

Instytut Chemii Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk



Opracowanie metody identyfikacji ryboprzełączników
bakteryjnych z wykorzystaniem wysokoprzepustowego
sekwencjonowania (Term-SHAPE-seq)
oraz zestawu metod nacełowanych na analizę
ich struktury i aktywności transkrypcyjnej.

Piotr Jan Machtel

Praca doktorska wykonana w Zespole Transkryptomiki Funkcjonalnej
Promotor: dr hab. Kamilla Bąkowska-Żywicka, prof. ICHB PAN

Poznań 2019

Pragnę złożyć najserdeczniejsze podziękowania

Dr hab. Kamilli Bąkowskiej-Żywickiej, prof. ICHB PAN, mojemu promotorowi i mentorowi

Za przekazaną mądrość, opiekę, wielką życzliwość i jeszcze większą cierpliwość.

Za wskazanie właściwej drogi, którą należy kroczyć po meandrach nauki.

Mgr Annie Mleczko

Za wierne towarzystwo w trudach i znojach pracy naukowej.

Za wszystkie wspaniałe rozmowy; te bardzo ważne i zupełnie białe.

Dr Markowi Żywickiemu

Za wsparcie merytoryczne oraz pomoc w realizacji pracy badawczej.

Dr Agacie Tyczewskiej, dr Joannie Gracz i mgr inż. Jakubowi Kuczyńskiemu.

Za przemiłą atmosferę i wszelką pomoc na początku mojej naukowej drogi.

Mgr inż. Natalii Dąbrowskiej, mgr Ammarowi Zaid, inż., Julianowi Zacharjaszowi i mgr Annie Wasilewskiej

Za pomoc w badaniach naukowych.

Mgr inż. Piotrowi Pietrasowi i mgr inż. Klementynie Marciniak

Za radosne chwile każdego dnia w pracy.

Prof. dr hab. Tomaszowi Twardowskiemu i prof. dr hab. Piotrowi Kozłowskiemu

Za wszystkie bezcenne wskazówki i rady.

Kolegom i koleżankom z Zakładu Genetyki Molekularnej

Za wspólnie spędzone czas w miłej atmosferze.

Rodzinnie i przyjaciołom

Za wielkie wsparcie w najtrudniejszych chwilach oraz dzielne kibicowanie do samego końca.

Mojej żonie Paulinie

Która uparcie we mnie wierzyła i dodawała siłę, gdy mi ich brakło

Spis Treści

1	Streszczenie	7
2	Wstęp	11
2.1	Mechanizmy kontroli ekspresji genów u bakterii.....	12
2.1.1	Promotor konstytutywny	12
2.1.2	Promotory specyficzne i podjednostki σ	14
2.1.3	Promotory indukowane i operony	15
2.1.4	Małe bakteryjne RNA (sRNA).....	18
2.1.5	Wewnętrzna terminacja transkrypcji (Rho-niezależna)	20
2.1.6	Rho-zależna terminacja transkrypcji	23
2.1.7	Atenuacja	24
2.1.7.1	Atenuacja operonów aminokwasowych.....	25
2.1.7.2	Termsensory RNA	26
2.1.7.3	pH-metry RNA.....	27
2.1.7.4	Elementy T-box.....	28
2.2	Ryboprzełączniki	29
2.2.1	Historia odkrycia ryboprzełączników	30
2.2.2	Ryboprzełączniki a hipoteza świata RNA.....	33
2.2.3	Różnorodność i występowanie ryboprzełączników	34
2.2.4	Mechanizm działania ryboprzełączników	37
2.2.4.1	Ryboprzełączniki prokariotyczne.....	38
2.2.4.2	Ryboprzełączniki eukariotyczne	41
2.2.4.3	Ryboprzełączniki tandemowe	42
2.2.5	Struktura ryboprzełączników	43
2.2.5.1	Budowa ryboprzełączników	44
2.2.5.2	Wiązanie ligandu.....	45
2.2.6	Identyfikacja nowych ryboprzełączników.....	48
2.2.7	Praktyczne zastosowanie ryboprzełączników	50
2.2.7.1	Cel antybiotykoterapii	50
2.2.7.2	Ryboselektory	52
2.2.7.3	Rybosensory	52
2.2.7.4	Indukowalne układy kontroli ekspresji	53
2.2.7.5	Wirusy onkolityczne	54

