vitro</i>	84
5.6.1. Ekspresja białka w komórkach <i>E.coli</i>	84
5.6.2. Oczyszczanie białka metodą chromatografii powinowactwa.....	84
5.7. Hydroliza enzymatyczna DsrA RNA	85
5.7.1. Analiza struktury DsrA RNA z wykorzystaniem RNazy H.....	85
5.7.2. Hydroliza z użyciem dezoksyrybozymów	86
5.8 Tworzenie i analiza kompleksu DsrA RNA z białkiem Hfq	86
5.8.1. Analiza kompleksów DsrA RNA-białko Hfq z wykorzystaniem rodnika hydroksylowego	87
5.8.2. Hydroliza indukowana jonami ołowiu	87
5.9. Analiza termodynamiczna kompleksów DsrA RNA z kinetyną, 8-oxo-dG, adeniną, guaniną	87
5.9.1. Tworzenie kompleksów DsrA RNA z kinetyną, 8-oxo-dG, adeniną, guaniną	87
5.9.2. Analiza termodynamiczna kompleksów	88
5.9.3. Tworzenie kompleksu DsrA RNA z białkiem Hfq w obecności kinetyny jako kompetytora	88
5.10. Przewidywanie struktury drugorzędowej RNA przy pomocy metod bioinformatycznych	89
6. LITERATURA.....	90

1. WSTĘP I CEL PRACY

Dotychczasowy model molekularnej organizacji systemów żywych opierał się na tzw. „centralnym dogmacie biologii molekularnej” zaproponowanym przez Francisca H. C. Cricka w 1958 roku. Zakłada on, że informacja genetyczna zakodowana w DNA przepływa do RNA, a następnie ulega translacji na rybosomach z pomocą adaptorowych cząsteczek RNA (tRNA). Efektem tych procesów są białka, które miałyby pełnić w komórce wszystkie funkcje enzymatyczne i strukturalne. W tym modelu geny przedstawiono jako fragmenty kodujące białka zgodnie z prostą zasadą „jeden gen - jedno białko”. Później okazało się, że oprócz fragmentów kodujących białko (ekzonów), mogą one zawierać również fragmenty, które nie podlegają translacji (intronów), a są usuwane z pierwotnych transkryptów podczas składania genów (ang. *splicing*). W wielu przypadkach w wyniku alternatywnego składania powstają różnorodne warianty danego białka pochodzące z tej samej jednostki transkrypcyjnej.

Na początku lat 80-tych ubiegłego stulecia pokazano, że komórkowe RNA pełnią znacznie bardziej zróżnicowane funkcje, daleko wykraczające poza ich udział w procesie biosyntezy białka. Wykazano, że rybonukleaza P oraz introny grupy III (tzw. samoskładające się) uczestniczą w dojrzewaniu RNA, nie wymagając przy tym obecności białka. Szybko okazało się, że RNA mogą pełnić różnorodne funkcje katalityczne oraz regulatorowe.

Wielkim przełomem w poznaniu świata RNA stało się sekwencjonowanie genomu człowieka - dało ono początek nowej erze w biologii molekularnej. Nie tylko sekwencja DNA, ale również część epigenetyczna, jest niezbędnym czynnikiem tworzącym architekturę genomu i uczestniczącym w procesach dekodowania informacji genetycznej. Zrozumienie genomu wymaga więc również szczegółowej wiedzy na temat mechanizmów regulatorowych kontrolujących przestrzenną i czasową ekspresję genów.

Większość funkcji RNA związana jest z ich strukturą. Wiele obecnych modeli opisujących syntezę mRNA, jego dojrzewanie, translację, degradację, oddziaływanie wirusowego RNA z tRNA^{Lys3}, tRNA^{Pro} czy niektórych regulatorowych RNA z określonymi białkami zakłada kluczową rolę swoistej struktury RNA. Zrozumienie różnorodności cząsteczek RNA oraz umiejętności manipulowania ich funkcjami będą możliwe tylko wtedy, kiedy zdobędziemy wystarczająco dużo informacji o właściwościach strukturalnych danej cząsteczki. Dotychczasowa wiedza wskazuje, że regulatorowe RNA mogą realizować swoje funkcje albo poprzez krótkie fragmenty komplementarne względem docelowych mRNA albo też poprzez stabilne małe cząsteczki (aptamery). Chociaż oddziaływanie komplementarnych odcinków RNA nie zawsze jest w pełni precyzyjne, pozwala jednak na

zablokowanie miejsca wiązania rybosomu i ograniczenie translacji. Wiele dowodów przemawia również za tym, że poziom RNA regulujących ekspresję danych genów zależy od warunków środowiska.

Jednym z najlepiej poznanych małych regulatorowych RNA jest DsrA RNA z *Escherichia coli*. Cząsteczka ta jest kluczowym elementem systemu uczestniczącego w odpowiedzi na stres temperaturowy i oddziałuje z dwoma docelowymi mRNA oraz ze specyficznym białkiem Hfq. Szczególne znaczenie dla funkcji DsrA RNA ma nie tylko sekwencja nukleotydowa, ale również jego struktura drugorzędowa. Poznanie elementów strukturalnych jest warunkiem do zrozumienia funkcjonowania tej cząsteczki oraz niezwykle cennym narzędziem w procesie poszukiwania nowych regulatorowych RNAw genomach bakteryjnych i eukariotycznych.

... ..

... ..

1.1. CEL PRACY

Celem moich badań było:

- poznanie i weryfikacja struktury drugorzędowej DsrA RNA
- analiza topografii kompleksu białkowo-nukleinowego Hfq/DsrA RNA
- określenie wpływu wybranych metabolitów komórkowych na strukturę drugorzędową DsrA RNA
- identyfikacja domen strukturalnych charakterystycznych dla bakteryjnych ncRNA

Zamierzone cele zostały zrealizowane w wyniku realizacji niniejszej pracy. Zaproponowałam nową strukturę DsrA RNA, która różni się w znaczący sposób od proponowanych dotychczas. Uzyskane wyniki stały się podstawą do opracowania deskryptora bakteryjnych ncRNA, który posłuży do poszukiwań nowych ncRNA w badaniach *in silico*.

Część zagadnień omawianych w niniejszej pracy zostało opublikowanych:

- **K.Bugała**, M.Żywicki, E.Wyszko, MZ.Barciszewska, J.Barciszewski
Ryboprzełączniki, *Postępy Biochem.* (2005), 51: 111-119
- **K.Rolle**, M.Żywicki, E.Wyszko, MZ.Barciszewska, J.Barciszewski
Evaluation of the dynamic structure of DsrA RNA from *E. coli* and its functional consequences, *J.Biochem.* (2006), 139: 431-438

Pozostałe wyniki po uzupełnieniu i rozszerzeniu zostaną opublikowane później.

Wykorzystując nabyte umiejętności w pracy z RNA, brałam również udział w projekcie mającym na celu wykorzystanie małych RNA w terapii guzów mózgu. Wyniki te zostały opublikowane:

- J. Pas, E.Wyszko, **K.Rolle**, L.Rychlewski, S.Nowak, R.Zukiel, J.Barciszewski
Analysis of the structure and function of tenascin-C, *Interantional Journal of Biochemistry and Cell Biology* (2006) 38: 1594-1602
- R.Żukiel, S.Nowak, E.Wyszko, **K.Rolle**, I.Gawrońska, M. Z. Barciszewska, J.Barciszewski

1.1. THE THEORY

... ..

- *
- *
- *
- *

... ..

... ..

... ..

- *
- *

... ..

... ..

- *
- *

Suppression of human brain tumor with interference RNA specific for tenascin-C, *Cancer Biology & Therapy* (2006) Vol. 5, Issue 8: e1-e6

- K.Drętkiewicz, E.Wyszko, **K.Rolle**, S.Nowak, R.Żukiel, J.Barciszewski
Tenascyna-C, *Na Pograniczu Chemii i Biologii*, tom XII, 2005
- R.Żukiel, S.Nowak, E.Wyszko, **K.Rolle**, R.Piesterzeniewicz,, J.Barciszewski
Bioterapia w glejakach mózgu, *Neuroskop* (2005), 7: 9-18
- K.Drętkiewicz, E.Wyszko, **K.Rolle**, S.Nowak, R.Żukiel, J.Barciszewski
Rola tenascyny-C w patogenezie, *Neuroskop* (2005), 7: 19-26

Dodatkowo, opublikowane zostały również wyniki badań dotyczących badania struktury liderowego RNA wirusa HIV1 oraz jej wpływu na inicjację odwrotnej transkrypcji, jak również jej oddziaływanie ze specyficznym tRNA^{Lys3}:

- H.Huthoff, **K.Bugała**, J.Barciszewski, B.Berkhout

On the importance of the Primer Activation Signal for initiation of tRNA^{Lys3}-primed reverse transcription of the HIV-1 RNA genome, *Nucleic Acids Res.* (2003), 17: 5186-5194

Department of Health and Human Services
Center for Disease Control and Prevention

1. *Journal of Infectious Diseases*, 1997, 175: 1111-1115

2. *Journal of Infectious Diseases*, 1997, 175: 1116-1120

3. *Journal of Infectious Diseases*, 1997, 175: 1121-1125

4. *Journal of Infectious Diseases*, 1997, 175: 1126-1130

5. *Journal of Infectious Diseases*, 1997, 175: 1131-1135

6. *Journal of Infectious Diseases*, 1997, 175: 1136-1140

7. *Journal of Infectious Diseases*, 1997, 175: 1141-1145

8. *Journal of Infectious Diseases*, 1997, 175: 1146-1150

9. *Journal of Infectious Diseases*, 1997, 175: 1151-1155

10. *Journal of Infectious Diseases*, 1997, 175: 1156-1160

11. *Journal of Infectious Diseases*, 1997, 175: 1161-1165

12. *Journal of Infectious Diseases*, 1997, 175: 1166-1170

WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY

- APS – nadsiarczan amonu
- ATP – 5' trifosforan adenozy
- bisakryloamid – N, N'-metylenobisakryloamid
- Ci – jednostka radioaktywności (1 Ci = 2.22×10^{12} d.p.m)
- Cpm – liczba cząsteczek β emitowanych w ciągu minuty
- DNAzym - deoksyrybozym
- DTE – ditioeritritol
- DTT – ditiotretiol
- EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy
- Fe[EDTA] – wersenian żelaza (II)
- Gln8 – glicyna w pozycji ósmej łańcucha aminokwasowego białka Hfq
- His-Tag – etykieta histydynowa
- IPTG – izopropyl- β -D-tiogalaktopiranozyd
- kDa – kilodaltony (1000 Da)
- miRNA – mikro RNA (ang. *microRNA*)
- ncRNA – niekodujące RNA (ang. *non-coding RNA*)
- Ni-NTA – aktywne jony niklu-kwas nitrylotrójoctowy
- nt – reszty nukleotydowe
- ORF- otwarta ramka odczytu (ang. *open reading frames*)
- 8-oxo-dG – 8-deoksyguanina
- [³²P]pCp – 3' 5' difosforan cytozyny
- PEG 8000 – glikol polietylenowy
- PNK – kinaza polinukleotydowa faga T4
- PMSF – sulfofluorek fenylometanu
- RBS – miejsce wiązania rybosomu (ang. *ribosome binding site*)
- RNaza – rybonukleaza
- RNAi – interferencyjny RNA (ang. *RNA interference*)
- rpm – obroty na minutę (ang. *rotation per minute*)
- SDS – sól sodowa siarczanu dodecyłu
- siRNA – małe interferencyjne RNA (ang. *small interfering RNA*)

TEMED – tetrametylenodiamina

Tris – hydroksymetyloaminometan

tRNALys3 - transferowy kwas rybonukleinowy specyficzny dla lizyny 3

tRNAPhe – transferowy kwas rybonukleinowy specyficzny dla fenyloalaniny

U – jednostka aktywności enzymatycznej

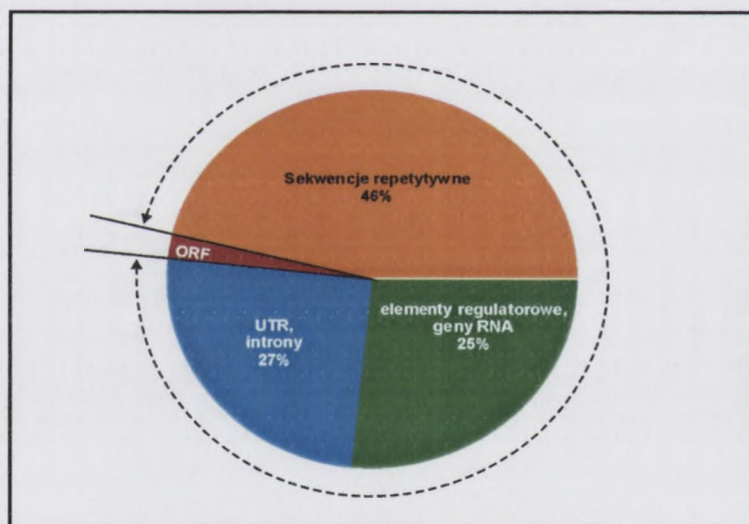
UTR – region nie podlegający translacji (ang. *untranslated region*)

WYOMING
TERRITORY
1842-1890
STATE OF WYOMING
1890-1900
U.S. DEPARTMENT OF THE INTERIOR
GEOLOGICAL SURVEY

2. OPRACOWANIE LITERATUROWE

Udział ncRNA w komórkowych procesach regulacyjnych

Z analizy ludzkiego genomu wynika, że zawiera on ponad 30 tysięcy genów kodujących białka. Ich otwarte ramki odczytu - ORF (ang. *open reading frames*) stanowią około 2% - 3,2 miliarda par zasad [Lander i wsp. 2001; Venter i wsp. 2001; Waterston i wsp. 2002]. W genomie człowieka oraz innych ssaków znajdują się ogromne fragmenty niekodujące białek. Znaczną frakcję DNA genomowego człowieka stanowią sekwencje powtarzające się, obejmujące około 46 % genomu [Lander i wsp. 2001; Venter i wsp. 2001; Waterston i wsp. 2002]. Niekodująca część genów białkowych (introny, 5' oraz 3' regiony nie podlegające translacji - UTR) obejmuje około 25-27% genomu [Venter i wsp. 2001].



Ryc. 1. Część kodująca i niekodująca w genomie człowieka. Na podstawie zdolności do kodowania białek, sekwencja genomu może być podzielona na dwie części. Część kodująca (zaznaczona kolorem czerwonym), stanowi ok. 2% i zawiera otwarte ramki odczytu (ORF). Część niekodująca (zaznaczona kolorami pomarańczowym, niebieskim i zielonym) stanowi 98% genomu [Szymański i wsp, 2005].

Chociaż funkcja pozostałej 1/4 genomowego DNA jest nieznana, wydaje się jasne, że przynajmniej pewna jego część jest odpowiedzialna za przestrzenną i czasową koordynację ekspresji genów.

Znaczenie regionów DNA, które nie stanowią matrycy dla syntezy białka jest ogromne. W rzeczywistości istnieje odwrotna korelacja pomiędzy stopniem skomplikowania organizmu a

MEMORANDUM

TO : [Name]

FROM : [Name]

SUBJECT : [Subject]

DATE : [Date]

1. [Text]

2. [Text]

3. [Text]

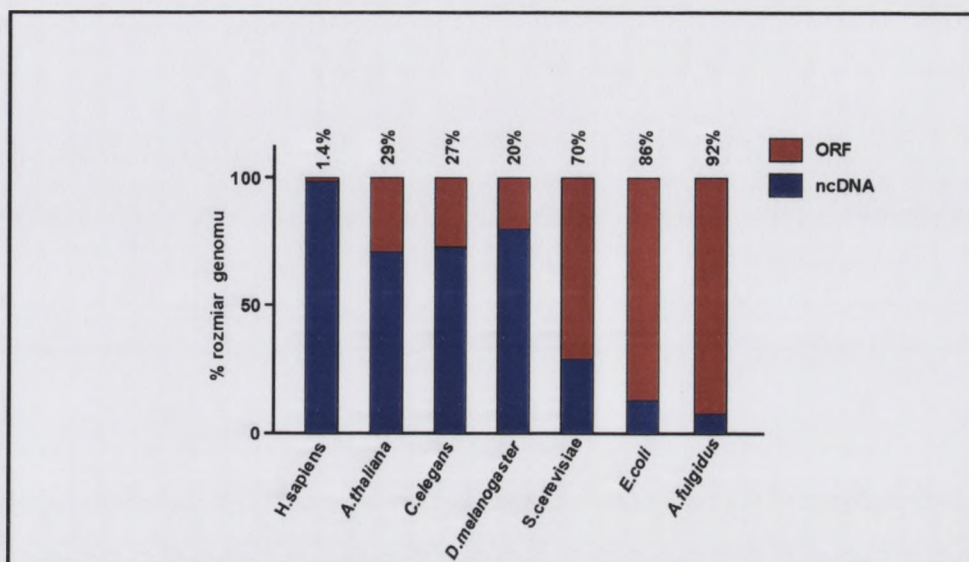
4. [Text]

5. [Text]

6. [Text]

7. [Text]

udziałem w jego genomie regionów kodujących [Mattick, 2003; Shabalina i Spiridonov, 2004].



Ryc. 2. Udział części niekodującej i kodującej w genomach różnych organizmów. Kolorem czerwonym zaznaczono część kodującą (ORF), granatowym - niekodującą (ncDNA) [Szymański i wsp. 2005]

U organizmów prokariotycznych, gdzie regiony międzygenowe oraz nie ulegające translacji są krótkie, a składanie (ang. *splicing*) zachodzi niezwykle rzadko, otwarte ramki odczytu stanowią ponad 90% genomowego DNA. U Eukaryota regiony niekodujące obejmują natomiast od 10-40% u organizmów jednokomórkowych, 70-90% u bezkręgowców aż do około 98% u ssaków [Mattic, 2001]. Tak więc niekodująca część genomu, określana dotychczas jako „śmieciowy DNA” (ang. *junk DNA*), może odgrywać kluczową rolę w regulacji mechanizmów leżących u podstaw rozwoju i różnicowania czy odpowiedzi na zmienne warunki środowiska.

Obserwacje poczynione na podstawie analizy pojedynczego ludzkiego chromosomu sugerują, że prawdopodobnie około połowa genomu człowieka podlega transkrypcji [Scherer i wsp., 2003]. Wielkość ta wyraźnie kontrastuje z ogromną liczbą genów kodujących białka. W chwili obecnej szeroko akceptowany jest fakt, iż znaczącą frakcję transkryptów komórkowych stanowią również niekodujące (regulatorowe) RNA (ncRNA) [Scherer i wsp., 2003].

Termin „niekodujące RNA” w szerokim znaczeniu odnosi się do wszystkich transkryptów lub ich elementów, które nie posiadają potencjału kodowania białek. Tym samym definicja ta obejmować może wszystkie cząsteczki RNA, z wyjątkiem matrycowych RNA, jak również sekwencje intronów usuwane w procesie dojrzewania pre-mRNA, czy też regiony nieulegające translacji przy końcach 5' i 3' mRNA [Scherer i wsp., 2003; Szymański i wsp., 2003].

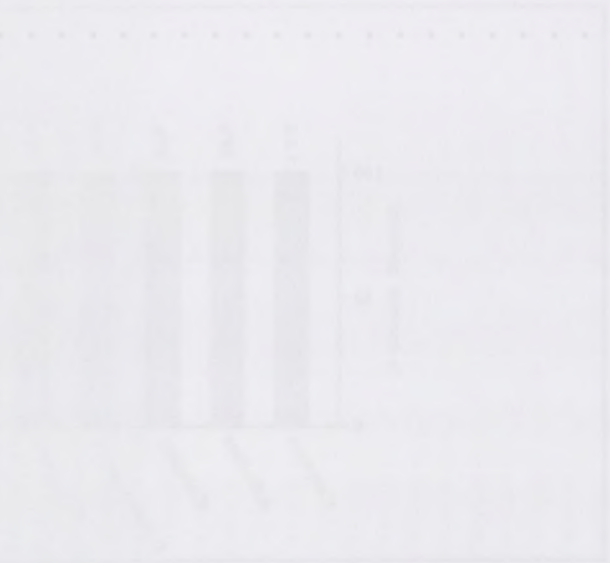


Fig. 1. Effect of pH on the removal efficiency of a membrane filtration system. The removal efficiency (%) is shown for different pH values (5, 6, 7, 8, 9).

The removal efficiency of the membrane filtration system was investigated as a function of pH. The results are shown in Figure 1. The removal efficiency was highest at pH 7 (95%) and lowest at pH 5 and 9 (65%). The removal efficiency was also high at pH 6 and 8 (85%). The removal efficiency was not significantly different at pH 6 and 8. The removal efficiency was significantly different at pH 5 and 9 compared to pH 7. The removal efficiency was also significantly different at pH 6 and 8 compared to pH 5 and 9.

The removal efficiency of the membrane filtration system was also investigated as a function of the concentration of the feed solution. The results are shown in Figure 2. The removal efficiency was highest at a concentration of 100 mg/L (95%) and lowest at a concentration of 10 mg/L (65%). The removal efficiency was also high at a concentration of 50 mg/L (85%) and 200 mg/L (85%). The removal efficiency was not significantly different at a concentration of 50 mg/L and 200 mg/L. The removal efficiency was significantly different at a concentration of 10 mg/L compared to a concentration of 100 mg/L. The removal efficiency was also significantly different at a concentration of 10 mg/L compared to a concentration of 50 mg/L and 200 mg/L.

Wszystkie komórkowe RNA można podzielić na dwie główne grupy: kodujące i niekodujące białka. Ze względu na pełnione w komórce funkcje, niekodujące RNA tworzą grupę konstytutywnych oraz regulatorowych RNA (Tabela 1).

Transkrypty konstytutywne odpowiadają za przebieg podstawowych procesów komórkowych, a ich ekspresja przebiega ciągle i na stałym poziomie. Grupa ta obejmuje wszystkie klasy RNA zaangażowane w powstawanie, dojrzewanie i modyfikację pierwotnych transkryptów (snRNA, snoRNA, RNaza P, gRNA), translację (tRNA, rRNA) oraz kontrolę jakości translacji (tmRNA). Do tej klasy należą również telomerazy RNA związane z procesami replikacji oraz odpowiadające za transport SRP RNA. Drugą, bardzo zróżnicowaną, grupę transkryptów niekodujących stanowią regulatorowe RNA. Obejmują one cząsteczki zaangażowane w specyficzną regulację wielu aspektów ekspresji genetycznej, zarówno w komórkach eukariotycznych, jak i prokariotycznych.

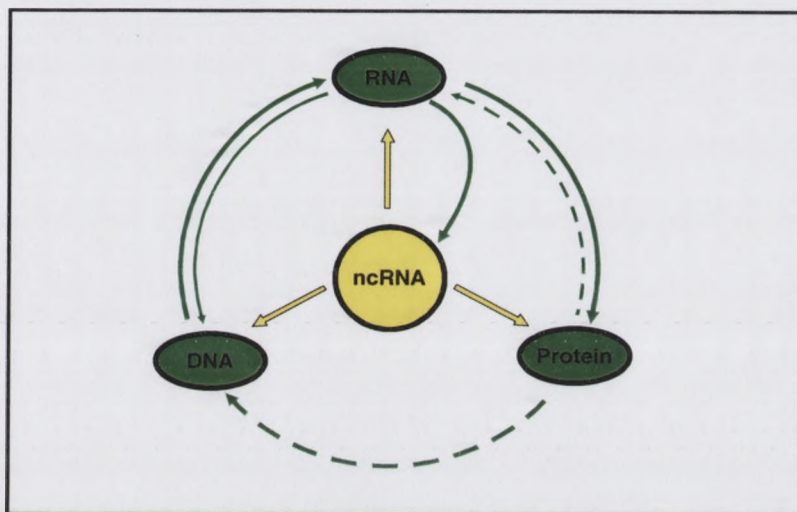
Tabela 1. Podział komórkowych cząsteczek RNA [Żywicki i wsp. 2003]

Kodujące białka	TRANSKRYPTY	
	Niekodujące (ncRNA)	
	Konstytutywne RNA (housekeeping RNAs)	Regulatorowe RNA (regulatory RNAs)
mRNA	<p>1. Translacja - tRNA - translacja informacji genetycznej - rRNA - składnik rybosomu, kataliza formowania wiązań peptydowych - tmRNA - trans-translacja, kontrola jakości translacji</p> <p>2. Dojrzewanie RNA - snRNA - splicing pre-mRNA, komponenty spliceosomu - snoRNA - modyfikacje RNA - RNaza MRP - dojrzewanie RNA - RNaza P RNA - dojrzewanie 5' końca pre-tRNA</p> <p>3. Replikacja - RNA telomerazy - komponent telomerazy, synteza telomerycznego DNA</p> <p>4. Lokalizacja białek - 4.5S RNA, 7SL RNA - translokacja białek przez błony u bakterii i eukariota</p> <p>5. Nieznane funkcje</p>	<p>1. Regulatory transkrypcji - regulacja ekspresji genów podlegających imprintingowi (H19, IPW, LIT1) - zmiana struktury chromatyny związana z inaktywacją chromosomu X i kompensacją dawki genów u eukariota (roX, Xist/Tsix)</p> <p>2. Regulatory posttranskrypcyjne - interakcje z docelowym mRNA na zasadzie antysensu (DsrA, MicF, li-4, let-7, microRNA)</p> <p>3. Modulatory aktywności białek - interakcje RNA-białko zmieniające zdolności katalityczne białek (6S RNA, SRA RNA)</p> <p>4. Regulatory lokalizacji RNA - specyficzny wpływ na lokalizację komórkowych mRNA lub pre-mRNA poprzez specyficzną lokalizację ncRNA (hsr-ω, Xlsirt, BC1, BC200)</p> <p>5. Ryboprzełączniki - zmiana struktury mRNA</p>



RNA mogą być zaangażowane w procesy regulacyjne na wszystkich etapach transmisji informacji genetycznej [Szymański i wsp., 2005] (Ryc. 3).

Wpływają one zarówno na regulację transkrypcji, jak również na kontrolę translacji. Ekspresja transkryptów z tej grupy często jest związana z określonym stadium rozwoju lub różnicowania. Wykazują one specyficzność tkankową, podlegają także modulacji przez biotyczne i abiotyczne czynniki środowiskowe [Szymański i wsp., 2003].



Ryc. 3. Schemat przepływu informacji genetycznej oraz udział ncRNA w jej regulacji - ster życia (ang. *steering wheel of life*) [Szymanski i wsp., 2005].

Wśród regulatorowych RNA znajdują się także cząsteczki, które modyfikując strukturę chromatyny wpływają na ekspresje genu już na jej bardzo wczesnym etapie.

Regulatorowe RNA różnią się także wielkością. W obrębie tej klasy znajdują się zarówno małe 20-nukleotydowe cząsteczki, jaki i 100-200-nukleotydowe bakteryjne regulatory posttranskrypcyjne oraz transkrypty pochodzące z ssaczycy genomów o wielkości ponad 10 kb [Szymański i wsp., 2003].

2.1. Funkcje regulatorowych RNA

Wydaje się, że jednym z powodów, dla których RNA zostały wykorzystane do sterowania procesami regulacyjnymi może być oszczędność energii - zarówno na poziomie pojedynczej komórki, jak również w skali ewolucji systemów molekularnych. Synteza i degradacja RNA wymaga znacznie mniej energii niż produkcja i degradacja białka. Mniejsza stabilność RNA w porównaniu ze stabilnością cząsteczki białkowej jest również korzystna w sytuacji, kiedy RNA pełniący funkcję sygnału przejściowego, powinien zostać gwałtownie zniszczony.

...the ...
...the ...
...the ...

...the ...
...the ...
...the ...

...the ...
...the ...
...the ...

...the ...
...the ...
...the ...

W wielu przypadkach ryboregulatory pełnią swoje funkcje poprzez komplementarne oddziaływanie z sekwencją docelową. W przypadku, kiedy procesy komórkowe wymagają jednak dodatkowego udziału białek, konieczne są tutaj oddziaływania z domenami wiążącymi RNA (np. aptamery).

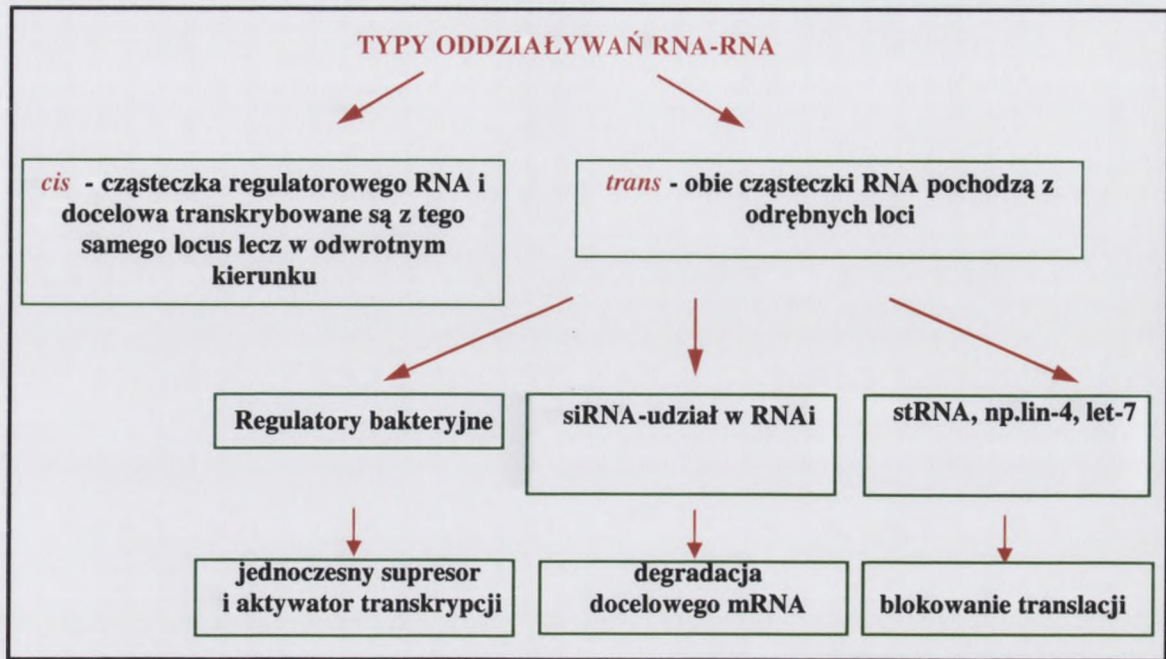
U Eukaryota transkrypcyjna regulacja ekspresji genów często odbywa się na strukturalnym poziomie chromatyny. Dotychczas sądzono, że znaczna ilość RNA będąca komponentem chromatyny jest związana z powstającymi transkryptami lub zaangażowana jest w ich dojrzewanie i modyfikację. Obecnie wiadomo, że transkrypcyjna aktywność fragmentów chromosomów może zależeć od RNA [Matzke i wsp., 2003]. Modułują one ekspresję danego genu poprzez aktywację lub inhibicję jego transkrypcji. Jednym ze szlaków regulacyjnych, w który zaangażowane są ncRNA jest znakowanie epigenetyczne (ang. *imprinting*) [Bartolomei i Tilghman, 1997]. Dotychczas udało się zidentyfikować kilka ncRNA, biorących udział w tym procesie i odgrywających jednocześnie podstawową rolę w genezie złożonych jednostek chorobowych, takich jak syndromy Prader-Willi czy Beckwith-Wiedemann [Nicholls, 2000; Hanel i Wevrick, 2001; Murphy i wsp., 2001].

Cząsteczki ncRNA z grupy regulatorów transkrypcji biorą również udział w procesie kompensacji dawki genów znajdujących się na chromosomie X [Kelley i Kuroda, 2000]. Odbywać się to może poprzez wyłączenie jednego z chromosomów u płci posiadającej dwa chromosomy X lub poprzez podwojenie poziomu ekspresji u płci mającej jeden chromosom X. Pierwszy z tych mechanizmów dotyczy ssaków, gdzie płeć zdeterminowana jest obecnością lub brakiem chromosomu Y [Graves, 1996; Goto i Takagi, 2000].

Najlepiej poznanymi cząsteczkami z tej grupy są występujący u ssaków Xist RNA oraz cząsteczki roX1 i roX2 z *Drosophila melanogaster* [Borsani i wsp. 1991; Jin i wsp. 1999, 2000; Meller i wsp. 2000; Kundel i Amrein, 2003].

Istnieje wiele rodzajów RNA, których wiązanie w orientacji „antysens” do regionów komplementarnych docelowych cząsteczek mRNA powoduje specyficzną i bardzo wydajną regulację ekspresji genu na poziomie translacji [Szymański i wsp., 2003; Wagner i Vogel, 2003]. Efektem ich działania może być albo represja albo stymulacja translacji, w zależności od lokalizacji miejsca wiązania regulatorowego RNA. Regulatory posttranskrypcyjne odpowiadają za regulację poziomu zsyntetyzowanego mRNA oraz jego białkowego produktu. Możliwe są dwa typy takich oddziaływań:





Ryc. 4. Typy oddziaływań regulatorów posttranskrypcyjnych. siRNA - małe interferencyjne RNA (ang. *small interfering RNA*); stRNA (ang. *small temporal RNA*).

W oddziaływaniach typu *trans* bierze udział zróżnicowana grupa cząsteczek.

Spośród ncRNA należących do tej grupy największą stanowią krótkie (około 20 nukleotydów) dwuniciowe RNA zwane siRNA (ang. *small interference RNA*). Są one zaangażowane w mechanizm wpływający na zmianę poziomu ekspresji genów - tzw. interferencyjny RNA (RNAi). Proces ten polega na degradacji docelowego RNA, a rolą siRNA jest tutaj zapewnienie jego wysokiej specyficzności [Escobar, 2002].

Bardzo podobne do siRNA są cząsteczki miRNA (ang. *microRNA*). Po raz pierwszy u *Caenorhabditis elegans* zidentyfikowano małe ncRNA: lin-4 i let-7 wiążące się do komplementarnych regionów docelowego mRNA. Wiązanie to powoduje blokowanie translacji na etapie postinicjacyjnym, wpływając jednocześnie na zmianę stabilności RNA [Lee i wsp., 1993; Reinhart i wsp., 2000]. Z badań genomów: ludzkiego, *D. melanogaster*, *C. elegans* oraz *A. thaliana* wynika, że miRNA stanowią dużą grupę antysensowych RNA działających w układzie *trans* i pełniących kluczową rolę w kontroli ekspresji genów, podlegających regulacji w zależności od stopnia rozwoju lub stopnia różnicowania komórek [Lee i wsp., 1993; Reinhart i wsp., 2000]. Główną funkcją miRNA jest nie degradacja mRNA lecz zahamowanie jego translacji poprzez wiązanie się do regionów 3'UTR [Mitsuya i wsp., 1999; Lai, 2002].

Inną grupą regulatorowych antysensowych RNA działających w układzie *trans* są dłuższe cząsteczki posiadające jedynie krótkie fragmenty komplementarne do docelowego mRNA.



The first section of the paper discusses the importance of understanding the relationship between the individual and the organization. It highlights the need for a comprehensive approach to organizational behavior, one that considers both the individual and the organization as interconnected entities. This approach is essential for developing effective strategies and interventions that address the needs of both the individual and the organization.

The second section of the paper focuses on the role of the individual in the organization. It discusses the various factors that influence individual behavior, such as personality, ability, and motivation. It also explores the ways in which the organization can support and enhance individual performance, through training, development, and job design.

The third section of the paper examines the role of the organization in the individual's life. It discusses the ways in which the organization can provide a supportive and challenging environment for its employees, one that fosters their growth and development. It also explores the ways in which the organization can address the needs of its employees, such as providing a safe and healthy work environment and offering opportunities for advancement and growth.

The fourth section of the paper discusses the importance of research in organizational behavior. It highlights the need for a rigorous and systematic approach to research, one that is grounded in theory and designed to test specific hypotheses. It also explores the ways in which research can inform practice, providing valuable insights into the nature of organizational behavior and the ways in which it can be improved.

The fifth and final section of the paper discusses the future of organizational behavior research and practice. It highlights the need for a continued focus on understanding the relationship between the individual and the organization, and the ways in which this relationship can be improved. It also explores the potential for new and innovative approaches to research and practice, one that is grounded in a deep understanding of the human condition and the complexities of the organization.

Mechanizm ich działania polega najczęściej na ograniczeniu lub stymulacji translacji mRNA poprzez wiązanie się do rejonów, które nie ulegają translacji, a odpowiedzialnych za jej inicjację - UTR. Ten typ oddziaływań, w odróżnieniu od dwóch poprzednich, występuje u bakterii [Eddy, 2001; Szymański i Barciszewski, 2002]. Ekspresja genów może również podlegać regulacji poprzez specyficzną lokalizację mRNA, co ma szczególne znaczenie w przypadku komórek o dużej specjalizacji, np. neuronów. Najlepiej poznanymi cząsteczkami wykazującymi taką aktywność są występujące u gryzoni BC1 oraz u naczelnych BC200 [Shi i wsp. 2001; Lanz i wsp. 2002]. Wpływają one na dendrytyczną lokalizację wybranych mRNA oraz na transport mRNA wazopresyny do aksonów [Kobayashi i Anzai, 1998].

Specyficzność sekwencji gwarantuje wysoką precyzję mechanizmów regulacyjnych opartych na tworzeniu dwuniciowych kompleksów RNA-RNA. Regulacyjna rola ncRNA nie jest jednak ograniczona tylko do oddziaływań z innymi kwasami nukleinowymi. Mogą one wpływać na funkcjonowanie białka nie tylko za pośrednictwem RNA, ale również poprzez bezpośrednie wiązanie do cząsteczki białka powodować zmianę struktury, modulować jego aktywność enzymatyczną lub zdolność wiązania ligandu [Lanz i wsp., 1999; Wassarman i Storz, 2000]. Przykładem modulatorów aktywności białek są między innymi: 6S RNA z *E. coli* czy SRA RNA znaleziony w komórkach ssaczych [Lanz i wsp., 1997; Wassarman i Storz, 2000].

Swoistość niezbędną do regulacji ekspresji genów białkowych zapewniają niekodującym RNA następujące elementy: sekwencja nukleotydów, odpowiedzialna za specyficzność wiązania ncRNA do mRNA oraz struktura drugo- i trzeciorzędowa, odpowiadająca za wiązanie licznych białek.

Funkcje regulatorowe mogą być także pełnione w układzie *cis* przez niekodujące regiony (UTR) mRNA. Jest to związane z możliwością tworzenia przez te regiony motywów strukturalnych zdolnych do wiązania niskocząsteczkowych metabolitów. Wiązanie to powoduje zmianę struktury drugorzędowej UTR i aktywację lub represję translacji. W konsekwencji cały proces odbywa się bez udziału dodatkowych czynników białkowych. Cząsteczki RNA wiążące metabolity nazwane zostały przełącznikami RNA (ryboprzełączniki, ang. *riboswitch*) [Mandal i wsp., 2003; Mandal i Breaker, 2004; Nudler i Mironov, 2004]. Dotychczas większość zidentyfikowanych ryboprzełączników znaleziono u organizmów prokariotycznych [Mandal i wsp., 2003]. Szacuje się, że ponad 4% genów *Bacillus subtilis* regulowanych jest przez cząsteczki RNA w układzie *cis* [Winkler, 2005]. Regulacja ekspresji genów białkowych możliwa jest dzięki odwracalnemu blokowaniu znajdującej się w obrębie UTR sekwencji RBS (ang. *ribosome binding site*) odpowiedzialnej za przyłączenie mRNA do

...the first part of the paper we consider the case of a ...

...the second part of the paper we consider the case of a ...

...the third part of the paper we consider the case of a ...

...the fourth part of the paper we consider the case of a ...

rybosomu. Możliwe jest również utworzenie, jeszcze na etapie transkrypcji, alternatywnej spinki atenuacyjnej będącej sygnałem terminacji transkrypcji u Prokaryota. Regulacja realizowana z udziałem ryboprzełączników pozwala zarówno na represję, jak i aktywację genu [Nudler i Mironov, 2004].

W obrębie struktury drugorzędowej wszystkich poznanych do tej pory ryboprzełączników wyróżnić można podstawowy trzon, centralną multipętlę oraz dodatkowe elementy strukturalne o charakterze spinki do włosów. W tworzenie oddziaływań trzeciorzędowych oraz w wiązanie ligandu zaangażowane są najprawdopodobniej regiony jednoniciowe [Grundy i wsp., 2003; Rodionov i wsp., 2003; Vitreschak, 2003].

Ryboprzełączniki posiadają dwie domeny: pierwszą - wiążącą naturalny ligand lub aptamer oraz „platformę ekspresyjną”, której konformacja wpływa na ekspresję genu [Winkler i Breaker, 2003]. Podobnie jak w przypadku aptamerów, przyłączenie ligandów do ryboprzełączników jest „wiązanym przystosowawczym” (ang. *adaptive binding*) polegającym na indukowanym dopasowaniu struktury RNA do ligandu [Hermann i Patel, 2000]. Zmiany konformacyjne przenoszone są na platformę ekspresyjną, co prowadzi do modulacji poziomu ekspresji określonego genu.

Domeny wiążące ligandy są wysoce konserwatywne w odległych od siebie ewolucyjnie organizmach. Platforma ekspresyjna natomiast wykazuje pewne różnice w obrębie sekwencji, struktury, jak również mechanizmu działania u różnych organizmów. To właśnie w obrębie tej platformy następuje tworzenie struktur powodujących zmiany poziomu ekspresji danego genu w zależności od ilości metabolitu w środowisku.

Zmiana struktury mRNA indukowana wiązaniem niskocząsteczkowego metabolitu może wywołać dwojakie konsekwencje w regulacji ekspresji genu [Winkler i Breaker, 2005], (Ryc.5). Pierwsze polegają na inhibicji translacji, gdzie modulacji podlega dostępność sekwencji Shine-Dalgarno oraz kodonu AUG. Jeśli region ten uwikłany jest w strukturę drugorzędową jest on niedostępny dla rybosomu, co prowadzi do inhibicji translacji. Jego uwolnienie natomiast powoduje natychmiastową ekspresję białka. Wiązanie metabolitu umożliwia przejście z jednego stanu konformacyjnego w drugi - uwolnienie lub związanie miejsca wiązania rybosomu (RBS) (Ryc. 5A)

W przypadku drugiego typu dochodzi do przedwczesnej terminacji transkrypcji (atenuacja). Jest to wynik asocjacji ligandów z terminatorem transkrypcji, antyterminatorem i anty-antyterminatorem. Terminator posiada strukturę spinki do włosów, po której następuje charakterystyczna sekwencja poli U. Przy braku odpowiedniego metabolitu część sekwencji



terminatora oddziałuje z antyterminatorem, co pozwala na prawidłowy przebieg transkrypcji i powstanie transkryptu o pełnej długości [Winkler i Breaker, 2005].

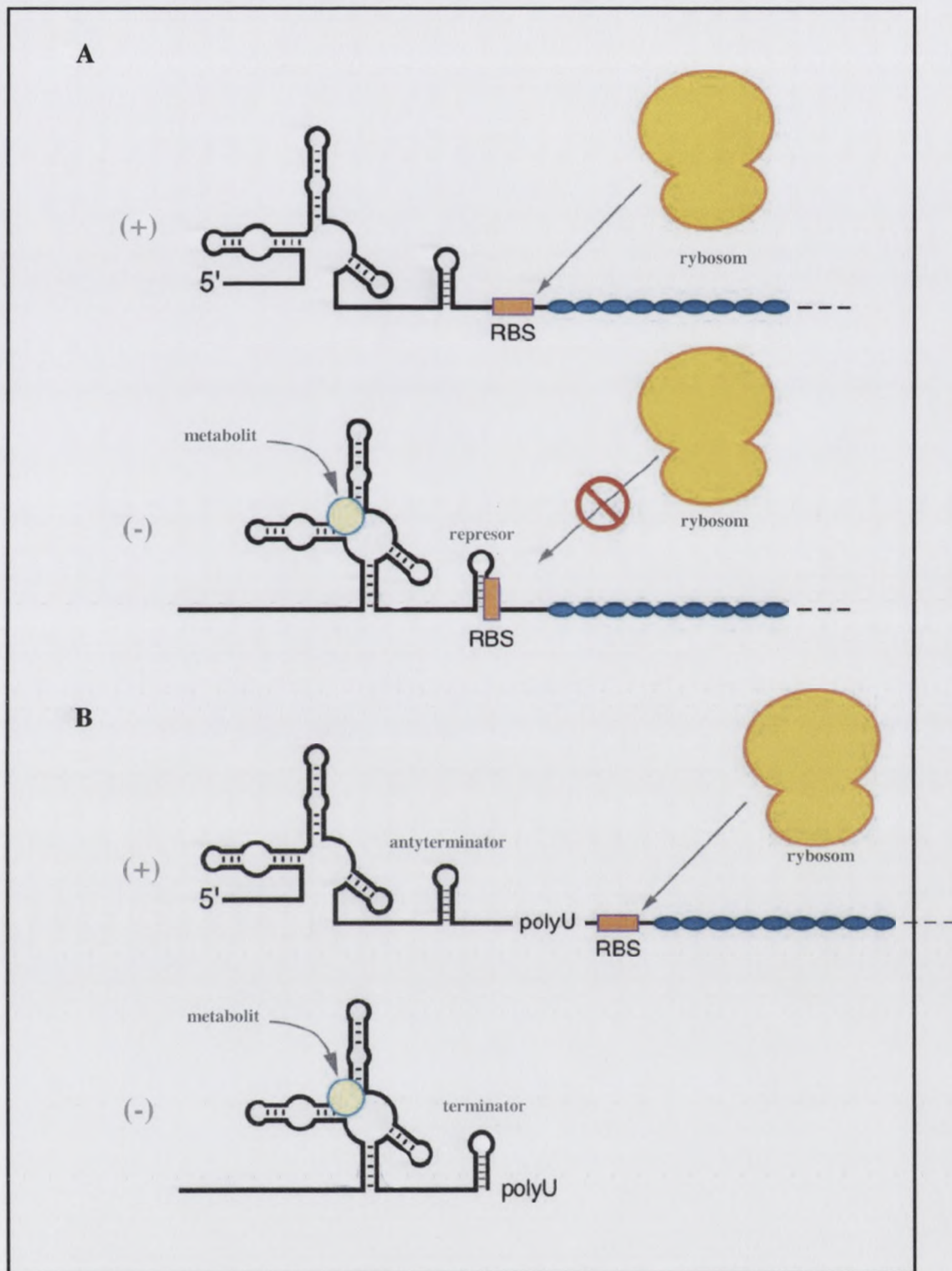
Po związaniu ligandu struktura antyterminatora w mRNA ulega zaburzeniu. Powoduje to utworzenie odpowiedniej konformacji terminatora, a następnie dysocjację polimerazy RNA za sekwencją poli U i w efekcie powstanie skróconego, niekodującego transkryptu (Ryc.5B).

Struktura spinki atenuacyjnej powstaje w wyniku niedoboru ligandu, natomiast związanie metabolitu powoduje jej rozplecenie i umożliwia transkrypcję pełnej długości mRNA.

Dotychczas elementy o charakterze przełączników RNA zidentyfikowano u blisko 100 gatunków bakterii wszystkich grup taksonomicznych, jak również w regionach niekodujących mRNA archebakterii, grzybów i niektórych roślin [Rodionov i wsp., 2002; Nudler i Mironov, 2004]. Znane ryboprzełączniki oraz ich rolę w regulacji metabolizmu bakteryjnego zestawiono w Tabeli 2.

Tabela 2. Ryboprzełączniki i ich rola w regulacji metabolizmu komórki bakteryjnej [Nudler i Mironov, 2000]

Metabolit (ligand)	Prekursor	Sensor RNA	Proces docelowy	Geny docelowe	Występowanie
FMN (mononukleotyd flawinowy)	B2	rfn-box	Terminacja transkrypcji lub inicjacja translacji	Synteza i transport B2	Bakterie Gram (+) i Gram (-)
TPP (pirofosforan tiaminy)	B1	thi-box	Terminacja transkrypcji lub inicjacja translacji	Synteza i transport B1	Bakterie Gram (+) i Gram (-), niektóre archebakterie, grzyby i rośliny
Ado-Cbl (adenozylkobalamina)	B12	B12-box	Terminacja transkrypcji i/lub inicjacja translacji	Synteza i transport B12	Bakterie Gram (+) i Gram (-)
SAM (S-adenozylometionina)	Met	S-box	Terminacja transkrypcji	Metabolizm siarki	Bakterie Gram (+)
Lizyna	N/A	L-box	Terminacja transkrypcji	LysC	Bakterie Gram (+) i Gram (-)
Glicyna	N/A	VCI-II	Terminacja transkrypcji	gcvT	<i>Bacillus subtilis</i>
Guanina, Hypoxantyna	N/A	G-box	Terminacja transkrypcji i atenuacja	Metabolizm i transport puryn	Bakterie Gram (+)



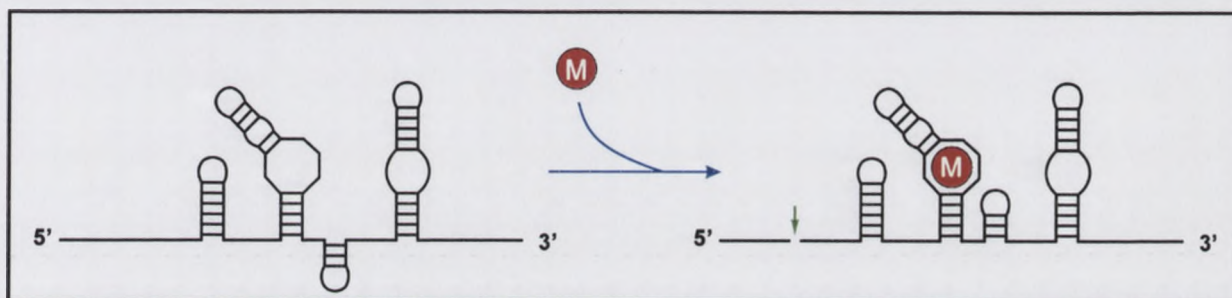
Ryc. 5. Mechanizmy regulacji ekspresji genów poprzez tworzenie alternatywnych struktur drugorzędowych RNA pod wpływem wiązania metabolitów [Winkler i Breaker, 2005].

A) Regulacja na poziomie translacji poprzez uwalnianie ("+") lub blokowanie ("-") sekwencji miejsca wiązania rybosomu (RBS) i kodonu inicjatorowego pod wpływem wiązania metabolitu.

B) Regulacja na poziomie transkrypcji poprzez tworzenie alternatywnej spinki atenuacyjnej (terminatora) pod wpływem wiązania metabolitu. Przykłady ilustrują aktywację ("+") lub przedwczesną terminację ("-") transkrypcji.



Od przedstawionego powyżej modelu regulacji poprzez ryboprzełączniki odbiega nieco wiązanie glukozoamino-6-fosforanu (GlcN6P), podstawowego składnika budulcowego bakteryjnej ściany komórkowej. Przełącznik RNA wiążący GlcN6P znajduje się w regionie 5'UTR mRNA związanego z genem kodującym białko odpowiedzialne za syntezę tego związku. Rearanżacja struktury 5' UTR mRNA odpowiedzialnej za wiązanie GlcN6P aktywuje znajdujący się w tym rejonie rybozym [Winkler i wsp., 2004], (Ryc.6). Jego aktywność w układzie *cis* powoduje hydrolizę mRNA, skrócenie czasu półtrwania mRNA z 4 minut do 15 sekund i w efekcie niemal całkowite zahamowanie biosyntezy białka.



Ryc. 6. Regulacja translacji poprzez ryboprzełącznik o aktywności rybozymalnej. Zmiana konformacji spowodowana wiązaniem metabolitu (M) aktywuje rybozym hydrolizujący sekwencję mRNA w miejscu wskazanym strzałką.

2.2. Bakteryjne RNA

W komórkach bakteryjnych stwierdzono ogromną liczbę małych cząsteczek RNA. Pełnią one tutaj funkcję głównych regulatorów w odpowiedzi na zmienne warunki środowiska.

Małe ncRNA są niezwykle powszechne wśród plazmidów bakteryjnych, fagów, transpozonów, gdzie wpływają na regulację procesów biologicznych działając jako cząsteczki antysensowe. Szacuje się, że w komórce *E. coli* znajduje się ponad 60 ncRNA, a analizy bioinformatyczne pokazują, że kolejnych 30 potencjalnych ncRNA może występować u hipertermofilnych bakterii *Methanococcus jannaschii* oraz *Pyrococcus furiosus* [Wassarman i wsp., 2001; Klein i wsp., 2002; Storz, 2002].