3	<i>Cel i Uzasadnienie Podjętej Tematyki Pracy</i>	55
4	<i>Wyniki i Dyskusja</i>	61
4.1	Sekwencjonowanie metodą Term-SHAPE-Seq	61
4.1.1	Krzywa wzrostu bakterii	62
4.1.2	Określenie współczynnika indukcji ryboprzełączników	63
4.1.3	Przygotowanie bibliotek cDNA do sekwencjonowania Term-SHAPE-Seq	70
4.1.4	Sekwencjonowanie.....	74
4.1.5	Dyskusja wyników przedstawionych w rozdziale 4.1	79
4.2	Metody walidacji potencjalnych ryboprzełączników	82
4.2.1	Terminacja transkrypcji <i>in vitro</i>	82
4.2.2	Określanie struktury drugorzędowej metodą SHAPE <i>in vitro</i>	86
4.2.3	Wyznaczanie K_d metodą filtracji membranowej	91
4.2.4	Eksperymentalna weryfikacja kandydata na ryboprzełącznik wyłonionego podczas sekwencjonowania Term-SHAPE-Seq	94
4.2.5	Dyskusja wyników przedstawionych w rozdziale 4.2.....	97
4.3	Zmienność współczynnika indukcji ryboprzełącznika SAM	100
4.3.1	Analiza współczynnika indukcji ryboprzełącznika SAM	100
4.3.2	Dyskusja wyników przedstawionych w rozdziale 4.3.....	103
4.4	Metoda analizy aktywności transkrypcyjnej ryboprzełączników	106
4.4.1	Reakcja cięcia transkryptów <i>in vitro</i> z wykorzystaniem RNazy H	108
4.4.2	Reakcja cięcia transkryptów <i>ex vivo</i> z wykorzystaniem RNazy H	111
4.4.3	Analiza wydajności i specyficzności cięcia RNazą H z użyciem ddPCR	116
4.4.4	Analiza aktywności transkrypcyjnej ryboprzełączników SAM	123
4.4.5	Porównanie współczynnika indukcji IR uzyskanych technikami RT-qPCR i ddPCR.....	128
4.4.6	Dyskusja wyników przedstawionych w rozdziale 4.4.....	130
5	<i>Podsumowanie</i>	133
6	<i>Materiały i Metody</i>	136
6.1	Aparatura	136
6.2	Materiały	137
6.3	Odczynniki	138
6.3.1	Enzymy	138
6.3.2	Zestawy	138
6.3.3	Bufory i roztwory	139
6.3.4	Inne odczynniki.....	139

6.3.5	Standardy do oznaczania wielkości kwasów nukleinowych	141
6.4	Hodowla bakterii <i>Bacillus subtilis</i>	142
6.5	Startery i Oligomery DNA	144
6.6	Protokoły	147
6.6.1	Izolacja genomowego DNA (gDNA).....	147
6.6.2	Izolacja całkowitego RNA	148
6.6.3	Ekstrakcja kwasów nukleinowych z żelu poliakryloamidowego	148
6.6.4	Strącanie kwasów nukleinowych	148
6.6.5	Elektroforeza kwasów nukleinowych	148
6.6.6	Analiza jakościowa i ilościowa kwasów nukleinowych	149
6.6.7	Transkrypcja <i>in vitro</i> w wykorzystaniu polimerazy T7.....	150
6.6.8	Transkrypcja <i>in vitro</i> z wykorzystaniem polimerazy <i>E. coli</i>	150
6.6.9	Odwrotna transkrypcja (RT)	151
6.6.10	Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR).....	151
6.6.11	Emulsyjny PCR w czasie rzeczywistym (ddPCR)	151
6.6.12	Ilościowy PCR w czasie rzeczywistym – RT-qPCR.....	152
6.6.13	Synteza imidazolidu kwasu 2-metylonikotynowego (NAI)	152
6.6.14	Mapowanie struktury drugorzędowej metodą SHAPE	153
6.6.15	Wyznaczanie K_d metodą filtracji membranowej.....	153
6.6.16	Endonukleolityczne cięcie RNazą H.....	154
6.6.17	Przygotowanie biblioteki do sekwencjonowania Term-SHAPE-Seq.....	154
7	<i>Wykaz Skrótów</i>.....	157
8	<i>Spis Rysunków, Tabel, Równań</i>.....	162
9	<i>Referencje</i>	168
10	<i>Dorobek Naukowy</i>	177

1 Streszczenie

Nieustannie zmieniające się środowisko wymaga od bakterii szybkiej i zdecydowanej odpowiedzi na poziomie komórkowym. Mając do dyspozycji jedynie zasoby jednej komórki, bakterie wykształciły najróżniejsze mechanizmy kontroli ekspresji genów. Wśród nich szczególne miejsce zajmują ryboprzełączniki, sekwencje występujące w transkryptach, mające zdolność bezpośredniego wiązania niskocząsteczkowych metabolitów i wywoływania odpowiedzi regulatorowej. Obecnie znanych jest ponad 100 000 różnych ryboprzełączników, jednak tylko niewielki ułamek z nich został eksperymentalnie zweryfikowany i przypisany do jednej z blisko 45 znanych obecnie klas. Aktualnie stosowane metody identyfikacji nowych ryboprzełączników oparte są na bioinformatycznej analizie porównawczej zachowawczości ewolucyjnej sekwencji i struktury RNA. Takie podejście, choć przyniosło wiele fascynujących odkryć, nie pozwala na rozpoznanie ryboprzełączników charakteryzujących się dużą zmiennością, krótką sekwencją czy występujących rzadko. Stąd potrzeba opracowania nowej, eksperymentalnej metody identyfikacji ryboprzełączników, pozbawionej tych ograniczeń.

W odpowiedzi na te braki metodologiczne w niniejszej pracy doktorskiej została stworzona nowatorska metoda Term-SHAPE-seq, oparta na technologii wysokoprzepustowego sekwencjonowania. Łączy ona w sobie atuty dwóch rodzajów sekwencjonowania: Term-seq, nastawionego na analizę naturalnych końców 3' transkryptów (pełnej długości jak i skróconych, powstałych w wyniku działania ryboprzełącznika) oraz SHAPE-seq, sekwencjonowania pozwalającego poznać strukturę drugorzędową wybranej sekwencji. Term-SHAPE-seq pozwala na identyfikację miejsca terminacji transkrypcji przy jednoczesnym wglądzie w strukturę RNA i jej ewentualne zmiany pod wpływem ligandu. Skuteczność i zasadność tej metody została w pracy doktorskiej pozytywnie zweryfikowana, co pozwoliło w ostateczności na wyłonienie sekwencji liderowej genu *yfmG*, jako nowego kandydata na ryboprzełącznik.

W kolejnym etapie pracy przygotowano trzy narzędzia pozwalające na eksperymentalną weryfikację wyłonięgo w Term-SHAPE-seq kandydata na ryboprzełącznik. Na przykładzie znanego ryboprzełącznika klasy SAM-I genu *metE* w *Bacillus subtilis* zoptymalizowałem: metodę terminacji transkrypcji *in vitro* z użyciem bakteryjnej polimerazy RNA, technikę SHAPE z użyciem nukleofilu NAI oraz wyznaczanie stałej dysocjacji K_d z wykorzystaniem radioaktywnie znakowanego SAM i filtracji membranowej. Wszystkie te metody okazały się skuteczne i adekwatne, dlatego z ich pomocą została

przetestowana wytypowana sekwencja *yfmG*. Eksperymenty potwierdziły obecność transkryptów pełnej długości jak i skróconych, będących efektem terminacji transkrypcji. Ponadto, analiza struktury drugorzędowej potwierdziła obecność spinki terminacyjnej. Jednak dodanie mieszaniny ligandów nie spowodowało zmian ilości poszczególnych transkryptów ani struktury drugorzędowej, co sugeruje, że żaden z przetestowanych związków chemicznych nie jest ligandem dla potencjalnego ryboprzełącznika, bądź *yfmG* posiada inny, nieznan element regulatorowy wykorzystujący mechanizm terminacji transkrypcji.