Szczególnie ważnym zagadnieniem w poszukiwaniu nowych ncRNA jest zachowawczość regionów niekodujących u spokrewnionych gatunków bakteryjnych. Cecha ta jest obecnie silnym wskaźnikiem w poszukiwaniu odpowiednich genów dla małych ncRNA. W genomie *E. coli* wyróżnić można cząsteczki RNA o charakterze konstytutywnym, jak również regulatorowym (Tabela 3) [Gottesman 2004].

Do konstytutywnych RNA u *E. coli* zaliczyć można RNazę P, tmRNA oraz 4.5 S RNA.

On the other hand, the results of the present experiments are in agreement with the results of the previous experiments (1,2) showing that the interaction between the polymer and the metal surface is not a simple adsorption process but involves a complex reaction mechanism. The results of the present experiments are in agreement with the results of the previous experiments (1,2) showing that the interaction between the polymer and the metal surface is not a simple adsorption process but involves a complex reaction mechanism. The results of the present experiments are in agreement with the results of the previous experiments (1,2) showing that the interaction between the polymer and the metal surface is not a simple adsorption process but involves a complex reaction mechanism.

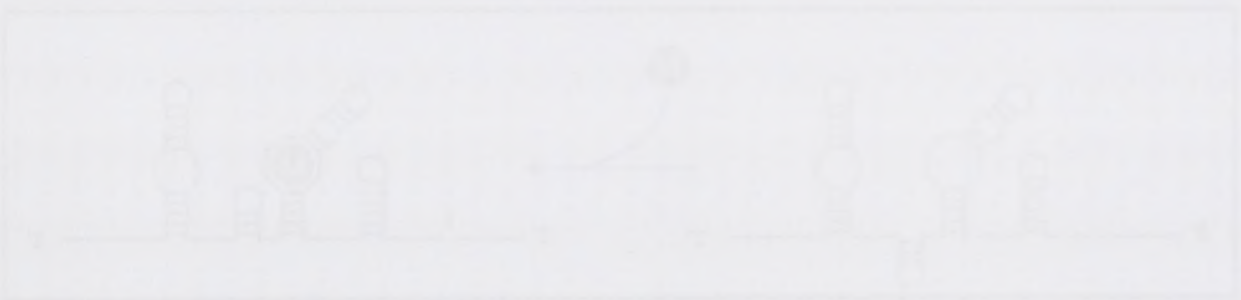


Fig. 1. Schematic representation of the interaction between the polymer and the metal surface. The polymer chain is represented by a series of circles connected by lines, and the metal surface is represented by a horizontal line with vertical bars.

References

1. J. K. Stille, *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.*, **1**, 1005 (1963).
2. J. K. Stille, *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.*, **2**, 1005 (1964).
3. J. K. Stille, *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.*, **3**, 1005 (1965).
4. J. K. Stille, *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.*, **4**, 1005 (1966).
5. J. K. Stille, *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.*, **5**, 1005 (1967).
6. J. K. Stille, *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.*, **6**, 1005 (1968).
7. J. K. Stille, *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.*, **7**, 1005 (1969).
8. J. K. Stille, *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.*, **8**, 1005 (1970).
9. J. K. Stille, *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.*, **9**, 1005 (1971).
10. J. K. Stille, *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.*, **10**, 1005 (1972).

Tabela 3. Małe bakteryjne cząsteczki RNA

Kategoria	Liczba cząsteczek RNA	Przykład	Wielkość (nt)	Mechanizm działania/funkcja
Funkcje strukturalne i enzymatyczne	2	4.5S RNaza P	114 377	Sekrecja Rybozym, udział w procesingu
Kontrola jakości	1	tmRNA	363	Kontrola jakości translacji
Inhibitory białek	3	6S CsrB CsrC	184 360 270	Hamowanie polimerazy RNA Hamowanie CsrA Hamowanie CsrA
Antysensowe RNA działające w układzie cis	9	SokA RdID	55 66	Antytoksyna HokA Antytoksyna LdrD
Antysensowe RNA wiążące białko Hfq	22	DsrA RprA OxyS RyhB/SraI Spot 42 MicF MicC DicF	87 105 109 90 109 93 108 56	Stymulacje rpos Hamowanie ans Stymulacja rpos Anty-rpos, fhfA Anty-galK Anty-ompF Anty-ompC Anty-ftsZ
Antysensowe RNA	3	RyeA/SraC	275	Anty-RyeB

Wszystkie cząsteczki tRNA u bakterii są syntetyzowane jako prekursorzy i wymagają obróbki w celu powstania dojrzałych 5' i 3' końców cząsteczki. U *E. coli* za ten proces odpowiedzialna jest RNaza P, zbudowana z dwóch podjednostek: M1 RNA o charakterze klasycznego rybozomu oraz białko C5 jako druga podjednostka [Frank i wsp., 1998; Altman i wsp., 1999].

W niektórych przypadkach zdarza się, że skrócone lub uszkodzone mRNA blokują rybosomy w czasie translacji. Dodatkowym problemem są niekompletnie zsyntetyzowane cząsteczki polipeptydów, które muszą zostać skierowane na drogę degradacji [Felden i wsp., 1997]. tmRNA posiada domenę strukturalną, która naśladuje tRNA oraz fragment kodujący krótką sekwencję aminokwasową (ang. „*mRNA-like domain*”).

„Domena tRNA” jest rozpoznawana i aminoacylowana przez bakteryjny RNA tmRNA (trans-messenger RNA) uczestniczy w kontroli jakości translacji [Keiler i wsp., 1996; Gillet i Felden, 2001]. Jest ona wiązana przez syntetazę alanylo-tRNA, następnie przez czynnik elongacyjny Tu i w końcu włączana do wolnego miejsca A na rybosomie zatrzymanym przez uszkodzony mRNA. Proces ten jest wspomagany przez białko SmpB wiążące tmRNA

Table 1: Summary of data

Year	Value	Unit
2000	100	kg
2001	110	kg
2002	120	kg
2003	130	kg
2004	140	kg
2005	150	kg
2006	160	kg
2007	170	kg
2008	180	kg
2009	190	kg
2010	200	kg
2011	210	kg
2012	220	kg
2013	230	kg
2014	240	kg
2015	250	kg
2016	260	kg
2017	270	kg
2018	280	kg
2019	290	kg
2020	300	kg

Western
 W. 100
 W. 110
 W. 120
 W. 130
 W. 140
 W. 150
 W. 160
 W. 170
 W. 180
 W. 190
 W. 200
 W. 210
 W. 220
 W. 230
 W. 240
 W. 250
 W. 260
 W. 270
 W. 280
 W. 290
 W. 300

[Wower i wsp., 2002]. W wyniku działania tmRNA, rybosom zostaje pozbawiony uszkodzonego mRNA i ponownie wykorzystany w procesie biosyntezy białka.

4.5 S RNA, najłatwiej poznany z konstytutywnych bakteryjnych RNA, związany jest z sekrecją białek. Nie do końca jeszcze wiadomo, czy cząsteczka ta zaangażowana jest wyłącznie w mechanizmy sekrecji czy może też odgrywać drugoplanową rolę w procesie translacji [Nakamura i wsp., 2001].

Regulacja ekspresji genów może zachodzić według różnorodnych mechanizmów, ale biorąc pod uwagę naturę cząsteczki RNA, wykorzystuje ona głównie oddziaływania specyficzne sekwencyjnie i wymaga przynajmniej częściowej komplementarności pomiędzy regulatorowym - antysensowym RNA a cząsteczką docelową.

Cząsteczka regulatorowa, aby pełnić swoje funkcje musi spełniać następujące kryteria:

1. Synteza lub aktywacja powinna zachodzić tylko w specyficznych warunkach. Dla bakteryjnych regulatorów zachodzi ona pod wpływem czynników stresowych. Te ryboregulatory wiążą małe cząsteczki efektorowe, co powoduje zmiany w strukturze RNA, a co za tym idzie terminację transkrypcji lub zmianę aktywności translacyjnej [Stormo, 2003; Weisberg i Storz, 2002].
2. Specyficzność działania. W przypadku ncRNA zarówno sekwencja jak i struktura są równorzędnymi czynnikami determinującymi specyficzność poprzez komplementarne oddziaływanie z docelowym mRNA.
3. Ograniczone działanie. Każdy regulator powinien ulec wyłączeniu w odpowiednim czasie. Synteza oraz aktywność regulatora powinny ulec zahamowaniu, kiedy zanika sygnał aktywacji. Wydaje się, że ncRNA działają więc raczej w układzie stechiometrycznym niż katalitycznym [Masse i wsp., 2003].

Większość z poznanych dotychczas antysensowych RNA kodowanych przez chromosom bakteryjny zalicza się do ryboregulatorów kategorii *trans*.

Jednym z pierwszych *trans* RNA zidentyfikowanych u *E. coli* jest MicF [Andersen i wsp., 1987]. Powstawanie tej cząsteczki RNA indukowane jest przez czynniki stresowe, np. zmiany osmolarności czy temperatury [Andersen i wsp., 1989; Delihias i wsp., 2001]. Wiązanie MicF do docelowego mRNA - ompF RNA w miejscu RBS blokuje translację białka OmpF. Konsekwencją tego procesu jest równowaga pomiędzy ilością zsyntetyzowanych białek OmpF i OmpC. Obydwa białka związane są z błoną komórkową, w związku, z czym w wyniku zmiany ich poziomu dochodzi do zmian we właściwościach błony. Kompleks formowany między MicF RNA a docelowym mRNA ilustruje powtarzający się schemat z

udziałem cząsteczek *trans* (antysens RNA): krótkie fragmenty cząsteczek oddziaływujących ze sobą tworzą krótkie funkcjonalne duplekisy [Delihias i wsp., 2001; Wagner i Vogel, 2002]. Zidentyfikowano także 514-nukleotydowy RNA- RNA III, który jest kodowany przez locus *agr* u *Staphylococcus aureus* [Novick i wsp., 1993]. Cząsteczka ta jest kluczowym regulatorem wirulencji tej patogennej bakterii i charakteryzuje się następującymi cechami: po pierwsze - jest niezwykle długi, jak na bakteryjny ryboregulator, po drugie - działa jako regulator multigenowy, inicjując represję genów kodujących białka powierzchniowe (ang. *cell-surface protein*), jak również aktywując geny odpowiedzialne za syntezę toksyn i po trzecie - poszczególne domeny RNA III odpowiadają za syntezę δ -hemolizyny. RNA III jest cząsteczką, która z reguły aktywuje translację docelowego mRNA [Benito i wsp., 2000].

OxyS RNA jest drugim przykładem regulatora multigenowego transkrybowanego w układzie *trans*. Ten 109-nukleotydowy RNA powoduje zmianę w ekspresji ponad 40 genów jako część ogólnego systemu obronnego komórki przeciwko uszkodzeniom spowodowanym przez stres oksydacyjny. W takim wypadku synteza OxyS gwałtownie wzrasta [Altuvia i wsp. 1997]. OxyS RNA wpływa m.in. na regulację dwóch genów: *fhlA*- odpowiedzialnego za syntezę aktywatora transkrypcji oraz *rpoS*- podjednostki sigma polimerazy RNA, aktywowanej w warunkach stresu oraz w fazie stacjonarnego wzrostu bakterii [Altuvia i wsp., 1998]. Translacja *fhlA* mRNA jest hamowana poprzez tworzenie dwóch kompleksów strukturalnych typu pętla-pętla (ang. *kissing loops*) pomiędzy dwiema głównymi spinkami OxyS a komplementarnymi strukturami w pobliżu miejsca RBS *fhlA* mRNA [Altuvia i wsp., 1998; Argaman i wsp., 2000].

Regulatorowe bakteryjne RNA mogą działać również na zasadzie jeden ryboregulator-dwa (lub więcej) docelowych mRNA. Jednym z poznanych dotychczas RNA, spełniających tę zasadę, jest DsrA RNA. Ta cząsteczka o długości 87 nukleotydów pełni rolę w procesie syntezy polisacharydów budujących otoczkę bakteryjną. DsrA RNA jest jednocześnie indukowany i stabilizowany w niskiej temperaturze [Sledjeski i Gottesman, 1995]. Docelowymi mRNA dla DsrA RNA są *rpoS* oraz *hns* [Lease i wsp., 1998]. Obydwie cząsteczki mRNA kodują białka będące globalnymi regulatorami procesów transkrypcyjnych, wpływających na kontrolę wielu genów.

Powstaje pytanie, jak jedna cząsteczka RNA może wpływać na wiązanie dwóch innych cząsteczek niewykazujących wyraźnego podobieństwa struktury pierwszorzędowej? Analiza sekwencji DsrA RNA wykazuje, że dwa różne segmenty tej cząsteczki są odpowiedzialne za oddziaływania z odpowiednimi mRNA.





Mechanizm działania DsrA RNA pokazuje, że nawet krótkie sekwencje RNA mogą oddziaływać z jedną lub więcej, niż jedną cząsteczką docelową [Lease i Belfort, 2000].

Czy jest więc możliwe, że jedna cząsteczka docelowa może być regulowana przez więcej niż jeden regulatorowy RNA?

Przykładem takiego działania jest, wspomniany wyżej, *rpoS*. Produkt genu *rpoS* jest kluczowym czynnikiem uczestniczącym w procesach adaptacyjnych, wynikających z działania różnorodnych warunków stresowych. Jest on również odpowiedzialny za regulację genów związanych z odpowiedzią na stres. Dla komórki bakteryjnej, znajdującej się w niekorzystnych warunkach wzrostu, niezwykle istotna jest integracja różnorodnych systemów, w celu uzyskania właściwej i skutecznej odpowiedzi. Punktem, w którym ta integracja mogłaby zachodzić u bakterii, jest właśnie regulacja *rpoS* mRNA.

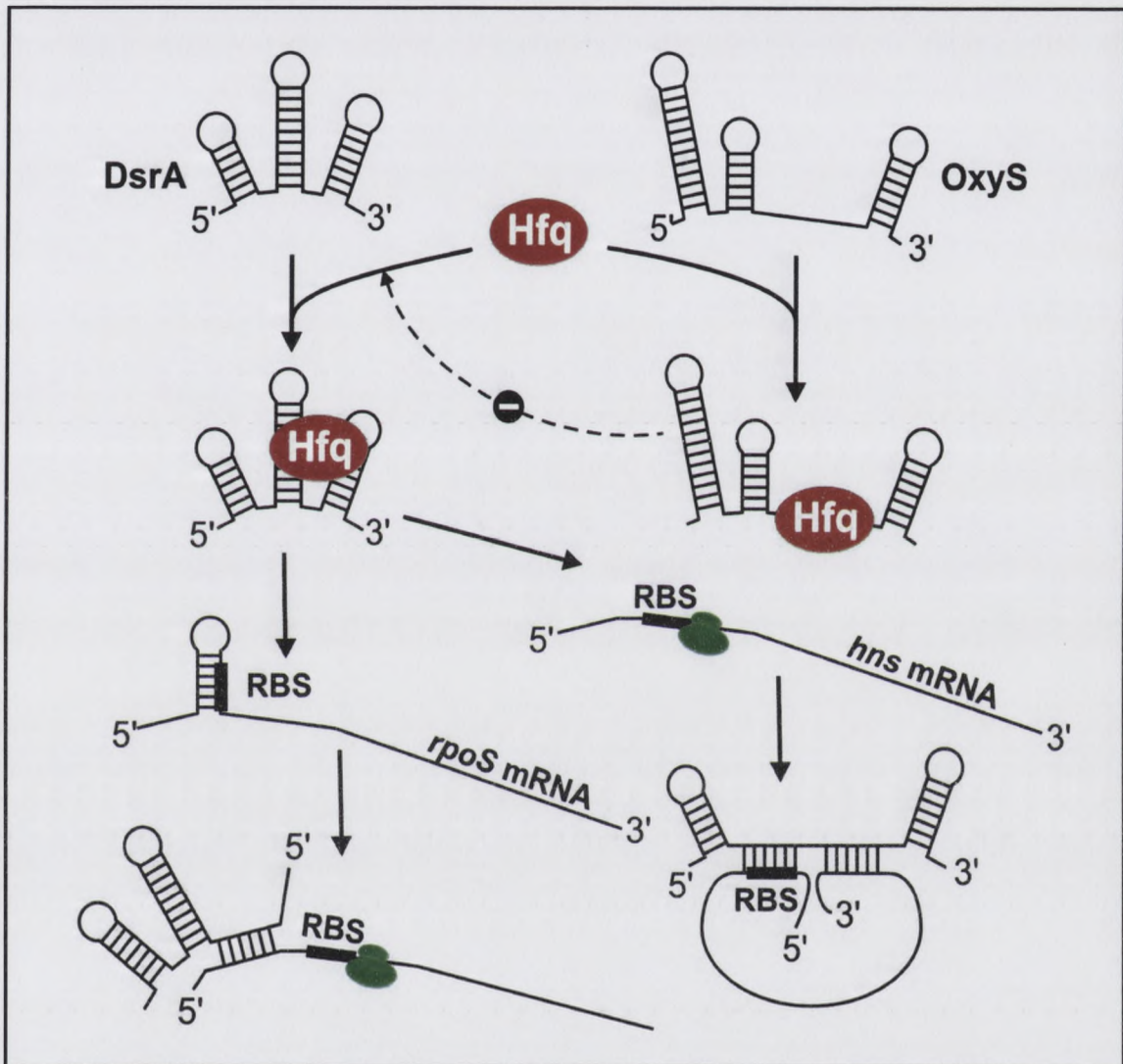
Gen *rpoS* koduje alternatywny czynnik sigma, wykorzystywany przez bakterie *E. coli* w warunkach stresowych (brak substancji pokarmowych, szok osmotyczny, pH, oksydacyjny, temperaturowy) do transkrypcji ogromnej liczby genów zaangażowanych w odpowiedź na stres (ang. *stress-response genes*) [Hengge-Aronis, 2002]. mRNA *rpoS* zawiera długi region 5'UTR, który tworzy strukturę drugorzędową o charakterze spinki hamującej translację poprzez blokowanie miejsca wiązania rybosomu [Brown i Elliott, 1997]. Translacja *rpoS* wzrasta gwałtownie w warunkach stresowych, a w podniesienie tego poziomu zaangażowane są dwa czynniki: ncRNA oraz białko Hfq [Brown i Elliott, 1997]. Zarówno OxyS, jak i DsrA RNA wpływają na poziom translacji *rpoS* mRNA, działają jednak przeciwnie. Cząsteczką wpływającą na podniesienie poziomu translacji *rpoS* jest również RprA RNA [Majdalani i wsp., 2001]. Ta 106-nukleotydowa cząsteczka oddziałuje z tym samym regionem *rpoS* RNA, co DsrA RNA [Majdalani i wsp., 2002].

DsrA RNA oraz RprA RNA wzmacniają translację *rpoS* poprzez oddziaływanie z UTR mRNA *rpoS*, zaburzając tym samym tworzenie struktury spinki do włosów oraz uwalniając RBS do oddziaływań z rybosomem [Lease i wsp., 1998; Majdalani i wsp., 1998; Majdalani i wsp., 2001]. Obie cząsteczki regulatorowych RNA: DsrA oraz RprA wykorzystują nie tylko oddziaływania na zasadzie Watsona-Cricka, ale również tworzą niekanoniczne pary zasad z docelowym RNA, co może wyjaśniać dlaczego dwa różne RNA, o innej sekwencji nukleotydowej wiążą tę samą cząsteczkę docelową [Lease i wsp., 1998; Majdalani i wsp., 1998; Majdalani i wsp., 2001].

Promotor *dsrA* jest aktywny tylko w warunkach niskiej temperatury (poniżej 30°C) [Repoila i Gottesman, 2001, 2003]. Podlega on również regulacji negatywnej ze strony LeuO. Fizjologiczna rola LeuO nie jest jednak jeszcze poznana [Klauck i wsp., 1997; Repoila i



Gottesman, 2001]. Niska temperatura prowadzi do podwyższenia poziomu RpoS, co z kolei powoduje podniesienie poziomu ekspresji genów *otsA* oraz *otsB*. Produkty tych genów regulują poziom osmoprotektanta- kalozy, co wpływa na ochronę komórki w bardzo niskiej temperaturze - nawet do 4°C [Sledjeski i Gottesman, 1995; Kandror i wsp., 2002].



Ryc. 8. Regulacja ekspresji czynników transkrypcyjnych RpoS i H-NS przez DsrA RNA oraz OxyS RNA. Translacja *rpoS* mRNA jest hamowana przez strukturę drugorzędową w obrębie 5'UTR, zawierającym region RBS. Białko Hfq ułatwia parowanie pomiędzy DsrA RNA i *RpoS* mRNA oraz *hns* mRNA. Oddziaływanie DsrA-RpoS mRNA otwiera RBS i pozwala na inicjację translacji. Oddziaływanie DsrA RNA z *hns* mRNA blokuje ekspresję H-NS poprzez „maskowanie” RBS i podnoszenie poziomu *hns* mRNA. OxyS RNA działa antagonistycznie w stosunku do DsrA RNA, współzawodnicząc o oddziaływanie z Hfq [Szymański i wsp., 2003].

Jak wspomniano wyżej, DsrA RNA ma również odrębną domenę komplementarną do regionu znajdującego się w pobliżu RBS genu *hns*. Produkt tego genu jest plejotropowym regulatorem transkrypcji i wpływa na obniżenie ekspresji genów aktywowanych w wyniku stresu osmotycznego [Sledjeski i Gottesman, 1995; Lease i Belfort, 2000]. W przypadku wiązania DsrA RNA z *hns* mRNA dochodzi więc do ograniczenia translacji i podniesienia stabilności mRNA [Lease i wsp., 1998].

Kolejnym ncRNA oddziałującym z *rpoS* jest OxyS RNA. Wpływa on na ograniczenie translacji poprzez interakcję z białkiem Hfq, prawdopodobnie w wyniku blokowania wiązania DsrA oraz RprA lub przez bezpośrednie wiązanie do RBS [Altuvia i wsp., 1998].

Dlaczego *E.coli* wykorzystuje trzy cząsteczki ncRNA do regulacji poziomu jednej cząsteczki? Odpowiedzią na to pytanie może być fakt, że DsrA, RprA oraz OxyS RNA ulegają ekspresji w różnych warunkach. DsrA RNA akumuluje się w niskiej temperaturze, RprA ulega ekspresji w warunkach stresu osmotycznego, podczas gdy OxyS RNA jest indukowany przez stres oksydacyjny. Te trzy ncRNA wywołują jednak odpowiedni efekt- aktywację lub inhibicję translacji *rpoS*, w różnych warunkach środowiskowych, integrując w ten sposób specyficzne reakcje komórki w odpowiedzi na różne czynniki stresowe. Co najważniejsze, efekt ten jest szybki i nie wymaga wysokich nakładów energetycznych ze strony komórki.

2.3. Regulacja poziomu ncRNA

Regulacja ekspresji wielu ncRNA zachodzi na poziomie transkrypcji. Ekspresja DsrA RNA jest kontrolowana przez dwa czynniki: temperaturę i białko LeuO [Sledjeski i wsp., 1996; Klauck i wsp., 1997; Repoila i Gottesman, 2001; Majumder i wsp., 2001]. Stężenie DsrA RNA w komórce jest ok. dwudziestopięciokrotnie wyższe w temperaturze 20°C w porównaniu z komórkami hodowanymi w temperaturze 37°C [Sledjeski i wsp., 1996, Repoila i Gottesman, 2001]. Podniesiony poziom akumulacji DsrA jest wynikiem zarówno podwyższonego poziomu transkrypcji genu *dsrA*, jak również wyższej stabilności DsrA RNA [Sledjeski i wsp., 1996, Repoila i Gottesman, 2001]. Wydaje się, że DsrA RNA działa jako swoisty "termometr komórkowy" kontrolujący ekspresję genu *rpoS* [Repoila i Gottesman, 2001].

Niezależna od temperatury regulacja genu *dsrA* zachodzi na poziomie hamowania transkrypcji poprzez białko LeuO [Klauck i wsp., 1997]. Chociaż wydaje się, że ekspresja genu *leuO* podlega regulacji w czasie fazy stacjonarnego wzrostu oraz w wyniku odpowiedzi na niedostatek aminokwasów w komórce, jego dokładna rola w regulacji poziomu DsrA RNA nie jest do końca jasna [Klauck i wsp., 1997; Fang i wsp., 2000]. Analiza mutacyjna



promotora *dsrA* sugeruje, że zawiera on dwa różne miejsca aktywacji transkrypcji (ang. *transcription activating region*), które mogą odpowiadać na nieznaną dotychczas regulatory lub sygnały [Repoila i Gottesman, 2001]. Transkrypcja dwóch pozostałych regulatorów ekspresji *rpoS*: OxyS oraz RprA zależy bezpośrednio od stresu oksydacyjnego oraz zmian zachodzących na powierzchni komórki. Te ncRNA pozwalają na precyzyjną regulację translacji *rpoS* w zależności od różnych warunków środowiskowych. Jest ona podobna do wpływu MicF RNA na translację genu *ompF*, gdzie promotor genu *micF* regulowany jest przynajmniej przez cztery różne czynniki transkrypcyjne [Pratt i wsp., 1996; Delihias i wsp., 1997; Delihias i wsp., 2001].

Jak wspomniano, poziom większości ncRNA regulowany jest na etapie transkrypcji lub poprzez zmianę stabilności RNA. Mogą one również odpowiadać bezpośrednio na sygnały środowiskowe, takie jak temperatura - tzw. termoczuJNIki lub wiązać małe cząsteczki sygnałowe - ryboprzełączniki (Załącznik 1).

W odmienny sposób działają dwa inne regulatorowe RNA zaangażowane w sekwestrację białek regulatorowych. Białka niezbędne do magazynowania glikogenu w komórce kodowane są przez operon *glgCAP*. W proces regulacji glikogenu w komórce zaangażowane są: CsrA-białko wiążące RNA oraz CsrB RNA- produkt genu *glgCAP*, cząsteczka o długości nukleotydów 363 z 18-nukleotydowym motywem wiążącym CsrA [Altuvia i wsp, 1997, Liu i wsp., 1997]. CsrA oddziałuje z docelowym mRNA powodując albo jego gwałtowną degradację, albo w niektórych przypadkach, aktywację translacji prowadząc tym samym do obniżenia wewnątrzkomórkowego poziomu glikogenu. Kiedy stężenie CsrB osiąga wysoki poziom w komórce, CsrA zostaje zaangażowany w tworzenie kompleksu globularnego z docelowym RNA. Tak więc, CsrB RNA wpływa na aktywność białka CsrA poprzez kontrolowanie poziomu i dostępności niezwiązanych cząsteczek CsrA [Gudapaty i wsp., 2001]. Prowadzi to do podniesienia stabilności i poziomu translacji mRNA *glgCAP*, a tym samym do podniesienia poziomu glikogenu w komórce.

Podobny mechanizm działania zaproponowano dla 6S RNA [Wassarman i Storz, 2000]. 6S RNA został po raz pierwszy zidentyfikowany jako mały, stabilny RNA, jednak jego funkcja pozostała nieznaną przez wiele lat [Hindley, 1967]. Ostatnio pokazano, że 6S RNA wiąże się specyficznie do polimerazy RNA *E.coli*, ale tylko kiedy znajduje się ona w kompleksie z głównym wegetatywnym czynnikiem sigma 70. Wykazano jednocześnie, że 6S RNA nie wiąże się do polimerazy RNA będącej w kompleksie z alternatywnymi czynnikami sigma [Wassarman i Storz, 2000]. Czynniki sigma zaangażowane są w rozpoznawanie promotora, tak więc sekwestracja kompleksu sigma 70/polimeraza RNA przez 6S RNA prowadzi do

W niniejszym artykule przedstawiono wyniki badań nad rolą białka p53 w procesie regulacji transkrypcyjnej. Białko p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym, który może indukować ekspresję genów, które hamują proliferację komórek i promują apoptozę. W tym celu przeprowadzono badania nad wpływem białka p53 na transkrypcję genów, które kodują białka hamujące proliferację i indukcję apoptozy. Wyniki badań wykazały, że białko p53 może indukować ekspresję genów, które hamują proliferację i indukcję apoptozy. Wyniki te sugerują, że białko p53 może być ważnym czynnikiem regulującym transkrypcję genów, które hamują proliferację i indukcję apoptozy.

1997; Dabala i wsp. 2001

W niniejszym artykule przedstawiono wyniki badań nad rolą białka p53 w procesie regulacji transkrypcyjnej. Białko p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym, który może indukować ekspresję genów, które hamują proliferację komórek i promują apoptozę. W tym celu przeprowadzono badania nad wpływem białka p53 na transkrypcję genów, które kodują białka hamujące proliferację i indukcję apoptozy. Wyniki badań wykazały, że białko p53 może indukować ekspresję genów, które hamują proliferację i indukcję apoptozy. Wyniki te sugerują, że białko p53 może być ważnym czynnikiem regulującym transkrypcję genów, które hamują proliferację i indukcję apoptozy.

1997; Dabala i wsp. 2001

W niniejszym artykule przedstawiono wyniki badań nad rolą białka p53 w procesie regulacji transkrypcyjnej. Białko p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym, który może indukować ekspresję genów, które hamują proliferację komórek i promują apoptozę. W tym celu przeprowadzono badania nad wpływem białka p53 na transkrypcję genów, które kodują białka hamujące proliferację i indukcję apoptozy. Wyniki badań wykazały, że białko p53 może indukować ekspresję genów, które hamują proliferację i indukcję apoptozy. Wyniki te sugerują, że białko p53 może być ważnym czynnikiem regulującym transkrypcję genów, które hamują proliferację i indukcję apoptozy.

1997; Dabala i wsp. 2001

W niniejszym artykule przedstawiono wyniki badań nad rolą białka p53 w procesie regulacji transkrypcyjnej. Białko p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym, który może indukować ekspresję genów, które hamują proliferację komórek i promują apoptozę. W tym celu przeprowadzono badania nad wpływem białka p53 na transkrypcję genów, które kodują białka hamujące proliferację i indukcję apoptozy. Wyniki badań wykazały, że białko p53 może indukować ekspresję genów, które hamują proliferację i indukcję apoptozy. Wyniki te sugerują, że białko p53 może być ważnym czynnikiem regulującym transkrypcję genów, które hamują proliferację i indukcję apoptozy.

obniżenia poziomu transkrypcji promotorów sigma 70, a co za tym idzie - do szerokich zmian w profilu ekspresji genów [Wassarman i Storz, 2000]. Większość z tych zmian powoduje podniesienie poziomu ekspresji genów fazy stacjonarnej.

Powyższe przykłady to jedyne znane do tej pory przypadki, kiedy poziom dwóch docelowych białek jest regulowany bezpośrednio przez wiązanie ncRNA [Weilbacher i wsp., 2002; Moll i wsp., 2003; Wassarman i Storz, 2006]. Obydwie cząsteczki reprezentują grupę bardzo zachowawczych regulatorowych RNA.

NcRNA zaangażowane są w procesy posttranskrypcyjne regulujące ekspresję pojedynczych genów lub przynajmniej pierwszych genów w obrębie operonu. Mogą one wpływać także na procesy regulacyjne, kiedy celem ncRNA jest region RBS położony poniżej otwartej ramki odczytu policistronowego mRNA [Ikemura i Dahlberg, 1973]. Prowadzi to w efekcie do zaburzenia koordynacji w ekspresji, czasem nawet funkcjonalnie pokrewnych białek kodowanych przez ten sam operon.

Jednym z takich RNA jest 109-nukleotydowy Spot 42, cząsteczka zidentyfikowana już w 1973 roku [Ikemura i Dahlberg, 1973]. Występuje ona w ogromnej liczbie kopii w komórce, jej funkcja jednak do dzisiaj jest niejasna. Wykazano, że Spot 42 RNA zaangażowany jest w regulację ekspresji cistronów operonu *galETKM*, odpowiedzialnych za ekspresję genów związanych z metabolizmem galaktozy [Moller i wsp., 2002]. Poziom UDP-epimerazy galaktozy w komórce (produkt *galE*- pierwszego genu w operonie) w porównaniu do stężenia galaktokinazy (produkt *galK*- trzeciego genu w operonie) podlega wahaniom. Kiedy stężenie cAMP jest niskie, poziom GalE:GalK jest wysoki. Translacja położonych powyżej regionu RBS ramek odczytu nie ulega zmianie, a poziom GalK:GalE w takiej sytuacji ulega obniżeniu. Proces ten ma sens fizjologiczny, ponieważ galaktokinaza niezbędna jest jedynie wówczas, kiedy galaktoza dostępna jest jako produkt metaboliczny. Gdy komórki bakteryjne wykorzystują do rozwoju glukozę dochodzi do podniesienia poziomu syntezy ncRNA oraz jego obniżenia w przypadku pojawienia się mniej faworyzowanego źródła węgla [Sahagan i Dahlberg, 1979].

Spot 42 RNA wpływa również na obniżenie ekspresji komponentów operonu *sucABCD*, kodujących enzymy cyklu kwasów trójkarboksylowych [Sahagan i Dahlberg, 1979].

90-nukleotydowy RhyB RNA należy do grupy ncRNA, które wpływają na regulację poziomu żelaza w komórce. Jego transkrypcja regulowana jest przez żelazo, a podlega represji przez białko Fur, kiedy stężenie żelaza w komórce jest wysokie. Poziom Fe^{+2} musi podlegać ścisłej regulacji, ponieważ jego nadmiar może prowadzić do poważnych uszkodzeń komórki, z drugiej jednak - jest jednym z kluczowych składników odżywczych. U *E. coli*, kiedy żelaza



jest pod dostatkim represor Fur wiąże Fe^{+2} i podlega aktywacji, w przypadku ograniczenia stężenie żelaza, Fur nie wpływa na represję transkrypcji, a znaczna liczba genów w regulonie Fur, kodujących białka zaangażowane w przyswajanie żelaza, podlega aktywacji [Masse i Gottesman, 2002]. Zidentyfikowano, że region RhyB komplementarny względem regionu RBS drugiego cistronu operonu *sdhCDAB*. Geny *sdh* i ich produkty są niezbędne dla wzrostu komórek bakteryjnych w obecności pirogronianu. W tym wypadku aktywacja *sdhD* zachodzi w wyniku represji transkrypcji RhyB [Masse i Gottesman, 2002].

2.4. Białko Hfq

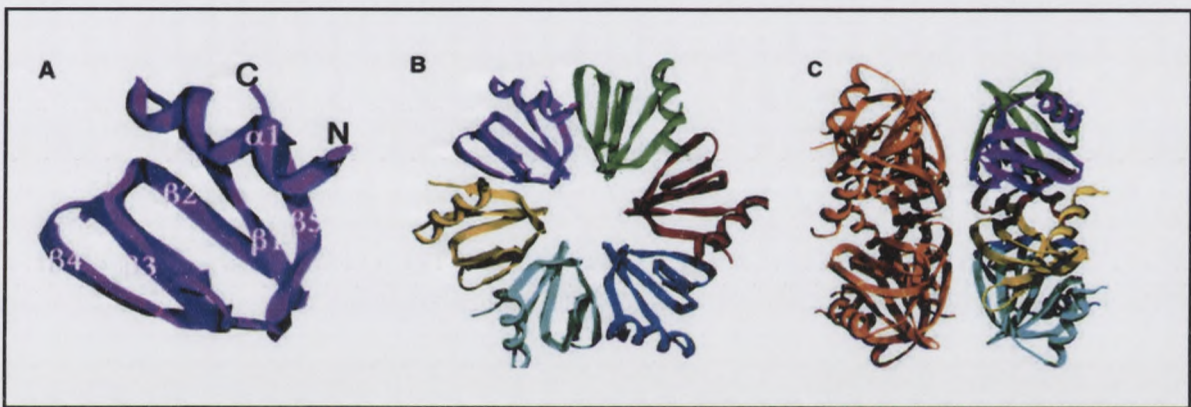
Grupa opisanych powyżej cząsteczek RNA wiążąc się z daną cząsteczką docelową wywołuje wysoce specyficzny efekt. Zakres takiego parowania, niezbędny do oddziaływań początkowych, nie został dotychczas zbadany szczegółowo dla żadnej cząsteczki ncRNA. Jeden lub dwa regiony, każdy składający się z 8-9 reszt nukleotydowych, są wystarczające dla rozpoczęcia specyficznej regulacji. Postuluje się, zarówno w przypadku transkryptów z grupy *cis* jak i *trans*, że krótkie fragmenty zaangażowane są w procesy inicjujące oddziaływania międzycząsteczkowe. Znajdują się one najczęściej w obrębie pętli struktur helikalnych i mogą ulec wydłużeniu do dłuższych fragmentów zaangażowanych w wiązanie. Znanych jest wiele białek wiążących RNA, np. Hfq, białko opiekuńcze StpA (ang. *protein chaperone*), białko HU (ang. *histone-like*) czy regulator transkrypcyjny H-NS [Waldsich i wsp., 2002; Cusick i Belfort, 1998; Balandina i wsp., 2002]. Białka te są niezwykle liczne w komórce, poczynając od 20-30000 (StpA, H-NS) do około 50000 (Hfq, HU) cząsteczek w komórce [Ali Azam i wsp., 1999]. Cząsteczki te wpływają bezpośrednio lub też pośrednio na regulację z udziałem ncRNA. Wykazano, że *in vivo* od ich aktywności zależy działanie takich regulatorów jak m.in. DsrA, RprA, RhyB, OxyS oraz Spot 42 RNA [Majdalani i wsp., 2001; Sledjeski i wsp., 2001; Masse i Gottesman, 2002; Moller i wsp., 2002; Zhang i wsp., 2002].

Hfq, znane również jako czynnik I (HE I, ang. *host factor I*), zostało zidentyfikowane u *E.coli* jako białko wiążące RNA, niezbędne dla replikacji *in vitro* bakteriofaga RNA-Q β [Cusick i Belfort, 1998; Balandina i wsp., 2002]. Regulatorowy efekt Hfq zaobserwowano również u innych gram-ujemnych bakterii, włącznie z *Brucella* oraz *Azorhizobium* [Massire i wsp., 1998; Batey i wsp., 2000; Wassarman i Storz, 2000; Repoila i Gottesman, 2001].

Białko to składa się z 77 reszt aminokwasowych, a jego masa wynosi 11,2 kDa. Tworzy ono heksameryczny pierścień o wysokości ≈ 23 Å i średnicy ≈ 65 Å. Każda podjednostka budująca strukturę białka Hfq składa się z 5 antyrównoległych elementów β -harmonijki (Ryc. 9) [Deighan i wsp., 2000; Moller i wsp., 2002; Sauter i wsp., 2003; Valentin-Hansen i wsp.,



2004]. Hfq jest odporne na działanie wysokiej temperatury, a jego ekspresja dochodzi do 55000 kopii na komórkę [Sledjeski i wsp., 2001; Zhang i wsp., 2002]. Obrazy mikroskopii elektronowej oraz struktury krystalograficzne pokazują, że białko Hfq o budowie pierścieniowej wykazuje homologię strukturalną do eukariotycznej rodziny białek Sm oraz „Sm-like”, biorących udział w składaniu RNA [Schumacher i wsp., 2002; Sun i wsp., 2002; Sauter i wsp., 2003]. Białka z rodziny Sm zawierają dwa regiony konserwatywne nazywane motywami Sm 1 oraz Sm 2. Są one oddzielone od siebie przez fragment, który nie jest zachowawczy pod względem sekwencji czy długości i nazywany jest regionem zmiennym [Cooper i wsp., 1995, Hermann i wsp., 1995; Séraphin i wsp., 1995].



Ryc. 9. Struktura białka Hfq. A) Monomer Hfq przedstawiony jako model β -harmonijki. B) Struktura heksamerycznej formy Hfq. Każda podjednostka została zaznaczona innym kolorem. C) dwie formy heksameryczne przedstawione w asymetrycznej jednostce krystalograficznej. Widok odwrócony o 90° względem osi pionowej [Schumacher i wsp., 2002].

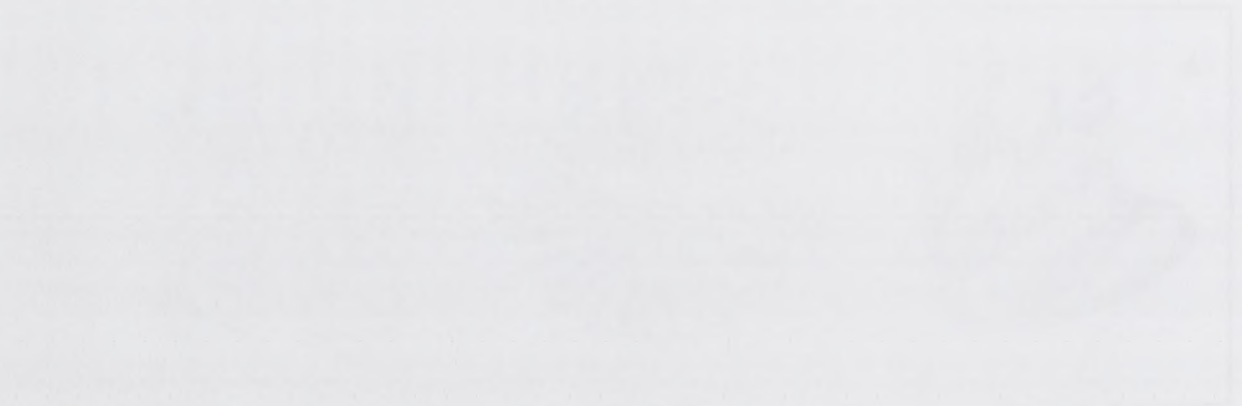
Struktura krystaliczna białek z rodziny Sm pokazuje, że zawierają one α -helisę na N-końcu cząsteczki, a następnie region zmienny o strukturze pięcioczłonowej harmonijki [Schumacher i wsp., 2002].

Kokrystalizacja Hfq heksameru, w miejscu, gdzie ma on ładunek dodatni z krótkim RNA pokazała, że RNA wiąże się w pobliżu centralnej części (Ryc. 10).

Jest to jednocześnie specyficzne dla jednej powierzchni heksameru [Schumacher i wsp., 2002]. Region ten odpowiada motywom Sm1 oraz Sm2 białka Hfq, jak również silnie konserwatywnej reszcie Gln8 obecnej w helisie α -1 [Schumacher i wsp., 2002], (Ryc.11).

Faint, illegible text at the top of the page, possibly a header or title.

Several lines of faint, illegible text in the upper middle section of the page.



Several lines of faint, illegible text in the lower middle section of the page.

Faint, illegible text at the bottom of the page, possibly a footer or concluding text.

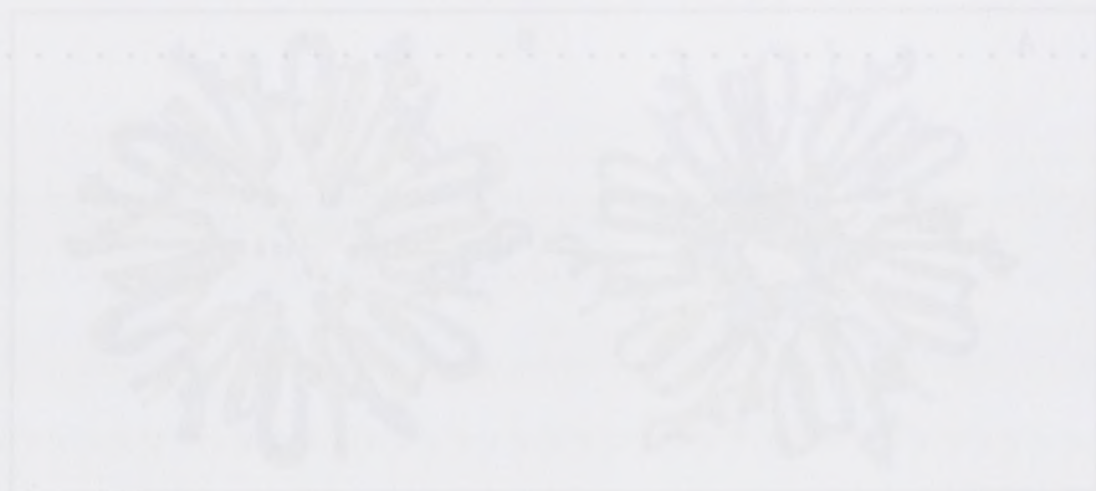


Fig. 10. Schematic representation of the microfibrillar structure in the cell wall of a plant cell. The left diagram shows a regular lattice structure, the right diagram shows an irregular structure. The microfibrils are represented by the lines.

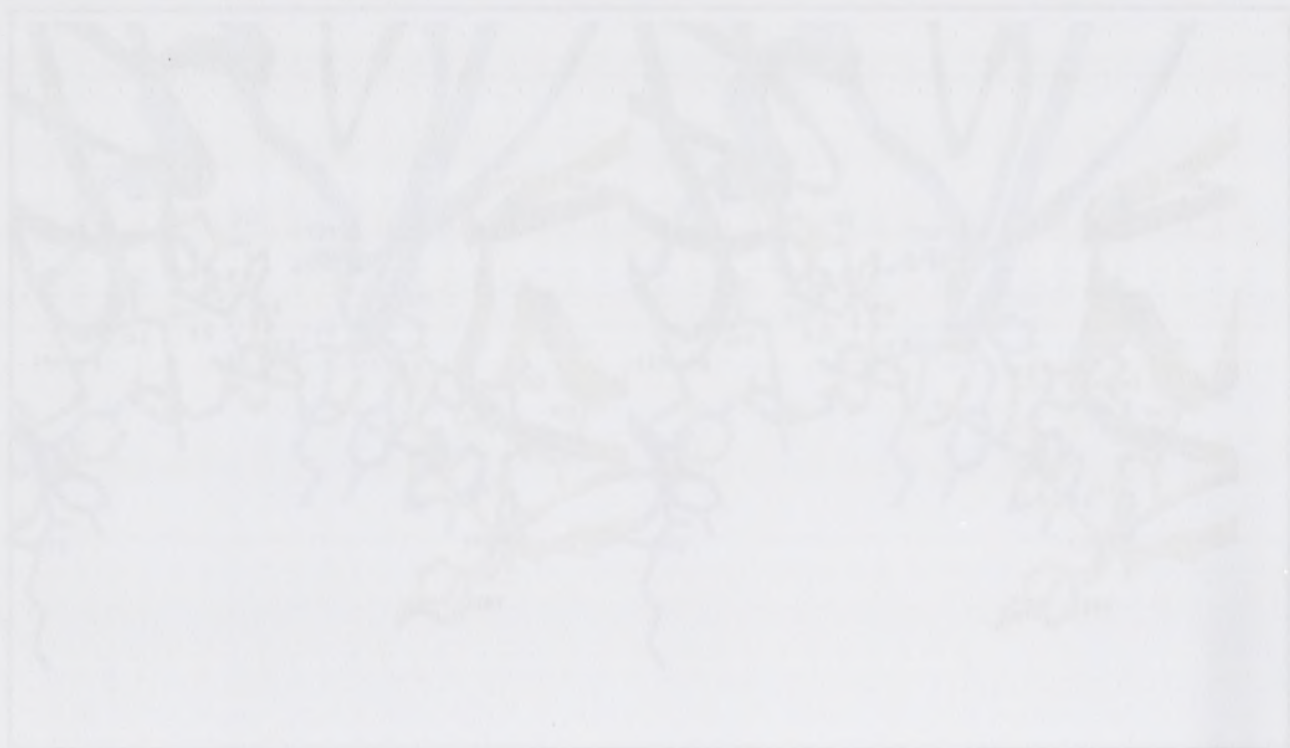


Fig. 11. Schematic representation of the microfibrillar structure in the cell wall of a plant cell. The microfibrils are represented by the lines. The diagram shows a complex network of microfibrils, which is characteristic of the cell wall of a plant cell.

Białka Sm zawierają również drugie miejsce wiązania RNA, poza miejscem wiążącym poliU [Thore i wsp., 2002]. W przypadku, kiedy Hfq wzmacnia oddziaływania międzycząsteczkowe (OxyS/fhlA mRNA, rpoS mRNA, Spot42/galK mRNA czy DsrA/rpoS mRNA) dwa heksamery białka Hfq z jednoniciowym fragmentem RNA mogą być związane do powierzchni kationowej razem formując dodekamer [Schumacher i wsp., 2002].

U *E. coli* Hfq podnosi poziom poliadenylacji mRNA oraz wpływa na wiązanie rybosomu [Vytvytska i wsp., 2000]. Wiąże się ono do krótkiego regionu polyA w *ompA* RNA i ułatwia jego wydłużanie przez polimerazę I (PAP I, ang. *polyadenylate polymerase*) [Hajnsdorf i wsp., 2000]. Wydłużony "ogon" poliA prowadzi do obniżenia stabilności mRNA *ompA*. Hfq wiąże się również do końca 5' mRNA *ompA*, blokuje region RBS, co prowadzi do obniżenia wydajności translacji [Hajnsdorf i wsp., 2000; Vytvytska i wsp., 2000]. Białko to wpływa także na obniżenie poziomu i stabilności jego własnych mRNA, w tym *miaA*, odpowiedzialnego za modyfikację tRNA oraz *mutS*- zaangażowanego w naprawę DNA [Tsui i wsp., 1997].

Oprócz wiązania i zmiany poziomu translacji mRNA, Hfq wpływa na zmianę wewnątrzcząsteczkowych oddziaływań faga Q β . W tym wypadku Hfq działa jako białko opiekuńcze RNA. Przypuszcza się, że Hfq wiąże koniec 3' tzw. nici „plus” faga, powoduje stopienie struktury drugorzędowej RNA, co pozwala na dalszą replikację i syntezę nici „minus” [Sledjeski i Gottesman, 1995].

Hfq wiąże się zarówno do mRNA jak i do ncRNA. Wykazano, że Hfq stymuluje *in vitro* oddziaływanie z docelowym mRNA zarówno Spot42, OxyS jak i RhyB RNA [Wachi i wsp., 1999; Zhang i wsp., 2002; Geisman i Touati, 2004]. Sugeruje się dwojaką rolę Hfq w takim działaniu: pierwszy model zakłada, że interakcja pomiędzy RNA a Hfq podnosi lokalne stężenie, wspomagając tym samym oddziaływanie RNA:RNA. Dla przykładu, jeśli jeden pierścień Hfq wiąże się z ncRNA, a drugi z docelowym mRNA, wiązanie pomiędzy obydwoma pierścieniami może wywołać reakcję, w którą zaangażowane będą cząsteczki RNA. Ponieważ nie jest do końca jasne, w jaki sposób właściwe pierścienie Hfq odnajdują się nawzajem prawdopodobnie oddziaływanie Hfq:Hfq mogą stabilizować reakcje zachodzące właśnie bezpośrednio pomiędzy cząsteczkami RNA. Drugi model sugeruje raczej opiekuńczą rolę białka Hfq. Białko wiążąc się do ncRNA lub do mRNA może zmieniać lub stabilizować strukturę RNA, uwydatniając jedynie region komplementarny i ułatwiając parowanie obu cząsteczek RNA [Brescia i Sledjeski, 2003].

1950

1950

1950

1950

1950

1950

1950

1950

1950

1950

1950

1950

1950

1950

1950

1950

1950

1950

1950

1950

1950

1950

1950

1950

1950

1950

1950

1950

1950

1950

Pomimo faktu, że białko Hfq jest niezbędne do regulacji translacji *hns* i *rpoS* przez DsrA RNA, przypuszcza się, że wiązanie białka nie powoduje zmian strukturalnych DsrA RNA. Jako, że DsrA RNA bezpośrednio wiąże *rpoS* i *hns* mRNA, dodatkową rolą Hfq mogłoby w tym wypadku być ułatwianie oddziaływań międzycząsteczkowych RNA.

Hfq nie destabilizuje struktury OxyS, wykazano jedynie subtelne zmiany strukturalne w czasie wiązania Hfq [Zhang i wsp., 2002].

Prawdopodobnie Hfq pełni również inne role, oprócz wpływu na zmianę struktury RNA lub ułatwianie oddziaływania pomiędzy dwiema cząsteczkami RNA. Sugeruje się także, że Hfq posiada aktywność ATPazy oraz zdolność do asocjacji z białkiem rybosomalnym S1, poprzez związanie z polimerazą RNA [Sukhodolets i Garges, 2003].

Chociaż wymienione wyżej ncRNA wymagają i oddziałują z Hfq, efekt powodowany przez te cząsteczki na docelowe mRNA jest różny. Jedna cecha pozostaje zawsze wspólna: zmiany strukturalne prowadzą do zmian w poziomie translacji i *vice versa*. Parowanie może zmienić strukturę docelowych mRNA lub ncRNA. Dla transkryptów z grupy *cis* oddziaływanie może wpłynąć na terminację transkrypcji, jak również na poziom translacji i stabilność mRNA [Wagner i Brantl, 1998; Gerdes i wsp., 1997; Brantl, 2002; Gottesman, 2002]. Oddziaływanie takie może również zmienić dostępność rybosomu poprzez degradację mRNA. W niektórych przypadkach parowanie może wspomóc dostępność rybosomu, jak w omówionej wyżej regulacji *RpoS* przez DsrA [Majdalani i wsp., 2002]. Wykazano także, że DsrA RNA może wiązać się bezpośrednio do podjednostki 30S rybosomu [Worhunsky i wsp., 2003]. Wiązanie to może lokalnie podnieść stężenie DsrA RNA w pobliżu miejsca podlegającego translacji, nie jest jednak jasne, czy jest to niezbędne dla aktywności DsrA RNA *in vivo*.