Podczas określania optymalnego współczynnika indukcji ryboprzełącznika okazało się, że ryboprzełączniki kontrolujące ekspresję różnych genów/operonów charakteryzują się indywidualną odpowiedzią na brak metioniny w pożywce, pomimo, że należą do tej samej, ewolucyjnie zakonserwowanej klasy SAM-I. Analiza indukcji ryboprzełączników w czasie została powiązana z funkcją fizjologiczną w metabolizmie metioniny. Ryboprzełączniki genów i operonów związanych z samą biosyntezą metioniny lub jej bezpośrednimi metabolitami charakteryzowały się najwyższym współczynnikiem indukcji oraz jego najszybszym wzrostem (*samT*, *metIC*, *metE*). Natomiast najniższy współczynnik indukcji ryboprzełączników (lub zupełny brak) obserwowany był dla genów/operonów związanych z dalszymi etapami metabolizmu metioniny (*mtnKA*), metabolizmem siarki (operon *cysH*), wymagającymi stałej ekspresji (*metK*) lub nieznannej funkcji (*yxjG*).

Ostatnim etapem mojej pracy doktorskiej było opracowanie rzetelnej metody analizy aktywności transkrypcyjnej ryboprzełączników. Dotychczasowe metody nie pozwalały na bezwzględne określenie stężeń skróconych jak i pełnej długości transkryptów oraz powodowały znaczne odchylenia w ilości tych transkryptów, związane z różną odległością od końca 3' analizowanych fragmentów. Nowa metoda umożliwia przewyciężenie tych ograniczeń, wykorzystując nukleolityczne właściwości RNazy H pozwalające na przecięcie wybranych cząsteczek mRNA w miejscu wskazanym przez odpowiednio zaprojektowane oligomery DNA oraz technikę ddPCR. Metoda ta pokazała, że przecięcie transkryptów zachodzi z bardzo wysoką skutecznością i specyficznością. Po jej zastosowaniu możliwe stało się wyliczenie poprawionego współczynnika indukcji, wyższego o średnio 23% od uzyskanego bez cięcia RNazą H. Okazało się także, że indukcja ryboprzełącznika nie wiąże się z bezwzględnym wzrostem poziomu ekspresji danego genu czy operonu, ale ze zmianą stosunku pełnej długości transkryptów do formy skróconej.

1 Abstract

Constantly changing environment requires bacteria to respond quickly and decisively at the cellular level. Notwithstanding, bacteria operate with a limited set of resources restricted to a single cell at their disposal. The natural effect of this state of things for bacteria was a development of a variety of different mechanisms for gene expression control. Among them, riboswitches, defined as sequences present in transcripts with their ability of direct binding low-molecular metabolites and inducing a regulatory response, are considered to be one of the most interesting mechanism of gene regulation. There are more than 100 000 different riboswitches, nevertheless, only a small fraction of them have been experimentally verified and assigned to one of nearly 45 known classes. Currently used methods for riboswitch identification are based on computational comparative analysis of evolutionary conservation of RNA sequences and structures. This particular approach has led to a number of vital discoveries. However, it is not able recognize riboswitches with high variability, short sequences or rare ones. As a consequence, a need to develop new experimental method for riboswitch identification, with a view to overcoming these limitations, has appeared.

In response to these scientific problems, an innovative Term-SHAPE-seq method based on high-throughput sequencing technology has been created within the scope of this thesis. It combines the advantages of two types of sequencing: Term-seq, focused on the analysis of natural 3' ends of transcripts (full-length as well as terminated, resulting from the action of the riboswitch) and SHAPE-seq, sequencing allowing for distinguish the secondary structure of sequence of interest. Term-SHAPE-seq identifies the transcription termination sites while looking at the RNA structure and its possible changes under the influence of the ligand. The effectiveness and validity of this method have been positively verified, which ultimately enabled selection of the leader sequence of the *yfmG* gene as a new riboswitch candidate.