Oddziaływanie z Hfq może także prowadzić do gwałtownej degradacji mRNA, jaką obserwuje się w przypadku *RhyB* [Masse i wsp., 2003]. Brak jest dowodów na to, czy degradacja jest pośrednia, a jej konsekwencją jest blokowanie dostępu do rybosomu, wiadomo jednak, że proces ten jest nieodwracalny [Masse i wsp., 2003]. Badania pokazują, że Hfq wiąże się do regionów RNA bogatych w reszty adenozyliny i urydyny (poliA i poliU) silniej niż do sekwencji poliG czy poliC [Carmichael i wsp., 1975; de Haseth i Uhlenbeck, 1980]. W przypadku regionu poliA, duże znaczenie odgrywa długość takiego fragmentu. Obserwowano dziesięciokrotnie silniejsze wiązanie 18-nukleotydowego poliA w porównaniu z 15-merowym fragmentem [de Haseth i Uhlenbeck, 1980]. Nie wiadomo, czy taka sama zależność dotyczy poliG i poliC. Badania z udziałem cząsteczek Spot42, OxyS i DsrA RNA pokazały, że Hfq wykazuje preferencje do wiązania się w regionach jednoniciowych bogatych w reszty A/U oskrzydłonych elementami strukturalnymi o charakterze spinki do włosów



[Brescia i wsp., 2002; Moller i wsp., 2002; Zhang i wsp., 2002]. DsrA RNA zawiera trzy strukturalne i funkcjonalne domeny: domena I- zaangażowana w regulację *rpoS*, II- z regionem oddziałującym z *hns* mRNA oraz zawierającym sekwencje bogate w A/U potencjalnie wiążące Hfq i domena III- terminator transkrypcji [Majdalani i wsp., 1998]. Sugeruje się, że białko Hfq wiąże się do regionu A/U w obrębie domeny II, jednak analizy mutacyjne pokazują, że sekwencja ta nie jest wystarczająca do wiązania tego białka do DsrA RNA [Brescia i wsp., 2002]. Wydaje się, że Hfq początkowo tylko wiąże się do regionu A/U w obrębie domeny II, ale w silne wiązanie muszą być zaangażowane oddziaływania w obrębie drugo- i trzeciorzędowej struktury RNA.

Wykazano również, że RNaza E odgrywa znaczącą rolę w oddziaływaniach Hfq-ncRNA. Interesujące, że motywem rozpoznającym dla RNazy E jest również jednoniciowy region bogaty w reszty A/U. Wykazano tym samym, że Hfq oraz RNaza E przynajmniej czasami rozpoznają te same cząsteczki docelowe [Masse i wsp., 2003; Moll i wsp., 2003; Zhang i wsp., 2003]. Jest więc prawdopodobne, że wiele, jeśli nie wszystkie, miejsca wiązania Hfq, mogą być również potencjalnymi celami RNazy E i odwrotnie. Równowaga pomiędzy ilością cząsteczki a specyficznym powinowactwem może być zdeterminowana tym, jak bardzo wiązanie Hfq ochrania ncRNA przed RNazą E [Masse i wsp., 2003; Moll i wsp., 2003; Zhang i wsp., 2003].

2.5. Struktury ncRNA

Większość zidentyfikowanych regulatorowych bakteryjnych RNA to cząsteczki małe o wielkości 60-200 nukleotydów. Dla kilku z nich na podstawie danych eksperymentalnych lub też na podstawie algorytmów bioinformatycznych zaproponowano struktury drugorzędowe. Podobnie do antysensowych RNA transkrybowanych w układzie *cis*, struktury ncRNA bardzo często zawierają elementy o charakterze spinki do włosów, najczęściej związane z elementami o mniej stabilnej strukturze drugorzędowej. Regiony ważne dla oddziaływań z docelowym RNA są najczęściej ulokowane w obrębie jednoniciowej pętli lub w łącznikach pomiędzy spinkami. Wyjątkiem jest tutaj DsrA RNA, którego sekwencje komplementarne względem docelowych mRNA znajdują się w obrębie dwóch z trzech spinek. W takim wypadku uwolnienie struktury przez Hfq lub inne białka jest konieczna dla wyeksponowania nukleotydów zaangażowanych w oddziaływanie. Niezbędne dla pełnienia odpowiednich funkcji przez regulatorowe RNA jest korelacja sekwencji z właściwą strukturą drugorzędową. Krótkie fragmenty komplementarne mogą być wykorzystane w oddziaływaniach tylko wtedy,

... (faint text) ...

... (faint text) ...

2.2. *Subsequent work*

... (faint text) ...

kiedy znajdują się w odpowiednim kontekście strukturalnym [Rivas i wsp., 2001; Carter i wsp., 2001].

Zdefiniowane, często kompaktowe struktury drugorzędowe mogą sugerować, że ncRNA są metabolicznie stabilne i ulegają długiemu rozpadowi. Rzeczywiście, większość z opisanych powyżej ncRNA wykazuje się długim okresem półtrwania wynoszącym 20-60 minut [Wagner i Vogel, 2003]. Niektórym z nich dodatkową stabilizację zapewnia wiązanie białka. Brak białka Hfq powoduje, że np. Spot 42 RNA jest całkowicie niestabilny [Moller i wsp., 2002; Zhang i wp., 2002].

DsrA RNA wykazuje pełen zakres stabilności w zależności od warunków. Kiedy działa jako regulator w niskiej temperaturze jego okres półtrwania wynosi 23 minuty, podniesienie temperatury do 37°C obniża jednak tę wartość do 4 minut.

2.6. Poszukiwanie genów dla ncRNA

Proces poszukiwania genów RNA jest bardzo złożony. Obecnie nie ma skutecznych metod pozwalających na oszacowanie ich liczby w genomie. Większość z cech charakterystycznych dla genów kodujących białka i używanych w metodach bioinformatycznych generalnie nie znajduje zastosowania w poszukiwaniach genów ncRNA. Jedną z cech strukturalnych, która umożliwiłaby rozpoznanie danego genu jest otwarta ramka odczytu oraz związane z nią parametry statystyczne, jak np. wykorzystanie kodonu. Sekwencje promotorowe i sygnały terminacyjne powinny występować w każdym genie, bez względu na właściwości związane z kodowaniem białka, ncRNA u eukariontów mogą być jednak kodowane przez trzy typy polimeraz. Sygnały poliadenylacji, splicingowe miejsca donorowe czy akceptorowe ograniczają dodatkowo poszukiwanie ncRNA podobnych do mRNA (mRNA-like). Problem definicji ncRNA może być jeszcze bardziej skomplikowany poprzez fakt, że ncRNA mogą na zasadzie prostego podobieństwa i porównania z innymi znanymi genami mieć również ograniczoną wartość, ponieważ funkcjonalne cząsteczki RNA zwykle wykazują tendencję do zachowania raczej struktury drugorzędowej, a nie sekwencji nukleotydowej. Taka cecha mogłaby być więc wykorzystana do identyfikacji genów homologicznych.

Najlepszym kryterium identyfikacji ncRNA wydaje się być obecnie specjalizacja tych cząsteczek. Programy poszukujące genów zaprojektowane dla wykrywania jednej specyficznej klasy RNA biorą pod uwagę zachowawcze elementy sekwencyjne, cechy struktury drugorzędowej lub jedno i drugie kryterium równocześnie. Ta metodologia znajduje zastosowanie w programach do poszukiwania tRNA, jak np. tRNAscan [Fischer i Burks, 1991], Pol3Scan [Pavesi i wsp., 1994] oraz COVE [Eddy i Durbin, 1994]. Obserwację, że



miRNA powstają z dłuższych prekursorów formujących strukturę spinki do włosów wykorzystano w poszukiwaniu tych cząsteczek u kręgowców [Lim i wsp., 2003]. Inne programy wykorzystują obecność specyficznych motywów pierwszo- lub drugorzędowych pełniących rolę deskryptorów domen [Gautheret, 1990; Winkler, 1990; Macke, 2001]. Ta metoda, pomimo wąskiej specjalizacji, nakierowanej na identyfikację jednej klasy RNA, wykorzystuje jednak podstawową wiedzę o cząsteczkach, które są obiektem badań.

Odrębnym problemem jest poszukiwanie nowych genów ncRNA, które nie posiadają homologii strukturalnej czy sekwencyjnej. Niektóre metody opierają się na założeniu, że sekwencje funkcjonalnych cząsteczek RNA powinny tworzyć bardziej stabilne struktury drugorzędowe [Le i wsp., 1990]. Przeszukiwanie sekwencji genomowych z zastosowaniem modyfikowanych metod z aplikacjami stochastycznymi doprowadziło do stwierdzenia, że przewidywane struktury drugorzędowe z sekwencji przypadkowej (ang. *random*) i rzeczywistej są nierozróżnialne [Rivas i Eddy, 2000]. Wiele metod wykorzystuje obecnie skład zasad lub stosunek reszt G+C. To podejście, razem z genomiką porównawczą oraz weryfikacją eksperymentalną, zostało zastosowane do identyfikacji nowych ncRNA u *M. jannaschii* oraz *P. furiosus* [Klein i wsp., 2002]. Kombinacja statystyki składu zasad, cech sekwencji nukleotydowej oraz przewidywania struktur drugorzędowych została zastosowana do zdefiniowania sygnałów wyróżniających geny kodujące RNA oraz białka z pozostałego genomowego tła. Cechy sekwencyjne oraz elementy strukturalne poszczególnych cząsteczek RNA zostały również użyte do przeszukiwania genomów eubakteryjnych i archebakterii. Rezultaty tych badań pokazują, że sekwencje kodujące RNA w rzeczywistości zawierają informacje, które mogą być wykorzystane w identyfikacji genów. Przeszukiwanie genomu *E. coli* zaowocowało 370 potencjalnymi cząsteczkami ncRNA, z których istnienie kilku zostało potwierdzone eksperymentalnie [Carter i wsp., 2001]. Poszukiwanie promotorów RNA polimerazy III oraz analiza ekspresji na podstawie przerw w sekwencji (ang. *sequence gaps*) pomiędzy przewidywanymi otwartymi ramkami odczytu u drożdży pozwoliło na identyfikację nowych transkryptów ncRNA, jak również cząsteczek RNA zawierających małe ORF [Olivas i wsp., 1997]. Kilka nowych ncRNA zidentyfikowano u *E. coli* wykorzystując podobną metodę opartą na obecności sekwencji terminalnych i paromotorowych u *E. coli* [Argaman i wsp., 2001].

W sytuacji, kiedy zawodzą metody przeszukiwania pojedynczego genomu, pomocna jest genomika porównawcza. To podejście oparte jest na założeniu, że w genach kodujących homologiczne RNA zachodzą mutacje kompensacyjne stabilizujące strukturę drugorzędową RNA [Rivas i Eddy, 2001]. Ta metoda, zastosowana do przeszukiwania genomów *E. coli* i



pięciu innych enterobakterii wykazała istnienie 275 kandydatów do genów ncRNA [Rivas i wsp., 2001]. Szczegółowe eksperymenty potwierdziły, że niektóre z tych sekwencji są w rzeczywistości funkcjonalnymi genami ncRNA [Argaman i wsp., 2001; Wassarman i wsp., 2001].

... ..
... ..
... ..

1980

... ..

... ..

... ..

... ..

3. WYNIKI BADAŃ WŁASNYCH I DYSKUSJA

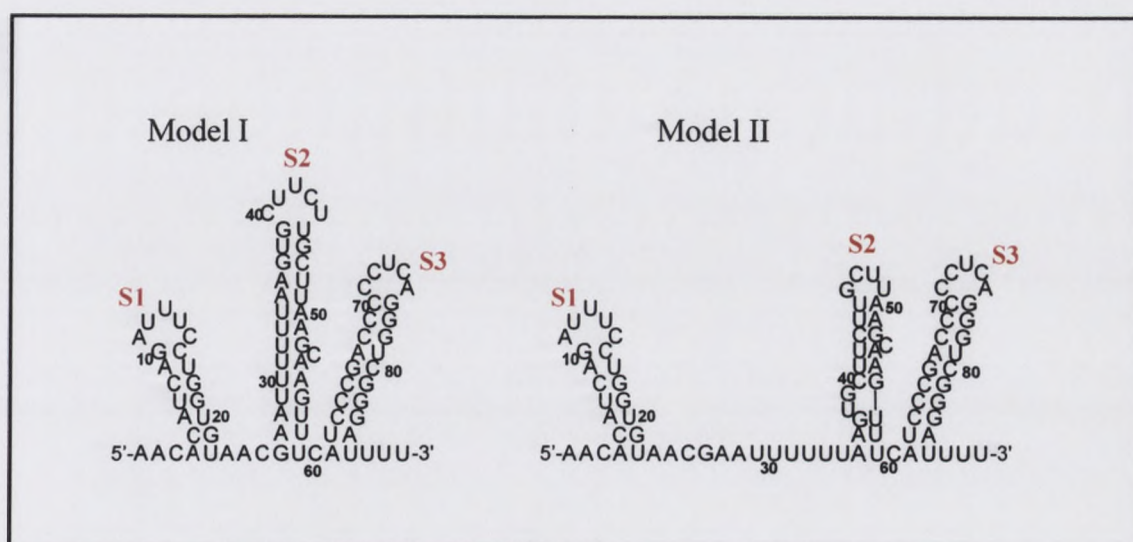
Od kilku lat niezwykle ważnym obiektem badań są cząsteczki niekodujących RNA. Celem ich jest identyfikacja nowych ncRNA, jak również ich charakterystyka pod względem strukturalnym i funkcjonalnym. Dotychczas jednak nie udało się znaleźć skutecznego sposobu ich identyfikacji *in silico*.

DsrA RNA stanowi kluczowy element w złożonym systemie regulacji poziomu transkrypcji w komórce bakteryjnej, dlatego też poznanie jej budowy jest niezbędne w badaniu funkcjonowania tej cząsteczki, w tym także oddziaływań z innymi RNA i białkami. Ze względu na ważną rolę, jaką odgrywa DsrA RNA w systemie regulacyjnym *E. coli*, cząsteczka ta jest intensywnie badana w wielu laboratoriach. U *E. coli* zidentyfikowano eksperymentalnie ponad 60 genów ncRNA, DsrA RNA może być więc modelem pozwalającym dodatkowo na poszukiwanie i optymalizację wypracowanych metod i narzędzi. Dla mechanizmów regulacji poprzez RNA działające na zasadzie antysensu, niezwykle ważne są zarówno sekwencja nukleotydowa danej cząsteczki, jak również jej cechy strukturalne. Wydaje się, że DsrA RNA pełni funkcje regulatorowe poprzez dwa fragmenty komplementarne względem docelowych mRNA. Odpowiednie sekwencje oraz elementy strukturalne są również kluczowe w oddziaływaniach z białkiem Hfq.

Dotychczas zaproponowano dwie struktury drugorzędowe DsrA RNA [Sledjeski i Gottesman, 1995; Majdalani i wsp. 1998; Lease i Belfort, 2000]. Pierwszy model zaproponowany został na podstawie analiz komputerowych, drugi - na podstawie hydrolizy enzymatycznej z wykorzystaniem rybonukleaz T1, V1, S1 oraz A. Obydwa modele zawierają trzy różne elementy o charakterze spinki do włosów: spinka pierwsza - nukleotydy 1-22, spinka trzecia - nukleotydy 59-87, oraz region jednoniciowy - 23-58 (Ryc.12).

Spinka pierwsza i trzecia są identyczne w obu przedstawionych strukturach, różnica dotyczy położenia i struktury spinki drugiej oraz regionu jednoniciowego, znajdującego się pomiędzy spinką pierwszą i drugą.

Pomimo poznania sekwencji ponad 220 genomów bakteryjnych, DsrA RNA zidentyfikowano tylko u *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica*, *Shigella sonnei* oraz *Shigella flexneri*. Dwa opisane wcześniej składniki systemu regulacyjnego z udziałem DsrA RNA: RpoS oraz Hfq są powszechne u wielu innych gatunków bakteryjnych, wysoce prawdopodobne jest związanie z tym systemem również DsrA RNA.



Ryc. 12. Proponowane struktury drugorzędowe dla DsrA RNA. Model I [Majdalani i wsp., 1998], model II [Lease i Belfort, 2000]. S1- spinka pierwsza, S2 - spinka druga, S3 - spinka trzecia.

Ze względu na brak skutecznej metody identyfikacji ncRNA w genomach bakteryjnych *in silico*, niezbędne jest także znalezienie deskryptora struktury drugorzędowej DsrA RNA – takiej domeny strukturalnej, która byłaby charakterystyczna i zachowawcza ewolucyjnie. Domena ta mogłaby stanowić klucz do poszukiwania ortologów genów DsrA RNA metodami *in silico* w obrębie innych genomów bakteryjnych.

W niniejszej pracy przeprowadziłam badanie struktury drugorzędowej DsrA RNA metodami analizy enzymatycznej - stosowanymi już wcześniej przez innych autorów [Majdalani i wsp., 1998; Lease i Belfort, 2000] oraz z użyciem RNazy H i DNAzymów - zastosowanymi po raz pierwszy do analizy struktury DsrA RNA [Rolle i wsp., 2006]. Przeprowadzono badanie kompleksów DsrA z białkiem Hfq, a następnie przeanalizowano miejsca wiązania białka Hfq z wykorzystaniem jonów ołowiu oraz wolnych rodników. Rezultaty analiz eksperymentalnych połączono z obliczeniami bioinformatycznymi, co w konsekwencji doprowadziło do zaproponowania nowej struktury drugorzędowej dla DsrA RNA.

Jak wspomniano wcześniej, DsrA RNA podlega indukcji w wyniku stresu temperaturowego, wpływa jednak na regulację poziomu ekspresji genu zaangażowanego w odpowiedź na stres oksydacyjny. Powszechnie wiadomo, że chemicznymi znacznikami tego procesu są między innymi 8-okso-deoksyguanozyna (8-oxo-dG) i kinetyna (K). W celu zbadania stabilności struktury DsrA RNA w obecności kinetyny i 8-oksoguaniny wykonano

analizy termodynamiczne warunków topnienia DsrA RNA. Przeprowadzono także wiązanie białka Hfq do DsrA RNA w obecności kinetyny jako kompetytora reakcji.

177

177

3.1. Analiza komputerowa

Do przewidywania struktury drugorzędowej DsrA RNA wykorzystano program Mfold 3.1, który przez minimalizację energii swobodnej i metodę najbliższego sąsiedztwa na podstawie sekwencji nukleotydowej proponuje szereg prawdopodobnych struktur RNA [Zucker, 2003].

Za pomocą programu wygenerowano dziesięć prawdopodobnych struktur drugorzędowych dla DsrA RNA (Ryc.13). Energię swobodną obliczoną dla proponowanych struktur przedstawia Tabela 4.

Tabela. 4. Wartości energii swobodnej (kcal/mol) dla struktur drugorzędowych DsrA RNA generowanych przez program Mfold

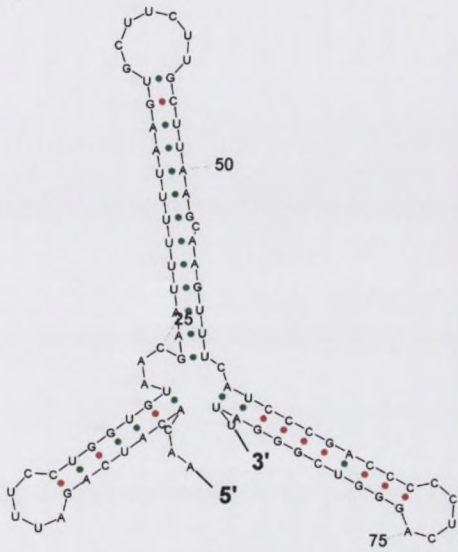
Struktura	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ΔG (kcal/mol)	-32.3	-30.9	-29.6	-28.3	-27.0	-25.7	-24.3	-23.0	-21.7	-19.1

Struktura drugorzędowa o najniższej wartości energii swobodnej proponowana przez program dla DsrA RNA (struktura nr 1), jest identyczna, jak w przypadku opisanego wcześniej modelu I [Sledjeski i Gottesman, 1995; Majdalani i wsp., 1998]. Lease i Belfort zaproponowali strukturę (Model II), której wartość energii swobodnej wynosi -23.9 kcal/mol. Jest to niemal najniższa energia, jaką proponuje program Mfold dla struktury DsrA RNA. Ponadto, żadna ze struktur wygenerowanych przez program nie była podobna do Modelu II [Lease i Belfort, 2000].

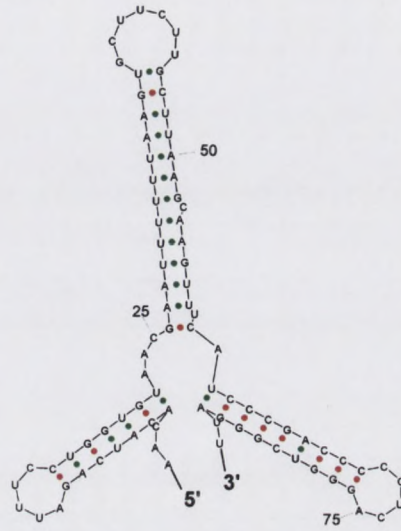
Dodatkowo wykonano obliczenia wartości energii swobodnej dla poszczególnych regionów struktury DsrA RNA. Wykazały one, że fragmenty sekwencji w pozycji 1-22 tworzą spinę o energii -7,10 kcal/mol, a odcinek 61-87 formuje niezwykle stabilną strukturę spinkową o energii -19 kcal/mol. Struktura obydwu elementów była identyczna, zarówno w przypadku Modelu I jak i II.

Region centralny (nukleotydy 23-59) wykazuje natomiast większą zmienność, a zgodnie z przewidywaniami programu możliwe jest tworzenie czterech alternatywnych struktur (Ryc.14).

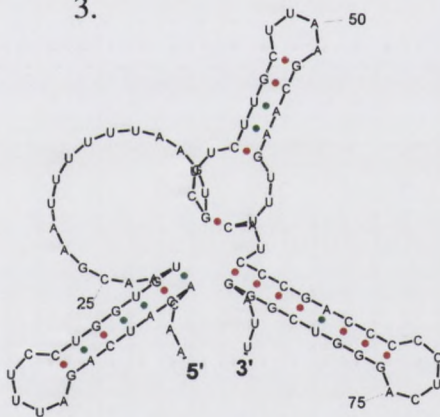
1.



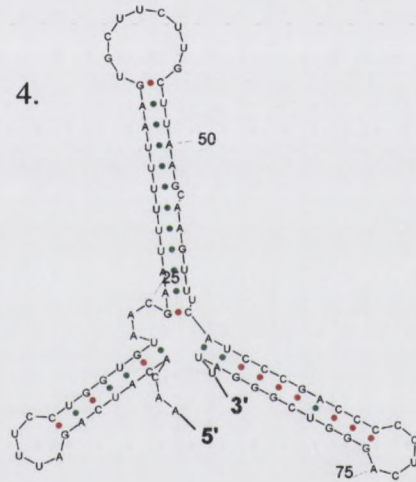
2.



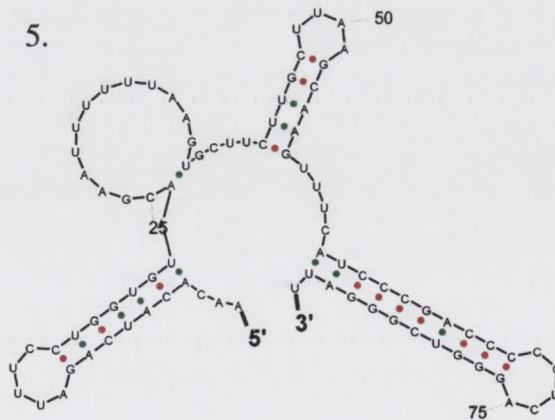
3.



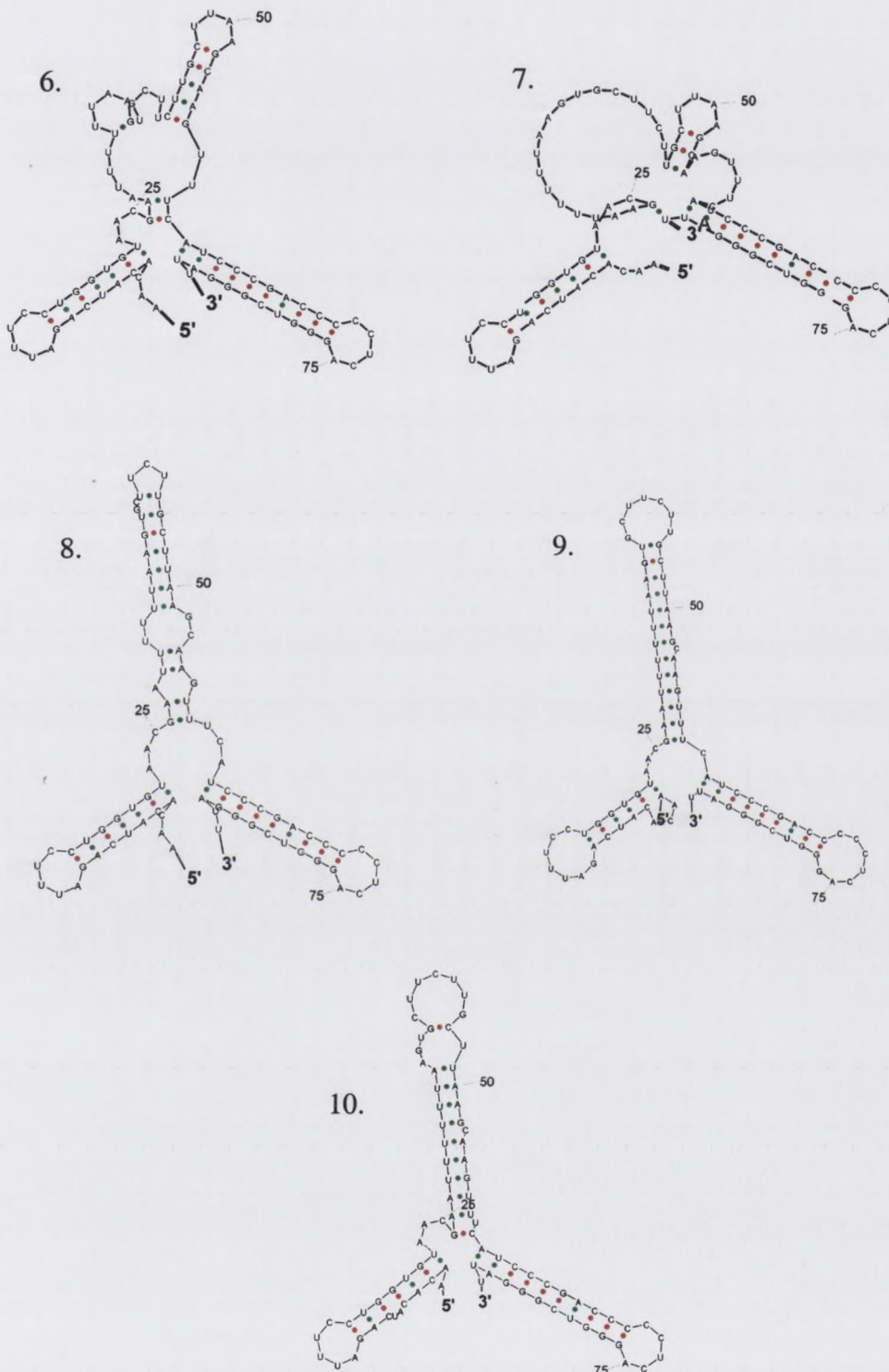
4.



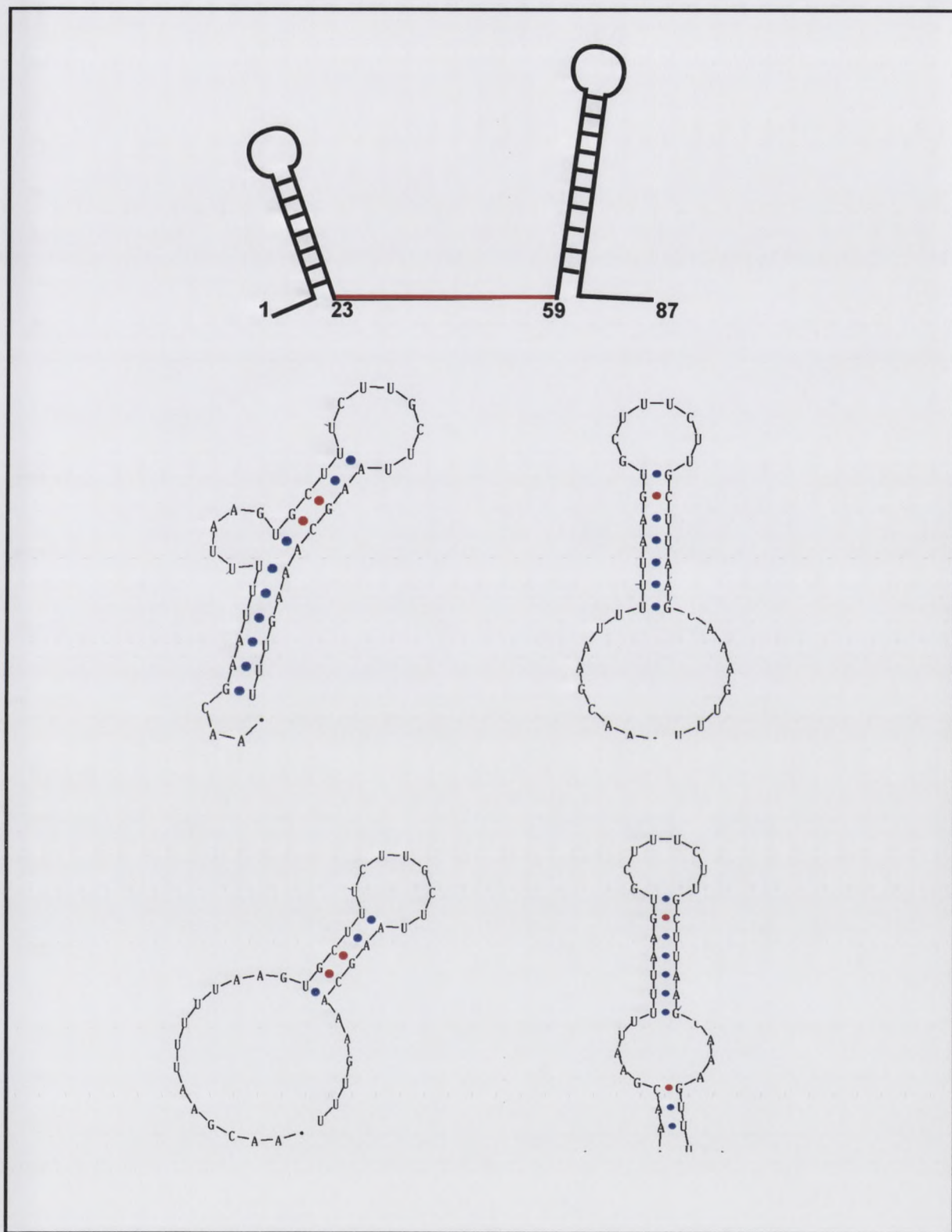
5.







Ryc. 13. Struktury drugorzędowe przewidywane przez program Mfold dla DsrA RNA. Strukturę o najniższej energii swobodnej zaznaczono ramką.



Ryc. 14. Struktury proponowane przez program Mfold dla regionu centralnego DsrA RNA (fragment zaznaczony na czerwono na modelu struktury drugorzędowej).



Dotychczasowe obliczenia oraz doniesienia literaturowe wskazują, że głównym odcinkiem zmiennym tworzącym strukturę DsrA RNA jest region centralny (sekwencja nukleotydowa 23-59). Obliczenia energii swobodnej wykonane dla poszczególnych fragmentów struktury DsrA RNA wykazały również, że jej wartość dla tego regionu proponowanego w Modelu I wynosi -5.2 kcal/mol, natomiast dla fragmentu jednoniciowego oraz spinki proponowanej w Modelu II - 2.6 kcal/mol (Tabela 5). Pozytywna wartości energii swobodnej sugeruje, że tworzenie takiej struktury nie jest faworyzowane termodynamicznie, a prawdopodobieństwo jej występowania w proponowanej w tym modelu postaci jest niewielkie.

Tabela 5. Wartości energii swobodnej (kcal/mol) obliczone dla spinki drugiej proponowanej w Modelach I i II.

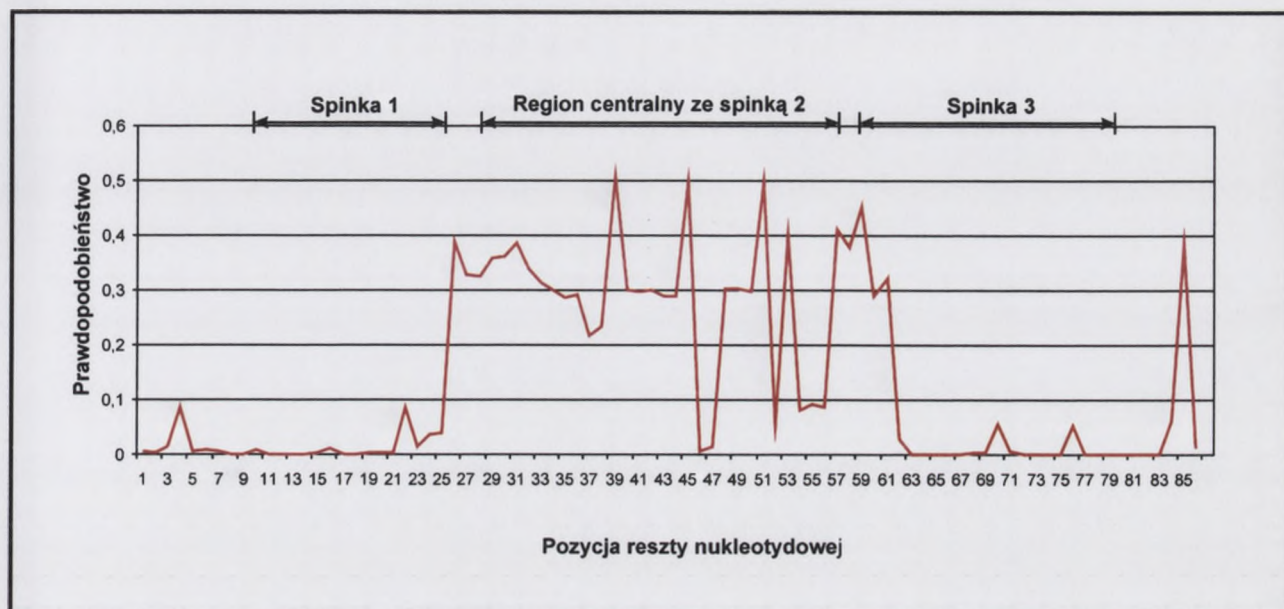
Model	Energia swobodna dla całej struktury (kcal/mol)	Energia swobodna dla spinki 2 (kcal/mol)	Literatura
Model I	-31.8	-5.2	Sledjeski i Gottesman, 1995, Majdalani i wsp. 1998
Model II	-23.9	2.6	Lease i Belfort, 2000

Kolejnym krokiem badań była analiza mutacji w sekwencji DsrA RNA z różnych organizmów. Sekwencje nukleotydowe DsrA z *E. coli*, *S. sonnei* i *S. flexneri* są w 99 % identyczne, a różnią się tylko nieznacznie od sekwencji opisanych dla *S. typhimurium* oraz *S. enetrica*. Ze względu na tak niewielką różnicę w sekwencji wszystkich gatunków przeprowadzono ich porównanie. Nie stwierdzono jednak żadnych mutacji kompensacyjnych faworyzujących którykolwiek z proponowanych wcześniej modeli struktury drugorzędowej DsrA RNA.

W celu sprawdzenia prawdopodobieństwa tworzenia ewentualnych elementów strukturalnych, przez DsrA RNA przeprowadzono analizę statystyczną z wykorzystaniem programu Sfold [Ding i wsp. 2004]. Obliczenia wykazały, że spinki pierwsza i trzecia są niezwykle stabilne, a prawdopodobieństwo tworzenia struktury innej niż spinka do włosów jest bliskie 0. Nie ma tutaj żadnych możliwości alternatywnego tworzenia innych par zasad, a raz utworzona konformacja jest niezwykle trwała termodynamicznie. Inaczej jest w przypadku regionu centralnego cząsteczki, obejmującego nukleotydy 23-59. Wykazuje on ogromną zmienność w zakresie tworzenia par zasad i formowania elementów strukturalnych, takich jak trzon spinki do włosów (Ryc. 15). Wyższe prawdopodobieństwo oznacza większą



możliwość, że określony fragment cząsteczki może być bardziej labilny. Niższe natomiast mówi o zdolności tworzenia bardziej stabilnych struktur.



Ryc. 15. Prawdopodobieństwo występowania wszystkich nukleotydów DsrA RNA w alternatywnych konformacjach strukturalnych.

3.2. Analiza struktury DsrA RNA za pomocą specyficznych rybonukleaz

Dla określenia struktury drugorzędowej DsrA RNA wykorzystano specyficzne nukleazy T1, V1 oraz S1.

W celu uzyskania preparatywnych ilości RNA wklonowano cDNA DsrA RNA do wektora pT7/T3- α 18 według metody opracowanej w naszym laboratorium [Wyszko i wsp., 1999]. Matrycę DNA hydrolizowano za pomocą enzymu restrykcyjnego HindIII, a następnie, przeprowadzono transkrypcję RNA *in vitro* przy udziale polimerazy RNA z faga T7 [Milligan i wsp., 1987], (Ryc. 16).

Wskazanie na możliwość wykonania zadania jest dla nas najważniejszą informacją, którą otrzymujemy podczas realizacji projektu.

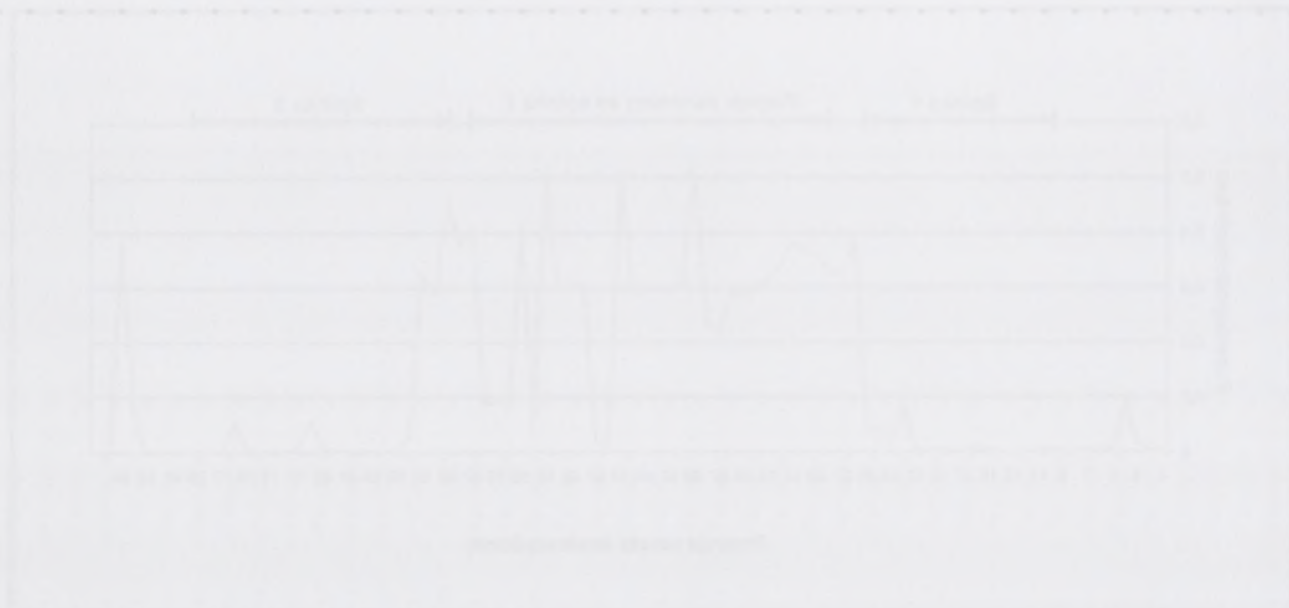
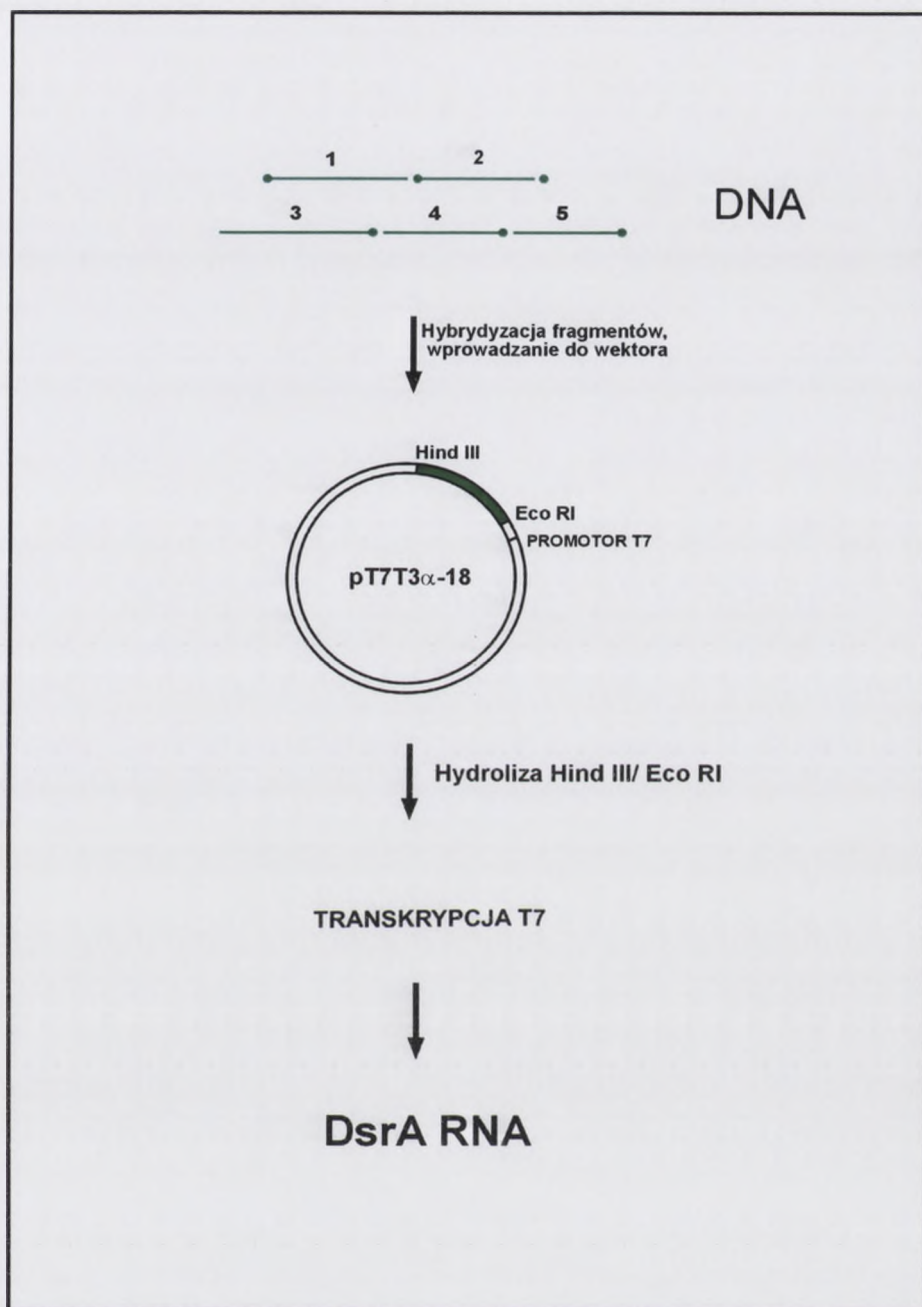


Fig. 1. Wykres przedstawiający przebieg sygnału pomiarowego. Oś X to czas, a oś Y to wartość.

3.1. Analiza struktury i funkcji

W celu określenia struktury i funkcji analizujemy dane z pomiaru. W tym celu wykorzystujemy dane z pomiaru i analizujemy je. W celu określenia struktury i funkcji analizujemy dane z pomiaru. W tym celu wykorzystujemy dane z pomiaru i analizujemy je.



Ryc. 16. Schemat otrzymywania DsrA RNA.

Otrzymany transkrypt znakowano radioaktywnym fosforem, a następnie poddano analizie z wykorzystaniem nukleaz T1, V1 oraz S1.



Fig. 17. Comparison of the results of the two models. The vertical axis represents the confidence interval (C.I.) in years, and the horizontal axis represents the model number. The data is presented in a grid-like format with a dashed horizontal line separating the top and bottom halves of each chart.

Rybonukleaza T1 hydrolizuje cząsteczkę RNA przy końcu 3' reszt guanylowych. Nukleotydy w pozycji 37 oraz 39 DsrA RNA są niezwykle wrażliwe na hydrolizę RNazą T1, co może sugerować, że region ten występuje jako jednoniciowy w warunkach natywnych (Ryc. 17). Reszty nukleotydowe w pozycjach 18, 19, 21 są hydrolizowane natomiast tylko w warunkach denaturujących, co wskazuje, że w roztworze znajdują się we fragmencie dwuniciowym [Lease i Belfort, 2000; Lease i Woodson, 2004].

Wykazano, że, rybonukleaza V1 hydrolizuje silnie pary zasad w obrębie trzonu spinki pierwszej oraz trzeciej (Ryc. 17 A, I, II). Ma ona preferencje hydrolizy regionów dwuniciowych o długości od 4 do 6 par zasad, chociaż nie wszystkie sekwencje ulegają hydrolizie [Ehresmann i wsp. 1987]. Eksperyment z RNazą V1 zasadniczo potwierdził więc strukturę obydwu spinek, proponowanych zarówno w obu wcześniejszych modelach struktury drugorzędowej, jak również przewidywanych w analizie bioinformatycznej. Dodatkowo zaobserwowano także hydrolizę wiązań nukleotydowych w pozycji 28-32. Lease i Belfort w proponowanym modelu struktury drugorzędowej DsrA RNA (Model II) zakładają występowanie tych reszt w regionie jednoniciowym. Obserwowali oni również hydrolizę V1 w pozycji 27, ale nie zaproponowali jednak partnera do oddziaływania z tą resztą nukleotydową, nie uwzględniając jej tym samym jako części struktury drugorzędowej, umieszczając ją w regionie jednoniciowym [Lease i Belfort, 2000].

Na podstawie wykonanych w niniejszej pracy badań, zaproponowano umieszczenie tej reszty nukleotydowej w obrębie struktury trzonu spinki drugiej i oddziaływanie z resztą adenozyiny. W wyniku analizy z użyciem RNazy V1 obserwowano również hydrolizę DsrA RNA dla niekanonicznej pary U29-G56. Wykazano, że RNaza V1 wykazuje także zdolność do hydrolizowania takich par zasad, które nie są związane wiązaniami Watsona – Cricka. Pary typu wobble są również wrażliwe na hydrolizę RNazą V1, co pokazano w przypadku tRNA^{Phe} z drożdży oraz 5S rRNA z *E. coli* [Lockard i Kumar, 1981].

Strukturę drugorzędową DsrA RNA analizowano również z użyciem specyficznej względem odcinków jednoniciowych RNazy S1. Obserwowano hydrolizę w obrębie pętli spinki pierwszej i trzeciej, co zgodne było z przewidywaniami programu Mfold i Sfold. Dodatkowo zaobserwowano hydrolizę w pozycji 36 oraz 37. Nukleaza S1 hydrolizuje fragmenty jednoniciowe bez preferencji względem sekwencji nukleotydowej, może ona również wykazywać aktywność względem regionów dwuniciowych, które są przejściowo niesparowane [Esteban i wsp., 1992]. W przypadku hydrolizy DsrA RNA działanie enzymu obserwowano wyłącznie we fragmentach struktury proponowanych jako jednoniciowe. Obserwowane produkty hydrolizy w obrębie regionów apikalnych obydwu spinek zgodne są



także ze strukturą tych fragmentów proponowaną w Modelu I w Modelu II. W odróżnieniu jednak od Modelu II nie zaobserwowano hydrolizy w regionie 24-34, postulowanym przez autorów jako długi fragment jednoniciowy [Lease i Belfort, 2000].

Wyniki hydrolizy RNazą V1 i S1 wyraźnie pokazują inną, niż proponowana w Modelu I i II, lokalizację pętli oraz wskazują na znacznie krótszy region jednoniciowy, niż ten pokazany w Modelu II.

3.3. Hydroliza RNazą H

W celu dokładniejszej analizy strukturalnej, przeprowadzono hydrolizę RNA z wykorzystaniem RNazy H. Metoda ta jest niezwykle użyteczna do badania małych cząsteczek i określania ich struktury drugorzędowej poprzez weryfikację miejsc dostępnych dla wiązania oligodeoksynukleotydów [Barciszewska i wsp., 1990]. Enzym ten hydrolizuje RNA w duplesie z DNA, a wykazując właściwości endonukleolityczne, formuje grupę 3'-hydroksylową oraz 5'-fosforanową w miejscu hydrolizy [Crooke i wsp., 1995].

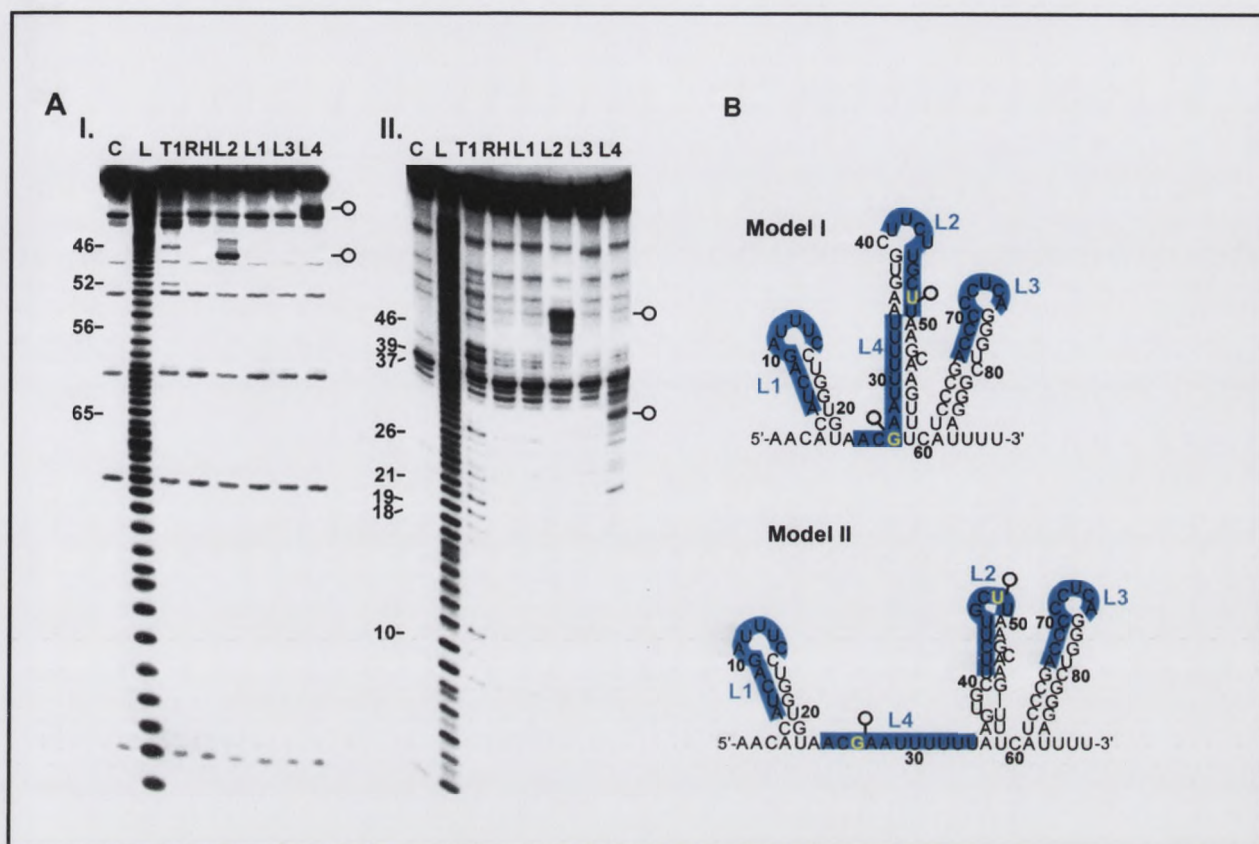
Istnieją jednak doniesienia, że RNaza H może również hydrolizować nie do końca precyzyjnie zdefiniowany dupleks RNA-DNA, wykazując jednocześnie aktywność i preferencję nukleolityczną względem par G-U [Wu i wsp. 1999].

W celu zbadania długości i dostępności regionów jednoniciowych zaprojektowano cztery oligodeoksynukleotydy komplementarne odpowiednio względem spinki pierwszej (L1) o długości 10 nukleotydów, spinki drugiej (L2) - 9 nukleotydów, trzeciej (L3) - 10 nukleotydów oraz względem proponowanego w Modelu II regionu jednoniciowego (L4) w pozycji od 24 do 34 (Ryc. 18).

Po hybrydyzacji DsrA RNA z oligodeoksynukleotydami przeprowadzono reakcję hydrolizy z RNazą H. Zaobserwowano dwa główne miejsca hydrolizy - w pozycji 26 i 48 (Ryc. 18). Ponieważ RNaza hydrolizuje heterodupleksy RNA-DNA, obserwowany obraz wskazuje, że tylko rejon nukleotydów 24-28 jest jednoniciowy w strukturze DsrA RNA. Miejsce hydrolizy przy końcu 5' odpowiada środkowej części oligodeoksynukleotydu, a reszta nukleotydowa w pozycji 26 tworzy nowy koniec 5' dupleksu.

Analiza ta pokazuje, że tylko krótki fragment DNA może utworzyć heterodupleks z DsrA RNA, a dalsza część proponowanego w Modelu II regionu jednoniciowego nie jest dostępna dla enzymu. Fakt ten potwierdza wcześniejsze obserwacje z analizy enzymatycznej, że nukleotydy w 28-34 są zaangażowane w tworzenie trzonu struktury spinkowej, a nie są zlokalizowane w regionie jednoniciowym.





Ryc. 18. Analiza hydrolizy DsrA RNA za pomocą RNazy H.

A. Autoradiogram 20% żelu poliakrylamidowego z 7 M mocznikiem przedstawiający produkty hydrolizy DsrA RNA za pomocą RNazy H. C- kontrola, DsrA RNA znakowany przy 3' końcu (I.) oraz przy końcu 5' (II.); L- produkty hydrolizy alkalicznej; T1- DsrA RNA poddany hydrolizie RNazą T1 w warunkach denaturujących; RH- kontrola, DsrA RNA z RNazą H bez oligodeoksynukleotydów; L1-L4- hydroliza RNazą H w obecności oligodeoksynukleotydu, odpowiednio: L1, L2, L3, L4.

B. Modele struktury drugorzędowej DsrA RNA. Fragmenty komplementarne względem odpowiednich sekwencji DsrA RNA zaznaczono na niebiesko, reszty nukleotydowe hydrolizowane przez RNazę H- na żółto.

Obserwowana hydroliza w pozycji 48 zakłada lokalizację tej reszty nukleotydowej w obrębie wybruszenia, a nie w pętli, jak w przypadku Modelu II. Jest to także ostatnia dostępna dla RNazy H wolna reszta nukleotydowa - niezaangażowana w tworzenie struktur spinkowych.

Interesujący jest fakt, że oprócz dwóch głównych miejsc hydrolizy, obserwowano również dodatkowe produkty. Te dodatkowe miejsca hydrolizy w pozycjach 45-47 pokazują, że mogą istnieć izofornie strukturalne RNA charakteryzujące się różną zdolnością wiązania oligodeoksynukleotydów.

w tym eksperymencie nie zaobserwowano jednocześnie hydrolizy RNazą H dupleksów w obrębie spinki pierwszej i trzeciej. Najprawdopodobniej niezwykle wysoka stabilność obu tych struktur czyni je trudnymi dla hybrydyzacji z odpowiednimi oligodeoksynukleotydami.



Fig. 10. Analysis of the effect of the amount of the additive on the crystallization rate. A - crystallization rate of the sample with 10% of the additive; B - crystallization rate of the sample with 20% of the additive; C - crystallization rate of the sample with 30% of the additive. The amount of the additive is expressed in % of the total weight of the sample.

The results of the analysis of the effect of the amount of the additive on the crystallization rate are presented in Figure 10. It can be seen that the crystallization rate increases with the amount of the additive. The maximum crystallization rate is observed for the sample with 30% of the additive. This is due to the fact that the additive acts as a nucleating agent, increasing the number of crystallization centers. The increase in the crystallization rate is also due to the fact that the additive reduces the activation energy of the crystallization process. The results of the analysis of the effect of the amount of the additive on the crystallization rate are presented in Figure 10. It can be seen that the crystallization rate increases with the amount of the additive. The maximum crystallization rate is observed for the sample with 30% of the additive. This is due to the fact that the additive acts as a nucleating agent, increasing the number of crystallization centers. The increase in the crystallization rate is also due to the fact that the additive reduces the activation energy of the crystallization process.

Biorąc pod uwagę niedostępność spinek pierwszej i trzeciej, miejsca hydrolizy w obrębie spinki drugiej oraz dodatkowe produkty aktywności RNazy H, można przypuszczać, że to centralny region DsrA RNA mógłby wykazywać dynamiczną naturę.

3.4. Hydroliza DsrA RNA za pomocą deoksyrybozymów

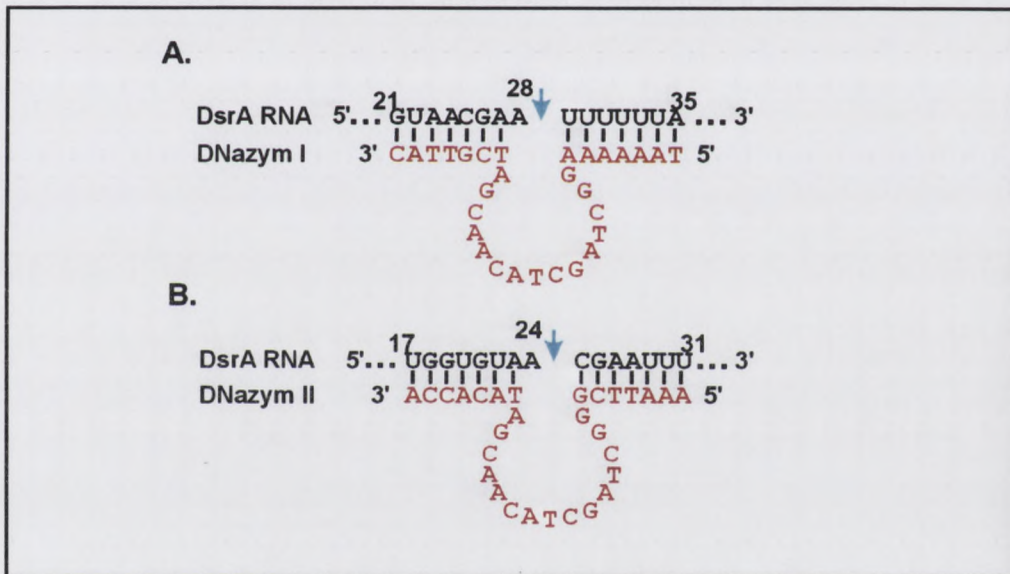
W przyrodzie występuje wiele rodzajów katalitycznych RNA – tzw. rybozymów zdolnych do hydrolizy wiązania fosfodiesterowego w pozycji wyznaczonej przez ich sekwencję [Doudna i Cech, 2002]. Są to między innymi rybozym o strukturze głowy młotka (*ang. hammerhead*) [Scott i wsp., 1995], spinki do włosów (*ang. hairpin*) [Earnshaw i wsp., 1997] oraz rybozym wirusa zapalenia wątroby typu D (*ang. hepatitis delta virus – HDV*) [Wu i wsp., 1989]. Ponadto drogą selekcji *in vitro* uzyskano katalityczne kwasy deoksyrybonukleinowe tzw. DNAzyny, które ze względu na swoją budowę charakteryzują się większą stabilnością wewnątrzkomórkową niż ich analogi rybonukleinowe (rybozyny) [Santoro i Joyce, 1997]. Do najbardziej znanych DNAzymów należą „10-23” oraz „8-17” (ich nazwy pochodzą od numeru cyklu i serii selekcji *in vitro*).

W celu potwierdzenia eksperymentów z rybonukleazą H, przeprowadzono hydrolizę DsrA RNA z wykorzystaniem DNAzymów „10-23”. Budową przypominają one rybozyny typu hammerhead [Sun i wsp. 2000]. Trzon struktury stanowi zachowawcza domena katalityczna o długości 16 nukleotydów oskrzydłona dwiema zmiennymi domenami wiążącymi (ramię prawe i lewe) [Santoro i Joyce, 1997]. Wykazano, że mają one zdolność do wiązania jednoniciowych fragmentów DNA lub RNA oraz katalizowania reakcji chemicznych takich jak: tworzenie i przeniesienie wiązania fosfoestrowego czy hydroliza RNA lub DNA w obecności różnorodnych jonów dwuwartościowych [Breaker i Joyce, 2004; Breaker i Joyce, 1995; Cuenoud i Szostak, 1995]. Katalityczny fragment DNA po przyłączeniu do docelowego RNA musi przyjąć odpowiednią strukturę, która umożliwia hydrolizę wiązania fosfodiesterowego [Santoro i Joyce, 1997].

W niniejszej pracy zastosowano dwa DNAzyny zależne od jonów magnezu komplementarne do regionu jednoniciowego proponowanego w Modelu II (fragment 23-34) (Ryc. 19). Są to cząsteczki o długości 29 nukleotydów, a region ich oddziaływania z DsrA RNA to odpowiednio nukleotydy G21-A35 dla DNAzymu I (Ryc. 19A) oraz U 17-U31 (Ryc. 19B) dla DNAzymu II. Obydwie cząsteczki katalitycznych DNA zawierają po dwa siedmionukleotydowe ramiona wiążące RNA oraz stałą pętlę katalityczną.



W przypadku DNazymu I, miejsce hydrolizy przewidziano dla nukleotydu w pozycji A28. Nie obserwowano jednak żadnego produktu hydrolizy, co pokazuje, że w tym miejscu cząsteczki nie dochodzi do oddziaływania DNazymu z DsrA RNA. Podobną sytuację obserwowano w przypadku DNazymu II. Tutaj miejsce hydrolizy znajdowało się w pozycji A24, jednak analogicznie do DNazymu I, nie zaszła hydroliza. Potwierdza to wcześniejszy wynik z udziałem RNazy H oraz specyficznych nukleaz, że region jednoniciowy 23-34 proponowany w Modelu II nie istnieje. Biorąc pod uwagę krótki fragment jednoniciowy proponowany w tej pracy na podstawie analizy z użyciem RNaz V1, S1 oraz H miejsce hydrolizy DNazymem I znajdowałoby się w obrębie trzonu drugiej spinki. Region oddziaływania DNazymu II z DsrA RNA był natomiast najprawdopodobniej za krótki, aby dać pozytywny efekt w postaci hydrolizy w miejscu A24.



Ryc. 19. Struktura drugorzędowa DNazymów I i II. Struktura i sekwencja DNazymu I (A) oraz DNazymu II (B). Miejsce hydrolizy zaznaczono strzałką.



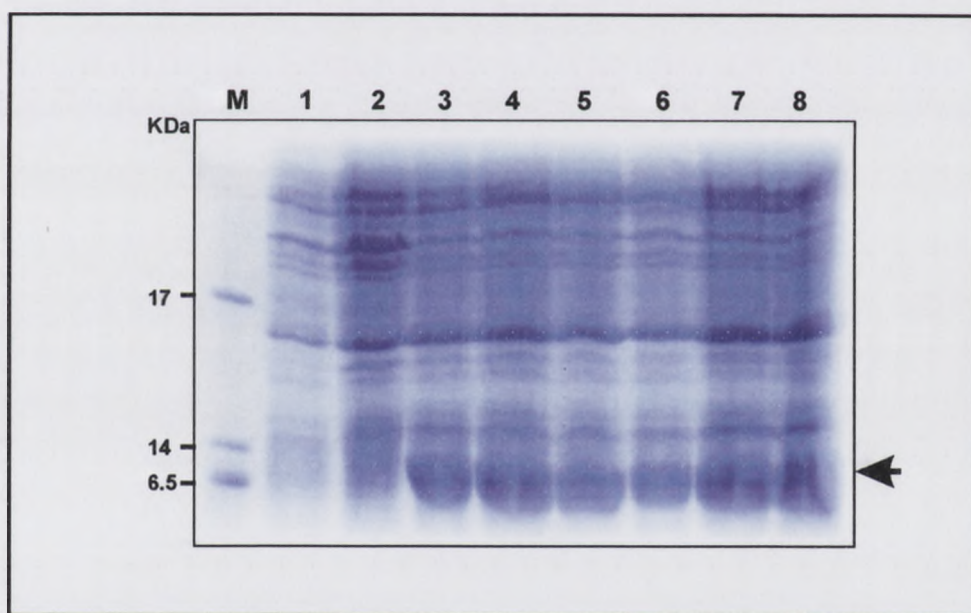
3.5. Otrzymywanie kompleksów DsrA RNA i białka Hfq

3.5.1. Ekspresja i oczyszczanie białka Hfq

Białko Hfq otrzymano w wyniku ekspresji genu w szczepie BL21DE3 pLysS bakterii *E. coli*, które są genetycznie najlepiej scharakteryzowanym i najczęściej wykorzystywanym systemem ekspresyjnym dla otrzymywania białek [Baneyx i wsp. 1999].

Do nadprodukcji białka Hfq wykorzystano zrekombinowany plazmid pET21b zawierający sekwencję kodującą białko Hfq oraz etykietę histydynową (His-Tag), który otrzymano od dr Giseli Storz z National Institute of Child Health and Development (Bethesda, USA).

Konstrukt wprowadzono drogą transformacji do szczepu *E. coli* BL21DE3 pLysS. Najwyższą wydajność ekspresji białka uzyskano, gdy indukcję genu przeprowadzono we wczesnej fazie logarytmicznej ($OD_{600}=0.6$) i prowadzono przez 5 godzin. Obecność białka obserwowano w 15% żelu poliakryloamidowym z SDS (Ryc. 20).



Ryc. 20. Ekspresja białka Hfq w szczepie *E. coli* - analiza w 15% żelu poliakryloamidowym z SDS.

M- standard wielkości białek, 1- całkowity ekstrakt białkowy z komórek BL21, 2- całkowity ekstrakt białkowy z komórek BL21 zawierający wektor z genem Hfq nieindukowanych IPTG, 3-5- ekstrakt z komórek indukowanych IPTG w stężeniu 0,5, 1, 2 mM hodowanych 3 godziny, 6-8- ekstrakt z komórek indukowanych IPTG w stężeniu 0,5, 1, 2 mM hodowanych 5 godzin. Strzałką pokazano poziom białka Hfq.

Hodowla prowadzona była według procedury opisanej wcześniej przez Zhang i współpracowników, z wyjątkiem zastosowania stężenia IPTG [Zhang i wsp, 2002]. Zmniejszenie stężenia IPTG z 5 mM do 2 mM również prowadziło do wydajnej nadprodukcji białka Hfq.

2.2. Wyniki badań i ocena jakości DNA RNA i białka

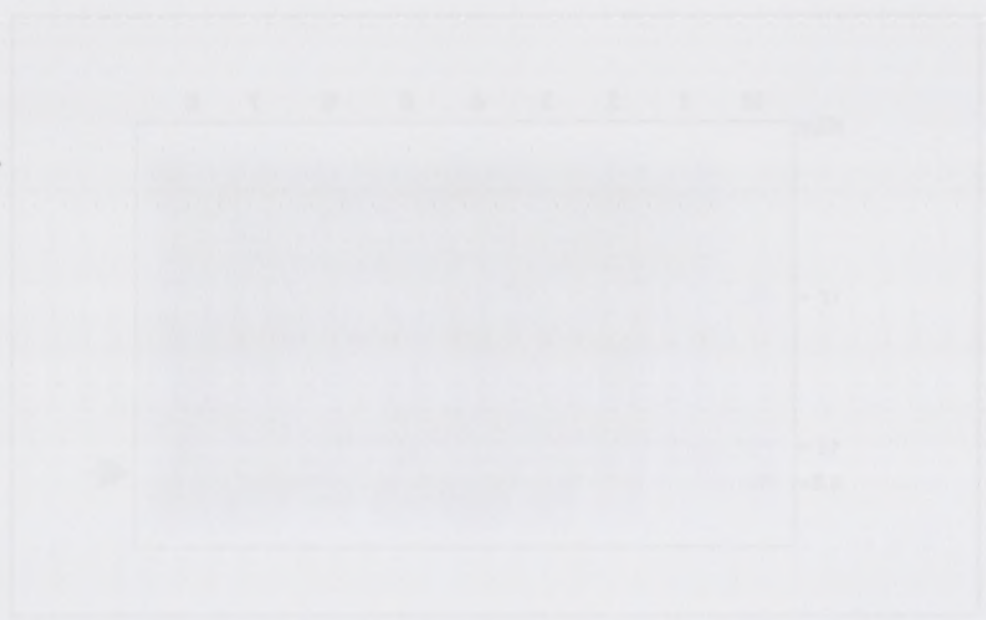
2.2.1. Wyniki badań i ocena jakości białka

W celu oceny jakości białka w organizmie zwierząt w tym celu wykonano badania w zakresie pH i zawartości białka. Wyniki badań przedstawiono w tabeli 1. Wyniki badań przedstawiono w tabeli 1.

Wyniki badań przedstawiono w tabeli 1. Wyniki badań przedstawiono w tabeli 1. Wyniki badań przedstawiono w tabeli 1.

Wyniki badań przedstawiono w tabeli 1. Wyniki badań przedstawiono w tabeli 1. Wyniki badań przedstawiono w tabeli 1.

Wyniki badań przedstawiono w tabeli 1.



Wyniki badań przedstawiono w tabeli 1. Wyniki badań przedstawiono w tabeli 1. Wyniki badań przedstawiono w tabeli 1.

Wyniki badań przedstawiono w tabeli 1. Wyniki badań przedstawiono w tabeli 1. Wyniki badań przedstawiono w tabeli 1.

Wyniki badań

Kolejne etapy procedury izolacji białka prowadzono według procedury zmodyfikowanej w naszym laboratorium.

Po zakończeniu hodowli komórki bakteryjne poddano wirowaniu i zawieszano w buforze A1-Ni-NTA. W celu ochrony białka Hfq przed degradacją proteolityczną bufor został wzbogacony o mieszaninę inhibitorów proteaz działających na różne klasy proteaz komórkowych - PMSF, aprotyna – serynowych, leupeptyna- cysteinowych i pepstatyna-kwasowych.

Pomimo obecności w szczepie *E. coli* BL21DE3 pLysS endogennego lizozymu, zawiesinę bakteryjną lizowano przez sonikację w celu dokładnego rozbicia komórek, obniżenia lepkości lizatu i dokładnego rozdzielenia frakcji rozpuszczalnej od nierozpuszczalnej podczas wirowania.

Frakcja rozpuszczalna poddawana była następnie oczyszczaniu techniką chromatografii powinowactwa. Obecność etykiety histydynowej w konstrukcie znacznie ułatwiło proces oczyszczania białka Hfq, ze względu na wysokie powinowactwo reszt histydynowych do jonów niklu.

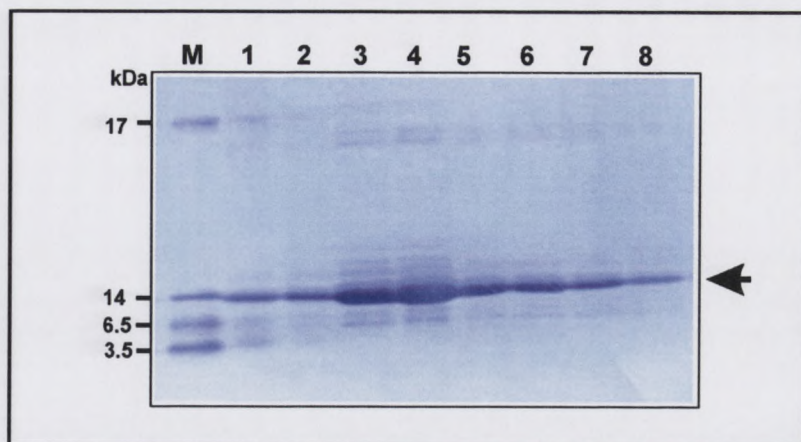
Do oczyszczania białka zastosowano złożę agarozowe zawierające aktywne jony niklu, których donorem był kwas nitrylotrójoctowy (kolumna Ni-NTA).

Złożę agarozowe przemywano dwukrotnie buforem A1-Ni-NTA, a następnie poddawano inkubacji z lizatem bakteryjnym. Kolejnym krokiem oczyszczania było wymywanie białka Hfq buforem B1-Ni-NTA w gradiencie imidazolu od 10 do 200 mM. Najwydajniejszą elucję białka Hfq obserwowano przy stężeniu 50-100 mM. Białko w poszczególnych frakcjach identyfikowano w 15% żelu poliakryloamidowym (Ryc. 21).

Stężenie białka Hfq oznaczano metodą Bradford [Bradford i wsp. 1976]. Białko przechowywano w 10% glicerolu (-70°C) w niewielkich objętościach (20 µl), co zapobiegało wielokrotnemu zamrażaniu i rozmrażaniu preparatu. Wykazano, że białko Hfq jest biologicznie aktywne i zdolne do tworzenia kompleksu z DsrA RNA.

Kompleksy DsrA RNA z białkiem Hfq otrzymano według procedury przedstawionej w rozdziale „MATERIAŁY I METODY”. Wyniki reakcji analizowano w 1% żelach agarozowych i poddano autoradiografii. Wolny DsrA RNA i występujący w kompleksie mierzono metodą densytometrii przy pomocy aparatu PhosphoImager z oprogramowaniem ImageQuant 5.1.

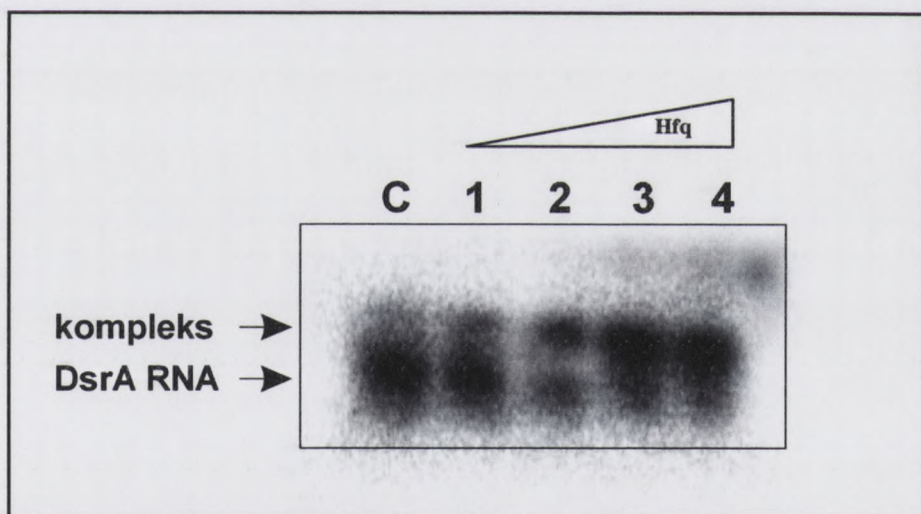




Ryc. 21. Oczyszczanie białka Hfq metodą powinowactwa.

M- standard wielkości białek, 1-2- frakcje izolowane przy 10 mM stężeniu imidazolu, 3-4- frakcje izolowane przy 50 mM stężeniu imidazolu, 5-6- frakcje izolowane przy 100 mM stężeniu imidazolu, 7-8- frakcje izolowane przy 200mM stężeniu imidazolu. Strzałka pokazuje oczyszczone białko Hfq.

Na wstępnym etapie pracy wykazano zdolność białka Hfq do oddziaływania z DsrA RNA. DsrA RNA znakowany radioaktywnym fosforem inkubowano z białkiem Hfq, którego stężenie mieściło się w zakresie 0.2, 0.3, 0.5 oraz 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Ryc. 22).



Ryc. 22. Analiza tworzenia kompleksu DsrA RNA - Hfq według wzrastającego stężenia białka.

C - DsrA RNA znakowany z końca 5', 1-4 - kompleks DsrA-Hfq (0.2, 0.3, 0.5, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ białka, odpowiednio).

3.5.2. Topografia kompleksów DsrA RNA z białkiem Hfq

Badania krystalograficzne są najlepszym, jak dotychczas, źródłem informacji na temat struktury cząsteczek kwasów nukleinowych oraz ich kompleksów z białkami. Wymagają one jednak dużej ilości wysokiej jakości materiału i kryształów o dużej rozdzielczości. Znane są

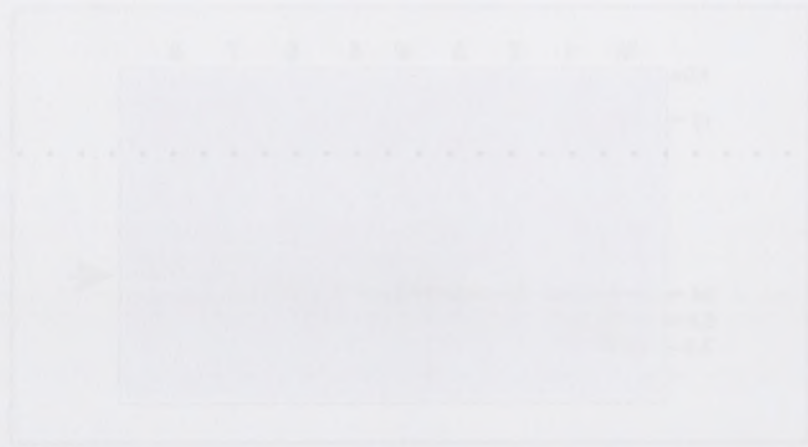


Fig. 11. Diagram showing the relationship between the variables in the model. The diagram illustrates the flow of information and the interaction between different components of the system.

The diagram illustrates the flow of information and the interaction between different components of the system. It shows the relationship between the variables in the model and how they influence each other.



Fig. 12. Diagram showing the relationship between the variables in the model. The diagram illustrates the flow of information and the interaction between different components of the system.

The diagram illustrates the flow of information and the interaction between different components of the system. It shows the relationship between the variables in the model and how they influence each other.

jednak inne precyzyjne techniki pozwalające na określenie struktury zarówno wolnej cząsteczki kwasu nukleinowego, jak i w kompleksie z białkiem. Do badania struktury RNA (np. roślinne 5S rRNA) stosowane są między innymi: metody enzymatyczne (specyficzne rybonukleazy), chemiczne (siarczan dwumetylu, pirowęglan dwuetylu, hydroliza indukowana jonami ołowiu oraz rodnik hydroksylowy) [Barciszewska i wsp., 1992, 1994]. Techniki te z powodzeniem wykorzystywane są również w analizie kompleksów DNA - białko oraz RNA - białko [Murakawa i wsp., 1989; Giel-Pietraszuk i wsp., 1997].

W celu poznania topografii kompleksu i zidentyfikowania nukleotydów zaangażowanych w jego tworzenie zastosowano dwa podejścia: hydrolizę indukowaną jonami ołowiu oraz za pomocą wolnego rodnika.

3.5.3. Analiza kompleksów DsrA RNA - Hfq przy pomocy rodnika hydroksylowego

Wolny DsrA RNA oraz w kompleksie z Hfq poddano hydrolizie rodnikiem hydroksylowym ($\cdot\text{OH}$) generowanym przez Fe(II)-EDTA i DTT.

Mechanizm hydrolizy rodnikiem hydroksylowym polega na oddziaływaniu rodnika z resztami rybozy w łańcuchu RNA. Degradacja reszt cukrowych prowadzi w efekcie do przerywania łańcucha, co sugeruje elastyczność i konformacyjne zmiany cząsteczki (Lathan i wsp., 1989; Wang i wsp., 1989).

Na podstawie różnic w obrazie hydrolizy DsrA RNA w obecności i przy braku białka Hfq, wyznaczono obszar cząsteczki chroniony przez białko. Przeprowadzono również analizę wpływu jonów magnezu na podatność kompleksu DsrA-Hfq na hydrolizę wolnym rodnikiem. Z przeprowadzonych eksperymentów mapowania kompleksu wynika, że białko Hfq wiąże się do DsrA RNA w obrębie spinki drugiej i trzeciej, ochraniając przed hydrolizą rodnikiem hydroksylowym reszty nukleotydowe 51-52, 55-58, 61-64 oraz 66-70 (Ryc. 23).

Przy braku jonów magnezu cząsteczka DsrA RNA łatwiej ulegała hydrolizie niż w obecności jonów magnezu. Ta obserwacja zgodna jest z wcześniejszymi badaniami pokazującymi, że struktura drugorzędowa RNA ulega stabilizacji pod wpływem jonów Mg^{2+} . Pokazano między innymi, że niemodyfikowany tRNAPhe zarówno natywny, jak i syntetyzowany *in vitro* wykazuje znaczną stabilność po związaniu jonów Mg^{2+} [Serebrov i wsp., 1998; Brion i wsp., 1999].

Celem badania kompleksu DsrA-Hfq było między innymi stwierdzenie, czy białko to wiąże się do proponowanego w Modelu II regionu jednoniciowego znajdującego się pomiędzy postulowaną spinką pierwszą a drugą.



Item	Description	Quantity	Unit Price	Total
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

...

Hfq jest białkiem kodowanym przez wiele genomów bakteryjnych [Sun i wsp. 2002]. Nie wykazuje wyraźnej preferencji sekwencyjno - strukturalnej, ale postuluje się, że wiąże się do miejsc bogatych w reszty AU [Vytvytska i wsp., 2000; Zhang i wsp., 2002, Brescia i wsp., 2003].

Sugeruje się, że kluczowy dla tego wiązania jest odcinek siedmionukleotydu AAUUUUU znajdujący się między pierwszą a drugą spinką Modelu II [Brescia i wsp., 2003]. Wykazano jednocześnie, że struktura cząsteczki RNA w tworzeniu kompleksu z białkiem jest przynajmniej tak samo ważna, jak sekwencja nukleotydu [Zhang i wsp., 2002]. Analizując długość fragmentów DsrA RNA we frakcjach związanych i niezwiązanych z białkiem zidentyfikowano fragment spinki pierwszej oraz region bogaty w reszty A/U we frakcji związanej z białkiem. Zanotowano jednak obecność fragmentu RNA od nukleotydu 44 do 65, zarówno we frakcji związanej, jak i niezwiązanej. To wskazywałoby raczej, że te reszty nukleotydu niezbędne są dla wiązania białka Hfq. Fragment RNA powyżej 65 reszty nukleotydu obecny był tylko we frakcji związanej, co również świadczy o tym, że silne wiązanie Hfq wymaga tego fragmentu cząsteczki DsrA RNA [Zhang i wsp., 2002; Brescia i wsp., 2003]. Pokazuje to jednoznacznie, że pomimo wskazania fragmentu AAUUUUU na główne miejsce wiązania białka Hfq, nie jest on jedynym i wystarczającym czynnikiem wpływającym na tworzenie kompleksu [Zhang i wsp., 2002].

Badania wykonane w niniejszej pracy nie potwierdziły wiązania białka w regionie postulowanym w Modelu II jako region jednoniciowy, jednoznacznie natomiast pokazały, że reszty znajdujące się w obrębie spinki drugiej i trzeciej są niezwykle istotne w procesie tworzenia kompleksu.

3.5.4. Analiza kompleksów DsrA RNA – Hfq metodą hydrolizy indukowanej jonami ołowiu

W celu poznania swoistych oddziaływań pomiędzy DsrA RNA a białkiem Hfq wykorzystano również metodę hydrolizy indukowanej jonami ołowiu, która zachodzi głównie w regionach jednoniciowych, takich jak pętle spinek czy wybrzuszenia [Ciesiołka i wsp., 1998; Olejniczak i wsp. 2002].

Na podstawie porównania obrazu hydrolizy DsrA RNA w stanie wolnym i kompleksie z białkiem Hfq możliwa była identyfikacja miejsc w strukturze DsrA zaangażowanych w oddziaływanie z białkiem Hfq i wrażliwych na hydrolizę indukowaną jonami Pb^{2+} .

W celu wyznaczenia stałej Boltzmana k_B i temperatury T w punkcie 1.1.1. Wykonano pomiary i otrzymano następujące dane:



Fig. 14. Analysis of hydrolysis products. (A) Chromatogram, (B) mass spectrum.

The chromatogram (A) shows the separation of hydrolysis products. The mass spectrum (B) shows the molecular weight distribution of the products. The peaks in the mass spectrum correspond to the peaks in the chromatogram.

Analiza produktów hydrolizy wolnego DsrA RNA pokazała, że jony ołowiu indukują hydrolizę w pozycji 42-49 oraz 57-60. W przypadku RNazy P *E. coli*, *Ch. vinosum* oraz *B. subtilis* we wszystkich przypadkach hydrolizie podlegały regiony jednoniciowe oraz niestabilne termodynamicznie, prawdopodobnie zaangażowane dodatkowo w oddziaływania trzeciorzędowe [Zito i wsp., 1993].

W przypadku DsrA RNA regiony hydrolizowane w wyniku indukcji jonami ołowiu zlokalizowane są w obrębie proponowanej w tej pracy części apikalnej spinki drugiej oraz trzech słabych par spinających trzon tej spinki. Z analizy danych otrzymanych dla kompleksu wynika natomiast, że białko Hfq osłania przed hydrolizą reszty nukleotydowe w pozycji 43-52, 57-59 oraz 69-71. Zaangażowanie tych reszt nukleotydowych w tworzenie oddziaływań pomiędzy DsrA RNA a Hfq jest zgodne z wcześniejszą analizą kompleksu hydrolizowanego przez wolny rodnik, z wyjątkiem reszt 47-50 oraz 71, które były wrażliwe na hydrolizę jonami ołowiu, ale nie wolnymi rodnikami (Ryc. 23, 24).

Dane te potwierdzają wcześniejszą obserwację pokazującą, że region w obrębie drugiej spinki oraz fragment spinki trzeciej są niezbędne do oddziaływań i tworzenia kompleksu z białkiem Hfq.

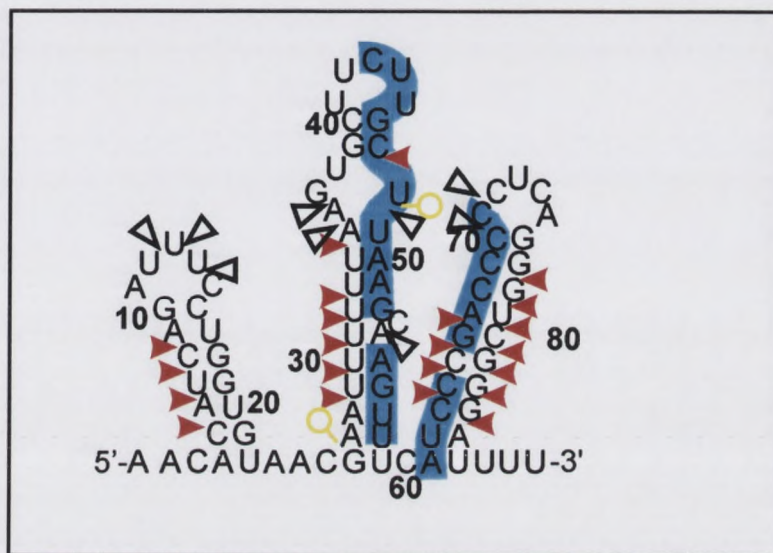
Zaobserwowano również hydrolizę wolnym rodnikiem w pozycji 60-63 oraz 65-68, której nie odnotowano w przypadku hydrolizy ołowiem w obecności białka Hfq, ani w stanie wolnym DsrA RNA. Może to być efektem strukturalnej niedostępności tych nukleotydów dla czynników hydrolitycznych oraz ich zaangażowania w tworzenie rdzenia struktury trzeciorzędowej DsrA RNA.

Hydroliza z udziałem wolnego rodnika, jak również indukowana jonami ołowiu nie potwierdziła więc postulowanego wcześniej miejsca wiązania Hfq w obrębie hipotetycznego regionu jednoniciowego. Przeprowadzone prace wykazały jednocześnie zgodność z proponowanymi dodatkowymi miejscami wiązania Hfq w obrębie spinki drugiej i trzeciej.

Stwierdzono jednakże, że mutacje wprowadzone w region bogaty w A/U powodują całkowity brak aktywności DsrA RNA oraz brak zdolności do wiązania białka Hfq [Brescia i wsp., 2003]. Ponieważ mutacje zostały wprowadzone w regionie postulowanym w tej pracy, jako region dwuniciowy tworzący trzon struktury o charakterze spinki do włosów, wydaje się, że spadek aktywności DsrA RNA nie jest wyłącznie efektem mutacji i osłabienia wiązania, ale głównie wynika z zaburzenia głównych cech strukturalnych, istotnych dla tworzenia kompleksu.



Na podstawie analizy specyficznymi nukleazami, RNAzą H, z wykorzystaniem DNazymów oraz mapowania kompleksu DsrA RNA z białkiem Hfq, jak również badań *in silico* zaproponowano nowy model struktury drugorzędowej dla DsrA RNA (Ryc. 25) [Rolle i wsp. 2006 - Załącznik 2].



Ryc. 25. Nowa struktura drugorzędowa DsrA RNA. Na model naniesiono miejsca hydrolizy V1 (czerwone strzałki), S1 (białe strzałki), RNAzy H (żółte kółeczka) oraz regiony chronione przed hydrolizą wolnymi rodnikami i jonami ołowiu (zaznaczone na niebiesko) [Rolle i wsp., 2006].

Energia swobodna dla przedstawionej struktury wynosi -28.4 kcal/mol, a dla spinki drugiej -2.8 kcal/mol.

3.6. Badanie kompleksów DsrA RNA z kinetyną, 8-oxo-dG, adeniną i guaniną

DsrA RNA powstaje w wyniku stresu temperaturowego, wpływa jednak na regulację poziomu ekspresji genu zaangażowanego w odpowiedź na stres oksydacyjny. Powszechnie wiadomo, że chemicznymi znacznikami tego procesu są między innymi 8-okso-deoksyguanozyna (8-oxo-dG) i kinetyna (K).

Wolne rodniki powstające podczas zwykłego metabolizmu komórkowego prowadzą do uszkodzeń kwasów nukleinowych oraz białek. Dotychczas zidentyfikowano ponad 50 różnych typów produktów utleniania DNA [Gajewski i wsp., 1990, Demple i Harrison, 1994, Hayakawa i wsp., 2002]. Spośród nich, najczęściej występująca i odgrywająca najważniejszą rolę jest oksydowana forma guaniny- 8-oksoguanina oraz powstająca jako drugorzędowy produkt oksydacyjny- kinetyna [Wyszko i wsp., 2003; Barciszewski i wsp., 2006].



Działanie DsrA RNA jako jednoczesnego supresora i aktywatora transkrypcji jest możliwe dzięki obecności dwóch fragmentów komplementarnych do regulowanych przez siebie mRNA H-NS i RpoS. W takim oddziaływaniu kluczową sprawą jest zmiana struktury drugorzędowej, prowadząca do aktywacji lub inhibicji transkrypcji, w zależności od potrzeb komórki i warunków środowiska.

3.6.1. Analiza kompleksu DsrA RNA z 8-oxo-dG

Poziom 8-oxo-dG powstającej w wyniku utleniania guaniny jest bardzo wysoki w komórce w czasie stresu oksydacyjnego [Michaels i Miller, 1992; Grollman i Morusa, 1993]. Podczas gdy guanina tworzy silną parę zasad z cytozyną, o tyle 8-oxo-dG może tworzyć zarówno parę typu Watson-Crick z cytozyną, jak również parę typu Hoogsteen z adeniną. W tym ostatnim przypadku parowanie z adeniną prowadzi w następnym cyklu replikacyjnym do zmiany G:C→T:A [Hollstein i wsp. 1996]. Tego typu transwersja jest jedną z najczęstszych somatycznych mutacji znalezionych w ludzkich nowotworach [Hollstein i wsp. 1996].

Przeprowadzono badanie wpływu 8-oxo-dG na stabilność cząsteczki DsrA RNA w warunkach *in vitro*. DsrA RNA inkubowano z 8-oxo-dG, a następnie przeprowadzono hydrolizę z wykorzystaniem RNaz V1 oraz S1. Wykazano, że 8-oxo-dG powoduje spontaniczną degradację cząsteczki DsrA RNA (Ryc. 26A).

Szczególnie wysoki poziom produktów hydrolizy RNA obserwowano w rejonie nukleotydów 52-54, 57-64 oraz 70-73 (Ryc. 22B). Wykazano jednocześnie, że znaczący wpływ na stopień hydrolizy ma stężenie 8-oxo-dG. Przy wyższym stężeniu - 50 nM obserwowano znacznie słabsze produkty hydrolizy RNaza V1 niż w przypadku stężenia 5 nM (Ryc. 26B). Porównując te wyniki z wcześniejszymi badaniami struktury drugorzędowej DsrA RNA, zauważyć można, że nukleotydy 57-60 oraz 60-62 podlegały hydrolizie indukowanej jonami ołowiu. Może to sugerować obniżoną stabilność tych fragmentów cząsteczki, o czym świadczy fakt, że nukleotydy 52-54 tworzą niewielkie wybrzuszenie w obrębie drugiej spinki DsrA RNA. Ponadto nukleotydy 57-59 zaangażowane są w formowanie słabych par spinających podstawę trzonu (A:U, A:U, G:U), nukleotydy w pozycji 70-73 znajdują się natomiast w obrębie pętli tworzonej przez trzecią spinkę.

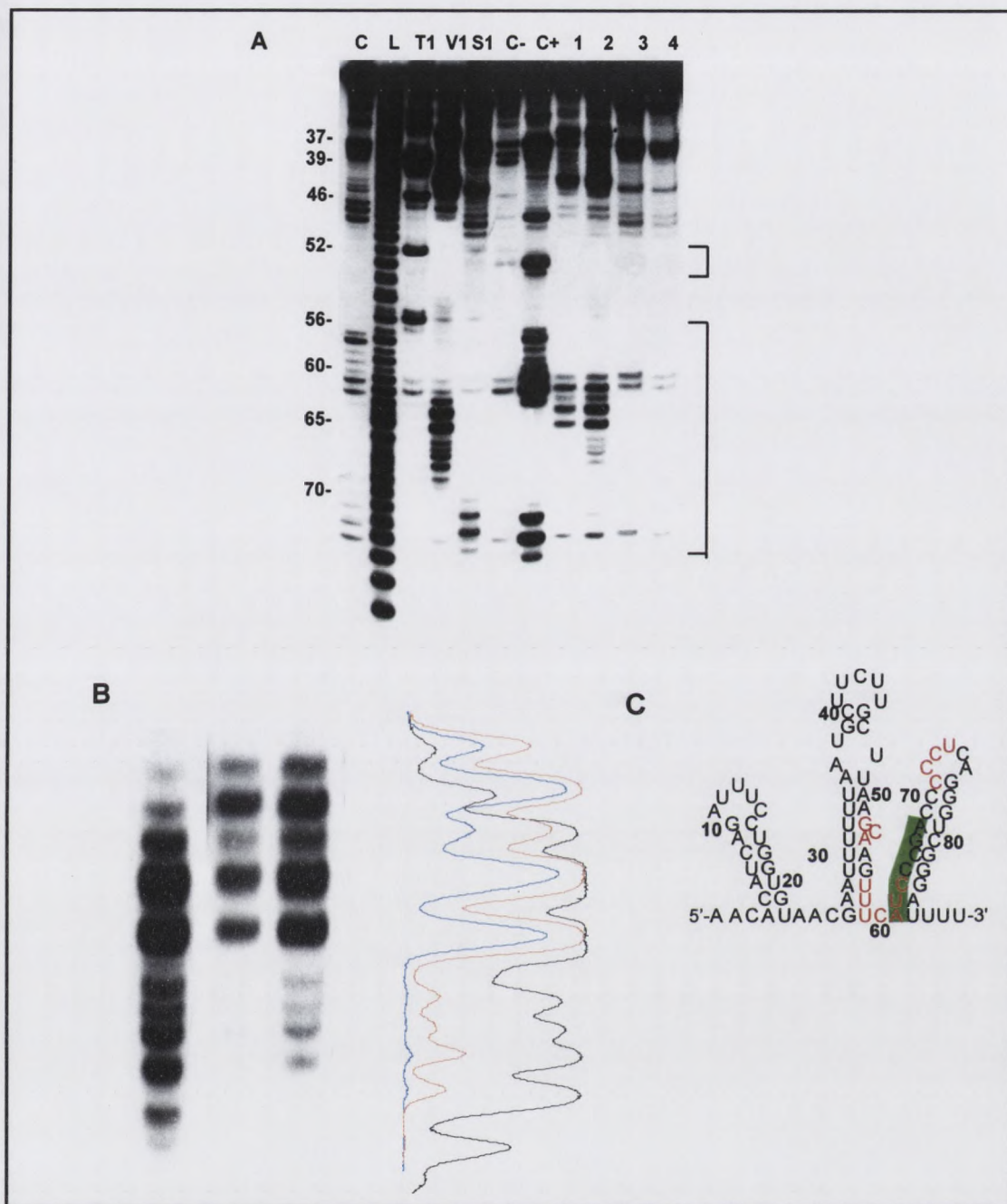
Ważnym elementem jest...

3.1.1. Analiza...

W tym celu...

Wynikami...

W ramach...



Ryc. 26. Analiza wpływu 8-oxo-dG na strukturę DsrA RNA.

A. Autoradiogram 20% żelu poliakrylamidowego z 7 M mocznikiem przedstawiający produkty hydrolizy kompleksu DsrA RNA – 8-oxo-dG. C- kontrola, DsrA RNA znakowany przy końcu 3'; L- produkty hydrolizy alkalicznej; T1- DsrA RNA poddany hydrolizie RNazą T1 w warunkach denaturujących; V1- DsrA RNA poddany hydrolizie RNazą V1; S1- DsrA RNA poddany hydrolizie RNazą S1; C- DsrA RNA w 50 mM Tris-HCl bez 8-oxo-dG, C+ - DsrA RNA w 50 mM Tris-HCl w obecności 50 nM 8-oxo-dG, 1-2 – hydroliza DsrA RNA RNazą V1 w obecności 8-oxo-dG (50 i 5 nM), 3-4 - hydroliza DsrA RNA RNazą S1 w obecności 8-oxo-dG (50 i 5 nM). Regiony podlegające wpływowi 8-oxo-dG zaznaczono na rysunku.

B. Intensywność produktów hydrolizy RNazą V1 w obecności 8-oxo-dG wyznaczona na podstawie pomiaru densytometrycznego. Czarną linią zaznaczono poziom hydrolizy DsrA RNA RNazą V1, czerwoną w obecności 5 nM, a niebieską w obecności 50 nM 8-oxo-dG.

C. Regiony zaangażowane w oddziaływanie zaznaczone na strukturze drugorzędowej DsrA RNA.



11

12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

Analiza pokazuje również, że nukleotydy 61-67 DsrA RNA są silnie hydrolizowane przez RNazę V1, natomiast w obecności 8-oxo-dG produkty hydrolizy obserwowane w żelu poliakryloamidowym są znacznie mniej intensywne. Można tym samym przypuszczać, że cząsteczka DsrA RNA w obecności 8-oxo-dG staje się mniej stabilna.

Utlenianie *in situ* może zachodzić nawet częściej w obrębie cząsteczek RNA niż DNA, które w większości są jednoniciowe, a tym samym bardziej podatne na uszkodzenia w porównaniu z dwuniciowym DNA, gdzie zasady chronione są dodatkowo przez wiązania wodorowe.

U bakterii *E. coli* zidentyfikowano mechanizm zapobiegający translacji cząsteczek RNA zawierających oksydowane nukleotydy [Hayakawa i wsp., 1999, 2002].

W jeden z nich zaangażowane jest białko Pnp - fosforylaza polinukleotydowa (*ang. polynucleotide phosphorylase*) wychwytyjące nieprawidłowe cząsteczki RNA. Wiązanie białka Pnp do cząsteczki RNA zawierającej 8-oxo-dG powoduje obniżenie tempa wzrostu komórki, prawdopodobnie poprzez unieczynnienie tego RNA dla maszyneryi translacyjnej [Hayakawa i wsp., 2001].

3.6.2. Analiza kompleksu DsrA RNA z kinetyną

Kinetyna, jako drugi znacznik oksydacyjny użyty w badaniach, wykazuje cechy naturalnego antyoksydantu. Może ona znosić działanie reaktywnych form tlenu i zapobiegać tworzeniu się 8-oxo-dG oraz innych produktów uszkodzenia oksydacyjnego w komórce [Olsen i wsp., 1999]. Jej właściwości biologiczne potwierdzono w badaniach roślin, gdzie stwierdzono, że kinetyna między innymi chroni roślinę przed stresem wywołanym wirusami i toksynami, blokując apoptozę i nekrozę tkanek, jak również przeciwdziała żółknięciu liści i spowalnia dojrzewanie owoców [Balazc i wsp., 1997; Barciszewski i wsp. 1999]. Wykazano również, że kinetyna opóźnia pojawianie się pierwszych oznak starzenia w kulturze tkankowej ludzkich fibroblastów, bez jednoczesnych zmian w morfologii komórek [Rattan i Clark, 1994].



Ryc. 27. Analiza wpływu kinetyki na strukturę DsrA RNA.

A. Autoradiogram 20% żelu poliakrylamidowego z 7 M mocznikiem przedstawiający produkty hydrolizy kompleksu DsrA RNA –kinetyna. C- kontrola, DsrA RNA znakowany przy końcu 3'; L- produkty hydrolizy alkalicznej; T1- DsrA RNA poddany hydrolizie RNazą T1 w warunkach denaturujących; V1- DsrA RNA poddany hydrolizie RNazą V1; S1- DsrA RNA poddany hydrolizie RNazą S1; C- DsrA RNA w 50 mM Tris-HCl bez kinetyki, C+ - DsrA RNA w 50 mM Tris-HCl w obecności 50 nM kinetyki, 1-2 - hydroliza DsrA RNA RNazą V1 w obecności kinetyki (50 i 5 nM), 3-4 - hydroliza DsrA RNA RNazą S1 w obecności kinetyki (50 i 5 nM). Regiony podlegające wpływowi kinetyki zaznaczono na rysunku.

B. Intensywność produktów hydrolizy RNazą V1 w obecności kinetyki wyznaczona na podstawie pomiaru densytometrycznego Zieloną linią zaznaczono poziom hydrolizy DsrA RNA RNazą V1, czerwoną w obecności 5 nM, a niebieską w obecności 50 nM kinetyki.

C. Regiony zaangażowane w oddziaływanie zaznaczone na strukturze drugorzędowej DsrA RNA.



Mechanizm działania kinetyny nie został jeszcze poznany. Wiele jednak dowodów przemawia za tym, że związek ten łączy w sobie dwie właściwości: transduktora sygnału i naturalnego antyoksydantu [Rattan i Clark, 1994]. Będąc cząsteczką sygnałową może stymulować wiele procesów biochemicznych spowalniających starzenie, a dzięki zdolnościom antyoksydacyjnym znosić działanie reaktywnych form tlenu.

W wyniku inkubacji kinetyny z DsrA RNA, stwierdzono, że działanie tego nukleotydu różni się od wpływu 8-oxo-dG na cząsteczkę DsrA RNA. Kinetyna wywiera na strukturę DsrA raczej działanie stabilizujące, które jest obserwowane szczególnie w przypadku późniejszej hydrolizy kompleksu DsrA RNA - kinetyna za pomocą RNazy V1 (Ryc. 27).

Nukleotydy w pozycji 49-51 są bardziej podatne na hydrolizę nukleazą V1 w obecności kinetyny, co pokazuje, że w tym miejscu dochodzi do podniesienia energii wiązań i dodatkowej stabilizacji struktury drugorzędowa DsrA RNA. Podobnie, jak w przypadku analizy z udziałem 8-oxo-dG, stężenie kinetyny również wpływa na intensywność hydrolizy RNazą V1. 50 nM stężenie kinetyny powoduje silniejszą hydrolizę określonych fragmentów cząsteczki DsrA RNA. Lockard i Kumar na przykładzie tRNAPhe z drożdży oraz tRNA_f^{Met} z *E. coli* wykazali, że RNaza V1 silniej hydrolizuje struktury bardziej stabilne. Koniec 3' tRNA_f^{Met} zawiera sześć par zasad G:C, co sprawia, że cząsteczka ta jest znacznie stabilniejsza od tRNA^{Phe}, zawierającego w tej części cztery pary G:C oraz dwie A:U [Lockard i Kumar, 1981].