In the next step, three tools have been prepared to enable the experimental verification of the riboswitch candidate. With the use of known SAM-I class riboswitch of the *metE* gene in *Bacillus subtilis* following assays were optimized: *in vitro* transcription termination with bacterial RNA polymerase, SHAPE technique with NAI as a nucleophile and the determination of the K_d dissociation constant using radioactively labeled SAM and membrane filtration. All of these methods proved to be effective and adequate, therefore, *yfmG* gene was tested as a new riboswitch candidate. Performed experiments confirmed the presence of full-length transcripts as well as shortened ones, as a result of transcription

termination. Furthermore, the analysis of the secondary structure confirmed the presence of a termination hairpin. However, the addition of a ligand mixture did not change the number of individual transcripts or secondary structure, suggesting that none of chemical compound tested in this thesis is a ligand for a potential riboswitch, or *yfmG* has another, yet unknown regulatory element utilizing transcription termination mechanism.

When determining the optimal induction factor of the riboswitch for the cDNA library, it was noticed that riboswitches controlling the expression of different genes/operons belonging to the same evolutionary conserved SAM-I class are characterized by an individual response to the lack of methionine in the medium. The analysis of the induction of riboswitches as a function of time has been linked to their physiological function during methionine metabolism. Riboswitches of genes and operons closely related to the methionine biosynthesis itself or its direct metabolites were characterized by the highest induction ratio and its fastest growth (*samT*, *metIC*, *metE*). Nevertheless, the lowest induction factor of riboswitches (or its complete lack) was observed for genes/operons associated with further stages of methionine metabolism (*mtnKA*), sulfur metabolism (*cysH* operon), requiring constant expression (*metK*) or of unknown function (*yxjG*).

The final stage of the thesis was the development of a reliable method for analyzing the transcription activity of riboswitches. The existing methods did not allow for an absolute quantification of truncated and full-length transcripts, moreover, they caused significant biases in the number of these transcripts, related to a different distance from the 3' end of the analyzed fragments. The presented method makes possible to overcome these constraints, benefiting from the nucleolytic activity of RNase H, which gives the opportunity to cleave mRNA molecules of interest in a site-specific manner by properly designed DNA oligomers and ddPCR technique. The demonstrated method proved that the hydrolysis of transcripts occurs with high efficiency and specificity. As a consequence, it became possible to calculate the improved induction ratio, higher by 23% on average than obtained without mRNA cleavage with RNase H. It also turned out that the induction of the riboswitch does not entail an absolute increase in the level of expression of the given gene or operon, but with a change in proportion between full-length and terminated transcripts.

2 Wstęp

Przyzwyczajaliśmy się myśleć o bakteriach jako niezwykle prostych i prymitywnych organizmach. Ale nawet przed najprostszą bakterią stoi niezwykle skomplikowane zadanie, jakim jest regulacja ekspresji genów. Życie w tak złożonym, zmiennym, a często także wrogim środowisku stanowi nie lada wyzwanie dla wszystkich żywych istot. Bakterie, jako organizmy jednokomórkowe, muszą szybko oraz skutecznie reagować na różnego rodzaju bodźce płynące ze środowiska zewnętrznego. Co więcej, mając do dyspozycji jedynie zasoby jednej komórki muszą być zdolne do samodzielnej syntezy wszystkich niezbędnych składników. Dlatego też podstawowy metabolizm bakterii oraz biosynteza związków organicznych odbywa się domyślnie na wysokim poziomie, a ewentualna regulacja skupia się głównie na inhibicji owych procesów (w przeciwieństwie do organizmów eukariotycznych, u których procesy przebiegają na niskim poziomie a dominującym zjawiskiem jest aktywacja). Wiele genów metabolizmu podstawowego (ang. *housekeeping genes*) ulega niezmiennej, konstytutywnej ekspresji, bądź podlega niewielkim wahaniom w ciągu życia bakterii. Produkty owych genów pełnią kluczową rolę dla przeżycia i rozmnażania bakterii na podstawowym poziomie, a jednocześnie ewentualny brak ich ekspresji nie może być skompensowany poprzez pozyskanie odpowiednich substancji ze środowiska. Dlatego też bez względu na sytuację, w jakiej aktualnie znajdują się bakterie, ekspresja tych genów musi pozostać na niezmiennym, często wysokim poziomie. Do tej grupy genów należą między innymi geny kodujące 16S rRNA, *gyrA* i *gyrB* kodujące podjednostki gyrazy, *rpoA* i *rpoB* kodujące podjednostki polimerazy DNA, *recA* – rekombinazę A, *rho* – czynnik terminacyjny Rho, *ftsZ* – białko podziału komórkowego FtsZ, *gapdh* – dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego oraz *secA* – podjednostkę translokazy A [1]. Niekontrolowana synteza wszelkich niezbędnych dla przeżycia związków chemicznych byłaby energetycznie zbyt kosztowna i w konsekwencji nadmiernie wyczerpująca. Dlatego też w pierwszej kolejności bakterie wykorzystują zasoby środowiskowe, a produkty genów niezbędne do ich pozyskania i następnie efektywnego spożytkowania podlegają ścisłej kontroli.