Struktura tRNA_f^{Met} hydrolizowana jest przez RNazę V1 bardzo silnie i nieco słabiej po każdej parze zasad, podczas gdy w obrębie tRNA^{Phe} RNaza V1 rozpoznała i hydrolizowała tylko cztery pary zasad z jednakową intensywnością [Lockard i Kumar, 1981].

W rejonie nukleotydów 56-57 oraz 68-69 DsrA RNA obserwuje się produkty hydrolizy, które nie pojawiają się bez dodatku kinetyny. W tym wypadku w oddziaływanie zaangażowane są reszty tworzące słabe pary zasad (49-51 – A:U, U:A, U:A) oraz 56-57 (U:G, A:U), znajdujące się jednocześnie u podstawy trzonu drugiej spinki (Ryc. 27C).

Wydaje się, że głównie pary A:U zaangażowane są w oddziaływanie z kinetyną. Najniższa energia swobodna takich układów pozwala na stabilizację przez dodatkowy czynnik, który można nazwać tutaj „naprawczym”. Olsen i współpracownicy wykazali, że w DNA izolowanym z grasicy i poddanym działaniu 8-oxo-dG jako markera uszkodzenia oksydacyjnego, kinetyna pełni rolę swoistego protektanta. Znacząco ochraniała DNA przed działaniem wolnych rodników w procesie inicjowanym przez reakcję Fentona [Olsen i wsp., 1999]. Udział kinetyny jako czynnika naprawczego pokazano także w przypadku alternatywnego splicingu leżącego u podstaw choroby neurodegeneracyjnej- rodzinnej

W tym celu dokonano analizy sekwencji kodujących. Wskazywane były fragmenty sekwencji, które w kodzie genetycznym odpowiadają kodonowi stopu (UAG, UGA, UAG). Wskazywane były również fragmenty sekwencji, które w kodzie genetycznym odpowiadają kodonowi startu (AUG). Wskazywane były również fragmenty sekwencji, które w kodzie genetycznym odpowiadają kodonowi stopu (UAG, UGA, UAG).

W wyniku analizy sekwencji DNA RNA stwierdzono, że istnieje jedno miejsce, w którym występuje kodon stopu (UAG, UGA, UAG). Wskazywane były również fragmenty sekwencji, które w kodzie genetycznym odpowiadają kodonowi startu (AUG).

Wskazywane były również fragmenty sekwencji, które w kodzie genetycznym odpowiadają kodonowi stopu (UAG, UGA, UAG). Wskazywane były również fragmenty sekwencji, które w kodzie genetycznym odpowiadają kodonowi startu (AUG).

Wskazywane były również fragmenty sekwencji, które w kodzie genetycznym odpowiadają kodonowi stopu (UAG, UGA, UAG). Wskazywane były również fragmenty sekwencji, które w kodzie genetycznym odpowiadają kodonowi startu (AUG).

Wskazywane były również fragmenty sekwencji, które w kodzie genetycznym odpowiadają kodonowi stopu (UAG, UGA, UAG). Wskazywane były również fragmenty sekwencji, które w kodzie genetycznym odpowiadają kodonowi startu (AUG).

Wskazywane były również fragmenty sekwencji, które w kodzie genetycznym odpowiadają kodonowi stopu (UAG, UGA, UAG). Wskazywane były również fragmenty sekwencji, które w kodzie genetycznym odpowiadają kodonowi startu (AUG).

Wskazywane były również fragmenty sekwencji, które w kodzie genetycznym odpowiadają kodonowi stopu (UAG, UGA, UAG). Wskazywane były również fragmenty sekwencji, które w kodzie genetycznym odpowiadają kodonowi startu (AUG).

Wskazywane były również fragmenty sekwencji, które w kodzie genetycznym odpowiadają kodonowi stopu (UAG, UGA, UAG). Wskazywane były również fragmenty sekwencji, które w kodzie genetycznym odpowiadają kodonowi startu (AUG).

dysautonomii [Slaughaupt i wsp., 2004]. Choroba ta powodowana jest poprzez mutację w transkrypcie białka związanego z kinazą (IKBKAP). Mutacja ta powoduje nieprawidłowe składaniem egzonów, podczas którego w wyniku pojedynczej mutacji w egzonie 20 dochodzi do wyłączeniem właśnie tego egzonu i pominięcia go podczas splicingu [Slaughaupt i wsp., 2004]. Mutacja prowadzi do zmiany sekwencji w donorowym miejscu splicingowym z GUAAGU na GUAAGC.

Wykazano, że kinetyna znacząco wpływa na obniżenie częstości tej pojedynczej mutacji prowadząc do podniesienia poziomu translacji prawidłowych transkryptów [Slaughaupt i wsp., 2004]. Zakładając, że kinetyna spowodowałaby zamianę niekonsensusowej sekwencji na sekwencje konsensusową, w miejscu mutacji UC, pojawiłaby się para AU, która była również preferencyjnie rozpoznawana w przypadku oddziaływania z DsrA RNA.

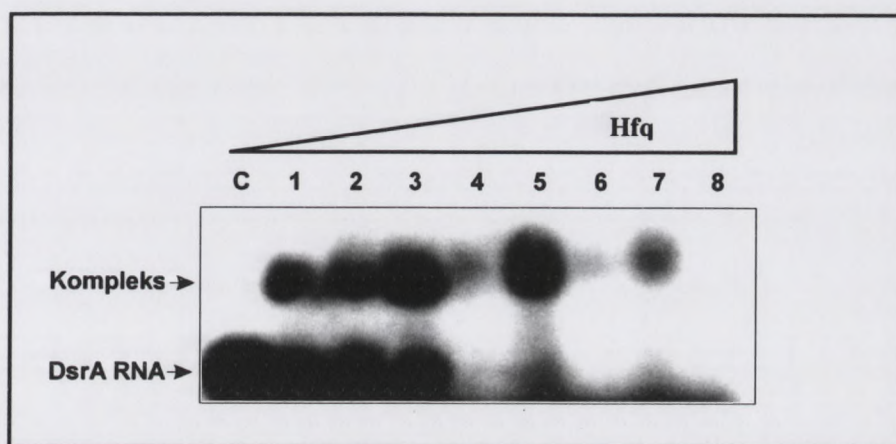
Wydaje się więc prawdopodobne, że kinetyna działa na cząsteczkę docelową rozpoznając słabe pary zasad A:U. Poprzez niewielkie obniżenie energii swobodnej może powodować stabilizację cząsteczki, a tym samym zmniejszać jej podatność na działanie czynników oksydacyjnych, takich jak 8-oxo-dG.

Na tym etapie badań można postawić hipotezę, że w szlaku uszkodzenia oksydacyjnego z udziałem 8-oxoG oraz kinetyny *in vivo* mogłyby być zaangażowane dwie cząsteczki ncRNA: DsrA RNA oraz OxyS. Jak wspomniano w Rozdziale 2, działanie obu tych cząsteczek jako regulatorów zależy od białka Hfq. Wydaje się prawdopodobne, że w czasie działania stresu oksydacyjnego najpierw dochodzi do nadekspresji OxyS RNA oraz do związania z tym RNA znacznej ilości komórkowej puli białka Hfq, które pełni rolę białka opiekuńczego i stabilizującego strukturę RNA. DsrA RNA pozbawione więc ochrony ze strony białka Hfq podlega stabilizacji przez kinetynę.

3.6.3. Analiza kompleksu DsrA RNA – Hfq w obecności kinetyny

W oddziaływania te zaangażowane są określone fragmenty struktury RNA. Wykazano jednocześnie, że kinetyna wpływa na stabilizację tej struktury. Wykonano więc doświadczenie z wiązaniem białka Hfq w obecności kinetyny jako potencjalnego kompetytora reakcji. Przy stężeniu 0.5, 0.75 oraz 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ białka oraz w obecności kinetyny w stężeniu 4mM obserwowano znaczące obniżenie wielkości tworzonego kompleksu (Ryc. 28). Kinetyna w tym wypadku nie musi pełnić roli klasycznego kompetytora rywalizującego o wiązanie DsrA z białkiem Hfq. Dotychczasowe wyniki sugerują tutaj po raz kolejny stabilizacyjny wpływ tego nukleotydu. Ustabilizowana struktura DsrA RNA jest bowiem

niedostępna dla białka Hfq i tym samym uniemożliwia jego wiązanie do RNA. Dopiero możliwość rozplecenia struktury i wyeksponowanie miejsc wiązania prowadzi do tworzenia kompleksu DsrA RNA – Hfq.



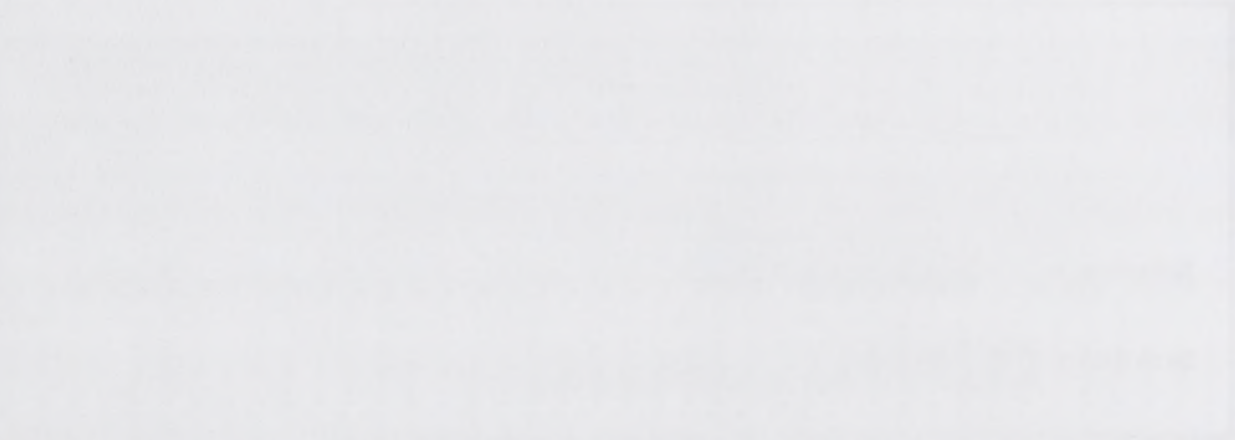
Ryc. 28. Badanie oddziaływania DsrA RNA z białkiem Hfq w obecności kinetyny – rozdziel w 2% żelu agarozowym. C – DsrA RNA znakowany z końca 5', linie: 1, 3, 5, 7 – kompleks DsrA RNA z białkiem Hfq wg wzrastającego stężenia Hfq (0.3, 0.55, 0.75, $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$), linie 2, 4, 6, 8 – kompleks DsrA RNA z Hfq w obecności kinetyny.

3.6.4. Analiza kompleksów DsrA RNA z adeniną i guaniną

W celu zbadania, czy 8-oxo-dG oraz kinetyna wywierają specyficzny wpływ na cząsteczkę DsrA RNA przeprowadzone reakcje wiązania adeniny i guaniny. Nie wykazały one jednak żadnego wpływu na strukturę drugorzędową DsrA RNA, potwierdzając jednocześnie specyficzność działania znaczników stresu oksydacyjnego (Ryc. 29).

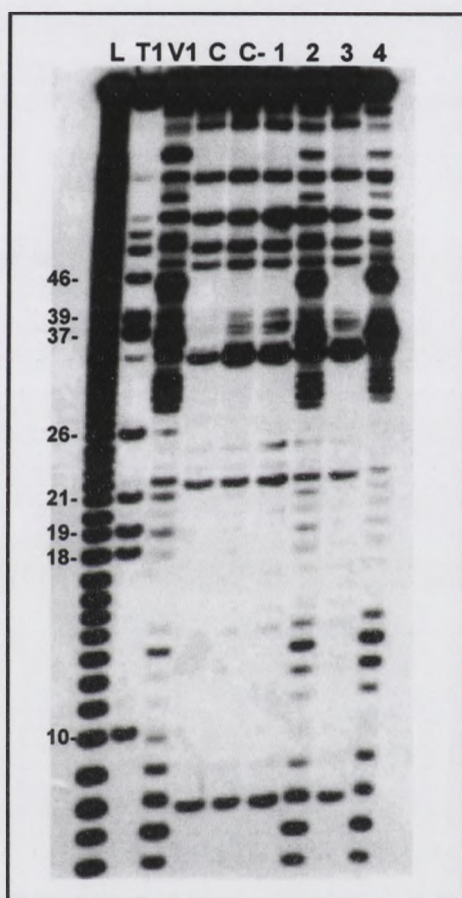
3.6.5. Analiza termodynamiczna kompleksów

W celu określenia wpływu określonych cząsteczek na stopień ustabilizowania struktury DsrA RNA, przeprowadzono analizę temperatury topnienia kompleksów DsrA RNA z kinetyną, guaniną i adeniną. W tym wypadku zbadano również wpływ jonów magnezu na temperaturę topnienia kompleksów. Na trwałość termodynamiczną cząsteczki



wpływa przede wszystkim jej struktura. Elementami strukturalnymi budującymi DsrA RNA są trzy główne spinki.

Struktura spinki tworzy się, kiedy łańcuch RNA zwija się i tworzą się wiązania wodorowe w obrębie tej samej cząsteczki RNA. Struktury takie są bardzo rozpowszechnione w obrębie naturalnych RNA. Wykazano, że 70% struktury rRNA tworzy właśnie ten rodzaj elementów [Antao i wsp., 1992].



Ryc. 29. Analiza wpływu adeniny i guaniny na strukturę DsrA RNA.

Autoradiogram 20% żelu poliakryloamidowego z 7 M mocznikiem przedstawiający produkty hydrolizy kompleksu DsrA RNA –adenina/guanina. L- produkty hydrolizy alkalicznej; T1- DsrA RNA poddany hydrolizie RNazą T1 w warunkach denaturujących; V1- DsrA RNA poddany hydrolizie RNazą V1; C- kontrola, DsrA RNA znakowany przy końcu 3'; C- DsrA RNA w 50 mM Tris-HCl bez adeniny i guaniny; 1 - DsrA RNA w 50 mM Tris-HCl w obecności 50 nM guaniny, 2 - hydroliza DsrA RNA RNazą V1 w obecności guaniny (50 nM), 3 - DsrA RNA w 50 mM Tris-HCl w obecności 50 nM adeniny, 4 - hydroliza DsrA RNA RNazą V1 w obecności adeniny (50 nM).

Wzrost wydatków na materiały eksploatacyjne i inne wydatki bieżące w 2005 r. w stosunku do 2004 r. wyniósł 100,0%.

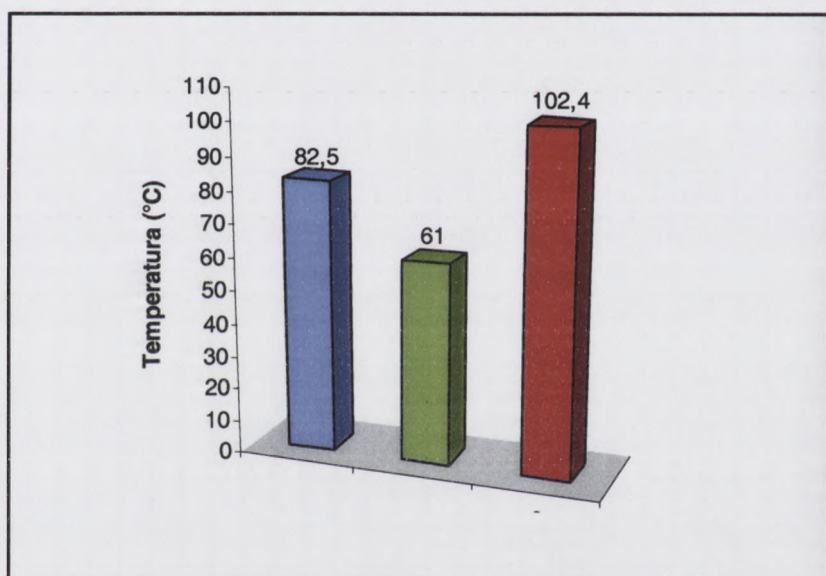
Wzrost wydatków na materiały eksploatacyjne i inne wydatki bieżące w 2005 r. w stosunku do 2004 r. wyniósł 100,0%. Wynik ten jest spowodowany wzrostem wydatków na materiały eksploatacyjne i inne wydatki bieżące w 2005 r. w stosunku do 2004 r. wyniósł 100,0%.



Wzrost wydatków na materiały eksploatacyjne i inne wydatki bieżące w 2005 r. w stosunku do 2004 r. wyniósł 100,0%. Wynik ten jest spowodowany wzrostem wydatków na materiały eksploatacyjne i inne wydatki bieżące w 2005 r. w stosunku do 2004 r. wyniósł 100,0%.

Struktury te są jednocząsteczkowe, tak więc ich konformacyjne zmiany są zmianami wewnątrzcząsteczkowymi. Stabilność spinki silnie zależy od sekwencji jej trzonu, charakteru zamykającej pary zasad, pierwszego niesparowania oraz wielkości pętli [Tuerk i wsp., 1998, SantaLucia i wsp., 1992].

Przy pomocy programu Mfold pokazano, że określone spinki tworzące strukturę drugorzędową DsrA RNA wykazują znacząco różną trwałość termodynamiczną. Obliczona temperatura topnienia dla pierwszej spinki (nukleotydy 1-22) wynosi 82,5°C, dla regionu centralnego (nukleotydy 23-59) - 61°C, a dla spinki trzeciej aż 102,4°C (Ryc. 30). Energia swobodna dla poszczególnych spinek to, odpowiednio: -7 kcal/mol, -4.8 kcal/mol oraz -18.2 kcal/mol.



Ryc. 30. Temperatury topnienia dla poszczególnych spinek DsrA RNA obliczone przez program Mfold. Kolor niebieski - spinka pierwsza, kolor zielony - spinka druga, kolor czerwony - spinka trzecia.

Analiza ta zgodna jest wcześniejszymi badaniami z wykorzystaniem programu Sfold oraz z wynikami otrzymanymi po hydrolizie RNazą H. Średnia temperatura topnienia DsrA RNA, przewidziana przez program wynosi natomiast 80.5°C.

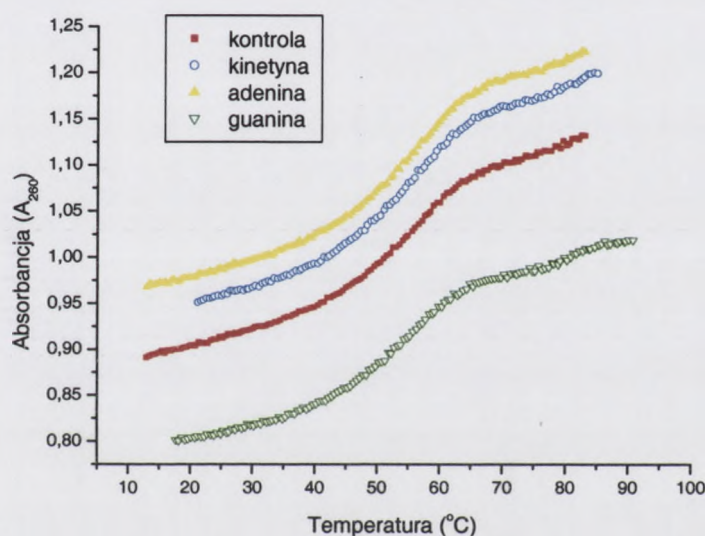
Dla porównania wyników otrzymanych podczas obliczeń *in silico*, przeprowadzono analizę topnienia struktury DsrA RNA w warunkach rzeczywistych.

Przeprowadzone w tej pracy badania wykazały, że temperatura topnienia dla DsrA RNA w stanie wolnym wynosi 52.1°C, a nie 80.5°C, jak przewidziano w programie (Ryc. 31).

Pokazano jednocześnie, że obecność kinetyny wpływa na podniesienie temperatury topnienia DsrA RNA z 52.1°C na 55.8°C. Potwierdza to wcześniejszą obserwację pokazującą



stabilizujący wpływ kinetyny na strukturę DsrA RNA. Pomimo braku efektu wywoływanego przez adeninę w obecności RNazy VI, zaobserwowano także wzrost temperatury topnienia do 55.6°C, a z guaniną do 56.7°C (Ryc. 31). Brak jest doniesień pokazujących wpływ nukleotydów na strukturę RNA. Istnieją jedynie dane o wprowadzaniu modyfikowanych reszt adenozy w pętlę antykodonową tRNA. Agris i współpracownicy pokazali, że treonylokarbamyloadenozyne nieznacznie destabilizuje badaną strukturę [Yarian i wsp., 2000; Agris i wsp., 1999].



Ryc. 31. Krzywe topnienia kompleksów DsrA RNA z kinetyną, adeniną oraz guaniną.

Porównania temperatur topnienia kompleksów DsrA RNA z wybranymi pochodnymi nukleotydów wyraźnie wskazują na większą trwałość termodynamiczną struktury w obecności jonów magnezu.

Ich obecność znacząco podniosła temperaturę topnienia DsrA RNA do 64.8°C, więc o 10.7°C, co świadczy o ustabilizowaniu struktury przez magnez (Ryc. 32).

Kinetyna wraz z jonami magnezu spowodowała podniesienie temperatury do 66.1°C, a adenina do 65.4°C, czyli o 0.6°. Można więc stwierdzić, że obecność kinetyny oraz jonów magnezu spowodowała silniejszy efekt stabilizacyjny na strukturę DsrA RNA.

W celu oceny wpływu temperatury na procesy DNA RNA, wykonano serię doświadczeń, w których zastosowano różne temperatury inkubacji (37°C, 42°C, 48°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C, 85°C, 90°C, 95°C). Wyniki tych doświadczeń przedstawiono w tabeli 1. Jak widać, w miarę wzrostu temperatury, wydajność procesu DNA RNA maleje, co jest spowodowane przez denaturację DNA i RNA, a także przez inaktywację enzymów. Wyniki te są zgodne z literaturą, która wskazuje, że optymalna temperatura dla DNA RNA wynosi 37°C.

Agos / wst. 1991



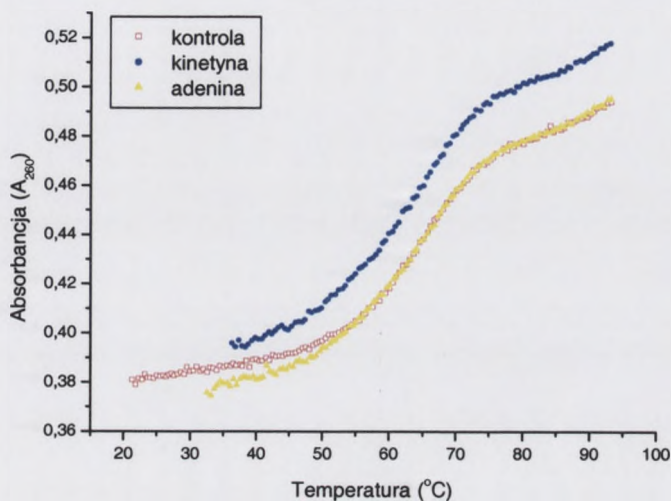
Tab. 1. Wyniki doświadczeń dotyczących wpływu temperatury na procesy DNA RNA.

W celu oceny wpływu temperatury na procesy DNA RNA, wykonano serię doświadczeń, w których zastosowano różne temperatury inkubacji (37°C, 42°C, 48°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C, 85°C, 90°C, 95°C). Wyniki tych doświadczeń przedstawiono w tabeli 1. Jak widać, w miarę wzrostu temperatury, wydajność procesu DNA RNA maleje, co jest spowodowane przez denaturację DNA i RNA, a także przez inaktywację enzymów. Wyniki te są zgodne z literaturą, która wskazuje, że optymalna temperatura dla DNA RNA wynosi 37°C.

W celu oceny wpływu temperatury na procesy DNA RNA, wykonano serię doświadczeń, w których zastosowano różne temperatury inkubacji (37°C, 42°C, 48°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C, 85°C, 90°C, 95°C). Wyniki tych doświadczeń przedstawiono w tabeli 1. Jak widać, w miarę wzrostu temperatury, wydajność procesu DNA RNA maleje, co jest spowodowane przez denaturację DNA i RNA, a także przez inaktywację enzymów. Wyniki te są zgodne z literaturą, która wskazuje, że optymalna temperatura dla DNA RNA wynosi 37°C.

W celu oceny wpływu temperatury na procesy DNA RNA, wykonano serię doświadczeń, w których zastosowano różne temperatury inkubacji (37°C, 42°C, 48°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C, 85°C, 90°C, 95°C). Wyniki tych doświadczeń przedstawiono w tabeli 1. Jak widać, w miarę wzrostu temperatury, wydajność procesu DNA RNA maleje, co jest spowodowane przez denaturację DNA i RNA, a także przez inaktywację enzymów. Wyniki te są zgodne z literaturą, która wskazuje, że optymalna temperatura dla DNA RNA wynosi 37°C.

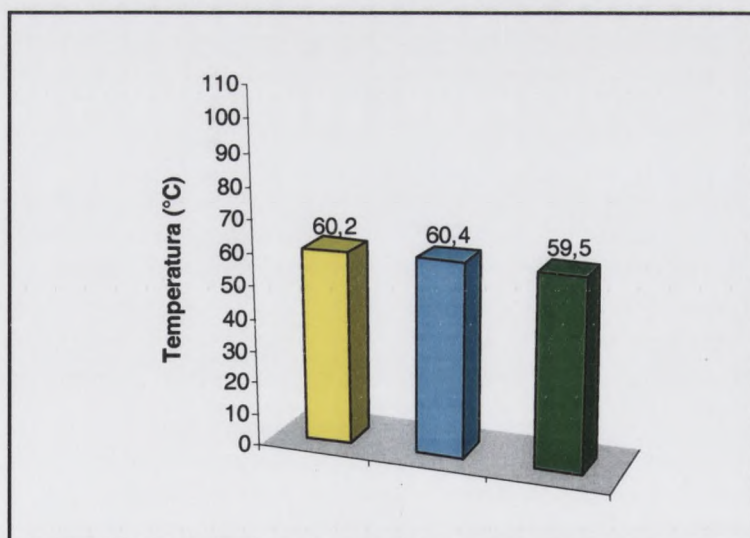
W celu oceny wpływu temperatury na procesy DNA RNA, wykonano serię doświadczeń, w których zastosowano różne temperatury inkubacji (37°C, 42°C, 48°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C, 85°C, 90°C, 95°C). Wyniki tych doświadczeń przedstawiono w tabeli 1. Jak widać, w miarę wzrostu temperatury, wydajność procesu DNA RNA maleje, co jest spowodowane przez denaturację DNA i RNA, a także przez inaktywację enzymów. Wyniki te są zgodne z literaturą, która wskazuje, że optymalna temperatura dla DNA RNA wynosi 37°C.



Ryc. 32. Krzywe topnienia kompleksów DsrA RNA z kinetyną i adeniną w obecności jonów Mg^{2+} .

W celu zbadania specyficzności oddziaływań powyższych związków na strukturę DsrA RNA, przeprowadzono badanie ich wpływu na temperatury topnienia 5S rRNA.

Pokazano, że żaden z testowanych nukleotydów nie wpłynął na zmianę temperatury topnienia 5S rRNA, co świadczy o specyficzności ich działania względem DsrA RNA (Ryc.33, 34). Po raz kolejny potwierdzono fakt, że znaczniki stresu oksydacyjnego działają specyficznie tylko na RNA zaangażowany w odpowiedź na stres oksydacyjny.



Ryc. 33. Temperatury topnienia dla kompleksów 5S RNA z adeniną i guaniną. Kolorem żółtym zaznaczono 5S RNA, niebieskim – kompleks 5S RNA z kinetyną, zielonym – 5S RNA z adeniną.

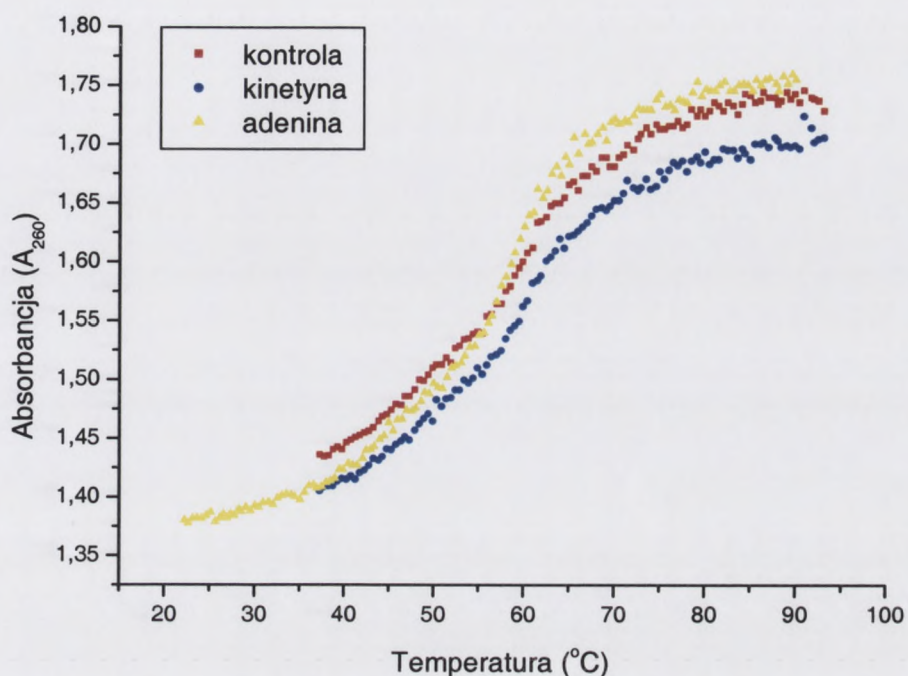


Fig. 10. Wykres przedstawia porównanie wzrostu u grupy kontrolnej i grupy leczącej.

W celu oceny skuteczności leczenia przeprowadzono badania kliniczne. Wyniki badań klinicznych wykazały, że leczenie przynosiło korzyści w postaci zwiększenia wzrostu i poprawy jakości życia. Wyniki te potwierdzają skuteczność leczenia i jego wpływ na poprawę jakości życia pacjentów. Wyniki te są zgodne z oczekiwaniami i dowodzą na skuteczność leczenia. Wyniki te są zgodne z oczekiwaniami i dowodzą na skuteczność leczenia.



Fig. 11. Wykres przedstawia porównanie wzrostu u trzech grup. Wyniki badań klinicznych wykazały, że leczenie przynosiło korzyści w postaci zwiększenia wzrostu i poprawy jakości życia.



Ryc. 34. Krzywe topnienia kompleksów 5S rRNA z kinetyną i adeniną.

Powyższe wyniki pokazują, że DsrA RNA jako składnik systemu zaangażowanego w odpowiedź na stres temperaturowy u *E. coli* poprzez oddziaływanie ze znacznikami oksydacyjnymi, może również reagować na stres oksydacyjny, a nie jak przypuszczano dotychczas, wyłącznie na stres temperaturowy.

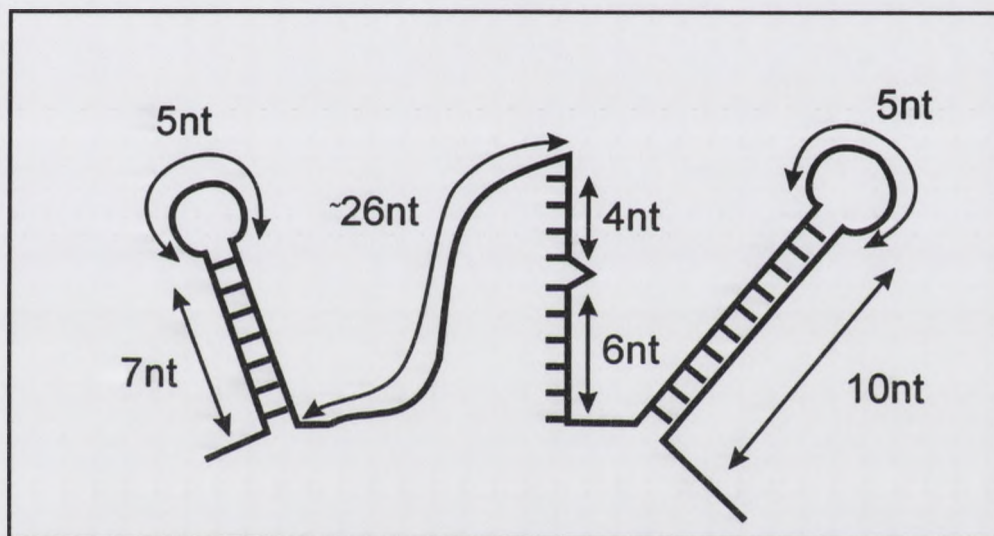
Może działać więc jako swoisty ryboprzełącznik - poprzez wiązanie specyficznych ligandów oraz stabilizację i destabilizację struktury DsrA RNA powodować zmianę poziomu ekspresji genów regulowanych przez ten RNA.

Jak wspomniano w rozdziale 2, DsrA RNA reguluje poziom czynnika transkrypcyjnego RpoS, który ulega ekspresji w fazie stacjonarnego wzrostu bakterii oraz w odpowiedzi na stresowe warunki środowiska. Wykazano, że wzrost ilości RpoS w czasie szoku osmotycznego jest uzależniony od obecności DsrA RNA [Majdalani, 2002]. Regulacja translacji mRNA RpoS i jego niski poziom związane są natomiast z tworzeniem krótkich regionów dwuniciowych, które blokują miejsca wiązania rybosomu [Majdalani, 2002]. Stabilizacja par A:U w wyniku wiązania kinetyny jest więc być może również konieczna dla zachowania pełnego fragmentu sekwencji niezbędnej do oddziaływania z mRNA RpoS.

Być może więc takie czynniki, jak kinetyna czy 8-oxo-dG poprzez zmianę stabilności DsrA RNA mogą wpływać na jego regulacyjną rolę w komórce bakteryjnej.



Przedstawione wyniki dostarczają dowodów na istnienie nowej struktury drugorzędowej DsrA RNA. Pozwoliły one również zaproponować deskryptor struktury DsrA RNA, który może posłużyć do poszukiwania ortologów genów DsrA u innych bakterii (Rolle i wsp. 2005). Deskryptor ten jako determinanty opisujące strukturę potencjalnych kandydatów ortologów genów DsrA RNA zawiera dwa elementy o charakterze spinki do włosów. Jedna z nich powinna zawierać trzon o długości siedmiu nukleotydów, druga natomiast - dziesięciu. Obydwa trzony powinny być zwieńczone pętlą o długości pięciu nukleotydów. Pomiędzy spinkami zakłada się istnienie fragmentu sekwencji o długości około 26 nukleotydów, w końcowym odcinku tworzącym fragment trzonu z wypełnieniem przedzielającym odcinek cztero- i sześcienukleotydowy.



Ryc. 35. Deskryptor struktury drugorzędowej DsrA RNA. Model składa się z wysoko zdefiniowanych spinek 1 i 3 oraz sekwencji w obrębie regionu centralnego o określonej długości poszczególnych fragmentów trzonu.

4. PODSUMOWANIE

Celem niniejszej pracy było poznanie struktury DsrA RNA, specyficzności jego oddziaływania z białkiem Hfq, jak również wpływ kinetyny i 8-oxo-dG na konformację DsrA RNA.

Przy pomocy metod bioinformatycznych, mapowania enzymatycznego oraz hydrolizy z użyciem RNazy H i DNAzymów określono nową strukturę DsrA RNA, która składa się z dwóch bardzo stabilnych spinek oraz regionu centralnego wykazującego niższą stabilność i prawdopodobnie znaczną dynamikę.

Wyznaczono reszty nukleotydowe zaangażowane w oddziaływanie z białkiem Hfq w wyniku badania kompleksu z zastosowaniem hydrolizy indukowanej jonami ołowiu oraz wolnym rodnikiem.

Przeprowadzono ocenę trwałości termodynamicznej DsrA RNA w stanie wolnym oraz związanym z produktami stresu oksydacyjnego. Wykazano, że kinetyna w niewielkim stopniu wpływa na stabilizację struktury DsrA RNA, podczas gdy 8-oxo-dG powoduje obniżenie jej trwałości.

Badanie kompleksu DsrA RNA z białkiem Hfq w obecności kinetyny jako potencjalnego kompetitora reakcji pokazało, że ten analog adeniny obniża ilość tworzonego kompleksu.

W wyniku przeprowadzonych badań zaproponowano deskryptor struktury drugorzędowej dla DsrA RNA.

WYKAZ

1. Wstęp 2

2. Materiał i metody 3

3. Wyniki i omówienie 4

4. Dyskusja 5

5. Podsumowanie 6

6. Bibliografia 7

7. Wykaz skrótów 8

8. Wykaz tabel 9

9. Wykaz rysunków 10

10. Wykaz załączników 11

11. Wykaz tabel 12

12. Wykaz rysunków 13

13. Wykaz załączników 14

14. Wykaz tabel 15

15. Wykaz rysunków 16

16. Wykaz załączników 17

17. Wykaz tabel 18

18. Wykaz rysunków 19

19. Wykaz załączników 20

20. Wykaz tabel 21

21. Wykaz rysunków 22

22. Wykaz załączników 23

23. Wykaz tabel 24

24. Wykaz rysunków 25

25. Wykaz załączników 26

26. Wykaz tabel 27

27. Wykaz rysunków 28

28. Wykaz załączników 29

29. Wykaz tabel 30

30. Wykaz rysunków 31

31. Wykaz załączników 32

32. Wykaz tabel 33

33. Wykaz rysunków 34

5. MATERIAŁY I METODY

5.1 Wykaz ważniejszych materiałów stosowanych w pracy

5.1.1 Odczynniki

Tab. 6. Zestawienie odczynników wykorzystywanych w pracy

Odczynnik	Producent
Zestaw do transkrypcji T7, rybonukleaza V1	Ambion
Kinaza polinukleotydomowa z faga T4	Amersham Pharmacia
Bacto-Agar, Bacto-Trypton, ekstrakt drożdżowy	Difco
PEG 8000	Fermentas
Guanina	Fluca
[γ - 32 P]ATP, [32 P] pCp	ICN
Chlorek magnezu, chlorek potasu, chlorek sodu, cytrynian sodu, wersenian żelaza, wodorotlenek sodu	Merck
Kwas borowy, kwas octowy, metanol, mocznik	Polskie Odczynniki Chemiczne
ATP, zestaw do sekwencjonowania DNA, ligaza RNA z faga T4, ligaza DNA z faga T4, octan sodu, rybonukleaza S1, IPTG	Promega
Adenina, Coomassie brilliant blue-R 250, PMSF	Serva
Agaroz , akryloamid, APS, aprotyna , chlorek wapnia, DTT, EDTA, fenol, glicyna, glicerol, imidazol, kakodylan sodu, kinetyna, leupeptyna, N, N'-metylenobisakryloamid, octan ołowiu, 8-oxo-dG, pepstatyna, rybonukleaza H, rybonukleaza T1, SDS, standard wielkości białka, TEMED, Tris	Sigma
Zestaw do izolacji DNA, agaroz wzbożona niklem	Qiagen
Zestawy oligodeoksynukleotydów	IBB (Warszawa)
Błony rentgenowskie	Foton

5.1.2. Szczepy *E. coli*

Szczep *E. coli* BL21 zawierający zrekombinowany wektor pET21b z genem białka Hfq otrzymano od dr Giseli Storz z National Institute of Child Health and Development (Bethesda, USA).

5.1.3. Pożywki i bufony

Pożywka LB

Bakto-Trypton - 1%

Ekstrakt drożdżowy - 0.5%

NaCl - 0.5%

Pożywka LB z agarem

Bakto-Trypton - 1%

Ekstrakt drożdżowy - 0.5%

NaCl - 0.5%

Agar - 1.5%

Bufor do elektroforezy białek

Tris-HCl, pH 8.3 - 50 mM

Glicyna - 2.88%

SDS - 0.3%

Roztwór do hydrolizy alkalicznej RNA

NaOH - 50 mM

EDTA - 10 mM

Bufor do rybonukleazy T1

CH₃COONa pH 4.5 - 20 mM

Mocznik - 7 M

EDTA - 1mM

Bufor do rybonukleazy V1

Tris-HCl pH 7.5 - 50mM

NaCl - 200 mM

MgCl₂ - 20 mM

Bufor 10x TBE

Tris-HCl pH 8.3 - 0.5 mM

H₃BO₃ - 0.5 mM

EDTA pH 8.0 - 10 mM

Bufor A1-Ni-NTA

Imidazol - 0.02 M

Tris-HCl pH 7.0 - 0.1 M

NaCl - 0.05 M

Bufor B1-Ni-NTA

Imidazol - 0.2 M (0.1 M, 0.05 M, 0.01 M)

Tris-HCl pH 7.0 - 0.1 M

NaCl - 0.05 M

Bufor do wiązania białka 5x

Tris-HCl pH 7.5 - 50 mM

NaCl - 250 mM

KCl - 250 mM

MgCl₂ - 50 mM

Bufor do ligacji 5x

Tris-HCl pH 7.5 - 0,25 mM

MgCl₂ - 50 mM

ATP - 5 mM

DTT - 5 mM

PEG 8000 - 25%

1954-1-1

1954-1-2

1954-1-3

1954-1-4

1954-1-5

1954-1-6

1954-1-7

1954-1-8

1954-1-9

1954-1-10

1954-1-11

1954-1-12

1954-1-13

1954-1-14

1954-1-15

1954-1-16

1954-1-17

1954-1-18

1954-1-19

1954-1-20

1954-1-21

1954-1-22

1954-1-23

1954-1-24

1954-1-25

1954-1-26

1954-1-27

1954-1-28

1954-1-29

1954-1-30

1954-1-31

1954-2-1

1954-2-2

1954-2-3

1954-2-4

1954-2-5

5.2. Metody rozdziłu i analizy kwasów nukleinowych oraz białka

5.2.1. Elektroforetyczny rozdział RNA w denaturujących żelach poliakryloamidowych

RNA rozdzielano w 10% i 20% żelach poliakryloamidowych z 7 M mocznikiem (Tab. 7), o wymiarach 20 cm x 40 cm, 20 cm x 60 cm i grubości 0.3 mm - 0.5 mm, przy napięciu 1000 V - 2000 V i natężeniu 5 mA - 20 mA w temperaturze pokojowej [Digweed i wsp., 1986]. Elektroforezę prowadzono w buforze 1 x TBE. Próby nakładano na żel w buforze obciążającym do RNA (Tab. 8).

Tab. 7. Skład denaturujących żeli poliakrylamidowych

Składniki	10% [100ml]	20% [100 ml]
40% akryloamid/bisakryloamid (38:2)	25 ml	50 ml
mocznik 7 M	42 g	42 g
10 x TBE	10 ml	10 ml
woda		
10% APS	700 µl	700 µl
TEMED	35 µl	35 µl

Tab. 8. Bufory do nakładania preparatów na żel (obciążające)

RNA	Białko	Kompleks białko-RNA
1 M cytrynian sodu pH 5.0	62.5 mM Tris-HCl pH 6.8	4 mM Tris-HCl pH 7.4
0.1 M EDTA	2% SDS	4% gliceryna
7 M mocznik	5.9 M mocznik	0.02 % błękit bromofenolowy
0.1% błękit bromofenolowy	0.1 M DTT	
0.1% cjanol ksylenowy	0.05% błękit bromofenolowy	

5.2.2. Elektroforetyczny rozdział białek w żelu poliakrylamidowym z SDS

Białka analizowano w 15% żelu poliakryloamidowym z SDS (Tab. 9), o wymiarach 10 cm x 10 cm lub 20 cm x 20 cm i grubości 0.2 mm - 0.5 mm (Laemmli, 1970). Elektroforezę prowadzono w buforze: 50 mM Tris-HCl pH 8.3, 2.9% glicyna, 0.3% SDS. Próby nakładano na żel w buforze obciążającym do białek (Tab. 8). Żel wybarwiano mieszaniną 45% metanolu, 7% kwas octowy i 0.5% Coomassie brilliant blue R-250 [Ausubel i wsp., 1994].

Tab. 9. Skład żelu poliakrylamidowego z SDS

Składniki	Żel zagęszczający [20 ml]	15% żel rozwijający [30ml]
30% akryloamid/bisakryloamid (30:0:8)	2.5 ml	15 ml
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	5.0 ml	-
3.0 M Tris- HCl pH 8.8	-	3.75 ml
10% SDS	0.2 ml	0.3 ml
woda	11.3 ml	9.45 ml
APS	1 ml	1.5 ml
TEMED	0.015 ml	0.015 ml

5.2.3. Elektroforetyczny rozdział kompleksów RNA- białko w żelach agarozowych

Kompleksy białko- kwas nukleinowy analizowano w 1% żelach agarozowych o wymiarach 10 cm x 10 cm i grubości 0.5 cm w buforze 1 x TBE [Ausubel i wsp., 1994]. Przed rozdziałem elektroforetycznym preparaty obciążano 1/10 objętości buforu do kompleksów nukleobiałkowych (Tab. 8). Elektroforezę prowadzono przy natężeniu prądu 50 mA- 60 mA w temperaturze pokojowej.

5.2.4. Identyfikacja białek w żelach i roztworze

Mikrogramowe ilości białka (0.3 µg - 1 µg) wybarwiano za pomocą roztworu Coomassie brilliant blue R-250 [Ausubel i wsp., 1994]. Stężenie białka w roztworze oznaczano metodą Bradford [Bradford, 1976].

5.2.5. Identyfikacja RNA w żelach

RNA w żelu poliakrylamidowym identyfikowano w świetle UV [Ausubel i wsp., 1994]. Znakowany radioaktywnie RNA analizowano za pomocą autoradiografii - ekspozycję żeli prowadzono w temperaturze -70°C stosując ekrany wzmacniające i błony rentgenowskie RTG-XS. Optymalny czas ustalano na podstawie pomiaru radioaktywności próbek poddawanych elektroforezie [Ausubel i wsp., 1994].

Table 1: Summary of Data

Category	Value
Item 1	100
Item 2	200
Item 3	300
Item 4	400
Item 5	500
Item 6	600
Item 7	700
Item 8	800
Item 9	900
Item 10	1000

Table 2: Detailed Data

Item	Value	Category
Item 1	100	Category A
Item 2	200	Category B
Item 3	300	Category C
Item 4	400	Category D
Item 5	500	Category E
Item 6	600	Category F
Item 7	700	Category G
Item 8	800	Category H
Item 9	900	Category I
Item 10	1000	Category J

5.3. Transformacja komórek kompetentnych *E. coli*

5.3.1. Przygotowanie komórek kompetentnych *E. coli*

Szczep *E. coli* Nova Blue przygotowano do transformacji zrekombinowanym plazmidem pT7/T3- λ 18 stosując metodę traktowania chlorkiem wapnia. Kulturę prowadzono w 100 ml pożywki LB, zaszczipiając ją bakteriami z hodowli całonocnej do wartości gęstości optycznej OD₆₀₀~0.05. Inkubację w 37°C prowadzono do wczesnej fazy logarytmicznego wzrostu bakterii OD₆₀₀~0.5. Kulturę wirowano 10 minut w 4°C przy 4000 rpm, osad zawieszano w 20 ml schłodzonego w lodzie 50 mM chlorku wapnia. Zawiesinę bakterii w roztworze chlorku wapnia inkubowano w lodzie 20 minut, po czym wirowano 10 minut w 4°C przy 4000 rpm. Komórki kompetentne zawieszano w 4 ml zimnego chlorku wapnia i zamrażano w ciekłym azocie po dodaniu glicerolu do stężenia 50%. Tak przygotowane bakterie przechowywano w temperaturze -70°C.

5.3.2. Przygotowanie konstrukt z sekwencją DsrA RNA

W celu stworzenia matrycy do transkrypcji *in vitro*, przygotowano konstrukt DNA zawierający sekwencję DsrA RNA. Powstał on przez ligację syntetyzowanych chemicznie pięciu krótkich odcinków oligodeoksynukleotydów, o następującej sekwencji:

Oligodeoksynukleotyd	Długość (nt)	SEKWENCJA 5'→3'
DsrA 1	45	AATTCAACACATCAGATTTCTGGTGTAAACGAATTTTTTAAGTGC
DsrA 2	47	TTCTTGCTTAAGCAAGTTTCATCCCGACCCCCTCAGGGTCGGGATTA
DsrA 3	31	AGCTTAATCCCGACCCTGAGGGGGTTCGGGAT
DsrA 4	40	GAAACTTGCTTAAGCAAGAAGCACTTAAAAAATTCGTTAC
DsrA 5	21	ACCAGGAAATCTGATGTGTTG

Oligonukleotydy hybrydyzowano w buforze do ligacji 5x z kinazą polinukleotydową T4 w temperaturze 37°C przez 30 minut, następnie denaturowane przez 3 minuty w 90°C i wolno schładzane. Otrzymany hybryd zawierający fragment DsrA1-DsrA2 dla jednej nici oraz DsrA3-DsrA5 dla drugiej nici, wklonowano do plazmidu pT7T3 α -18 zawierającego miejsca restrykcyjne dla Hind III oraz Eco RI oraz promotor dla polimerazy T7 [Wyszko i wsp., 1999].

5.3.3. Transformacja bakterii plazmidowym DNA

Szczep *E. coli* Nova Blue transformowano zrekombinowanym plazmidem pT7/T3- λ 18, zawierającym sekwencję dla DsrA RNA. Do 300 μ l komórek kompetentnych dodawano DNA w stężeniu 0.4 pmol i inkubowano 40 minut w lodzie, a następnie 2 minuty w 42°C, po czym wirowano 1 minutę w temperaturze pokojowej. Osad zawieszano w 100 μ l pożywki LB i inkubowano przez godzinę w temperaturze 37°C. Bakterie ponownie krótko wirowano a osad zawieszano w 100 μ l pożywki LB i rozprowadzano na powierzchni pożywki stałej LB na szalkach Petriego, zawierającej antybiotyk selekcyjny (ampicylina o stężeniu końcowym 50 μ g/ml). Transformowane bakterie hodowano w temperaturze 37°C przez 16 godzin.

5.4. Transkrypcja *in vitro* DsrA RNA

W celu potwierdzenia poprawności ligacji, plazmidowe DNA izolowano z transformantów przy pomocy Qiagen Midi Kit oraz sekwencjonowane.

Przed transkrypcją 40 μ g/ml plazmidowego DNA przecięto enzymem restrykcyjnym Hind III w celu otrzymania relatywnie długiej matrycy dla polimerazy T7. Transkrypcję prowadzono przez 16 godzin według procedury MEGashortscript (Ambion).

Produkt reakcji denaturowano 3 minuty w 95°C i oczyszczano w 10% żelu poliakryloamidowym z 7 M mocznikiem. RNA wycinano z żelu, eluowano w wodzie w temperaturze pokojowej, następnie strącano w 2,5 objętości 96% etanolu i 1/10 objętości octanu sodu, pH=5.2 [You i wsp., 1991]. Uzyskane RNA rozpuszczano w wodzie, a ocenę ilości materiału dokonywano przez pomiar UV.

5.5. Znakowanie DsrA RNA przy końcu 5' i 3'

Tab. 10. Reagenty używane do znakowania DsrA RNA [Digweed i wsp. 1986]

	Znakowanie z 5'	Znakowanie z 3'
Enzym	Kinaza T4- 5U/ μ l	Ligaza T4- 2U/ μ l
Bufor	Bufor do kinazy 10x	Bufor do ligazy 10x
Radioizotop	[γ - ³² P] ATP - 50 μ Ci (3000 Ci/mmol)	[³² P]pCp - 20 μ Ci (3000 Ci/mmol)
Czas reakcji	45 minut	16 godzin
Temperatura reakcji	37°C	4°C
Objętość reakcji	10 μ l	20 μ l

Po zakończeniu reakcji, znakowany DsrA RNA oczyszczano w 10% żelu poliakryloamidowym i identyfikowano przy pomocy autoradiografii. Odpowiednie pasma żelu wycinano a RNA wymywano w wodzie, w temperaturze pokojowej przez 16 godzin. Po elucji RNA strącano 2,5 objętościami 96% etanolu i 1/10 objętości octanu sodu, pH=5.2 [You i wsp., 1991].

5.6. Nadprodukcja i oczyszczanie białka Hfq *in vitro*

5.6.1. Ekspresja białka w komórkach *E.coli*

Inokulację szczepu *E. coli* BL21 zawierającego zrekombinowany plazmid pGEX z regionem kodującym białko Hfq, prowadzono w 10 ml pożywki LB z ampicyliną (50µg/ml) przez noc z wytrząsaniem. Następnie w warunkach sterylnych hodowlę rozcieńczano 1:100 pożywką LB z ampicyliną (50µg/ml). Inkubację z wytrząsaniem prowadzono 2,5 godziny w objętości 100ml do wczesnej fazy logarytmicznej (OD~0.5). Ekspresję białka indukowano przez dodanie IPTG do stężenia 1 mM. Komórki bakteryjne inkubowano kolejne 5 godzin w temperaturze 37°C, a następnie kulturę wirowano 10 minut w 4°C przy 8000 rpm [Zhang i wsp., 2002]. Osad bakteryjny zawieszano w 10 ml buforu A1-Ni-NTA w obecności inhibitorów proteaz (1mM PMSF, aprotyna, leupeptyna, pepstatyna- każdy w stężeniu 2 µg/ml). Inkubowano 10 minut na lodzie i lizowano przez sonikację 5 x 15 sekund z przerwami około minuty. Sonikat wirowano 15 minut w 4°C w celu usunięcia resztek komórek.

5.6.2. Oczyszczanie białka metodą chromatografii powinowactwa

Białko Hfq izolowane było w warunkach niedenaturujących na złożu agarozowym zawierającym aktywne jony niklu (agaroza Ni-NTA) (procedura firmy Qiagen). 100 µl ml złoża Ni-NTA równoważono 1 ml buforu A1-Ni-NTA, inkubowano 10 minut w temperaturze 25°C, a następnie wirowano 2 minuty przy 10000 rpm. Procedurę przemywania powtarzano dwukrotnie.

Do złoża agarozowego dodano 1 ml lizatu białkowego, inkubowano 45 minut z lekkim wytrząsaniem, a następnie wirowano 2 minuty przy 10000 rpm. Supernatant usunięto, dodano 500 µl buforu A1-Ni-NTA, inkubowano 15 minut w 25°C, wirowano 2 minuty przy 10000 rpm. Przemywanie buforem A1-Ni-NTA powtarzano trzykrotnie. Po usunięciu supernatantu do złoża dodawano buforów elucyjnych B1-Ni-NTA, zawierających - kolejno: 10, 50 100, 200

The following table shows the results of the study on the effect of the antibiotic on the growth of the bacteria. The results are given in the following table.

Table 1

Table 1. Results of the study on the effect of the antibiotic on the growth of the bacteria.

Table 1. Results of the study on the effect of the antibiotic on the growth of the bacteria.

The following table shows the results of the study on the effect of the antibiotic on the growth of the bacteria. The results are given in the following table.

Table 2. Results of the study on the effect of the antibiotic on the growth of the bacteria.

The following table shows the results of the study on the effect of the antibiotic on the growth of the bacteria. The results are given in the following table.

mM imidazol. Złóże przemywano dwukrotnie buforem z każdym stężeniem imidazolu, inkubowano po 15 minut w 25°C, a następnie wirowano po 2 minuty przy 10000 rpm. Preparaty białkowe przechowywano w 10% glicerolu w -70°C.

5.7. Hydroliza enzymatyczna DsrA RNA

DsrA RNA znakowany przy 5' i 3' końcu poddano hydrolizie specyficznymi rybonukleazami T1 (2.5 U), S1 (0.25 U), V1 (0.005 U). W tabeli przedstawiono wykaz enzymów stosowanych w poszczególnych reakcjach, ich źródła pochodzenia, specyficzność działania oraz warunki reakcji.

Tab. 11. Zestawienie enzymów używanych w analizie struktury DsrA RNA

RNaza	Pochodzenie	Specyficzność	Temperatura i czas reakcji
T1	<i>Aspergillus oryzae</i>	Gp↓N	55°C, 20 min
S1	<i>Aspergillus oryzae</i>	N↓pN w odcinkach jednonicowych	25°C, 10 min
V1	Jad węża <i>Naja naja oxiana</i> (kobra)	N↓pN w odcinkach dwuniciowych	25°C, 10 min

Produkty hydrolizy rozdzielano w 20% żelu poliakryloamidowym z 7 M mocznikiem. Jako kontrolę dla uzyskanych fragmentów wykorzystano DsrA RNA poddany hydrolizie alkalicznej (90 sekund, 99°C, w obecności 50 mM NaOH i 10 mM EDTA).

5.7.1. Analiza struktury DsrA RNA z wykorzystaniem RNazy H

1 pmol nieznakowanego oraz 30000 cpm znakowanego z końca 3' oraz 5' DsrA RNA inkubowano z pięciokrotnym nadmiarem odpowiednich oligodeoksynukleotydów.

Sekwencje oligonukleotydów pokazano w tabeli.

OLIGONUKLEOTYD	DŁUGOŚĆ (nt)	SEKWENCJA 5'→3'
L1	10	GAAATCTGAT
L2	10	AAGCAAGAAA
L3	10	TGAGGGGGTC
L4	12	AAAAAATTCGTT

Reakcję prowadzono w całkowitej objętości 10 μ l w obecności 0.4 U RNazy H i w buforze zawierającym 40 mM Tris-HCl pH 7.5, 4 mM MgCl₂, 0.1 mM DTT, 20mM KCl przez 7.5 minuty w 37°C. W celu zahamowania reakcji dodawano 2 μ l 0.5 M EDTA, następnie próbę denaturowano przez 3 minuty w 65°C i umieszczano w lodzie [Barciszewska i wsp., 1990]. Produkty hydrolizy rozdzielano w 20% żelu poliakryloamidowym, a jako kontrolę dla uzyskanych fragmentów wykorzystano DsrA RNA poddany hydrolizie alkalicznej oraz enzymatycznej przy pomocy rybonukleazy T1.

5.7.2. Hydroliza z użyciem dezoksyrybozymów

1 pmol nieznakowanego oraz 30000 cpm znakowanego z 3' oraz z 5' końca DsrA RNA inkubowano z pięciokrotnym lub dziesięciokrotnym nadmiarem DNAzemu I oraz DNAzemu II o sekwencjach przedstawionych w tabeli.

OLIGONUKLEOTYD	DŁUGOŚĆ (nt)	SEKWENCJA 5'→3'
DNAzym I	29	TAAAAAAGGCTAGCTACAACGATCGTTAC
DNAzym II	29	AAATTCGGCTAGCTACAACGATACACCA

DsrA RNA oraz odpowiednie DNAzemy denaturowano przez 2 minuty w 85°C, a następnie wolno ochładzano do temperatury pokojowej. Reakcję prowadzono w 10 μ l reakcji w 50 mM Tris-HCl pH 7.5 i 10 mM MgCl₂, a następnie inkubowano w 25°C przez 30 minut. Hydrolizę zatrzymywano przez dodanie 2 μ l 0.5 M EDTA i umieszczenie w lodzie [Breaker i wsp., 1995]. Produkty hydrolizy rozdzielano w 20% żelu poliakryloamidowym, a jako kontrolę dla uzyskanych fragmentów wykorzystano DsrA RNA poddany hydrolizie alkalicznej oraz enzymatycznej przy pomocy rybonukleazy T1.

5.8 Tworzenie i analiza kompleksu DsrA RNA z białkiem Hfq

Kompleksy DsrA RNA z białkiem Hfq otrzymano według następującego schematu:

- 1 μ l (30 000 cpm) DsrA RNA znakowanego radioaktywnie przy końcu 3'
- 1-4 μ l (1-1.6 μ g) białka Hfq
- 2 μ l buforu do wiązania 5x
- 3-6 μ l wody

Faint, illegible text covering the upper portion of the page.

Faint, illegible text covering the middle portion of the page.

Faint, illegible text covering the lower portion of the page.

Inkubację prowadzono w objętości 10 μ l przez 20 minut w 25°C [Zhang i wsp., 2002]. Wynik reakcji obserwowano w 1% żelu agarozowym. Kompleksy identyfikowano za pomocą autoradiografii.

5.8.1. Analiza kompleksów DsrA RNA-białko Hfq z wykorzystaniem rodnika hydroksylowego

Wolny DsrA RNA oraz kompleksy DsrA RNA-Hfq poddano hydrolizie rodnikiem hydroksylowym (\cdot OH) generowanym przy pomocy Fe(II)-EDTA oraz czynnika redukującego. Reakcję prowadzono 2 godziny w temperaturze 25°C w 50 mM Tris-HCl pH 7.5, zawierającym 10 mM FeSO₄, 20 mM EDTA, 5 mM DTT oraz w próbach z magnezem-10 mM MgCl₂ [Barciszewska i wsp., 1994].

Jako kontrolę dla uzyskanych fragmentów wykorzystano DsrA RNA poddany hydrolizie alkalicznej (90 sekund, 99°C, w obecności 50 mM NaOH i 10 mM EDTA) oraz enzymatycznej przy pomocy rybonukleazy T1 (2.5 U) w warunkach denaturujących (20 mM CH₃COONa pH 4.5, 7 M mocznik, 1 mM EDTA, 55°C, 20 minut).

Produkty hydrolizy rozdzielano w 20% żelu poliakryloamidowym z 7 M mocznikiem i poddawano autoradiografii.

5.8.2. Hydroliza indukowana jonami ołowiu

Wolny DsrA RNA-30000 cpm oraz kompleksy DsrA RNA-Hfq poddano hydrolizie indukowanej jonami ołowiu. Reakcja przebiegała w temperaturze 25°C przez 15 minut w obecności 2 μ g niefrakcjonowanego tRNA z *Lupinus luteus* w 50 mM Tris-HCl pH 7.5 z różnym stężeniem ołowiu: 1mM, 2.5mM, 5 mM. Produkty hydrolizy rozdzielano w 20% żelu poliakryloamidowym, a jako kontrolę dla uzyskanych fragmentów wykorzystano DsrA RNA poddany hydrolizie alkalicznej oraz enzymatycznej przy pomocy rybonukleazy T1.

5.9. Analiza termodynamiczna kompleksów DsrA RNA z kinetyną, 8-oxo-dG, adeniną, guaniną

5.9.1. Tworzenie kompleksów DsrA RNA z kinetyną, 8-oxo-dG, adeniną, guaniną

DsrA RNA znakowany przy końcu 3' inkubowano z kinetyną, 8-oxoguaniną, adeniną, guaniną. Denaturację prowadzono przez 3 minuty w 85°C, a następnie powoli schładzano do 25°C. Reakcję prowadzono w objętości 10 μ l przez 20 godzin w 50 mM Tris-HCl pH 7.5 oraz

Wyniki pomiarów w temperaturze 25°C (tablica 1) wykazują, że w tym zakresie temperatury, w którym zachodzi proces polimerizacji, nie obserwujemy żadnych zmian w lepkości i w innych właściwościach fizycznych.

3.1. Analiza kinetyczna reakcji polimerizacji w temperaturze 25°C

W celu określenia czasu połowicznego zaniku (t_{1/2}) oraz energii aktywacji (E_a) reakcji polimerizacji, przeprowadzono serię pomiarów w temperaturach 25°C, 30°C, 35°C i 40°C. Wyniki pomiarów przedstawiono w tabeli 2. Zmierzono zmiany lepkości oraz czasu polimerizacji w funkcji czasu i temperatury.

Analiza danych kinetycznych wykazuje, że reakcja polimerizacji jest procesem jednoczynnikowym. Wyniki pomiarów przedstawiono w tabeli 3. Zmierzono zmiany lepkości oraz czasu polimerizacji w funkcji czasu i temperatury. Wyniki pomiarów przedstawiono w tabeli 4. Zmierzono zmiany lepkości oraz czasu polimerizacji w funkcji czasu i temperatury.

3.2. Wpływ temperatury na kinetykę reakcji polimerizacji

W celu określenia wpływu temperatury na kinetykę reakcji polimerizacji, przeprowadzono serię pomiarów w temperaturach 25°C, 30°C, 35°C i 40°C. Wyniki pomiarów przedstawiono w tabeli 5. Zmierzono zmiany lepkości oraz czasu polimerizacji w funkcji czasu i temperatury. Wyniki pomiarów przedstawiono w tabeli 6. Zmierzono zmiany lepkości oraz czasu polimerizacji w funkcji czasu i temperatury.

4. Wnioski

Wyniki pomiarów wykazują, że reakcja polimerizacji jest procesem jednoczynnikowym. Wyniki pomiarów przedstawiono w tabeli 7. Zmierzono zmiany lepkości oraz czasu polimerizacji w funkcji czasu i temperatury. Wyniki pomiarów przedstawiono w tabeli 8. Zmierzono zmiany lepkości oraz czasu polimerizacji w funkcji czasu i temperatury.

w obecności kinetyny (50 nM, 5 nM), 8-oksoguaniny (50 nM, 5nM), adeniny (50 nM), guaniny (50 nM). Po inkubacji próby poddawane były hydrolizie RNazą V1 oraz S1, według procedury opisanej powyżej. Produkty hydrolizy rozdzielano w 20% żelu poliakryloamidowym.

5.9.2. Analiza termodynamiczna kompleksów

Pomiaru absorbancji DsrA RNA dokonano za pomocą spektrofotometru Beckman DU640. Krzywe topnienia (absorbancja względem temperatury) wykonano przy długości fali 260 nm. Do reakcji użyto DsrA RNA w stężeniu 10 μ M.

Zastosowano bufor o pH=7.0 i następującym składzie:

Tab. 12. Skład buforów do topnienia struktury DsrA RNA

Bufor T ₁	Bufor T ₂
100 mM NaCl	10 mM MgCl ₂
20 mM kakodylan sodu	150 mM KCl
2 mM EDTA	0.5 mM EDTA
	20 mM kakodylan sodu

Topnienie prowadzono od 0 do 90°C w tempie 0.5°C/min. W czasie eksperymentu zapewniono stały dostęp azotu, w celu uniknięcia kondensacji pary wodnej wokół kuwety. Obliczenia wykonano z użyciem programu MeltWin 3.5.

5.9.3. Tworzenie kompleksu DsrA RNA z białkiem Hfq w obecności kinetyny jako kompetytora

DsrA RNA znakowany z końca 3' inkubowano z kinetyną (4mM), jak opisano powyżej. Po inkubacji do mieszaniny reakcyjnej dodawano białko Hfq (0.7-2 μ l) oraz bufor do wiązania. Inkubację prowadzono w objętości 10 μ l przez 20 minut w 25°C. Wynik reakcji obserwowano w 2% żelu agarozowym. Kompleksy identyfikowano za pomocą autoradiografii. Wizualizację danych przeprowadzono z zastosowaniem ekranów wzmacniających oraz skanera Typhoon wraz z oprogramowaniem ImageQuqnt 5.1.

5.10. Przewidywanie struktury drugorzędowej RNA przy pomocy metod bioinformatycznych

Analizę struktury drugorzędowej struktury DsrA RNA przeprowadzono przy pomocy programów Mfold wersja 3.1 oraz Sfold (<https://sfold.wadsworth.org>).



6. LITERATURA

- Agris P. F., Guenther, R., Sochacka, E., Newman, W., Czerwinska, G., Liu, G., Ye, W., Malkiewicz, A. (1999) Thermodynamic contribution of nucleoside modifications to yeast tRNA(Phe) anticodon stem loop analogs, *Acta Biochim. Pol.* 46, 163-172
- Ali Azam, T., Iwata, A., Nishimura, A., Ueda, S., Ishihama, A. (1999) Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid, *J. Bacteriol.* 181, 6361-6370
- Altuvia, S., Weinstein-Fischer, D., Zhang, A., Postow, L., Storz, G. (1997) A small, stable RNA induced by oxidative stress: role as a pleiotropic regulator and antimutator, *Cell* 90, 43-53
- Altuvia, S., Zhang, A., Argaman, L., Tiwari, A., Storz, G. (1998) The *E.coli* OxyS regulatory represses fhlA translation by blocking ribosome binding, *EMBO J.* 17, 6069-6075
- Andersen, J., Delihias, N., Ikenaka, K., Green, P. J., Pines, O., Ilercil, O., Inouye, M. (1987) The isolation and characterization of RNA coded by the micF gene in *E. coli*, *Nucleic Acids Res.* 15, 2089-2101
- Andersen, J., Forst, S.A., Zhao, K., Inouye, M., Delihias, N. (1989) The function of micF RNA. MicF RNA is a major factor in thermal regulation of OmpF protein in *E.coli*, *J. Biol. Chem.* 264, 17961-17970
- Antao, V. P., Tinoco, I, Jr. (1992) Thermodynamic parameters for loop formation in RNA and DNA hairpin tetraloops, *Nucleic Acids Res.* 20, 819-824
- Argaman, L., Altuvia, S. (2000) fhlA repression by OxyS RNA: kissing complex formation at two sites results in a stable antisense-target RNA complex, *J. Mol. Biol.* 300, 1101-1112
- Argaman, L., Hershberg, R., Vogel, J., Bajerano, G., Wagner, E.G., Margalit, H, Altuvia, S. (2001) Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of *Escherichia coli*, *Curr. Biol.* 11, 941-950
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K., Eds, (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, New York Vol. 1, pp. 4.7.1-4.7.6
- Azam T.A., Ishihama, A. (1999) Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli*. Sequence recognition specificity and DNA binding affinity, *J. Biol. Chem.* 274, 33105-33113

- Balandina, A., Kamashev, D., Rouviere-Yaniv, J. (2002) The bacterial histone-like protein HU specifically recognizes similar structures in all nucleic acids. DNA, RNA, and their hybrids, *J. Biol. Chem.* 277, 27622-27628
- Balazs, E., Sziraki, I., Kiraly, Z. (1977) The role of cytokinins in the systemic acquired resistance of tobacco hypersensitive to tobacco mosaic virus, *Physiol. Plant Pathol.* 11, 29-37
- Baneyx, F. (1999) Recombinant protein expression in *E.coli*, *Curr. Opin. Biotech.* 10, 411-421
- Barciszewska, M. Z., Erdmann, V. A. and Barciszewski, J. (1994) The dynamic conformation of plant cytoplasmic 5S rRNAs. *Phytochemistry* 37, 113-117
- Barciszewska, M. Z., Lorenz, S., Erdmann, V.A., Barciszewski, J. (1990) Structural analysis of plant ribosomal 5S RNAs. Visualisation of novel tertiary interactions by cleavage of lupin and wheat 5SrRNAs with ribonuclease H, *Biochim. Biophys. Acta.* 1087, 68-72
- Barciszewska, M.Z., Erdmann, V.A, Barciszewski J.(1992) Dynamic structure of transfer RNA in solution monitored by reaction with hydroxyl radicals, *Biochem. Int.* 27, 1127-1134
- Barciszewski, J.(1999) Kinetin – 45 years on, *Plant Sci.* 148, 37-45
- Barciszewski, J., Massino, F., Clark, B. F. C (2006) Kinetin - a multiactive molecule. *Int J Biol Macromol.* - w druku
- Batey, R. T., Rambo, R. P., Lucast, L., Rha, B, Doudna, J.A. (2000) Crystal structure of the ribonucleoprotein core of the signal recognition particle, *Science* 287, 1232-1239
- Benito, Y., Kolb, F. A., Romby, P., Lina, G., Etienne, J., Vandenesch, F. (2000) Probing the structure of RNAlII, the *Staphylococcus aureus* agr regulatory RNA, and identification of the RNA domain involved in repression of protein A expression, *RNA* 6, 668-679
- Borsani, G., Tonlorenzi, Simmler, M. C., Dandolo, L., Arnaud, D., Capra, V., Grompe, M., Pizzuti, A., Muzny, D., Lawrence, C. (1991) Characterization of a murine gene expressed from the inactive X chromosome, *Nature* 351, 325-329
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254
- Brantl, S. (2002) Antisense-RNA regulation and RNA interference, *Biochim. Biophys. Acta*, 1575, 15-25

- Ishiguro, S., Kuroki, D., Furuya-Yanai, I. (1988) The protein kinase C protein III specifically recognizes single nucleotides in 3' non-coding RNA and their hybrid. *J. Biol. Chem.* 263, 27022-27025
- Ito, H., Ohtsuka, I., Kuroki, Y. (1977) The role of cytosol in the synthesis and transport of ribosomes in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 252, 1111-1117
- Ito, H. (1987) Molecular genetic evidence for a protein in *Escherichia coli*. *Gene* 60, 111-121
- Ito, H., Ohtsuka, I., Kuroki, Y., Furuya-Yanai, I. (1984) The domain organization of ribosomal protein S23. *J. Biochem.* 95, 111-117
- Ito, H., Ohtsuka, I., Kuroki, Y., Furuya-Yanai, I. (1986) Structural analysis of ribosomal protein S23. Visualization of intermolecular interactions by electron microscopy. *J. Biol. Chem.* 261, 11111-11117
- Ito, H., Ohtsuka, I., Kuroki, Y., Furuya-Yanai, I. (1987) Primary structure of ribosomal protein S23. *J. Biol. Chem.* 262, 11111-11117
- Ito, H., Ohtsuka, I., Kuroki, Y., Furuya-Yanai, I. (1988) Kinetics of ribosomal protein S23. *J. Biol. Chem.* 263, 111-117
- Ito, H., Ohtsuka, I., Kuroki, Y., Furuya-Yanai, I. (1989) Kinetics of ribosomal protein S23. *J. Biol. Chem.* 264, 111-117
- Ito, H., Ohtsuka, I., Kuroki, Y., Furuya-Yanai, I. (1990) Kinetics of ribosomal protein S23. *J. Biol. Chem.* 265, 111-117
- Ito, H., Ohtsuka, I., Kuroki, Y., Furuya-Yanai, I. (1991) Kinetics of ribosomal protein S23. *J. Biol. Chem.* 266, 111-117
- Ito, H., Ohtsuka, I., Kuroki, Y., Furuya-Yanai, I. (1992) Kinetics of ribosomal protein S23. *J. Biol. Chem.* 267, 111-117
- Ito, H., Ohtsuka, I., Kuroki, Y., Furuya-Yanai, I. (1993) Kinetics of ribosomal protein S23. *J. Biol. Chem.* 268, 111-117
- Ito, H., Ohtsuka, I., Kuroki, Y., Furuya-Yanai, I. (1994) Kinetics of ribosomal protein S23. *J. Biol. Chem.* 269, 111-117
- Ito, H., Ohtsuka, I., Kuroki, Y., Furuya-Yanai, I. (1995) Kinetics of ribosomal protein S23. *J. Biol. Chem.* 270, 111-117
- Ito, H., Ohtsuka, I., Kuroki, Y., Furuya-Yanai, I. (1996) Kinetics of ribosomal protein S23. *J. Biol. Chem.* 271, 111-117
- Ito, H., Ohtsuka, I., Kuroki, Y., Furuya-Yanai, I. (1997) Kinetics of ribosomal protein S23. *J. Biol. Chem.* 272, 111-117
- Ito, H., Ohtsuka, I., Kuroki, Y., Furuya-Yanai, I. (1998) Kinetics of ribosomal protein S23. *J. Biol. Chem.* 273, 111-117
- Ito, H., Ohtsuka, I., Kuroki, Y., Furuya-Yanai, I. (1999) Kinetics of ribosomal protein S23. *J. Biol. Chem.* 274, 111-117
- Ito, H., Ohtsuka, I., Kuroki, Y., Furuya-Yanai, I. (2000) Kinetics of ribosomal protein S23. *J. Biol. Chem.* 275, 111-117
- Ito, H., Ohtsuka, I., Kuroki, Y., Furuya-Yanai, I. (2001) Kinetics of ribosomal protein S23. *J. Biol. Chem.* 276, 111-117
- Ito, H., Ohtsuka, I., Kuroki, Y., Furuya-Yanai, I. (2002) Kinetics of ribosomal protein S23. *J. Biol. Chem.* 277, 111-117
- Ito, H., Ohtsuka, I., Kuroki, Y., Furuya-Yanai, I. (2003) Kinetics of ribosomal protein S23. *J. Biol. Chem.* 278, 111-117
- Ito, H., Ohtsuka, I., Kuroki, Y., Furuya-Yanai, I. (2004) Kinetics of ribosomal protein S23. *J. Biol. Chem.* 279, 111-117
- Ito, H., Ohtsuka, I., Kuroki, Y., Furuya-Yanai, I. (2005) Kinetics of ribosomal protein S23. *J. Biol. Chem.* 280, 111-117
- Ito, H., Ohtsuka, I., Kuroki, Y., Furuya-Yanai, I. (2006) Kinetics of ribosomal protein S23. *J. Biol. Chem.* 281, 111-117
- Ito, H., Ohtsuka, I., Kuroki, Y., Furuya-Yanai, I. (2007) Kinetics of ribosomal protein S23. *J. Biol. Chem.* 282, 111-117
- Ito, H., Ohtsuka, I., Kuroki, Y., Furuya-Yanai, I. (2008) Kinetics of ribosomal protein S23. *J. Biol. Chem.* 283, 111-117
- Ito, H., Ohtsuka, I., Kuroki, Y., Furuya-Yanai, I. (2009) Kinetics of ribosomal protein S23. *J. Biol. Chem.* 284, 111-117
- Ito, H., Ohtsuka, I., Kuroki, Y., Furuya-Yanai, I. (2010) Kinetics of ribosomal protein S23. *J. Biol. Chem.* 285, 111-117
- Ito, H., Ohtsuka, I., Kuroki, Y., Furuya-Yanai, I. (2011) Kinetics of ribosomal protein S23. *J. Biol. Chem.* 286, 111-117
- Ito, H., Ohtsuka, I., Kuroki, Y., Furuya-Yanai, I. (2012) Kinetics of ribosomal protein S23. *J. Biol. Chem.* 287, 111-117
- Ito, H., Ohtsuka, I., Kuroki, Y., Furuya-Yanai, I. (2013) Kinetics of ribosomal protein S23. *J. Biol. Chem.* 288, 111-117
- Ito, H., Ohtsuka, I., Kuroki, Y., Furuya-Yanai, I. (2014) Kinetics of ribosomal protein S23. *J. Biol. Chem.* 289, 111-117
- Ito, H., Ohtsuka, I., Kuroki, Y., Furuya-Yanai, I. (2015) Kinetics of ribosomal protein S23. *J. Biol. Chem.* 290, 111-117
- Ito, H., Ohtsuka, I., Kuroki, Y., Furuya-Yanai, I. (2016) Kinetics of ribosomal protein S23. *J. Biol. Chem.* 291, 111-117
- Ito, H., Ohtsuka, I., Kuroki, Y., Furuya-Yanai, I. (2017) Kinetics of ribosomal protein S23. *J. Biol. Chem.* 292, 111-117
- Ito, H., Ohtsuka, I., Kuroki, Y., Furuya-Yanai, I. (2018) Kinetics of ribosomal protein S23. *J. Biol. Chem.* 293, 111-117
- Ito, H., Ohtsuka, I., Kuroki, Y., Furuya-Yanai, I. (2019) Kinetics of ribosomal protein S23. *J. Biol. Chem.* 294, 111-117
- Ito, H., Ohtsuka, I., Kuroki, Y., Furuya-Yanai, I. (2020) Kinetics of ribosomal protein S23. *J. Biol. Chem.* 295, 111-117

- Breaker R. R., Joyce G. F. (1995) A DNA enzyme with Mg(2+)-dependent RNA phosphoesterase activity, *Chem Biol.* 2, 655-660
- Breaker, R. R., Joyce, G. F. (1994) A DNA enzyme that cleaves RNA. *Chem Biol* 1, 223-229
- Brescia, C. C., Mikulecky, P. J., Feig, A. L. and Sledjeski, D. D. (2003) Identification of the Hfq-binding site on DsrA RNA: Hfq binds without altering DsrA secondary structure. *RNA* 9, 33-43
- Brescia, C. C., Sledjeski D. D. (2003) We are legion: noncoding regulatory RNAs and Hfq, in "Noncoding RNAs: Molecular Biology and Molecular Medicine" (J. Barciszewski and V.A. Erdmann, Eds), pp.242-258, Kluwer Academic/Plenum Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Brion, P., Michel, F., Schroeder, R., Westhof, E. (1999) Analysis of the cooperative thermal unfolding of the td intron of bacteriophage T4. *Nucleic Acids Res* 27, 2494-2502
- Brown, L., Elliott, T. (1997) Mutations that increase expression of the rpoS gene and decrease its dependence on hfq function in *Salmonella typhimurium*, *J Bacteriol.* 179, 656-662
- Carmi, N., Shultz, L. A., Breaker, R. R. (1996) *In vitro* selection of self-cleaving DNAs. *Chem Biol* 3, 1039-1046
- Carmichael, G. G., Weber, K., Niveleau, A., Wahba, A. J. (1975) The host factor required for RNA phage Qbeta RNA replication in vitro. Intracellular location, quantitation, and purification by polyadenylate-cellulose chromatography., *J. Biol. Chem.* 250, 3607-3612
- Carter, R. J., Dubchak, I., Holbrook, S. R. (2001) A computational approach to identify genes for functional RNAs in genomic sequences, *Nucleic Acids Res.* 29, 3928-3938
- Ciesiolka, J., Michalowski, D., Wrzesinski, J., Krajewski, J., Krzyzosiak, W. J. (1998) Patterns of cleavages induced by lead ions in defined RNA secondary structure motifs. *J Mol Biol.*, 275, 211-20
- Crooke, S. T., Lemonidis, K. M., Neilson, L., Griffey, R., Lesnik, E. A., Monia, B. P. (1995) Kinetic characteristics of *Escherichia coli* RNase H1: cleavage of various antisense oligonucleotide-RNA duplexes. *Biochem J*, 599-608
- Cusick M. E., Belfort, M. (1998) Domain structure and RNA annealing activity of the *Escherichia coli* regulatory protein StpA, *Mol. Microbiol.* 28, 847-57
- de Haseth, P. L., Uhlenbeck, O. C. (1980) Interaction of *Escherichia coli* host factor protein with Q beta ribonucleic acid, *Biochemistry* 19, 6146-6151

- Delihias, N., Forst, S. (2001) MicF: an antisense RNA gene involved in response of *E. coli* to global stress factors, *J. Mol. Biol.* 313, 1-12
- Delihias, N., Rokita, S. E., Zheng, P. (1997) Natural antisense RNA/target RNA interactions: possible models for antisense oligonucleotide drug design, *Nat. Biotechnol.* 15, 751-753
- Demple, B., Harrison, L. (1994) Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annu Rev Biochem.* 63, 915-48
- Digweed, M., Pieler, T., Erdmann, V. A. (1986) RNA sequencing, *Advanced Methods in Protein Microsequence Analysis*, Wittman-Liebold et al. (Eds.), Springer-Verlag Heidelberg
- Ding, Y., Chan, C. Y., Lawrence, C. E. (2004) Sfold web server for statistical folding and rational design of nucleic acids. *Nucleic Acids Res* 32, W135-141
- Doudna J., Cech, T. (2002) The chemical repertoire of natural ribozymes, *Nature* 418, 222-228
- Earnshaw, D. J., Gait, M. J. (1997) Progress toward the structure and therapeutic use of the hairpin ribozyme, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 7, 403-411
- Eddy, S. R., (2001) Noncoding RNA genes and the modern RNA world, *Nature Rev. Genet.* 2, 919-929
- Eddy, S. R., Durbin, R. (1994) RNA sequence analysis using covariance models, *Nucleic Acids Res.* 22, 2079-2088
- Ehresmann, C., Baudin, F., Mougel, M., Romby, P., Ebel, J. P., Ehresmann, B. (1987) Probing the structure of RNAs in solution, *Nucleic Acids Res.* 15, 9109-9128
- Escobar, M. A., Dandekar, A. M., (2003) Post-transcriptional gene silencing in plants, in "Noncoding RNAs: Molecular Biology and Molecular Medicine" (J. Barciszewski and V.A. Erdmann, Eds), pp.129-141, Kluwer Academic/Plenum Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Esteban, J. A. (1992) Activation of S1 nuclease at neutral pH, *Nucleic Acids Res.* 20, 4932
- Fang, M., Majumder, A., Tsai, K.J., Wu, H.Y. (2000) ppGpp-dependent leuO expression in bacteria under stress, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276, 64-70
- Felden, B., Himeno, H., Muto, A., McCutcheon, J. P., Atkins, J. F., Gesteland, R. F. (1997) Probing the structure of the *E. coli* 10Sa RNA (tmRNA), *RNA* 3, 89-103
- Fischant, G. A., Burks, C. (1991) Identifying potential tRNA genes in genomic DNA sequences, *J. Mol. Biol.* 220, 659-671

- Frank, D. N., Pace, N. R. (1998) Ribonuclease P: unity and diversity in a tRNA processing ribozyme, *Annu. Rev. Biochem.* 67, 153-180
- Gajewski, E., Rao, G., Nackerdien, Z., Dizdaroglu, M. (1990) Modification of DNA bases in mammalian chromatin by radiation-generated free radicals. *Biochemistry* 29, 7876-82
- Gautheret, D., Major, F., Cedergren, R. (1990) Pattern searching/alignment with RNA primary and secondary structures: an effective descriptor for tRNA, *Comput. Appl. Biosci.* 6, 325-331
- Geissmann, T. A., Touati, D. (2004) Hfq, a new chaperoning role: binding to messenger RNA determines access for a small RNA regulator, *EMBO J.* 23, 396-405
- Gerdes, K., Gulyaev, A. P., Franch, T., Pedersen, K., Mikkelsen, N. D. (1997) Antisense RNA-regulated programmed cell death, *Annu. Rev. Genet.* 31, 1-31
- Giel-Pietraszuk, M., Barciszewska, M. Z., Mucha, P., Rekowski, P., Kupryszewski, G., Barciszewski, J. (1997) Interaction of HIV Tat model peptides with tRNA and 5S rRNA, *Acta Biochim. Polon.* 44, 591-600
- Gillet, R., Felden, B. (2001) Emerging views on tmRNA-mediated protein tagging and ribosome rescue, *Mol. Microbiol.* 42, 879-885
- Gottesman, S. (2002) Stealth regulation: biological circuits with small RNA switches, *Genes Dev.* 16, 2829-2842
- Gottesman, S. (2004) The small RNA regulators of *E.coli*: roles and mechanisms, *Annu. Rev. Microbiol.* 58, 303-328
- Grollman, A. P., Moriya, M. (1993) Mutagenesis by 8-oxoguanine: an enemy within, *Trends Genet.* 9, 246-249
- Grundy, F. J., Lehman, S. C., Henkin, T. M. (2003) The L box regulon: lysine sensing by leader RNAs of bacterial lysine biosynthesis genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 12057-62
- Gudapaty, S., Suzuki, K., Wang, X., Babitzke, P., Romeo, T. (2001) Regulatory interactions of Csr components: the RNA binding protein CsrA activates *csrB* transcription in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 183, 6017-27
- Hajnsdorf, E., Regnier, P. (2000) Host factor Hfq of *Escherichia coli* stimulates elongation of poly(A) tails by poly(A) polymerase I, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97, 1501-1505
- Hanel, M. L., Wevrick, R. (2001) The role of genomic imprinting in human developmental disorders: Lessons from Prader-Willi syndrome. *Clin. Genet.* 59, 156-164

- Hayakawa, H., Hofer, A., Thelander, L., Kitajima, S., Cai, Y., Oshiro, S., Yakushiji, H., Nakabeppu, Y., Kuwano, M., Sekiguchi, M. (1999) Metabolic fate of oxidized guanine ribonucleotides in mammalian cells. *Biochemistry*. 38, 3610-4
- Hayakawa, H., Kuwano, M., Sekiguchi, M. (2001) Specific binding of 8-oxoguanine-containing RNA to polynucleotide phosphorylase protein *Biochemistry*. 40, 9977-82
- Hayakawa, H., Uchiumi, T., Fukuda, T., Ashizuka, M., Kohno, K., Kuwano, M., Sekiguchi, M. (2002) Binding capacity of human YB-1 protein for RNA containing 8-oxoguanine. *Biochemistry* 41, 12739-44
- Hengge-Aronis, R. (2002) Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma (S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol Mol Biol Rev.* 66, 373-395
- Hermann, T., and Patel, D. J. (2000) RNA bulges as architectural and recognition motifs. *Structure* 8, R47-54
- Hindley, J. (1967) Fractionation of 32P-labelled ribonucleic acids on polyacrylamide gels and their characterization by fingerprinting, *J. Mol. Biol.* 30, 125-136
- Hollstein, M., Shome, B., Greenblatt, M., Soussi, T., Hovig, E., Montesano, R., Harris, C. C. (1996) Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: updated compilation, *Nucleic Acids Res.* 24, 141-146
- Ikemura, T., and Dahlberg, J.E. (1973) Small ribonucleic acids of *Escherichia coli*. II. Noncoordinate accumulation during stringent control, *J. Biol. Chem.* 248, 5033-5041
- Jin, Y., Wang, Y., Johansen, J., Johansen, K. M. (2000) JIL-1, a chromosomal kinase implicated in regulation of chromatin structure, associates with the male specific lethal (MSL) dosage compensation complex, *J. Cell Biol.* 149, 1005-1010
- Jin, Y., Wang, Y., Walker, D. L., Dong, H., Conley, C., Johansen, J., Johansen, K. M. (1999) JIL-1: A novel chromosomal tandem kinase implicated in transcriptional regulation in *Drosophila*, *Mol. Cell* 4, 129-135
- Kajitani, M., Kato, A., Wada, A., Inokuchi, Y., Ishihama, A. (1994) Regulation of the *Escherichia coli* hfq gene encoding the host factor for phage Q beta, *J. Bacteriol.* 176, 531-534
- Kandror, O., DeLeon, A., Goldberg, A. L. (2002) Trehalose synthesis is induced upon exposure of *Escherichia coli* to cold and is essential for viability at low temperatures, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99, 9727-32
- Keiler, K.C., Waller, P. R., Sauer, R. T. (1996) Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA, *Science* 271, 990-993

- Klauck, E., Bohringer, J., Hengge-Aronis, R. (1997) The LysR-like regulator LeuO in *Escherichia coli* is involved in the translational regulation of rpoS by affecting the expression of the small regulatory DsrA-RNA, Mol. Microbiol. 25, 559-569
- Klein, R. J., Misulovin, Z., Eddy, S. R. (2002) Noncoding RNA genes identified in AT-rich hypertermophiles, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 7542-7547
- Kobayashi, S., Goto, S., Anzai, K. (1991) Brain-specific small RNA transcript of the identifier sequences is present as a 10 S ribonucleoprotein particle, J. Biol. Chem. 266, 4726-4730
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4, Nature 227, 680-695
- Lai E. C. (2002) Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation, Nat. Genet. 30, 363-364
- Lander, E.S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C, Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., et al., (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome, Nature 409, 860-921
- Lanz R .B., McKenna, N. J, Onate, S. A., Albrecht, U., Wong, J., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., O'Malley, B. W. (1999) A steroid receptor co activator, SRA, functions as an RNA and is present in an SRC-1 complex, Cell 97, 17-27
- Lanz, R. B., Razani, B., Goldberg, A. D., O'Malley, B. W. (2002) Distinct RNA motifs are important for coactivation of steroid hormone receptors by steroid receptor activator (SRA), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 16081-16086
- Le, S.Y., Chen, J. H., Shapiro, B., Currey, K. M., Maizel, J. V. (1990) A computational procedure for assessing the significance of RNA secondary structure. Comput Appl Biosci. 6, 7-18
- Lease, R. A., Belfort M. (2000) A trans-acting RNA as a control switch in *Escherichia coli*: DsrA modulates function by forming alternative structures, Proc Natl Acad Sci USA 97, 9919-24
- Lease, R. A., Belfort M. (2000) Riboregulation by DsrA RNA: trans-actions for global economy, Mol Microbiol. 38, 667-672
- Lease, R. A., Cusick, M. E., Belfort, M. (1998) Riboregulation in *Escherichia coli*: DsrA RNA acts by RNA:RNA interactions at multiple loci, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 12456-12461
- Lease, R., Woodson, S. (2004) Cycling of the Sm-like protein Hfq on the DsrA small regulatory RNA, J. Mol. Biol., 344, 1211-1223.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., Ambros, V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14, Cell 75, 843-854

- Lim, L. P., Glasner, M. E., Yekta, S., Burge, C. B., Bartel, D. P. (2003) Vertebrate microRNA genes, *Science* 299, 1540
- Liu, M. Y., Gui, G., Wei, B., Preston, J.F 3rd, Oakford, L., Yuksel, U., Giedroc, D. P., Romeo, T. (1997) The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 272, 17502-17510
- Lockard R. E., Kumar A. (1981) Mapping tRNA structure in solution using double-strand-specific ribonuclease from cobra venom, *Nucleic Acids Res.* 19, 5125-5140
- Macke, T. J., Ecker, D. J., Gutell, R. R., Gautheret, D., Case, D. A., Sampath, R. (2001) RNAMotif, an RNA secondary structure definition and search algorithm, *Nucleic Acids Res.* 29, 4724-4735
- Majdalani, N. (2002) Regulation and mode of action of the second small RNA activator of RpoS translation, RprA, *Mol. Microbiol.* 46, 813-26
- Majdalani, N., Chen, S., Murrow, J., St John, K., Gottesman, S. (2001) Regulation of RpoS by a novel small RNA: the characterization of RprA, *Mol. Microbiol.* 39, 1382-1394
- Majdalani, N., Cunning, C., Sledjeski, D., Elliott, T., Gottesman, S. (1998) DsrA RNA regulates translation of RpoS message by an anti-antisense mechanism, independent of its action as an antisilencer of transcription, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 12462-12467
- Mandal M, Boese B, Barrick JE, Winkler WC, Breaker RR (2003) Riboswitches control fundamental biochemical pathways in *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Cell* 113: 577-586
- Mandal M., Breaker RR (2004) Gene regulation by riboswitches. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 451-463
- Masse, E., Gottesman, S. (2002) A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *E. coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 4620-4625
- Masse, E., Escorcía, F. E., Gottesman, S. (2003) Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*, *Genes Dev.* 17, 2374-2383
- Massire, C., Jaeger, L., Westhof, E. (1998) Derivation of the three-dimensional architecture of bacterial ribonuclease P RNAs from comparative sequence analysis, *J. Mo. Biol.* 279,773-793
- Mattick, J.S. (2003) Challenging the dogma: the hidden layer of non-protein-coding RNAs in complex organisms, *BioEssays* 25, 930-939
- Mattick, J.S., (2001) Non-coding RNAs: the architects of eukaryotic complexity, *EMBO Rep.* 2, 986-991



- Meller, V. H., Gordadze, P. R., Park, Y., Chu, X., Stuckenholz, C., Kelley, R. L., Kuroda, M. I. (2000) Ordered assembly of roX RNAs into MSL complexes on the dosage-compensated X chromosome in *Drosophila*, *Curr. Biol.* 10, 136-143
- Michaels, M. L., Miller, J. H. (1992) The GO system protects organisms from the mutagenic effect of the spontaneous lesion 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine), *J. Bacteriol.* 174, 6321-6325
- Milligan, J. F., Groebe, D. R., Witherell, G. W., Uhlenbeck, O. C. (1987) Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates, *Nucleic Acids Res.* 15, 8783-8072
- Mitsuya, K., Meguro, M., Lee, M. P., Katoh, M., Schulz, T. C., Kugoh, H., Yoshida, M. A., Niikawa, N., Feinberg, A. P., Oshimura, M. (1999) LIT1, an imprinted antisense RNA in the human KvLQT1 locus identified by screening for differentially expressed transcripts using monochromosomal hybrids, *Hum. Mol. Genet.* 8, 1209-1217
- Moll, I., Afonyushkin, T., Vytvytska, O., Kaberdin, V. R., Blasi, U. (2003) Coincident Hfq binding and RNase E cleavage sites on mRNA and small regulatory RNAs, *RNA*, 9, 1308-1314
- Moller, T., Franch, T., Hojrup, P., Keene, D. R., Bachinger, H. P., Brennan, R. G., Valentin-Hansen, P. (2002) Hfq: A bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA interaction, *Mol. Cell* 9, 23-30
- Moller, T., Franch, T., Udesen, C., Gerdes, K., Valentin-Hansen, P. (2002) Spot 42 RNA mediates discoordinate expression of the *E. coli* galactose operon, *Gene. Dev.* 16, 1696-1706
- Moss E. G., (2003) MicroRNAs, in "Noncoding RNAs: Molecular Biology and Molecular Medicine" (J.Barciszewski and V.A. Erdmann, Eds), pp.98-115, Kluwer Academic/Plenum Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Murakawa, G.J., Nierlich, D. P. (1989) Mapping the lacZ ribosome binding site by RNA footprinting, *Biochemistry* 28, 8067-8072
- Murphy, S. K., Wylie, A. A., Jirtle, R. L. (2001) Imprinting of PRG3, the human homologue of a mouse gene involved in nurturing behavior, *Genomics* 71, 110-117
- Nahvi, A., Sudarsan, N., Ebert, M. S., Zou, X., Brown, K. L., Breaker, R. R. (2002) Genetic control by a metabolite binding mRNA, *Chem Biol.* 9, 1043
- Nicholls, R. D. (2000) The impact of genomic imprinting for neurobehavioral and developmental disorders, *J. Clin. Invest.* 105, 413-418
- Novick, R. P., Ross, H. F., Projan, S. J., Kornblum, J., Kreiswirth, B., Moghazeh, S. (1993) Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule, *EMBO J.* 12, 3967-3975

- Nudler E., Mironov, A. S. (2004) The riboswitch control of bacterial metabolism, *Trends Biochem Sci* 29: 11-17
- Olejniczak, M., Gdaniec, Z., Fischer, A., Grabarkiewicz, T., Bielecki, L., Adamiak, R. W. (2002) The bulge region of HIV-1 TAR RNA binds metal ions in solution, *Nucleic Acids Res.* 30, 4241-4249
- Olivas, W. M., Muhrad, D., Parker, R. (1997) Analysis of the yeast genome: identification of new non-coding and small ORF-containing RNAs, *Nucleic Acids Res.* 25, 4619-4625
- Olsen, A., Siboska, G. E., Clark, B. F., Rattan, S. I. (1999) N6-furfuryladenine, kinetin protects against Fenton reaction-mediated oxidative damage to DNA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265, 499-502
- Pavesi, A., Conterio, F., Bolchi, A., Dieci, G., Ottonello, S. (1994) Identification of new eukaryotic tRNA genes in genomic DNA databases by a multistep weight matrix analysis of transcriptional control regions, *Nucleic Acids Res.* 22, 1247-1256
- Petyuk, V. A., Zenkova, M. A., Giege, R., Vlassov, V. V. (1999) Hybridization of antisense oligonucleotides with the 3'part of tRNA(Phe). *FEBS Lett.* 444, 217-221
- Pratt, L. A., Hsing, W., Gibson, K. E., Silhavy, T. J. (1996) From acids to osmZ: multiple factors influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.* 20, 911-917
- Rattan, S.I.S., Clark, B.F.C. (1994) Kinetin delays the onset of ageing characteristics in human fibroblasts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201, 665-672
- Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquinelli, A. E., Bettinger, J. C., Rougvie, A. E., Horvitz H. R., Ruvkun, G. (2000) The 21- nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *C. elegans*, *Nature* 403, 901-906
- Repoila, F., Gottesman, S. (2001) Signal transduction cascade for regulation of RpoS: temperature regulation of DsrA, *J. Bacteriol.* 183, 4012-4023
- Repoila, F., Gottesman, S. (2003) Temperature sensing by the *dsrA* promoter, *J Bacteriol.* 2003 185, 6609-6614
- Rivas, E., Klein, R. J., Jones, T. A., Eddy, S. R. (2001) Computational identification of noncoding RNAs in *E. coli* by comparative genomics, *Curr. Biol.* 11, 1369-1373
- Robertson, G. T., and Roop, Jr, M. R. (1999) The *Brucella abortus* host factor I (HF-I) protein contributes to stress resistance during stationary phase and is a major determinant of virulence in mice, *Mol. Microbiol.* 34, 690-700
- Rodionov, D. A., Vitreschak, A. G., Mironov, A. A., Gelfand, M. S. (2003) Regulation of lysine biosynthesis and transport genes in bacteria: yet another RNA riboswitch? *Nucleic Acids Res.* 31, 6748-57

- Rolle, K., Zywicki, M., Wyszko, E., Barciszewska, M. Z., Barciszewski, J. (2006) Evaluation of the dynamic structure of DsrA RNA from *E. coli* and its functional Consequences, *J Biochem* 139, 431-438
- Sahagan, B., and Dahlberg J. E. (1979) A small, unstable RNA molecule of *Escherichia coli*: spot 42 RNA. I. Nucleotide sequence analysis, *J. Mol. Biol.* 131, 573-592
- SantaLucia, J. Jr., Kierzek, R., Turner, D. H. (1992) Context dependence of hydrogen bond free energy revealed by substitutions in an RNA hairpin, *Science*, 256, 217-219
- Santoro, S. W., Joyce, G. F. (1997) A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 4262-4266
- Sauter, C., Basquin, J., Suck, D. (2003) Sm-like proteins in Eubacteria: the crystal structure of the Hfq protein from *Escherichia coli*, *Nucleic Acids Res.* 31, 4091-4098
- Scherer, S.W. (2003) Human chromosome 7: DNA sequence and biology, *Science* 300, 767-772
- Schumacher, M. A., Pearson, R. F., Moller, T., Valentin-Hansen, P., Brennan, R. G. (2002) Structures of the pleiotropic translational regulator Hfq and an Hfq-RNA complex: a bacterial Sm-like protein, *EMBO J.* 21, 3546-3556
- Scott, W. G., Finch, J. T., Klug, A. (1995) The crystal structure of an all-RNA hammerhead ribozyme: a proposed mechanism for RNA catalytic cleavage, *Cell* 81, 991-1002
- Serebrov, V., Vassilenko, K., Kholod, N., Gross, H. J., Kisselev, L. (1998) Mg²⁺ binding and structural stability of mature and in vitro synthesized unmodified *Escherichia coli* tRNA^{Phe}. *Nucleic Acids Res.* 26, 2723-2728
- Shabalina, S.A., Spiridonov, N.A., (2004) The mammalian transcriptome and the function of non-coding DNA sequences, *Genome Biol.* 5, 105
- Shi, Y., Downes, M., Xie, W., Kao, H. Y., Ordentlich, P., Tsai, C. C., Hon, M., Evans, R. M. (2001) Sharp, and inducible cofactor that integrates nuclear receptor repression and activation, *Genes Dev.* 15, 1140-1151
- Slaughaupt, S. A., Mull, J., Leyne, M., Cuajungco, M. P., Gill, S. P., Hims, M. M., Quintero, F., Axelrod, F. B., Gusella, J. F. (2004) Rescue of a human mRNA splicing defect by the plant cytokinin kinetin. *Hum Mol Genet.* 13, 429-36
- Sledjeski D. D., Whitman, C., Zhang, A. (2001) Hfq is necessary for regulation by the untranslated RNA DsrA, *J. Bacteriol.* 183, 1997-2005.
- Sledjeski, D. D., Gottesman, S., (1995) A small RNA acts as an antisilencer of the HNS-silenced rcsA gene of *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 2003-2007

- Sledjeski, D. D., Gupta, A., Gottesman, S. (1996) The small RNA, DsrA, is essential for the low temperature expression of RpoS during exponential growth in *Escherichia coli*, EMBO J. 15, 3993-4000
- Stormo, G. (2003) New tricks for an old dogma: Riboswitches as *cis*-only regulatory system, Mol. Cell 11, 1419-1420
- Storz, G. (2002) An expanding universe of noncoding RNAs, Science 296, 1260-1263
- Sukhodolets, M. V., Garges, S. (2003) Interaction of *Escherichia coli* RNA polymerase with the ribosomal protein S1 and the Sm-like ATPase Hfq, Biochemistry, 42, 8022-8034
- Sun, L. Q., Cairns, M. J., Saravolac, E. G., Baker, A., Gerlach, W. L. (2000) Catalytic nucleic acids: from lab to applications. Pharmacol Rev., 52, 325-347
- Sun, X., Zhulin, I., Wartell, R. M. (2002) Predicted structure and phyletic distribution of the RNA-binding protein Hfq, Nucleic Acids Res. 30, 3662-3671
- Szymański, M, Erdmann, V.A., Barciszewski, J. (2003) Riboregulators: an overview, in "Noncoding RNAs: Molecular Biology and Molecular Medicine" (J. Barciszewski and V.A. Erdmann, Eds), pp.1-10, Kluwer Academic/Plenum Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Szymanski, M., Barciszewska, M. Z., Erdmann, V. A., Barciszewski, J. (2005) A new frontier for molecular medicine: noncoding RNAs, BBA 1765, 65-75
- Szymański, M., Barciszewska, M. Z., Zywicki, M., Barciszewski, J. (2003) Noncoding RNA transcripts, J. Appl. Genet. 44, 1-19
- Thore, S., Mayer, C, Sauter, C., Weeks, S., Suck, D. (2002) Crystal structures of the *Pyrococcus abyssi* Sm core and its complex with RNA. Common features of RNA binding in archaea and eukarya, J. Biol. Chem. 278, 1239-1247
- Tuerk, C., Gauss, P., Thermes, C., Groebe, D. R., Gayle, M., Guild, N., Stormo, G., d'Aubenton-Carafa, Y., Uhlenbeck, O. C., Tinoco, I. Jr., et al. (1998) CUUCGG hairpins: extraordinarily stable RNA secondary structures associated with various biochemical processes, Proc Natl Acad Sci USA, 85, 1364-1368
- Urbanowski, M. L., Stauffer, L. T., Stauffer, G. V. (2000) The *gcvB* gene encodes a small untranslated RNA involved in expression of the dipeptide and oligopeptide transport systems in *Escherichia coli*, Mol. Microbiol. 37, 856-868
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., et al. (2001) The sequence of the human genome. Science 291, 1304-1351

- 1. The first part of the book is devoted to a general introduction to the subject of the history of the world.
- 2. The second part of the book is devoted to a general introduction to the subject of the history of the world.
- 3. The third part of the book is devoted to a general introduction to the subject of the history of the world.
- 4. The fourth part of the book is devoted to a general introduction to the subject of the history of the world.
- 5. The fifth part of the book is devoted to a general introduction to the subject of the history of the world.
- 6. The sixth part of the book is devoted to a general introduction to the subject of the history of the world.
- 7. The seventh part of the book is devoted to a general introduction to the subject of the history of the world.
- 8. The eighth part of the book is devoted to a general introduction to the subject of the history of the world.
- 9. The ninth part of the book is devoted to a general introduction to the subject of the history of the world.
- 10. The tenth part of the book is devoted to a general introduction to the subject of the history of the world.