2.1 Mechanizmy kontroli ekspresji genów u bakterii

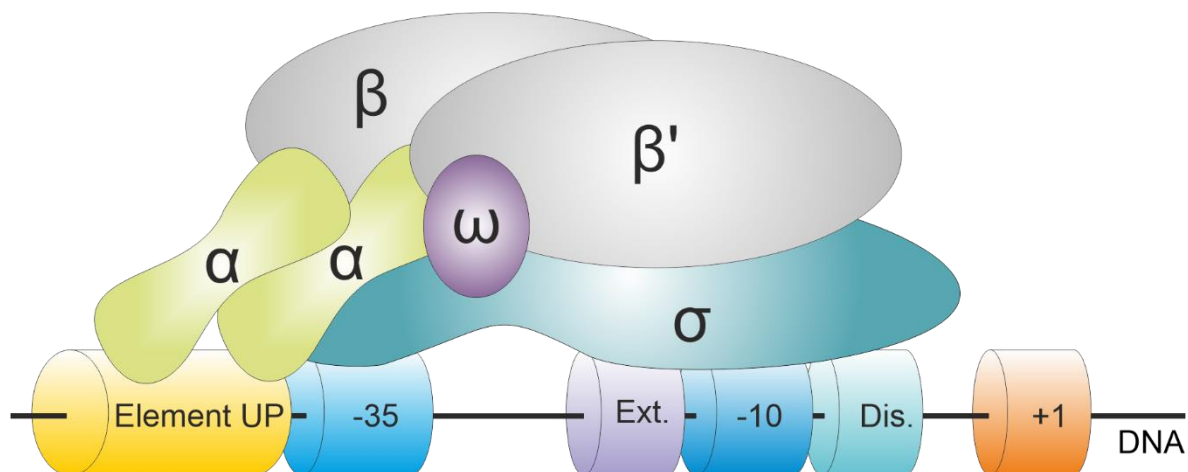
2.1.1 Promotor konstytutywny

U organizmów prokariotycznych enzymem odpowiedzialnym na transkrypcję genów jest polimeraza RNA (RNAP). W przeciwieństwie do organizmów eukariotycznych, u których, jak dotąd odkryto pięć różnych polimeraz RNA [2,3], prokarioty posiadają tylko jeden enzym pełniący taką funkcję. Bakteryjna RNAP składa się z 5 podjednostek [4,5], będących odpowiednikami analogicznych podjednostek polimerazy RNA II – głównego enzymu transkrypcyjnego, odpowiedzialnego za syntezę prekursorów mRNA, snoRNA i miRNA [6,7]:

1. α – podjednostka obecna w dwóch kopiach, odpowiedzialna jednocześnie za złożenie polimerazy oraz oddziaływania niespecyficzne z promotorem,
2. β – kodowana przez gen *rpoB*, odpowiedzialna częściowo za aktywność polimerazową,
3. β' – największa podjednostka RNAP, kodowana przez gen *rpoC*, odpowiedzialna częściowo za aktywność polimerazową,
4. ω – najmniejsza podjednostka, odpowiedzialna za składanie i stabilność RNAP,
5. σ – czynnik inicjacji transkrypcji, zapewnia specyficzność względem konkretnych promotorów, oddysocjuje w momencie rozpoczęcia elongacji.