- Vitreschak, A.G., Rodionov, D. A., Mironov, A. A., Gelfand, M. S. (2003) Regulation of the vitamin B12 metabolism and transport in bacteria by a conserved RNA structural element. *RNA*. 9, 1084-97
- Vytvytska, O., Moll, I., Kaberdin, V. R., von Gabain. A., Blasi, U. (2000) Hfq (HF1) stimulates ompA mRNA decay by interfering with ribosome binding, *Genes Dev.* 14, 1109-1118
- Wachi, M., Takada, A., Nagai, K. (1999) Overproduction of the outer-membrane proteins FepA and FhuE responsible for iron transport in *Escherichia coli* hfq::cat mutant, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264, 525-529
- Wagner E. G., Vogel, J., (2003) Noncoding RNAs encoded by bacterial chromosomes, in "Noncoding RNAs: Molecular Biology and Molecular Medicine" (J. Barciszewski and V.A. Erdmann, Eds), pp.242-258, Kluwer Academic/Plenum Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Wagner, E. G. H., Brantl, S. (1998) Kissing and RNA stability in antisense control of plasmid replication, *Trends Biochem. Sci.* 23, 451-454
- Waldsich, C., Grossberger, R., Schroeder, R. (2002) RNA chaperone StpA loosens interactions of the tertiary structure in the. td group I intron *in vivo*, *Genes Dev.* 16, 2300-2312
- Wassarman K. M., Storz, G. (2000) 6 S RNA regulates *E. coli* RNA polimerase activity, *Cell* 101, 613-623
- Wassarman K. M., Repoila, F., Rosenow, C., Storz, G., Gottesman, S. (2001) Identification of novel small RNAs using comparative genomics and micro arrays, *Genes Dev.* 15, 1637-1651
- Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J. F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An, P., Antonarakis, S. E., Attwood, J., Baertsch, R. (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome, *Nature* 420, 520-562
- Weilbacher, T., Suzuki, K., Dubey, A. K., Wang, X., Gudapaty, S., Morozov, I., Baker, C. S., Georgellis, D., Babitzke, P., Romeo, T. (2003) A novel sRNA component of the carbon storage regulatory system of *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.* 48, 657-70
- Weisberg R. A., Storz, G. (2002) Take your vitamins with a pinch of RNA, *Mol. Cell* 10, 1266-1268
- Winker, S., Overbeek, R., Woese, C. R., Olsen, G. J., Pfluger, N. (1990) Structure detection through automated covariance search, *Comput. Appl. Biosci.* 64, 365-371
- Winkler W. C., Breaker, R. R. (2003) Genetic control by metabolite-binding riboswitches. *ChemBiochem* 4: 1024-1032

- Winkler, W. C. (2005) Riboswitches and the role of noncoding RNAs in bacterial metabolic control. *Curr Opin Chem Biol.* 9, 594-602
- Winkler, W. C., Breaker, R. R. (2005) Regulation of bacterial gene expression by riboswitches. *Annu Rev Microbiol.* 59, 487-517
- Winkler, W., Nahvi, A., Breaker, R. R. (2002) Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression, *Nature* 419, 952-956
- Worhunsky, D. J., Godek, K., Litsch, S., Schlux, P. J. (2003) Interactions of the non-coding RNA DsrA and RpoS mRNA with the 30 S ribosomal subunit, *J. Biol. Chem.* 278, 15815-15824
- Wower, J., Zwieb, C. W., Hoffman, D. W., Wower, I.K. (2002) SmpB: a protein that binds to double-stranded segments in tmRNA and tRNA, *Biochemistry* 41, 8826-8836
- Wu, H. N., Lin, Y. J., Lin, F. P., Makino, S., Chang, M. F., Lai, M. M. (1989) Human hepatitis delta virus RNA subfragments contain an autocleavage activity, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 1831-1835
- Wu, H., Lima, W. F., Crooke, S. T. (1999) Properties of cloned and expressed human RNase H1, *J Biol Chem.* 1999, 274, 28270-8
- Wyszko, E., Barciszewska, M. Z., Markiewicz, M., Szymanski, M., Markiewicz, W. T., Clark, B. F., Barciszewski, J. (2003) "Action-at-a distance" of a new DNA oxidative damage product 6-furfuryl-adenine (kinetin) on template properties of modified DNA. *Biochim Biophys Acta.* 1625, 239-45
- Wyszko, E., Fuerste J. P., Barciszewska, M., Szymanski, M., Adamiak, R., Erdmann, V. A., Barciszewski, J. (1999) Preparation of HIV TAR RNA with RNA scissors, *J. Biochem.* 126, 326-332
- Yarian, C., Marszalek, M., Sochacka, E., Malkiewicz, A., Guenther, R., Miskiewicz, A., Agris, P. F. (2000) Modified nucleoside dependent Watson-Crick and wobble codon binding by tRNA^{Lys}UUU species, *Biochemistry* 39, 13390-13395
- You, Q. M., Veldhoen, N., Baudin, F., Romaniuk, P. J. (1991) Mutations in 5S DNA and 5S RNA have different effects on the binding of *Xenopus* transcription factor IIIA, *Biochemistry* 30, 2495-2500
- Zhang, A., Wassarman, K. M., Ortega, J., Steven, A. C., Storz, G. (2002) The Sm-like Hfq protein increases OxyS RNA interaction with target mRNAs, *Mol. Cell* 9, 11-22
- Zhang, A., Wassarman, K. M., Rosenow, C., Tjaden, B. C., Storz, G., Gottesman, S. (2003) Global analysis of small RNA and mRNA targets of Hfq, *Mol. Microbiol.* 50, 1111-1124
- Zito, K., Huttenhofer, A., Pace, N. R. (1993) Lead-catalyzed cleavage of ribonuclease P RNA as a probe for integrity of tertiary structure, *Nucleic Acids Res.* 21, 5916-5920

- Wolter, W. C. (2002) Eukaryotes and the role of noncoding RNAs in metabolic control. *Cell Opin Cell Biol* 9, 294-302
- Wolter, W. C., Braker, K. S. (2002) Regulation of bacterial gene expression by ribozymes. *Annu Rev Microbiol* 56, 417-513
- Wolter, W., Jester, A., Braker, K. S. (2001) Ribozymes: alternative small molecule RNA directly to regulate bacterial gene expression. *Nature* 410, 922-926
- Worsham, D. J., Gohar, K., Lutz, S., Sabat, F. J. (2001) Interaction of the non-coding RNA Dax and Rps2 mRNA with the 30 S ribosomal subunit. *J Biol Chem* 276, 12812-12824
- Wozniak, J., Zamb, C. W., Latham, D. W., Wozniak, J. K. (2001) Single-stranded RNA-protein complexes in mRNA and tRNA. *Bioprocess* 41, 583-588
- Wu, H. H., Liu, Y. J., Liu, F. T., Malhotra, S., Chang, M. R., Liu, M. M. (1999) Human hepatitis delta virus RNA ribozymes contain an autocatalytic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1431-1435
- Wu, H. H., Liu, W. F., Conner, S. Y. (1999) Properties of cloned and expressed human hepatitis III. *J Biol Chem* 274, 28378-28382
- Wzack, E., Babinchak, M. S., Malhotra, S., Szymanski, M., Malhotra, W. T., Chen, S. P., Babinchak, J. (2002) Antisense-directed by a new DNA oxidative damage product 8-hydroxy-2'-deoxyadenosine (8-hydroxy-dAdo) on template synthesis of modified DNA. *Biochim Biophys Acta* 1523, 239-42
- Wzack, E., Wang, J. F., Babinchak, M. S., Szymanski, M., Adams, R., Edwards, V. A., Babinchak, J. (1999) Expression of HIV TAR RNA with RNA sequence. *J Biomol Struct Funct* 176, 309-312
- Yates, C., Munnich, M., Zwickler, B., Malhotra, S., Gonsky, R., Malhotra, S., Aguiar, B. S. (2000) Molecular recognition between Watson-Crick and wobble codon pairing by tRNA^{Met} in the genetic code. *Biochemistry* 39, 15380-15383
- Yeo, G. M., Volinnov, N., Bouda, F., Bouda, F. J. (1997) Mutation in 22 DNA and 22 RNA base pairing effects on the binding of X-ray transcription factor IIIA. *Biochemistry* 36, 2682-2689
- Zhang, A., Watanabe, S. M., Zhang, J., Zhou, A. C., Szostak, J. (2002) The 3' UTR of the genome encodes a GTPase inhibitor with major tRNA^{Met} Mol Cell 9, 11-22
- Zhang, A., Watanabe, S. M., Zhang, J., Zhou, B. C., Szostak, J. (1999) 3' UTR of the genome encodes of small RNA and mRNA target of Hsp 70. *Mol Microbiol* 30, 1114-1124
- Zhou, H., Hoshino, A., Park, M. R. (1995) Lead-catalyzed cleavage of ribonucleosides: RNA as a probe for integrity of tertiary structure. *Nucleic Acids Res* 23, 2916-2920

- Zuker, M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 31, 3406-3415
- Żywicki, M., Szymański, M., Barciszewski, J. (2004) Różnorodność i funkcje niekodujących regulatorowych RNA. *Postępy Biochem.* 50, 90-102



Załącznik 1

Włącznik RNA (ang. RNA attachment) to proces, w którym cząsteczki RNA są przyłączane do białek, tworząc kompleksy białko-RNA. Te kompleksy są niezbędne dla wielu procesów biologicznych, takich jak transport RNA, regulacja ekspresji genów i kataliza reakcji chemicznych. Włączniki RNA mogą być białkami lub innymi cząsteczkami, które wiążą się z RNA poprzez interakcje elektrostatyczne, wodorowe i hydrofobowe.

WŁĄCZNIKI

Włączniki RNA są białkami, które wiążą się z RNA, tworząc kompleksy białko-RNA. Te kompleksy są niezbędne dla wielu procesów biologicznych, takich jak transport RNA, regulacja ekspresji genów i kataliza reakcji chemicznych. Włączniki RNA mogą być białkami lub innymi cząsteczkami, które wiążą się z RNA poprzez interakcje elektrostatyczne, wodorowe i hydrofobowe.

Włączniki RNA są białkami, które wiążą się z RNA, tworząc kompleksy białko-RNA. Te kompleksy są niezbędne dla wielu procesów biologicznych, takich jak transport RNA, regulacja ekspresji genów i kataliza reakcji chemicznych. Włączniki RNA mogą być białkami lub innymi cząsteczkami, które wiążą się z RNA poprzez interakcje elektrostatyczne, wodorowe i hydrofobowe.

WŁĄCZNIKI

Włączniki RNA są białkami, które wiążą się z RNA, tworząc kompleksy białko-RNA. Te kompleksy są niezbędne dla wielu procesów biologicznych, takich jak transport RNA, regulacja ekspresji genów i kataliza reakcji chemicznych. Włączniki RNA mogą być białkami lub innymi cząsteczkami, które wiążą się z RNA poprzez interakcje elektrostatyczne, wodorowe i hydrofobowe.

Włączniki RNA są białkami, które wiążą się z RNA, tworząc kompleksy białko-RNA. Te kompleksy są niezbędne dla wielu procesów biologicznych, takich jak transport RNA, regulacja ekspresji genów i kataliza reakcji chemicznych. Włączniki RNA mogą być białkami lub innymi cząsteczkami, które wiążą się z RNA poprzez interakcje elektrostatyczne, wodorowe i hydrofobowe.



Przełączniki RNA

WSTĘP

Przełączniki RNA (ryboprzełączniki, ang. *riboswitches*) są to struktury RNA wiążące niskocząsteczkowe metabolity i regulujące ekspresję genów zarówno na poziomie transkrypcji jak i translacji. Występują one przede wszystkim u bakterii, w regionach mRNA eulegających translacji (UTR), przy końcu 5'. U *Bacillus subtilis* około 2% całego genomu znajduje się pod kontrolą przełączników RNA. Wiązanie metabolitów charakteryzuje się wysoką specyficznością i w niektórych przypadkach ma charakter kooperatywny. Obecnie znane są ryboprzełączniki wiążące mononukleotyd flawinowy, tiaminę i pirofosforan tiaminy, adenozylokobalaminę, S-adenozylometioninę, lizynę, glicynę, adeninę i guaninę oraz ukozoamino-6-fosforan. Niektóre z nich, np. element wiążący pirofosforan tiaminy występują również u grzybów (*Neurospora crassa*) oraz u roślin (*Oryza sativa*, *Arabidopsis thaliana*). U człowieka zidentyfikowano dotychczas jeden przełącznik RNA, wiążący 2-aminopurynę. Występowanie przełączników RNA we wszystkich grupach taksonomicznych wskazuje na ich odległe pochodzenie ewolucyjne. Sugeruje ponadto pytanie o ich udział w regulacji ekspresji genów u wyższych *Eukaryota*, a w szczególności u człowieka.

WPROWADZENIE

Zgodnie z podstawowym dogmatem biologii molekularnej informacja genetyczna zakodowana w DNA przekazywana jest do RNA, a następnie do białek, które pełnią funkcje enzymatyczne, transportujące i regulatorowe. Ten prosty model został znacznie wzbogacony po odkryciu właściwości katalitycznych RNA. U wielu organizmów stwierdzono, że cząsteczki RNA wpływają bezpośrednio na takie procesy, jak hydroliza RNA, składanie RNA czy translacja, niekodujące RNA (ncRNA) zaangażowane są w regulację ekspresji genów, zarówno na poziomie DNA, RNA, jak również białka [1-3].

Do szerokiego spektrum właściwości RNA w ostatnim czasie doszło jeszcze bardziej specyficzne wiązanie niskocząsteczkowych metabolitów komórkowych. Ta cecha umożliwia cząsteczkom mRNA samoregulację transkrypcji lub translacji. W konsekwencji cały proces może odbywać się bez udziału dodatkowych czynników białkowych. Funkcje te realizowane są przez niekodujące regiony mRNA (UTR, ang. *untranslated region*) w układzie *cis*, które tworzą motywy strukturalne wiążące poszczególne metabolity. Wiązanie to indukuje zmiany struktury niekodującego regionu mRNA oraz aktywację lub represję translacji czy transkrypcji. Regulacja ekspresji genów kodujących białka odbywa się poprzez odwrotne blokowanie znajdującej się w obrębie UTR sekwencji RBS (ang. *ribosome binding site*) stanowiącej miejsce przyłączenia mRNA do rybosomu. Możliwe jest również utworzenie, jeszcze na etapie transkrypcji, alternatywnej spinki atenuacyjnej będącej sygnałem terminacji transkrypcji u *Prokaryota*. Cząsteczki RNA wiążące metabolity nazywa się przełącznikami RNA (ryboprzełącznikami) (ang. *riboswitch*). Większość zidentyfikowanych do tej pory ryboprzełączników znaleziono u organizmów prokariotycznych.

STRUKTURA PRZEŁĄCZNIKÓW RNA

W obrębie struktury drugorzędowej wszystkich poznanych do tej pory przełączników RNA wyróżnić można następujące elementy: podstawowy trzon, centralną multipętlę oraz dodatkowe elementy strukturalne o charakterze spinki i pętli (Rys. 1). W oddziaływaniu trzeciorzędowej oraz w wiązaniu ligandu zaangażowane są najprawdopodobniej regiony pojedynczonicowe [4-6].

Ryboprzełączniki posiadają dwie domeny funkcjonalne: jest to element wiążący naturalny ligand lub aptamer oraz „platforma ekspresyjna”, której konformacja wpływa na ekspresję genu [7]. Podobnie jak w przypadku aptamerów, przyłączenie ligandów do przełączników RNA jest „wiązaniem przystosowanym” (ang. *adaptive binding*), polegającym na indukowanym „dopasowaniu”

Katarzyna Bugała

Marek Żywicki

Eliza Wyszko

Mirosława Z. Barciszewska

Jan Barciszewski✉

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Poznań

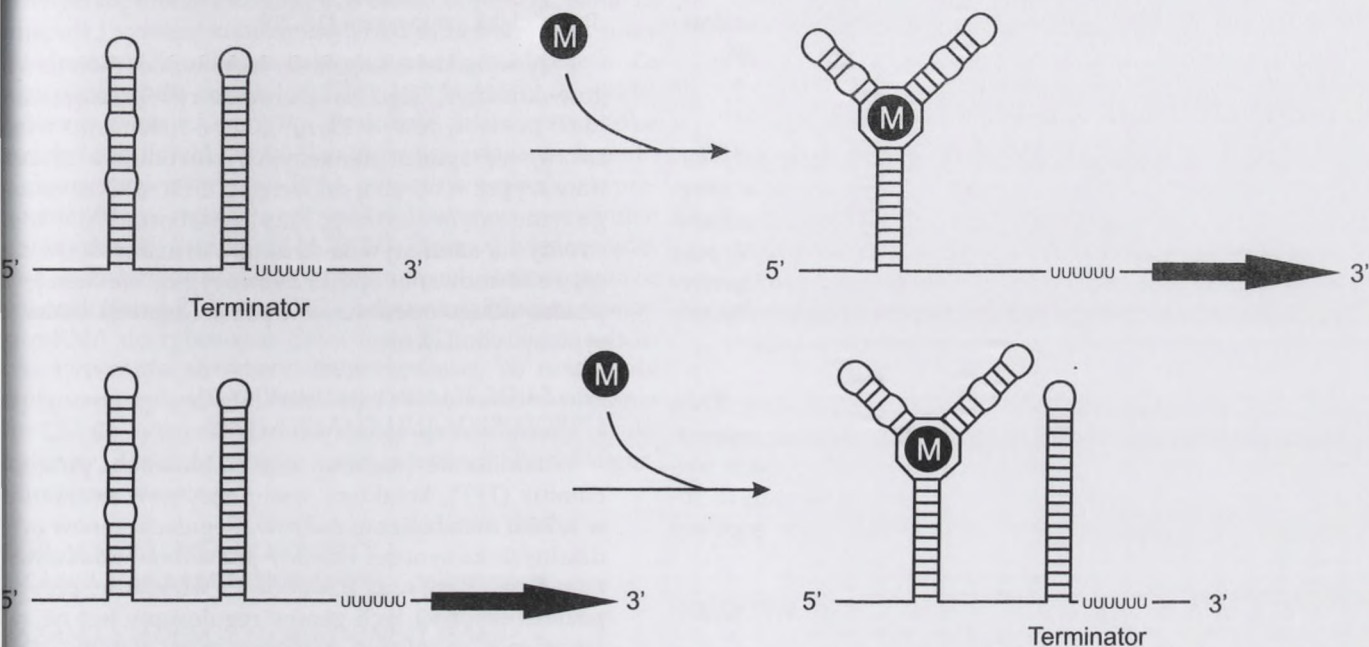
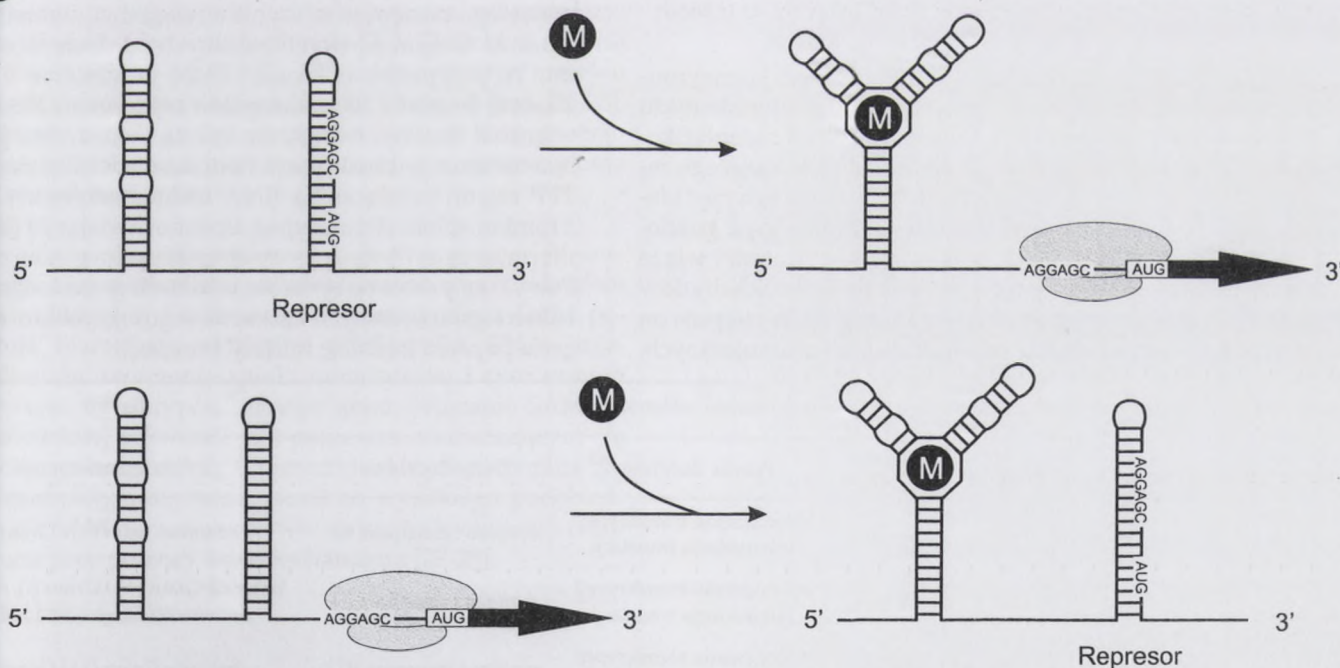
✉Instytut Chemii Bioorganicznej PAN,
ul. Noskowskiego 12, 61-704 Poznań; e-mail:
Jan.Barciszewski@ibch.poznan.pl; tel. (61) 852
85 03

Artykuł otrzymano 28 października 2004

Artykuł zaakceptowano 28 grudnia 2004

Słowa kluczowe: przełączniki RNA, regulatorowe RNA, niekodujące RNA, regulacja ekspresji genów, transkrypcja, translacja

Wykaz skrótów: Ado-Cbl - adenozylokobalaminina; FAD - dinukleotyd flawinoadeninowy; FMN - mononukleotyd flawinowy; GlcN6P - 6-fosfoglukozoamina; GTP - guanozynotrifosforan; ncRNA - niekodujące RNA; PKR - RNA-zależna kinaza białkowa; RBS - miejsce wiązania rybosomu; SAM - S-adenozylometionina; SD - sekwencja Shine-Dalgarno; TNF α - czynnik martwicy nowotworu; TPP - pirofosforan tiaminy; UTR - niekodujący region mRNA

A**B**

rynek 2. Sposoby regulacji ekspresji genów poprzez formowanie alternatywnych struktur drugorzędowych RNA pod wpływem wiązania metabolitów. A) Regulacja poziomu transkrypcji poprzez tworzenie alternatywnej spinki atenuacyjnej (terminatora) pod wpływem wiązania metabolitu (M). Przykłady ilustrują aktywację oraz przedwczesną terminację transkrypcji. B) Regulacja na poziomie translacji odpowiednio poprzez uwalnianie lub blokowanie sekwencji Shine - Dalgarno i kodonu inicjacyjnego pod wpływem wiązania metabolitu (M). Nie związana sekwencja Shine - Dalgarno pozwala na przyłączenie rybosomu i rozpoczęcie translacji.

poprzez aktywację transkrypcji jest przeciwieństwem hamowanego procesu. Struktura spinki atenuacyjnej występuje w sytuacji niedoboru ligandu, natomiast związanie metabolitu powoduje jej rozplecenie i umożliwia transkrypcję pełnej długości mRNA.

W przypadku drugiego typu regulacji polegającej na inhibicji translacji, modulacji podlega dostępność sekwencji Shine-Dalgarno (RBS) oraz kodonu AUG. Jeśli region ten uwikłany jest w strukturę drugorzędową jest on niedostępny dla rybosomu, co prowadzi do inhibicji translacji. Jego

uwolnienie natomiast powoduje natychmiastową ekspresję białka. Podobnie jak w przypadku regulacji transkrypcji znane są przełączniki RNA działające jako aktywatory i represory translacji. Wiązanie metabolitu umożliwia uwolnienie lub związanie miejsca wiązania rybosomu (Rys. 2B).

PRZYKŁADY PRZEŁĄCZNIKÓW RNA

Biologiczne znaczenie ryboprzełączników może potwierdzać ich rozpowszechnienie i duża zachowawczość w obrębie *Prokaryota*, a w niektórych przypadkach również u *Eukaryota* [10]. Poszczególne typy przełączników RNA występują wielokrotnie w genomie jednego organizmu, np. 69 genów *Bacillus subtilis* regulowanych jest poprzez ryboprzełączniki, co stanowi ok. 2% całego genomu bakterii [10-12].

Dotychczas elementy o charakterze przełączników RNA zidentyfikowano u blisko 100 gatunków bakterii wszystkich grup taksonomicznych, jak również w regionach niekodujących mRNA archebakterii, grzybów i niektórych roślin [10,13]. Znane ryboprzełączniki oraz ich rolę w regulacji metabolizmu bakteryjnego zebrano w Tabeli 1.

PRZEŁĄCZNIKI W KONTROLI METABOLIZMU WITAMIN

Pierwsze przełączniki RNA zaangażowane w regulację poziomu ekspresji genów odpowiedzialnych za syntezę witamin, zidentyfikowano w *B.subtilis*, *E.coli* oraz *Rhizobium etli*.

WIĄZANIE MONONUKLEOTYDU FLAWINOWEGO (FMN)

Witamina B2 (ryboflawina) jest prekursorem koenzymu mononukleotydu flawinowego (FMN) oraz dinukleotydu flawinoadeninowego (FAD). Przełącznik RNA zidentyfikowano w 300 nukleotydowym fragmencie niekodującego regionu 5' operonu ryboflawinowego (*rib*), kodującego pięć białek biorących udział w szlaku syntezy ryboflawiny z guanozynotrifosforanu (GTP) u *B. subtilis* oraz *E. coli*. FMN wiąże się do fragmentu mRNA o długości około 140 nukleotydów [14-17]. Element ten nazywany jest kasetą *rfn*. Występuje on również u innych bakterii gramdodatnich i gramujemnych.

W jego strukturze wyróżnić można 5 „spinek do włosów” z których trzy są wyjątkowo zachowawcze, natomiast stałe wykazują większą zmienność zarówno pod względem długości jak i sekwencji [18-20].

Przy wysokiej dostępności mononukleotydu flawinowego w komórce i jego związaniu do ryboprzełącznika, około 60 nukleotydów w kierunku 3' od elementu wiązania tworzy się spinka atenuacyjna, powodująca zakończenie transkrypcji w obrębie sekwencji 5'UTR mRNA, co zapobiega tym samym ekspresji. Przy niedoborze FMN w komórce tworzy się alternatywna struktura drugorzędowa zapobiegająca formowaniu spinki atenuacyjnej. Efektem jest pełna ekspresja operonu *rib* i pełna ekspresja białek syntetyzujących ryboflawinę.

WIĄZANIE TIAMINY (WITAMINY B1) I PIROFOSFORANU TIAMINY (TPP)

Witamina B1 (tiamina) jest prekursorem pirofosforanu tiaminy (TPP), kofaktora wielu enzymów uczestniczących w szlaku metabolizmu cukrów. Regulacja genów odpowiedzialnych za syntezę tiaminy jest dobrze udokumentowana u *E.coli*, *R.etli* oraz *B.subtilis*. W większości przypadków poziom ekspresji tych genów regulowany jest na zasadzie sprzężenia zwrotnego zarówno przez tiaminę jak i TPP [21,22]. Element wiążący tiaminę i jej pirofosforan składa się z zachowawczego fragmentu mRNA o długości 300 nukleotydów, nazywanego kasetą *thi* i tworzącego strukturę drugorzędową typu spinki do włosów [13,15]. Regulacja podobnie jak w przypadku wiązania mononukleotydu flawinowego następuje w wyniku tworzenia alternatywnych struktur drugorzędowych zależnych od dostępności tiaminy. W przypadku obecności FMN w komórce i asocjacji z kasetą *thi*, około 30 nukleotydów w kierunku 3' od miejsca wiązania tiaminy, tworzy się spinka atenuacyjna powodująca terminację transkrypcji. Podczas niedoboru tiaminy TPP region przełącznika RNA blokuje sekwencję jednoczynnikową z ramion spinki atenuacyjnej, uniemożliwiając jej poprawne uformowanie. Powoduje to pełną ekspresję genów operonu *thi*. Powyższy proces odbywa się u bakterii gramdodatnich i gramujemnych. U bakterii gramdodatnich kasetą *thi* reguluje poziom ekspresji genów poprzez inhibicję inicjacji translacji.

Tabela 1. Ryboprzełączniki i ich rola w regulacji metabolizmu komórki bakteryjnej

Metabolit (ligand)	Prekursor	Sensor RNA	Proces docelowy	Geny docelowe	Gdzie znaleziono
FMN	B2	rfn-box	zakończenie transkrypcji lub inicjacja translacji	synteza i transport B2	bakterie Gram (+) i Gram (-)
TPP	B1	thi-box	zakończenie transkrypcji lub inicjacja translacji	synteza i transport B1	bakterie Gram (+) i Gram (-), niek. archebakterie, grzyby i rośliny
Ado-Cbl	B12	B12-box	zakończenie transkrypcji i/lub inicjacja translacji	synteza i transport B12	bakterie Gram (+) i Gram (-)
SAM	Met	S-box	zakończenie transkrypcji	metabolizm siarki	bakterie Gram (+)
lizyna	N/A	L-box	zakończenie transkrypcji	LysC	bakterie Gram (+) i Gram (-)
glicyna	N/A	VCI-II	zakończenie transkrypcji	gcvT	<i>Bacillus subtilis</i>
guanina, hipoksantyna	N/A	G-box	zakończenie transkrypcji i atenuacja	metabolizm i transport puryn	bakterie Gram (+)

WIĄZANIE ADENOZYLOKOBALAMINY (ADO-CBL)

Elementy wiążące Ado-Cbl znajdują się w obrębie dwóch ównych operonów kodujących białka odpowiedzialne za anspport i syntezę kobalaminy. Taki system regulatorowy inkcjonuje u *E. coli* oraz bakterii z rodzaju *Salmonella*. Za iązanie ligandu odpowiedzialny jest fragment 25-nukle- ydowy, zwany kasetą B₁₂. Podobnie, jak w przypadku aminy i mononukleotydu flawinowego, wiązanie ligandu o elementu przełącznika RNA powoduje represję ekspre- i genu, jednak regulacja odbywa się zarówno na poziomie anskrypcji jak i translacji [4,23,24]. Element wiążący ade- zylokobalaminę w stanie wolnym znajduje się w pobliżu kwencji Shine-Dalgarno (SD), odpowiedzialnej za wiąza- e mRNA do rybosomu. Sekwencja SD nie bierze udzia- w tworzeniu struktury drugorzędowej, co umożliwia zyłaczenie rybosomu i translację. W momencie związania do-Cbl do rybosomu następuje rearanżacja struk- ry prowadząca do zablokowania sekwencji Shine-Dalgar- o i represję translacji.

PRZEŁĄCZNIKI RNA W KONTROLI METABOLIZMU AMINOKWASÓW

WIĄZANIE S-ADENOZYLOMETIONINY (SAM)

S-adenozylometionina jest kluczowym koenzymem wielu organizmów. Jest syntetyzowana bezpośrednio metioniny przez syntetazę SAM i jest donorem grup me- lowych dla modyfikacji białek i kwasów nukleinowych. *B. subtilis* zidentyfikowano 11 operonów zawierających genów podlegających kontroli poprzez rybosprzełącz- k wiążący S-adenozylometioninę [25]. Charakteryzują ją e obecnością w rejonie 5'UTR zachowawczego motywu kwencyjnego nazywanego kasetą S (ang. *S-box*) [25,26]. iększość z tych genów zaangażowana jest bezpośrednio metabolizm siarki, biosyntezę cysteiny i metioniny oraz adenozylometioniny.

Regulacja ekspresji realizowana jest na poziomie trans- ypcji, a jej mechanizm podobny jest do tego z udziałem ononukleotydu flawinowego i tiaminy. Brak SAM po- oduje rearanżację struktury przełącznika RNA, unie- ożliwiając tworzenie spinki atenuacyjnej i tym samym tywując transkrypcję pełnego genu. Wiązanie SAM do powniej sekwencji jest procesem odznaczającym się ysoką specyficznością. Cząsteczki takie jak metionina lub adenozylohomocysteina, pomimo wysokiego podobień- wa do SAM nie mają wpływu na kontrolę ekspresji reali- waną przy pomocy tego mechanizmu [27-29].

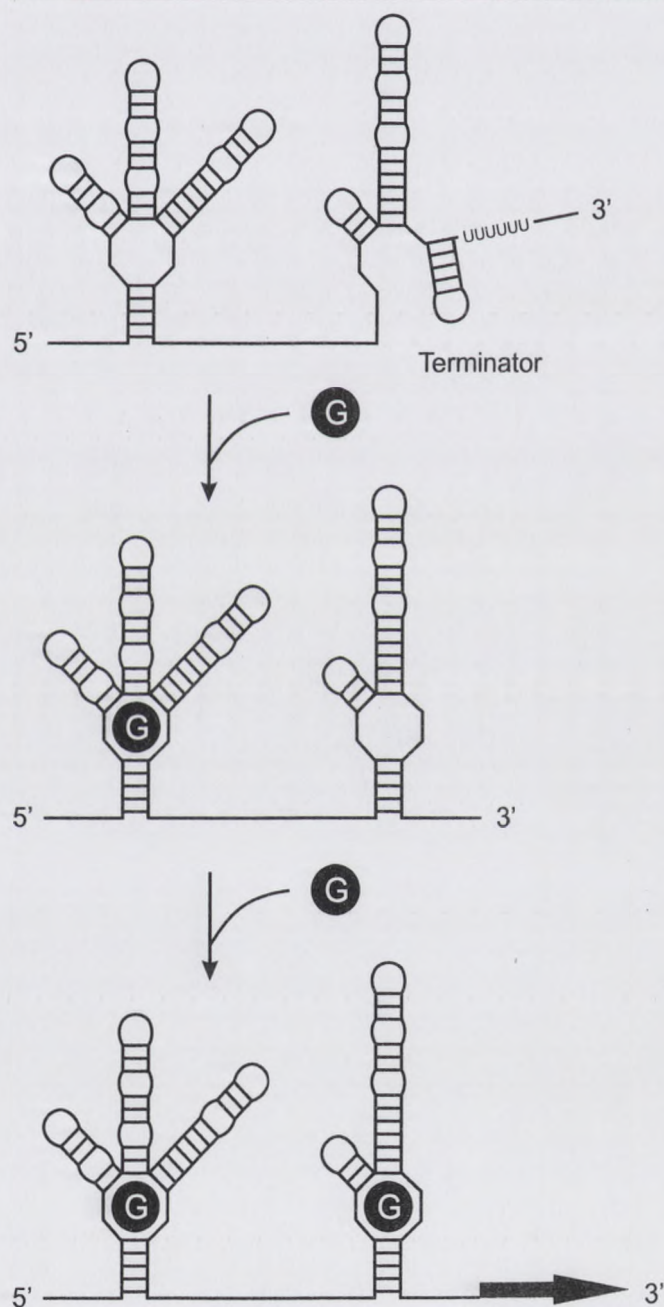
WIĄZANIE LIZYNY

Przełączniki RNA wiążące lizynę występują w nieko- jających regionach wielu genów związanych z biosyntezą go aminokwasu u bakterii. Ich sekwencje 5'UTR zawierają ysocje konserwatywne kasety sekwencyjne oraz posiadają podobną strukturę drugorzędową regionu, w którym zlo- lizowany jest rybosprzełącznik [7,30]. Pomimo tak wyso- ej zachowawczości, mechanizm działania przełącznika NA jest inny u bakterii gramdodatnich i gramujemnych. w pierwszej grupie organizmów polega on na powstaniu spinki atenuacyjnej oraz rearanżacji struktury prowadzącej

do aktywacji transkrypcji pełnej długości mRNA po związa- niu lizyny. U bakterii gramujemnych, przy niedoborze lizy- ny rybosprzełącznik oddziałuje z fragmentem UTR mRNA, blokując sekwencję Shine-Dalgarno w stanie związanym ligandu. W obu tych przypadkach brak lizyny powoduje w efekcie aktywację ekspresji genów związanych z biosyn- tezą tego aminokwasu [30,31].

WIĄZANIE GLICYNY

Przełącznik RNA wiążący glicynę znajduje się w regio- nach niekodujących genów odpowiedzialnych za katabo- lizm glicyny i włączenie jej do cyklu kwasu cytrynowego jako substratu energetycznego. Regulacja ekspresji białka odbywa się poprzez tworzenie spinki atenuacyjnej w przy-



Rysunek 3. Regulacja transkrypcji poprzez kooperatywne wiązanie dwóch czą- steczek glicyny. Związanie pierwszej cząsteczki powoduje zmiany strukturalne w obrębie drugiej domeny wiążącej, co umożliwia przyłączenie drugiej cząstecz- ki glicyny i aktywację transkrypcji pełnej długości mRNA.

padku niedoboru glicyny. Ryboprzełącznik ten, w odróżnieniu od innych znanych tego typu elementów, wiąże dwie cząsteczki glicyny [32]. Jest to możliwe dzięki występowaniu dwóch podobnych do siebie motywów wiążących w ściśle określonej odległości od siebie. Wykazano, że wiązanie glicyny odbywa się w sposób kooperatywny, charakterystyczny dla białek (Rys. 3).

PRZEŁĄCZNIKI RNA W KONTROLI METABOLIZMU ADENINY I GUANINY

Pięć operonów kodujących białka szlaków biosyntezy, konwersji i transportu puryn u *B.subtilis* podlega regulacji poprzez przełączniki RNA [10]. W wiązaniu adeniny, guaniny oraz hipoksantyny biorą udział struktury RNA o długości około 70 nukleotydów, formujące strukturę drugorzędową składającą się z dwóch „spinek do włosów” spiętych helisą. Specyficzność wiązania ligandu uzależniona jest od jednego nukleotydu w obrębie sekwencji wiążącej, tzw. kasety G. Zamiana cytozyny w pozycji 74 na urydynę powoduje zmianę specyficzności wiązania ligandu z guaniny lub hipoksantyny na adeninę [14]. Mechanizm regulacji jest typowym przykładem powstawania spinki atenuacyjnej poniżej sekwencji wiążącej nukleotyd. W przypadku braku ligandu alternatywna struktura blokująca możliwość powstania spinki, umożliwia transkrypcję całego genu.

PRZEŁĄCZNIKI RNA UCZESTNICZĄCE W BIOSYNTYZIE ŚCIANY KOMÓRKOWEJ

Wiązanie glukozaamino-6-fosforanu (GlcN6P), podstawowego składnika budulcowego bakteryjnej ściany komórkowej, odbiega nieco od typowego modelu regulacji poprzez ryboprzełączniki [12]. Przełącznik RNA wiążący GlcN6P znajduje się w regionie 5'UTR mRNA związanego z genem kodującym białko odpowiedzialne za syntezę tego związku. Rearanżacja struktury 5' UTR mRNA odpowiedzialnej za wiązanie GlcN6P aktywuje znajdujący się w tym rejonie rybozym (Rys. 4) [12]. Aktywność tego rybozomu w układzie *cis* powoduje hydrolizę mRNA, skrócenie czasu półtrwania mRNA z 4 minut do 15 sekund i w efekcie niemal całkowite zahamowanie biosyntezy białka.

Przełącznik RNA dla GlcN6P wykazuje wysoką specyficzność – analogi GlcN6P takie jak glukozo-6-fosforan czy glukozaamina nie wpływają na aktywację rybozomu. Mechanizm ten jest przykładem bardzo efektywnego i szybkiego sposobu regulacji poprzez sprzężenie zwrotne [33,34].

PRZEŁĄCZNIKI RNA U *Eukaryota*

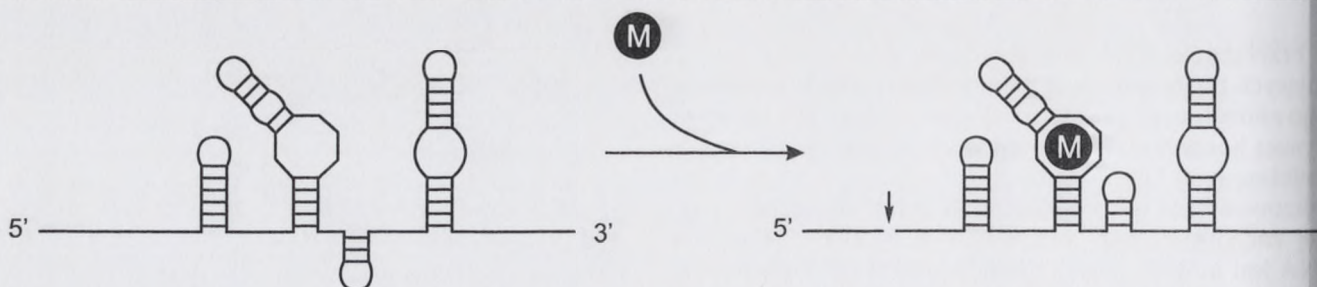
Dotychczas w organizmach eukariotycznych zidentyfikowano jedynie elementy wiążące pirofosforan tiaminy. Motywy takie znaleziono u grzybów (*Neurospora*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus oryzae*) oraz u roślin (*Sativa*, *Poa secunda* oraz *Arabidopsis thaliana*) [10,34]. Motyw wiążący pirofosforan tiaminy znajduje się w obrębie 3'UTR mRNA enzymu biorącego udział w biosyntezie tiaminy (ortologu bakteryjnego *thiC*). Postulowano, że rearanżacja struktury tego regionu wywołana wiązaniem ligandu może wpływać na stabilność mRNA i na ekspresję białka.

W przypadku grzybów motyw wiążący pirofosforan tiaminy znajduje się w sekwencji intronu, a postulowany mechanizm polega na włączaniu i wyłączaniu alternatywnych miejsc składania mRNA w zależności od poziomu tiaminy.

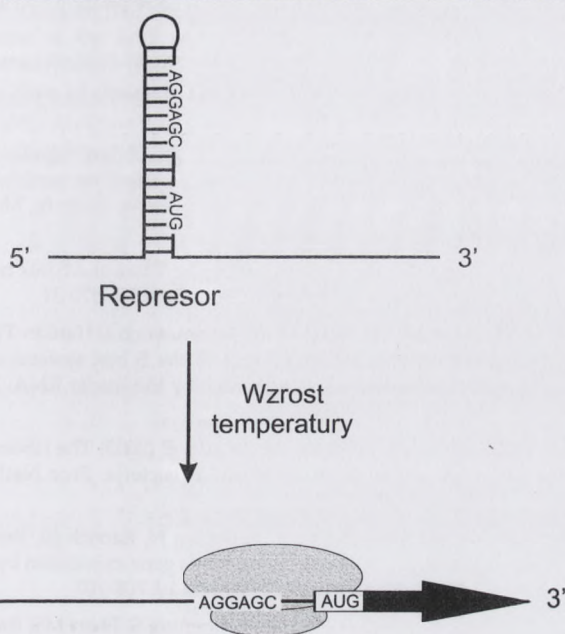
Przełączniki RNA biorą również udział w regulacji ekspresji czynnika TNF- α (ang. *tumor necrosis factor*) człowieka. W obrębie 3'UTR mRNA tego genu występuje element wiążący 2-aminopurynę [35,36]. Przy niskiej dostępności ligandu, element ten wiąże nieaktywną RNA-zależną kinazę (ang. *RNA-dependent protein kinase-PKR*), natomiast przy wysokiej aktywacji tego enzymu, co z kolei powoduje zwiększenie efektywności składania mRNA kodującego TNF- α . W tym celu przełącznik wiążący 2-aminopurynę w stanie wolnym wiąże PKR znacznie efektywniej niż dwuniciowy RNA. Postuluje się, że wiązanie i aktywacja kinazy PKR przez element kodujący region mRNA pozwala na szybką ekspresję białka TNF- α podczas infekcji wirusowej.

TERMOCZUJNIKI

Regulacja ekspresji i aktywności genów, w zależności od temperatury może być wywołana w dwóch przypadkach: jako odpowiedź na szok temperaturowy oraz na infekcję przez patogeny [37-40]. Struktura drugorzędowa RNA jest zwykle wrażliwa na temperaturę, samo RNA może pełnić rolę termoczuJNIKA (ang. *termosensor*). Dotychczas zidentyfikowano u bakterii z rodzaju *Rhizobium* oraz *S. typhimurium*, *S. flexneri*, *E. coli*, *Y. pestis* i *L. monocytogenes* [40-44]. Zaangażowane są one bezpośrednio w regulację translacji, a ściślej w modulację dostępności sekwencji Shine-Dalgarno oraz miejsca inicjacji translacji AUG. Struktura o charakterze spinki do włosów obejmująca sekwencję Shine-Dalgarno zapobiega translacji mRNA przy obniżonej temperaturze. W przypadku podniesienia t



Rysunek 4. Regulacja translacji poprzez ryboprzełącznik o aktywności rybozymalnej. Zmiana konformacji spowodowana wiązaniem metabolitu (M) – glukozaamino-6-fosforanu aktywuje rybozym hydrolizujący sekwencję mRNA w miejscu wskazanym strzałką.



rysunek 5. Zmiany strukturalne w regionie 5'UTR mRNA indukowane wzrostem temperatury. Uwolnienie sekwencji Shine-Delgarno i kodonu inicjatorowego umożliwia przyłączenie rybosomu i inicjację translacji.

temperatury z 30°C do 37°C dochodzi do oddziaływań rybosomu sekwencją RBS, a w konsekwencji do translacji odpowiedniego mRNA (Rys. 5).

METODY IDENTYFIKACJI PRZEŁĄCZNIKÓW RNA *in silico*

Obecnie znana jest jedna metoda przewidywania struktur przełączników RNA *de novo* [45]. Polega ona na poszukiwaniu sekwencji mogących tworzyć dwie alternatywne stabilne energetycznie struktury drugorzędowe. Powinny one być oddzielone barierą energetyczną, której pokonanie możliwi dopiero jakiś czynnik zewnętrzny (np. wiążący ligand). Alternatywne struktury powinny mieć zbliżoną entalpię swobodną, jednak powinny się zdecydowanie różnić. Sekwencje tworzące więcej niż dwie struktury odrzuca się, gdyż po zadziałaniu czynnika zewnętrznego, cząsteczka powinna mieć możliwość przyjęcia tylko jednej, ściśle określonej konformacji. Implementacja powyższych założeń ma na celu wyszukanie sekwencji zdolnych do „przełączenia” struktury drugorzędowej na alternatywną, o zbliżonej energii, pod wpływem czynnika zewnętrznego. Metoda ta okazała się jednak nieskuteczna w przypadku występowania w jednej z alternatywnych struktur pseudowęzłów lub oddziaływań pomiędzy odległymi fragmentami sekwencji. Struktury tego typu zawiera około 2/3 wszystkich znanych przełączników RNA. Dla zidentyfikowanych sekwencji „przełącznikowych” nie można również przewidzieć potencjalnych ligandów zdolnych do wywołania zmiany struktury. Fakt ten pozostawia przewidziane przełączniki bez żadnego znaczenia biologicznego.

Innym podejściem mającym na celu identyfikację nowych przełączników RNA jest poszukiwanie scharakteryzowanych eksperymentalnie motywów wiążących metabolity u organizmów, u których jeszcze nie stwierdzono ich obecności. Znana jest obecnie tylko jedna metoda pozwalająca

na tego typu badania. Jej implementacja dostępna jest w postaci serwisu internetowego www.biozentrum.uni-wuerzburg.de/bioinformatik/Riboswitch/ [46]. Polega ona na przeszukiwaniu zadanej sekwencji profilem sekwencyjno-strukturalnym stworzonym na podstawie porównania znanych ryboswitchów danego typu. Po zidentyfikowaniu sekwencji odpowiadającej profilowi następuje przewidywanie struktur suboptymalnych. Następnym krokiem jest weryfikacja struktury o najniższej energii pod kątem liczby utworzonych par zasad w każdym z elementów strukturalnych. Na tym etapie dopuszczalne jest wprowadzenie pewnych uproszczeń pozwalających na stopniowanie restrykcyjności metody.

Wyniki ewaluacji metody z użyciem profilu dla elementu wiążącego adeninę wykazały, że jest ona w stanie zidentyfikować wszystkie znane ryboswitchy bakteryjne dla wypracowanego modelu. Dodatkowo przeszukiwanie bazy danych EMBL doprowadziło do identyfikacji 19 nowych potencjalnych przełączników RNA wiążących adeninę [46].

Metoda ta posiada jednak wiele ograniczeń. Jedynym modelem użytym do oceny i dostępnym w chwili obecnej do analizy jest ryboswitch adeninowy. Jak widać na Rys. 1, element ten jest najprostszym spośród znanych elementów wiążących metabolity. Obecność łatwych do zdefiniowania oddziaływań strukturalnych (trzy występujące blisko siebie struktury „spinki do włosów”) pozwala na proste określenie punktacji w profilu (minimalna ilość par zasad w każdej helisie, krytyczne pozycje konserwatywnych nukleotydów). Metoda ta nie wydaje się jednak przydatna w przypadku przełączników RNA o bardziej złożonych oddziaływaniach.

PERSPEKTYWY

Możliwość regulacji ekspresji genów bezpośrednio przez mRNA, bez potrzeby biosyntezy białek receptorowych i regulacyjnych jest przykładem wyjątkowo ekonomicznego mechanizmu. Prostota działania ryboswitchów oraz powszechność ich występowania u bakterii, grzybów i roślin wskazuje na ich odległe pochodzenie ewolucyjne. Na tej podstawie można przewidywać, że elementy te powinny być również obecne u człowieka oraz innych przedstawicieli królestwa zwierząt. Zidentyfikowany u człowieka element regulujący poziom czynnika TNF- α potwierdza słuszność tej tezy. Złożoność szlaków regulacyjnych u wyższych Eukaryota nie pozwala jednak na prostą analizę genów związanych bezpośrednio ze szlakiem transportu i syntezy wiązanych przez ryboswitch metabolitu. Skomplikowane mechanizmy sygnalizacyjne oraz aktywujące transkrypcję i translację zmuszają do poszukiwania przełączników RNA w szerokim spektrum genów pozornie niezwiązanych z danym szlakiem metabolicznym. Identyfikacja tego typu elementów w tak złożonych organizmach uzależniona jest od opracowania skutecznych narzędzi bioinformatycznych pozwalających na szybkie wyłonienie kandydatów dla badań eksperymentalnych.

PIŚMIENICTWO

1. Erdmann VA, Barciszewska MZ, Hochberg A, de Groot N, Barciszewski J (2001) Regulatory RNAs. *Cell Mol Life Sci* 58: 960-977
2. Lai EC (2003) RNA sensors and riboswitches: self-regulating messages. *Curr Biol* 13: R285-291
3. Szymanski M, Barciszewska MZ, Zywicki M, Barciszewski J (2003) Noncoding RNA transcripts. *J Appl Genet* 44: 1-19
4. Grundy FJ, Lehman SC, Henkin TM (2003) The L box regulon: lysine sensing by leader RNAs of bacterial lysine biosynthesis genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 12057-12062
5. Vitreschak AG, Rodionov DA, Mironov AA, Gelfand MS (2003) Regulation of the vitamin B12 metabolism and transport in bacteria by a conserved RNA structural element. *RNA* 9: 1084-1097
6. Rodionov DA, Vitreschak AG, Mironov AA, Gelfand MS (2003) Regulation of lysine biosynthesis and transport genes in bacteria: yet another RNA riboswitch? *Nucleic Acids Res* 31: 6748-6757
7. Winkler WC, Breaker RR (2003) Genetic control by metabolite-binding riboswitches. *Chembiochem* 4: 1024-1032
8. Hermann T, Patel DJ (2000) Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. *Science* 287: 820-825
9. Sudarsan N, Barrick JE, Breaker RR (2003) Metabolite-binding RNA domains are present in the genes of eukaryotes. *RNA* 9: 644-647
10. Nudler E, Mironov AS (2004) The riboswitch control of bacterial metabolism. *Trends Biochem Sci* 29: 11-17
11. Mandal M, Boese B, Barrick JE, Winkler WC, Breaker RR (2003) Riboswitches control fundamental biochemical pathways in *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Cell* 113: 577-586
12. Winkler WC, Nahvi A, Roth A, Collins JA, Breaker RR (2004) Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme. *Nature* 428: 281-286
13. Rodionov DA, Vitreschak AG, Mironov AA, Gelfand MS (2002) Comparative genomics of thiamin biosynthesis in prokaryotes. New genes and regulatory mechanisms. *J Biol Chem* 277: 48949-48959
14. Winkler WC, Cohen-Chalamish S, Breaker RR (2002) An mRNA structure that controls gene expression by binding FMN. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 15908-15913
15. Mironov AS, Gusarov I, Rafikov R, Lopez LE, Shatalin K, Kreneva RA, Perumov DA, Nudler E (2002) Sensing small molecules by nascent RNA: a mechanism to control transcription in bacteria. *Cell* 111: 747-756
16. Miranda-Rios J, Navarro M, Soberon M (2001) A conserved RNA structure (*thi* box) is involved in regulation of thiamin biosynthetic gene expression in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 9736-9741
17. Stormo GD, Ji Y (2001) Do mRNAs act as direct sensors of small molecules to control their expression? *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 9465-9467
18. Kreneva RA, Perumov DA (1990) Genetic mapping of regulatory mutations of *Bacillus subtilis* riboflavin operon. *Mol Gen Genet* 222: 467-469
19. Mack M, van Loon AP, Hohmann HP (1998) Regulation of riboflavin biosynthesis in *Bacillus subtilis* is affected by the activity of the flavokinase/flavin adenine dinucleotide synthetase encoded by *ribC*. *J Bacteriol* 180: 950-955
20. Gusarov, II, Kreneva RA, Rybak KV, Podcherniaev DA, Iomantas Iu V, Kolibaba LG, Polanuer BM, Kozlov Iu I, Perumov DA (1997) Primary structure and functional activity of the *Bacillus subtilis* *ribC* gene. *Mol Biol (Mosk)* 31: 820-825
21. Begley TP, Downs DM, Ealick SE, McLafferty FW, Van Loon AP, Taylor S, Campobasso N, Chiu HJ, Kinsland C, Reddick JJ, Xi J (1999) Thiamin biosynthesis in prokaryotes. *Arch Microbiol* 171: 293-300
22. Petersen LA, Downs DM (1997) Identification and characterization of an operon in *Salmonella typhimurium* involved in thiamine biosynthesis. *J Bacteriol* 179: 4894-4900
23. Mandal M, Breaker RR (2004) Gene regulation by riboswitch. *Rev Mol Cell Biol* 5: 451-463
24. Nahvi A, Barrick JE, Breaker RR (2004) Coenzyme B12 riboswitches are widespread genetic control elements in prokaryotes. *Nucleic Acids Res* 32: 143-150
25. Grundy FJ, Henkin TM (1998) The S box regulon: a new transcription termination control system for methionine and lysine biosynthesis genes in gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 7: 737-749
26. Grundy FJ, Henkin TM (2003) The T box and S box transcription termination control systems. *Front Biosci* 8: d20-31
27. McDaniel BA, Grundy FJ, Artsimovitch I, Henkin TM (2003) Transcription termination control of the S box system: direct measurement of S-adenosylmethionine by the leader RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 3083-3088
28. Epshtein V, Mironov AS, Nudler E (2003) The riboswitch-mediated control of sulfur metabolism in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 5052-5056
29. Winkler WC, Nahvi A, Sudarsan N, Barrick JE, Breaker RR (2003) An mRNA structure that controls gene expression by binding S-adenosylmethionine. *Nat Struct Biol* 10: 701-707
30. Sudarsan N, Wickiser JK, Nakamura S, Ebert MS, Breaker RR (2003) An mRNA structure in bacteria that controls gene expression by binding lysine. *Genes Dev* 17: 2688-2697
31. Kochhar S, Paulus H (1996) Lysine-induced premature transcription termination in the *lysC* operon of *Bacillus subtilis*. *Microbiol (Pt 7)*: 1635-1639
32. Mandal M, Lee M, Barrick JE, Weinberg Z, Emilsson GM, Winkler WC, Breaker RR (2004) A glycine-dependent riboswitch that uses cooperative binding to control gene expression. *Science* 306: 275-278
33. Soukup GA, Breaker RR (2000) Allosteric nucleic acid catalysis. *Opin Struct Biol* 10: 318-325
34. Kubodera T, Watanabe M, Yoshiuchi K, Yamashita N, Nishimura A, Nakai S, Gomi K, Hanamoto H (2003) Thiamine-regulated expression of *Aspergillus oryzae* *thiA* requires splicing of the mRNA containing a riboswitch-like domain in the 5'-UTR. *FEBS Lett* 516: 516-520
35. Kaempfer R (2003) RNA sensors: novel regulators of gene expression. *EMBO Rep* 4: 1043-1047
36. Osman F, Jarrous N, Ben-Asouli Y, Kaempfer R (1999) A cis-element in the 3'-untranslated region of human TNF-alpha mRNA renders splicing dependent on the activation of protein kinase C. *Genes Dev* 13: 3280-3293
37. Morita MT, Tanaka Y, Kodama TS, Kyogoku Y, Yanagi H, Teraoka T (1999) Translational induction of heat shock transcription factor sigma32: evidence for a built-in RNA thermosensor. *Genes Dev* 13: 655-665
38. Narberhaus F, Kaser R, Nocker A, Hennecke H (1998) A novel cis-element that controls bacterial heat shock gene expression. *Mol Microbiol* 28: 315-323
39. Nocker A, Hausherr T, Balsiger S, Krstulovic NP, Hennecke H, Narberhaus F (2001) A mRNA-based thermosensor controls expression of rhizobial heat shock genes. *Nucleic Acids Res* 29: 4800-4807
40. Hurme R, Rhen M (1998) Temperature sensing in bacteria: regulation--what it all boils down to. *Mol Microbiol* 30: 1-6
41. Hurme R, Berndt KD, Normark SJ, Rhen M (1997) A protein-coupled gene regulatory thermometer in *Salmonella*. *Cell* 90: 55-64
42. Falconi M, Colonna B, Prosseda G, Micheli G, Gualerzi CO (2003) Thermoregulation of *Shigella* and *Escherichia coli* EIEC pathogen temperature-dependent structural transition of DNA modulates accessibility of *virF* promoter to transcriptional repressor. *EMBO J* 22: 7033-7043

Hoe NP, Goguen JD (1993) Temperature sensing in *Yersinia pestis*: translation of the LcrF activator protein is thermally regulated. *J Bacteriol* 175: 7901-7909

Johansson J, Mandin P, Renzoni A, Chiaruttini C, Springer M, Cosart P (2002) An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Cell* 110: 551-561

45. Voss B, Meyer C, Giegerich R (2004) Evaluating the predictability of conformational switching in RNA. *Bioinformatics* 20: 1573-1582

46. Bengert P, Dandekar T (2004) Riboswitch finder--a tool for identification of riboswitch RNAs. *Nucleic Acids Res* 32: W154-159

Riboswitches

Catarzyna Bugała, Marek Żywicki, Eliza Wyszko, Mirosława Z. Barciszewska, Jan Barciszewski✉

Institute of Bioorganic Chemistry Polish Academy of Sciences, 12 Noskowskiego St., 61-704 Poznan, Poland
e-mail: Jan.Barciszewski@ibch.poznan.pl

Key words: RNA switches, regulatory RNAs, non-coding RNAs, regulation of gene expression, transcription, translation

ABSTRACT

Riboswitches are RNA structures able to bind small molecules and regulate gene expression at both, transcriptional and translational level. They are present in a wide variety of bacterial species. In *Bacillus subtilis* more than 2% of the genome is regulated by riboswitches. Metabolite binding is highly specific and can be provided in cooperative manner. Several riboswitches have been identified and characterized to be specific for flavin mononucleotide, thiamine, thiamine pyrophosphate, adenosylcobalamin, S-adenosylmethionine, lysine, glycine, adenine, guanine and lucosamine-6-phosphate. Some of them have been found also in fungi (*Neurospora crassa*) and plants (*Oryza sativa*, *Arabidopsis thaliana*). In human only one riboswitch with binding capacity for 2-aminopurine, has been found. Occurrence of riboswitches in all of the filogenetic groups suggests that they are one of the oldest regulatory systems. It provokes also the question about their involvement in regulation of gene expression in human.



Załącznik 2



Evaluation of the Dynamic Structure of DsrA RNA from *E. coli* and Its Functional Consequences

Katarzyna Rolle*, Marek Zywicki*, Eliza Wyszko, Mirosława Z. Barciszewska and Jan Barciszewski[†]

Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań, Poland

Received October 7, 2005; accepted December 20, 2005

DsrA RNA is an 87-nucleotide regulatory non-protein-coding RNA of *Escherichia coli* for which two secondary structure models (I and II) have been proposed. We have compared these models by the energy calculations, which revealed that the currently accepted model II should be rejected on the basis of thermodynamics. Here we provide new results of nuclease footprinting analysis and the application of RNA technologies that have not previously been used for DsrA RNA structural studies, such as hydrolysis with RNase H, DNazyme, hydroxyl radicals and lead. These approaches together with bioinformatics calculations provided strong arguments for a new model III. This model clearly shows that the long U-rich region between hairpins 1 and 2 is double-stranded. These findings shed new light on DsrA RNA–Hfq interactions.

Key words: DsrA RNA, non-coding RNAs, regulatory RNAs, RpoS, small RNAs.

One of the most spectacular outcomes of genome sequencing projects is that the complete human genome contains less than 2% of protein-coding genes (1). The remaining noncoding part of the genome is a huge source of RNA genes. Despite the lack of efficient methods for their identification, several functional non-protein-coding RNAs (noncoding RNAs, npcRNAs, ncRNAs) deriving from intergenic regions, introns (2) and pseudogenes have recently been fished out (3). Although the non-protein-coding part of the bacterial genome is relatively small (ca. 25%), some ncRNAs capable of posttranscriptional gene silencing have been found (4). They usually contain a short nucleotide sequence complementary to a target mRNA in the 5' untranslated region (UTR). Although ncRNA-mRNA base-pairing can sometimes be imperfect, it can affect the accessibility of a ribosome-binding site (RBS) located in the 5'UTR. There is much evidence that the expression of ncRNAs is induced by different stress conditions.

One of the most extensively studied bacterial small ncRNAs is DsrA RNA. It is a key component of cold shock response machinery in *Escherichia coli* which acts by binding two mRNAs. The first one encodes RpoS, an alternative RNA polymerase sigma subunit responsible for global transcription activation, and the second one encodes H-NS—antagonist of RpoS (5). The interaction of DsrA RNA in the 5'UTR of RpoS mRNA is very specific and unique. The binding site is localized about 70–80 nt upstream of the start codon, within a stable stem containing an RBS sequence. DsrA RNA through binding the complementary sequence blocking the RBS induces a release of RBS and initiation of RpoS translation. On the other hand, the interaction in the 5' and 3' UTRs of H-NS mRNA causes its translational arrest. The final observed

effect is an increase of RpoS and decrease of H-NS proteins contents in a cell. Since these two proteins are antagonists in the transcription regulation, a small variation in DsrA concentration causes critical changes of global transcription level.

It is clear that for a mechanism of regulation by anti-sense RNAs, both sequence and structural features are important. The complementary sequences in hairpin loops are crucial for an increased rate of complex association and propagation (6). Two secondary structures of DsrA RNA have been proposed (5, 7–9). They consist of three hairpins. The stem-loops 1 and 3 in both models are identical, but the difference lies in the location and structure of the second hairpin, containing H-NS mRNA-binding site. Part of the region of DsrA RNA binds the ubiquitous and nonspecific RNA binding protein Hfq, which is crucial for interaction with RpoS mRNA (10–12). Hfq probably acts as an RNA chaperone for DsrA RNA. A decrease of Hfq protein level is associated with extremely fast DsrA RNA degradation. Therefore, Hfq is a key factor in the modulation of DsrA RNA activity and it affects the RpoS translation.

Up to now, DsrA RNA has only been found in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica* and *Klebsiella pneumoniae* out of more than 220 sequenced bacterial genomes. Since another two components of the above-described regulatory system, RpoS and Hfq, have been identified for a variety of species, it is reasonable to expect the same for DsrA RNA. Recently, it has been shown that in *Vibrio cholerae* deletion of Hfq affects pathogenesis due to disruption of the genes which are under transcriptional control of RpoS sigma factor (13). This suggests that Hfq influences RpoS translation, probably through association with an unidentified regulatory RNA in *V. cholerae*.

In order to identify orthologous DsrA RNA genes in other bacterial species with an *in silico* approach, it is necessary to develop a DsrA RNA secondary structure descriptor. Since there are two alternative models of its structure,

*Authors contributed equally to the work.

[†]To whom correspondence should be addressed. Tel: +48-61-8528 503 (Ext. 132), Fax: +48-61-8520 532, E-mail: Jan.Barciszewski@ibch.poznan.pl

we verified them experimentally. To get comprehensive results on DsrA RNA structure, we have applied the same methods as previously used by other authors (5, 7) as well as novel RNA technologies, not used previously to study that RNA. Here, we present a new structural model for DsrA RNA. It is similar to the model I proposed initially by Sledjeski and Gottesman (8) and then by Majdalani *et al.* (5). It is a predicted rather than a confirmed model, and it differs significantly from the experimental model II proposed by Lease and Belfort (7). Our experimental data and bioinformatical calculations prove the new structure of the second hairpin and point to the conclusion that DsrA RNA has a dynamic nature. The data allowed us to propose new structural determinants of DsrA RNA. Moreover, since the second hairpin is crucial for DsrA function, our observations bring new insights into the mechanism of interaction of DsrA RNA.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of DNA Plasmid Harboring DsrA RNA—A double-stranded 92 oligodeoxynucleotide was prepared by ligation of chemically synthesized short overlapping oligodeoxynucleotides of DsrA1—DsrA2 for one strand, and DsrA3—DsrA5 for the complementary one. The DNA fragments were inserted into the pT7/T3 α -18 plasmid at the *Eco*RI and *Hind*III restriction sites. The *E. coli* NovaBlue (Novagen) bacterial strain was used as a host for the transformation. To confirm the correctness of ligation of the DNA fragments, the plasmid was isolated from transformants (QIAGEN Plasmid Midi Kit). The length of the ligation product was verified by PCR reaction and visualized on 2% agarose gel. The nucleotide sequence of the construct was confirmed by DNA sequencing using fmol DNA Sequencing System (Promega).

In Vitro T7 RNA Transcription—Plasmid (40 μ g/ml) was cleaved with *Hind*III enzyme and the transcription was done with an Ambion Megashortscript T7 Transcription Kit. RNA was subsequently excised from a 10% denaturing polyacrylamide gel and eluted overnight in water at room temperature. RNA was precipitated with 2.5 volumes of 96% ethanol in the presence of 0.1 volume of 5 M ammonium acetate stop solution containing 100 mM EDTA (Ambion) and dissolved in RNase-free water (Ambion). The amount of RNA was calculated from the UV-absorbance measurements.

Labeling of DsrA RNA—The DsrA RNA (5 μ g) was labeled at the 5'-end with [γ - 32 P]ATP (ICN) and T4 polynucleotide kinase (5 U/ μ l) at 37°C for 45 min in the 10 \times reaction buffer containing 0.5 M Tris-HCl pH 7.6, 100 mM MgCl₂ and 100 mM 2-mercaptoethanol (Amersham Pharmacia). At the 3'-end the transcript was labeled with [32 P] pCp and T4 RNA ligase with a 10 \times reaction buffer containing 500 mM Tris-HCl pH 7.8, 100 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 10 mM ATP (Promega) at 4°C for 14 h. The labeled DsrA RNA was purified on 10% polyacrylamide gel containing 7 M urea. The radioactive band was cut off. RNA was eluted with water overnight at room temperature and then, precipitated with 2.5 volumes 96% ethanol in the presence of 0.1 volume 5 M ammonium acetate with 100 mM EDTA (Ambion) and dissolved in RNase-free water (Ambion). The quantification of the labeled RNA was done by the scintillation counting.

Alkaline Hydrolysis—To generate a sequence ladder RNA, alkaline hydrolysis was performed at 95°C for 1.5 min in 10 μ l of reaction mixture containing 50 mM NaOH, 1 mM EDTA and 4 μ g of total RNA from *Lupinus luteus* as a carrier.

Nuclease Cleavages—The [32 P] labeled RNA (30,000 cpm) was treated with specific RNases. T1 RNase (Sigma) digestion was performed in a buffer containing 20 mM sodium citrate (pH 5.0), 7 M urea and 1 mM EDTA with 2.5 units of the enzyme, at 55°C for 20 min. RNase V1 digestion was done under native conditions, using (0.005 U/ μ l) RNase V1 (Ambion) in a buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.2, 100 mM NaCl and 10 mM MgCl₂. The RNase S1 digestion in native conditions was done using (0.25 U/ μ l) RNase S1 (Promega) in the 10 \times reaction buffer [500 mM sodium acetate (pH 4.5), 280 mM NaCl and 45 mM ZnSO₄], supplied by the manufacturer (Promega). The reactions with V1 and S1 were carried out for 10 minutes at 25°C. The footprinting results were analyzed with 20% PAGE.

RNase H Cleavage—Unlabeled RNA (1 pmol) and 30,000 cpm of labeled RNA were incubated with a 5-fold excess of oligodeoxynucleotide (L1: GAAATCTGAT, L2: AAGCAA-GAAA, L3: TGAGGGGGTC or L4: AAAAAATTCGTT), and 0.4 U RNase H (Sigma) in a buffer containing 40 mM Tris-HCl pH 7.5, 4 mM MgCl₂, 0.1 mM DTT, 20 mM KCl in a total volume of 10 μ l for 7.5 min at 37°C. Then 2 μ l of 0.5 M EDTA was added to stop the reaction. The samples were denatured for 3 minutes at 65°C and analyzed on a 20% polyacrylamide gel with 7 M urea. The oligonucleotides complementary to different portions of putative regions of DsrA RNA were chemically synthesized (Institute of Biochemistry and Biophysics, Warsaw, Poland).

Cleavage with DNAzyme—Unlabeled (1 pmol) and 30,000 cpm of labeled DsrA RNA were incubated in the presence of a 5- or 15-fold excess of DNAzyme I and II in 50 mM Tris-HCl pH 7.5, respectively with DNAzyme I or II. Prior to the reaction, the target RNA and DNAzymes were denatured separately for 2 min at 85°C and cooled down to room temperature in a heating block. The reaction was initiated by the addition of MgCl₂ to a final concentration of 10 mM in a total volume of 10 μ l. After incubation at 25°C for 30 min hydrolysis was stopped by the addition of 2 μ l of 0.5 M EDTA and cooling on ice. The samples were analyzed on a 20% polyacrylamide gel with 7 M urea. The DNAzymes with sequences complementary to different portions of the putative regions were chemically synthesized (Institute of Biochemistry and Biophysics, Warsaw, Poland).

The Lead-Induced Hydrolysis—The [32 P]-labeled RNA supplemented with 2 μ g of tRNA carrier was incubated in 50 mM Tris-HCl pH 7.5 with different concentrations of Pb²⁺ (1, 2.5 and 5 mM), at 25°C for 15 min. The hydrolysis products were analyzed by 20% PAGE.

Cleavage of RNA with Hydroxyl radicals—The cleavage reaction was carried out in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 containing 5 mM Fe(II), 2 mM EDTA, 5 μ M DTT and with or without 10 mM MgCl₂ for 2 h at 25°C. The hydrolysis products were analyzed by 20% PAGE.

Hfq Protein Purification—Hfq was purified from *E. coli* harboring pET21b-plasmid with a His-Tag coding sequence. Cells were grown to 0.6 OD₆₀₀ at 37°C, then

Hfq expression was induced with 1 mM IPTG. After 5 h the cells were harvested by centrifugation and resuspended in buffer A1-Ni-NTA (0.02 M imidazole, 0.1 M Tris pH 7.0, 0.05 M NaCl). The cells were ultrasonicated and cellular debris was removed by centrifugation. The supernatant was boiled for 10 min and centrifuged to remove the non-heat-stable proteins. The cleared supernatant was bound to Ni-NTA Agarose (Qiagen), incubated for 45 min at 25°C and centrifuged for 2 min at 8,000 rpm. The Ni-NTA was then washed three times with buffer A1-Ni-NTA. The Hfq protein was finally eluted with buffer B1-Ni-NTA containing different concentrations of imidazole (10, 50, 100 and 200 mM), and 0.1 M Tris-HCl, pH 7.0, 0.05 M NaCl. Hfq amount was determined by the Bradford method (14). The binding activity of the purified Hfq protein containing His-Tag was tested on 1% agarose gel (data not shown).

Cleavage Assay of DsrA RNA in the Complex with Hfq Protein—The [³²P] labeled DsrA RNA (30,000 cpm) and Hfq protein were incubated at 25°C for 20 min in 10 μl of reaction mixture in a buffer containing 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM NaCl, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂. The binding step was followed by cleavage with Pb²⁺ ions and hydroxyl radicals, as described above. All samples were analyzed by electrophoresis on a 20% PAGE.

Calculation of Structural Flexibility of DsrA RNA—To determine the structural stability of distinct regions of DsrA RNA, we used a statistical folding method (implemented in SFOLD: <http://sfold.wadsworth.org>) (15). The probability of existence of a nucleotide in a defined type of loop was used for further analysis. The probability of existence within the stem structure was calculated using the formula: $P_S = 1 - \Sigma P_L$ (P_S , probability of existence of a nucleotide within the stem structure; P_L , probability of existence of a nucleotide in a defined type of loop). The probability of secondary structure flexibility was calculated as follows: $P_F = 1 - P_{\max}$ (P_F , probability of structural flexibility; P_{\max} , maximum probability of existence of a nucleotide within the stem or a defined type of loop).

RESULTS

Computational Analysis—The very first step of our studies was computational analysis of the DsrA RNA nucleotide sequence. The secondary structure prediction using MFOLD (16) revealed a minimum free energy structure which was the same as that described for the model I of DsrA RNA (5). Other suboptimal structures were also calculated, but none of them was similar to that proposed by Lease and Belfort (7). Surprisingly, the calculations performed for different portions (hairpins) of the DsrA RNA structure reveal that hairpin 2 of model II has positive free energy (Table 1), which indicated that formation of such structure is not thermodynamically favored. To find energetically favorable conformations of the central region of DsrA RNA, we used the nucleotide sequence string between hairpins 1 and 3. Only short (4 nt long) stems, not present in any of the known models, were predicted (data not shown).

To verify if the middle region of DsrA RNA is highly structured, we carried out a statistical folding (SFOLD) analysis (15). Our calculations of DsrA RNA revealed that hairpins 1 and 3 are extremely stable (Fig. 1). There are no other possibilities of alternative base pairings for these regions and a conformation once acquired not can be disrupted. Conversely, the central region of DsrA RNA revealed relatively high diversity of possible base pairings and stem locations.

RNases Footprintings—RNases footprintings were used to propose model II (7). We have also carried out a experiments with the same nucleases in order to verify the

Table 1. Free energy (kcal/mol) of overall structure and hairpin 2 of DsrA RNA models calculated using MFOLD (16).

Model	Overall	Hairpin 2	Reference
Model I	-31.8	-5.2	(5)
Model II	-23.9	2.6	(7)
Model III	-28.4	-2.8	(This paper)

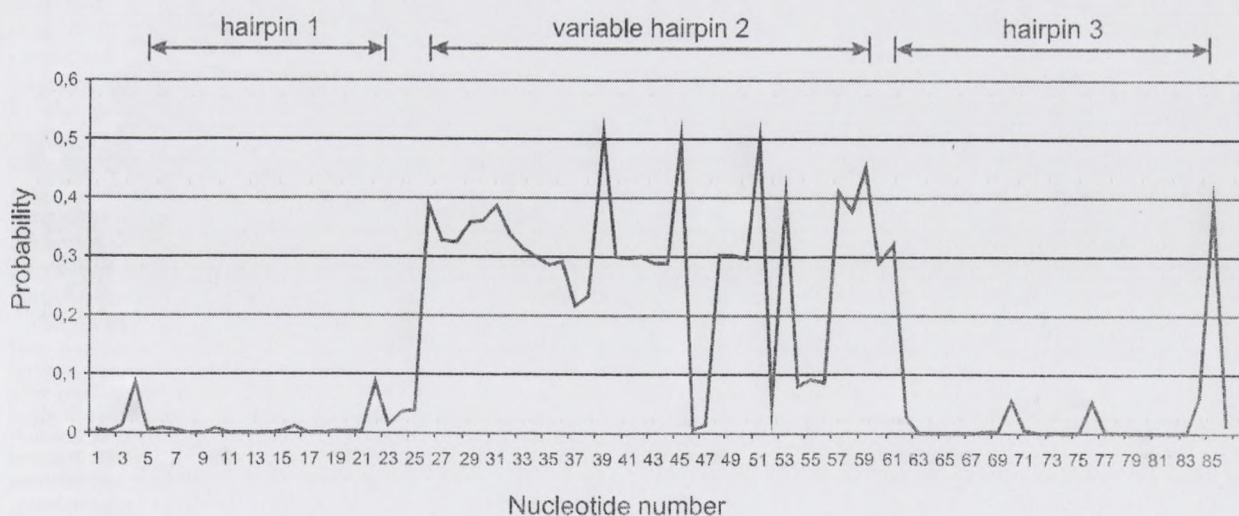


Fig. 1. Structural flexibility of DsrA RNA. Probabilities of existence of a nucleotide in alternative structures have been calculated.

The central stem-loop region reveals relative high flexibility in comparison to the rest of the particle.

previous data. The RNase T1, V1 and S1 footprintings on DsrA RNA labeled at the 5' and 3' ends essentially confirm the structure of stem-loops 1 and 3, which in fact, are the same for both models (Fig. 2). However, in contrast to model II, we observed strong hydrolysis by RNase V1 that is specific for double-stranded RNA at positions 28–32 of hairpin 2. This observation is consistent with the structure of the second stem-loop proposed in model I. It clearly shows that these nucleotides are involved in stem formation rather than being single-stranded, as is proposed in model II (Fig. 2, A and C). We propose location of this region in a stem of the hairpin 2 (Fig. 2C, III).

Our nuclease S1 results did not show cleavage at positions 29–34 (Fig. 2, A and C). This clearly indicates that the single-stranded region between hairpins 1 and 2 that was proposed earlier in model II does not exist. Although these data seem to be consistent with model I, we observed additional S1 cleavage sites at nucleotides 38 and 39 (Fig. 2C). This result suggested different localization of the loop region in hairpin 2. Based on S1 hydrolysis at positions 36 and 37 and V1 cleavage at positions 28–32, 34 and 47, we proposed the new structure of hairpin 2 (Fig. 2C, III).

RNase H Hydrolysis—To confirm our DsrA RNA secondary structure model, we used RNase H to digest DsrA RNA in the presence of oligodeoxynucleotides complementary to

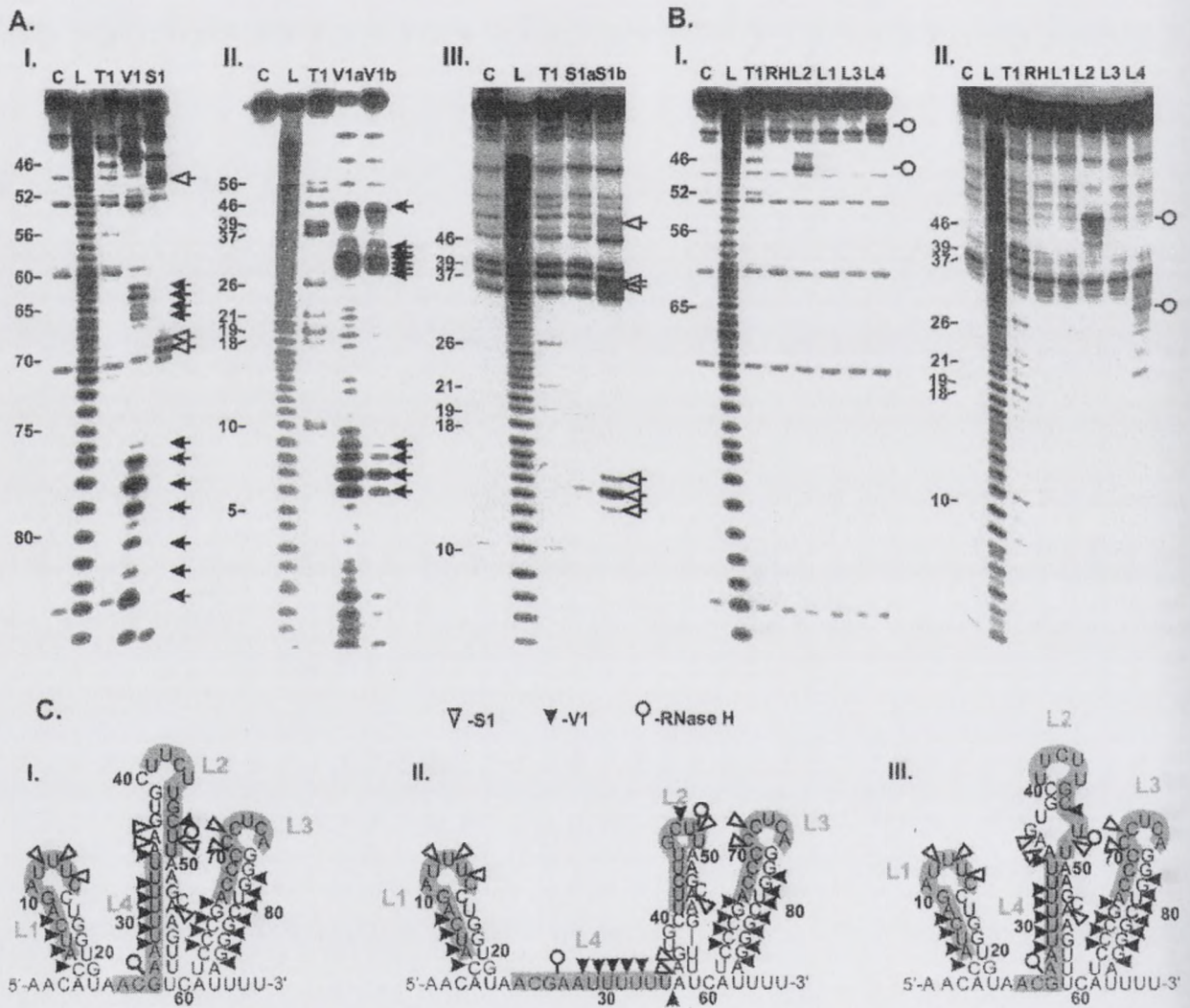


Fig. 2. Autoradiogram of 20% polyacrylamide gel electrophoresis of partial hydrolysate. (A) 3' [32 P] (I), and 5' [32 P] (II and III)-labeled DsrA RNA with different amounts of V1 and S1 RNases. Lanes: C, control RNA; L, alkaline hydrolysis ladder; T1, limited hydrolysis with RNase T1; V1(I), V1a and V1b(II), partial hydrolysis with 0.003, 0.01 and 0.005 U of V1 RNase, respectively; S1(I), S1a and S1b(III), partial hydrolysis with 0.25, 0.125 and 0.25 U of S1 RNase, respectively. (B) 3' [32 P]-(I), and 5' [32 P]-(II)-labeled DsrA RNA with RNase H

in presence of different oligodeoxynucleotides. Lanes: C, control RNA; L, alkaline hydrolysis ladder; T1, limited hydrolysis with RNase T1; RH, DsrA RNA with RNase H in the absence of oligonucleotide; L1-L4, hydrolysis of DsrA RNA with 0.4 U of RNase H and oligonucleotide L1, L2, L3 and L4, respectively. (C) The secondary structure models of DsrA RNA: I (5), II (7) and III (this paper). Fragments of DsrA RNA complementary to oligonucleotides L1-L4 are shadowed. The enzymatic cleavage patterns are consistent only with model III.

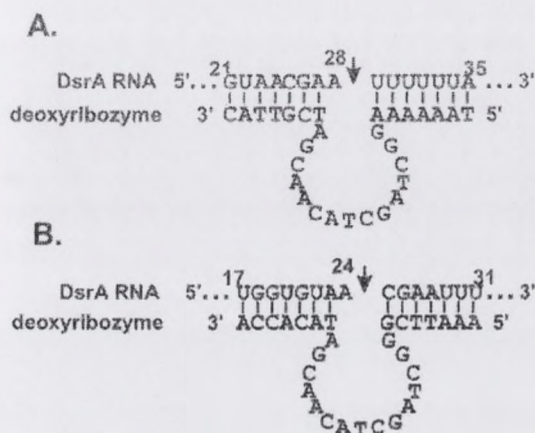


Fig. 3. The secondary structure of DNazymes A and B designed to cleave DsrA RNA at *a priori* predicted sites (marked with arrows).

the loops of hairpins 1, 2 and 3 (L1–L3) and, finally, to the single-stranded region (nucleotides 24–34) proposed in model II (L4). We observed two main cleavage sites at nucleotides 26 and 48 (Fig. 2, B and C). Since RNase H can hydrolyze only RNA-DNA heteroduplex (17, 18), the observed cleavage pattern confirms that targeted region is single-stranded. Hydrolysis at nucleotide 26 confirms the lack of long single-stranded region between hairpins 1 and 2 as in model II. Instead the cleavage site at the 5' end corresponds to the middle part of the antisense oligonucleotide. This suggests a short stretch of the oligonucleotide able to hybridize because the stem begins with nucleotide 26, which creates a new 5' end of the duplex. The cleavage at that position supports our model (Fig. 2, B and C). Interestingly, we also noticed additional RNase H hydrolysis products at positions 45–47, with different length than the main product.

Cleavage with DNazymes—To confirm the lack of the long single-stranded region between hairpins 1 and 2 proposed in model II, we designed two DNazymes (Fig. 3) (19). DNazymes are RNA-cleaving agents with conserved catalytic domains flanked by variable binding domains (20). They target single-stranded DNA or RNA in the presence of divalent cations (21–24). We used magnesium-dependent deoxyribozymes. If the regions G₂₁–A₃₅ and U₁₇–U₃₁ interact with DNzyme I and II, respectively, one may expect cleavage at A₂₈ and A₂₄, respectively (Fig. 3). However, such hydrolysis was not observed. This supports our finding that the previously proposed single-stranded region (23–34nt) is, in fact, double-stranded.

Interactions of DsrA RNA with Hfq Protein—To identify the nucleotides involved in the interactions with Hfq protein, we designed experiments with hydroxyl radical and Pb²⁺ cleavage.

Hydrolysis with Hydroxyl Radicals—To get a better insight into the structural dynamics of DsrA RNA in the interaction with Hfq protein, we used a Fe(II)-EDTA solvent-based reagent (25). In the absence of Mg²⁺ ions, DsrA RNA was more susceptible to hydrolysis than in the presence of Mg²⁺. This is consistent with previous

results showing that Mg²⁺ ions stabilize the secondary structure of RNA (Fig. 4A) (26, 27). The hydrolysis pattern of DsrA RNA in the presence and absence of Hfq protein was different. The data show that the regions of hairpin 2 spanning nucleotides 51–52, 55–58, 61–64 and 66–70 are strongly protected by the protein from hydrolysis by hydroxyl radicals (Fig. 4, A and C).

Lead-Induced Hydrolysis—Lead induces hydrolysis in regions 42–49 and 57–60 of DsrA RNA. In the presence of Hfq protein, we observed strong protection against cleavage at nucleotides 43–52, 57–59 and 69–71 (Fig. 4B). Involvement of these nucleotides in protein-RNA interaction is consistent with hydroxyl radical cleavage pattern. The nucleotides 43–50 and 71 were protected against cleavage by lead, but not against hydroxyl radicals. Moreover, in the presence of Hfq, we observed additional cleavage sites around nucleotides 10 and 30. Since lead-induced cleavage is structure-dependent, these differences identify structural changes in DsrA RNA affected by the Hfq binding.

Nucleotides 60–63 and 65–68 were cleaved by hydroxyl radicals, but not by lead neither in presence nor absence of Hfq protein. This may be an effect of structural inaccessibility of those nucleotides. It means that those regions form the core of DsrA RNA tertiary structure.

DISCUSSION

Deep understanding of non-protein-coding RNAs is still hampered by the lack of efficient methods for their identification. The best solution would be a descriptor of preserved domains, characteristic and well conserved through evolution. Two different models of DsrA RNA secondary structure have been already proposed (5, 7). The first one (model I) is based on thermodynamic calculations and mutation analysis (5). It consists of three stem-loops and one short single-stranded region between hairpins 1 and 2. Model II, currently believed to be the correct one, is supported by specific nuclease cleavage experiments (7). It has similar stem-loops 1 and 3 to those in the model I, but a different structure for hairpin 2.

We began our study on DsrA RNA structure with computational analysis of its sequence. The statistical folding experiment reveals a relatively high structural flexibility of its central region (Fig. 1). This feature of DsrA RNA raises a question about the energy and structural stability of the second hairpin loop proposed in models I and II. Thus, we calculated the free energy for both versions of hairpin 2 (Table 1). The results clearly show that the conformation of this region proposed in model II is very unlikely due the positive free energy. For the energy calculations only secondary structure energy values were used and therefore the possibility that this hairpin loop is stabilized by strong tertiary interactions or external factors (*e.g.* proteins) cannot be excluded. Thus, we decided to use a verification method independent from energy calculations. It is based on covariation of mutations in DsrA RNA sequences from different organisms. Currently, there are five DsrA RNA sequences known: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica*, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. The nucleotide sequences of DsrA RNA from *E. coli* and two species of *Shigella* are 99% identical, as are those from the

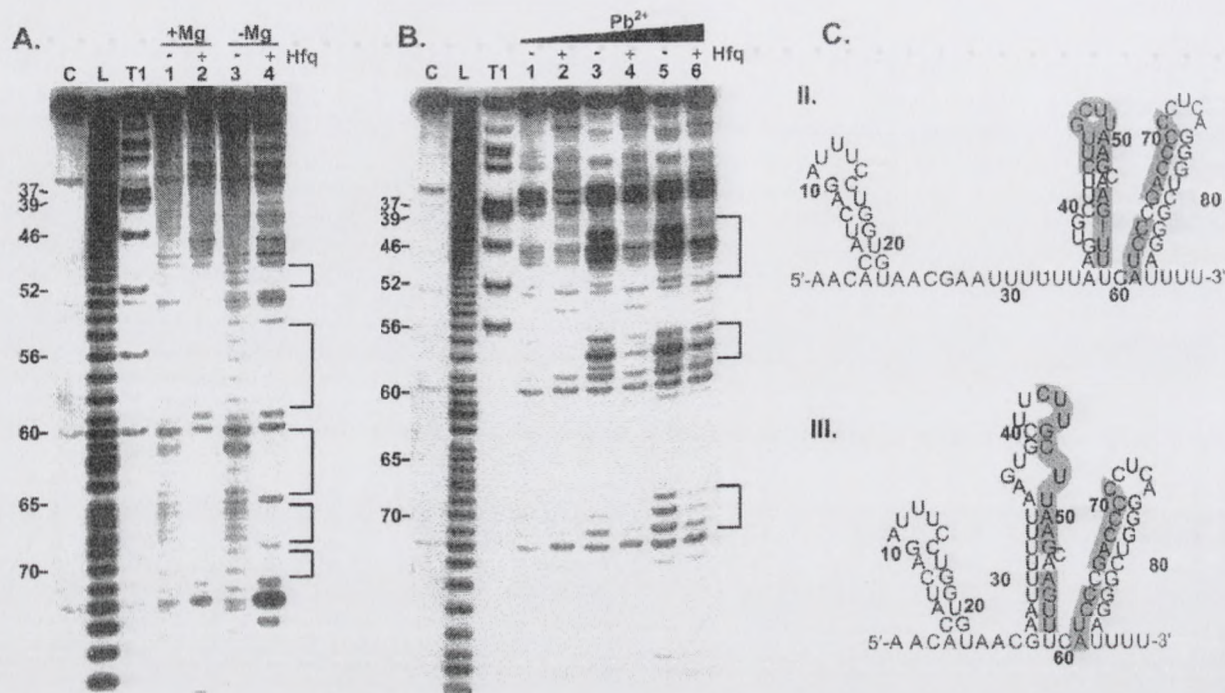


Fig. 4. Autoradiogram of a 20% polyacrylamide gel analysis of the hydrolysis products of 3' [³²P] labeled DsrA RNA with hydroxyl radical (A) and Pb²⁺ (B) ions in the presence and absence of Hfq protein. Lines: C, untreated control RNA; L, alkaline hydrolysis ladder; T1, limited hydrolysis with RNase T1; A) 1-2, hydrolysis with hydroxyl radical in the presence of magnesium ions, in the absence (lane 1) and in the presence (lane 2) of Hfq protein; 3-4, hydrolysis with hydroxyl radicals in the absence of magnesium ions, in the absence (lane 3) and in the presence (lane 4) of Hfq protein; B) 1-2, hydrolysis with Pb²⁺ ions

(1 mM) in the absence (lane 1) and in the presence of Hfq protein (lane 2); 3-4, hydrolysis with Pb²⁺ ions (2.5 mM) in the absence (lane 3) and in the presence (lane 4) of Hfq protein; 5-6, hydrolysis with Pb²⁺ ions (5 mM) in the absence (lane 5) and in the presence (lane 6) of Hfq protein. C) Regions protected from hydroxyl radicals and lead-induced cleavage by Hfq binding marked on models II (7) and III (this paper) of DsrA RNA secondary structure. No protection was observed on poly-U tract in positions 31-36, proposed to be the main Hfq binding site on DsrA RNA.

two *Salmonella* species. This resulted in only two non-redundant sequences. Because of this small dataset, we decided to align the DsrA RNA sequences manually to both models proposed previously and obtained in our further experimental studies. We observed no compensatory base changes favoring any of the models (data not shown).

To verify the DsrA RNA structure model II proposed by Lease and Belfort (7), we performed a new set of experimental studies. In addition to the previously used tools, we applied novel methods, not used before for the analysis of DsrA RNA secondary structure. Its primary aim was to prove the existence of the long single-stranded region between hairpins 1 and 2 proposed earlier in model II, which is thought to be the main Hfq binding site.

Generally, our results clearly suggest that this region between hairpins 1 and 2 is double-stranded. The strongest evidence which supports such a model is the set of RNase V1 cleavages observed at nucleotides 28-32. In the previous work (7), this part of the molecule was cleaved by RNase S1. This was not a case in our studies. Interestingly, hydrolysis by RNase V1 at position 27 was also observed in the previous work (7), although model II does not accommodate this site in a double-stranded part. Our model fully accommodates this cleavage. The single-stranded region between hairpins 1 and 2 was also excluded by the lack

of cleavage with the designed DNazymes (this work). Also, the RNase H hydrolysis experiments did not reveal the ability of this region to bind oligodeoxynucleotide and strongly confirm that DsrA RNA has a dynamic structure. Additional cleavages at nucleotides 45-47 show that there are several structural isoforms possible with different abilities to bind oligonucleotides. Therefore, hybridization of oligonucleotides complementary to the central region of DsrA RNA, followed by RNase H cleavage sites, together with lack of hydrolysis in case of the oligonucleotides complementary to hairpins 1 and 3 constitute the best evidence for the dynamic character of hairpin 2 and the high stability of the hairpins 1 and 3, which are inaccessible for hybridization.

The reason for the differences in V1 and S1 RNases cleavage patterns between our data and Lease and Belfort's (7) results is not clear. No details are available of the conditions used in experiments performed by Lease and Belfort (7). However, we suppose that the structural differences observed are effects of magnesium concentration. Because of the well-documented impact of magnesium ions on RNA structure (28), we carefully controlled the experimental conditions. We removed the magnesium ions used for the DsrA RNA preparation by adding EDTA in each precipitation step. After the very last step of purification, DsrA RNA was dissolved in pure RNase-free water, instead of

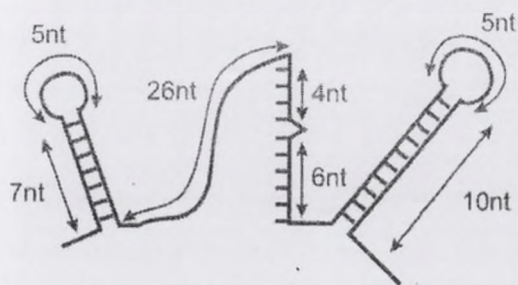


Fig. 5. The secondary structure determinants of DsrA RNA. The model consists of highly defined stems 1 and 3, and a sequence located upstream from stem 3, which takes part in interaction with Hfq protein and should be double-stranded.

DEPC treated water, as in Lease and Belfort's studies (9). This approach provides an RNA sample containing only trace amounts of magnesium ions.

Structural differences observed in our studies can be explained also by variations in the primary sequence of the RNA transcript. DsrA RNA that we worked with shows exactly the same sequence as reported in GeneBank database, whereas the transcript used by Lease and Belfort had two additional guanosines at the 5' end and lacked one uridine at the 3' end. One should also notice that differences between the models II (7) and III (this paper) could result from higher concentration of RNase V1 used by Lease and Belfort and elution of RNA from the gel at 60°C which might induce degradation of the material.

The absence of a single-stranded region between hairpins 1 and 2 demonstrated in our studies has a big impact on our understanding of DsrA RNA action. It has been shown that DsrA RNA has several Hfq binding sites (9). At low Hfq concentration, one of the sites seems to bind the Hfq necessary for interaction with target mRNAs (9). At high Hfq concentration additional Hfq molecules are bound under, which causes DsrA arrest and stops its interaction with RpoS mRNA.

We did not observe any protection by Hfq against hydroxyl or lead-induced hydrolysis in the region between hairpins 1 and 2 as has been suggested by model II studies. Instead, we clearly identified regions in stems 2 and 3, that are consistent with previous reports on the importance of these sites in Hfq binding (10). However, the mutations introduced in the DsrA RNA poly-U tract resulted in the loss of Hfq binding and loss of DsrA RNA function (10). Since the mutations occur in the stem region of the second hairpin loop, we propose from our model that the observed effect was not due to mutation of the Hfq binding sequence, but rather because of disruption of key structural features necessary for Hfq binding. Our results indicate that the poly-U tract sequence is not involved in Hfq binding, but this aspect still needs more detailed studies.

In summary, our results deny the existence and importance of a long single-stranded region between hairpins 1 and 2. Thus also allow us to propose a secondary structure descriptor of DsrA RNA, which does not include this region as a DsrA RNA determinant (Fig. 5). The new model of DsrA RNA secondary structure clearly indicates that the mechanism of Hfq-dependent regulation by DsrA RNA proposed previously needs to be revised.

We would like to thank Gisela Storz for her kind gift of pET21b-plasmid. This work was supported with a grant from the Polish Ministry of Science and Education no. 2 PO4A 046 29. MZ doctoral scholarship was funded by the President of the Polish Academy of Sciences.

REFERENCES

- Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science* **291**, 1304–1351
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J.L., and Bradley, A. (2004) Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* **14**, 1902–1910
- Yano, Y., Saito, R., Yoshida, N., Yoshiki, A., Wynshaw-Boris, A., Tomita, M., and Hirotsune, S. (2004) A new role for expressed pseudogenes as ncRNA: regulation of mRNA stability of its homologous coding gene. *J. Mol. Med.* **82**, 414–422
- Gottesman, S. (2004) The small RNA regulators of *Escherichia coli*: roles and mechanisms. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**, 303–328
- Majdalani, N., Cuning, C., Sledjeski, D., Elliott, T., and Gottesman, S. (1998) DsrA RNA regulates translation of RpoS message by an anti-antisense mechanism, independent of its action as an antisilencer of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 12462–12467
- Kolb, F.A., Engdahl, H.M., Slagter-Jager, J.G., Ehresmann, B., Ehresmann, C., Weithof, E., Wagner, E.G., and Romby, P. (2000) Progression of a loop-loop complex to a four-way junction is crucial for the activity of a regulatory antisense RNA. *EMBO J.* **19**, 5905–5915
- Lease, R.A. and Belfort, M. (2000) A trans-acting RNA as a control switch in *Escherichia coli*: DsrA modulates function by forming alternative structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 9919–9924
- Sledjeski, D. and Gottesman, S. (1995) A small RNA acts as an antisilencer of the H-NS silenced *rcaA* gene of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 2003–2007
- Lease, R.A. and Woodson, S.A. (2004) Cycling of the Sm-like protein Hfq on the DsrA small regulatory RNA. *J. Mol. Biol.* **344**, 1211–1223
- Brescia, C.C., Mikulecky, P.J., Feig, A.L., and Sledjeski, D.D. (2003) Identification of the Hfq-binding site on DsrA RNA: Hfq binds without altering DsrA secondary structure. *RNA* **9**, 33–43
- Sledjeski, D.D., Whitman, C., and Zhang, A. (2001) Hfq is necessary for regulation by the untranslated RNA DsrA. *J. Bacteriol.* **183**, 1997–2005
- Mikulecky, P.J., Kaw, M.K., Brescia, C.C., Takach, J.C., Sledjeski, D.D., and Feig, A.L. (2004) *Escherichia coli* Hfq has distinct interaction surfaces for DsrA, rpoS and poly (A) RNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 1206–1214
- Ding, Y., Davis, B.M., and Waldor, M.K. (2004) Hfq is essential for *Vibrio cholerae* virulence and downregulates sigma expression. *Mol. Microbiol.* **53**, 345–354
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254
- Ding, Y., Chan, C.Y., and Lawrence, C.E. (2004) Sfold web server for statistical folding and rational design of nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* **32**, W135–141
- Zuker, M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3406–3415
- Crooke, S.T., Lemonidis, K.M., Neilson, L., Griffey, R., Lesnik, E.A., and Monia, B.P. (1995) Kinetic characteristics of *Escherichia coli* RNase H1: cleavage of various antisense oligonucleotide-RNA duplexes. *Biochem. J.* **312** (Pt 2), 599–608

18. Wu, H., Lima, W.F., and Crooke, S.T. (1999) Properties of cloned and expressed human RNase H1. *J. Biol. Chem.* **274**, 28270–28278
19. Sun, L.Q., Cairns, M.J., Saravolac, E.G., Baker, A., and Gerlach, W.L. (2000) Catalytic nucleic acids: from lab to applications. *Pharmacol. Rev.* **52**, 325–347
20. Santoro, S.W. and Joyce, G.F. (1997) A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 4262–4266
21. Cuenoud, B. and Szostak, J.W. (1995) A DNA metalloenzyme with DNA ligase activity. *Nature* **375**, 611–614
22. Breaker, R.R. and Joyce, G.F. (1994) A DNA enzyme that cleaves RNA. *Chem. Biol.* **1**, 223–229
23. Breaker, R.R. and Joyce, G.F. (1995) A DNA enzyme with Mg²⁺-dependent RNA phosphoesterase activity. *Chem. Biol.* **2**, 655–660
24. Carmi, N., Shultz, L.A., and Breaker, R.R. (1996) In vitro selection of self-cleaving DNAs. *Chem. Biol.* **3**, 1039–1046
25. Barciszewska, M.Z., Erdmann, V.A., and Barciszewski, J. (1994) The dynamic conformation of plant cytoplasmic 5S rRNAs. *Phytochemistry* **37**, 113–117
26. Serebrov, V., Vassilenko, K., Kholod, N., Gross, H.J., and Kisselev, L. (1998) Mg²⁺ binding and structural stability of mature and in vitro synthesized unmodified *Escherichia coli* tRNA^{Phe}. *Nucleic Acids Res.* **26**, 2723–2728
27. Brion, P., Michel, F., Schroeder, R., and Westhof, E. (1999) Analysis of the cooperative thermal unfolding of the td intron of bacteriophage T4. *Nucleic Acids Res.* **27**, 2494–2502
28. Petyuk, V.A., Zenkova, M.A., Giege, R., and Vlassov, V.V. (1999) Hybridization of antisense oligonucleotides with the 3' part of tRNA(Phe). *FEBS Lett.* **444**, 217–221