Polimeraza RNA wiąże się ze ściśle określoną sekwencją DNA zwaną promotorem (Rysunek 1) [8]. Pierwszym elementem, zaczynając od końca 5' jest element UP – region bogaty w nukleotydy A i T, rozciągający się ok. 40 do 60 nukleotydów (nt) powyżej kodonu start. Sekwencja ta jest rozpoznawana przez podjednostkę α RNAP [9]. Kolejnym elementem jest blok -35, o sekwencji konsensusowej 5'-TTGACA-3' dla bakterii *Escherichia coli*, choć dla różnych bakterii oraz różnych genów sekwencja może się nieco różnić. Blok -35 oddziałuje specyficznie z czynnikiem σ RNAP. Pomiedzy blokiem -35 a blokiem -10 znajduje się *spacer* [10]. Nie posiada on sekwencji konsensusowej jednak jego długość jest ewolucyjnie zakonserwowana i wynosi 17 ± 1 nt. W przypadku niektórych promotorów obecny może być wydłużony blok -10 (Ext., ang. *extended -10*) [11]. Jego sekwencja konsensusowa 5'-TGTTG-3' jest zlokalizowana w pozycji -17 do -14 i jego główną funkcją jest wzmacnianie transkrypcji w przypadku słabego dopasowania sekwencji promotora w bloku -35 lub w przypadku jego braku. Tylko niewielka część promotorów *E. coli* posiada wydłużony blok -10, jednak w przypadku *Bacillus subtilis* występuje on znacznie częściej [12]. Kolejnym, a zarazem najważniejszym elementem promotora bakteryjnego jest blok -10 [10]. Jego sekwencja konsensusowa

to 5'-TATAAT-3'. Oddziałuje ona specyficznie z czynnikiem σ polimerazy. Ostatnim elementem promotora, poprzedzającym miejsce startu transkrypcji +1 jest dyskryminator (Dis., ang. *discriminator*) [13]. Element ten, długości 6-8 nt, nie jest silnie zakonserwowany i jest on zaangażowany w regulację czasu trwania otwartego kompleksu polimerazy (im krótszy dyskryminator, tym dłuższy czas trwania otwartego kompleksu) [14].



Rysunek 1. Budowa promotora bakteryjnego wraz z podjednostkami bakteryjnej polimerazy RNA. Ext. – wydłużony blok -10, Dis. – dyskryminator.

Powyższe elementy stanowiące promotor konstytutywny zlokalizowane są przed większością genów metabolizmu podstawowego oraz genów o konstytutywnym poziomie ekspresji, które przez większość czasu ulegają jedynie niewielkim wahaniom. Jest on specyficznie rozpoznawany przez podjednostkę RNPA σ^{70} , będącą podstawowym czynnikiem inicjującym transkrypcję [5]. Promotory o powyższej sekwencji należą do najsilniejszych wśród bakterii, jednak siła konkretnego promotora zależy od stopnia podobieństwa sekwencyjnego do sekwencji konsensusowej obu bloków -35 i -10, oraz obecności pozostałych elementów (perfekcyjne dopasowanie warunkuje największą siłę promotora) [10]. Po związaniu sekwencji promotora następuje rozplecenie nici DNA w regionie -10, bogatym w nukleotydy A i T, a następnie po syntezie kilku pierwszych nukleotydów nowej nici RNA, oddysocjowuje podjednostka σ , tworząc transkrypcyjny kompleks elongacyjny (TEC, ang. *transcription elongation complex*).

2.1.2 Promotory specyficzne i podjednostki σ

Spośród wszystkich elementów składowych bakteryjnej polimerazy RNA, najistotniejszą rolę w rozpoznawaniu miejsc promotorowych pełni podjednostka σ^{70} . Aby jednak kontrolować ekspresję konkretnych genów już na etapie wyboru promotora, bakterie w toku ewolucji wykształciły różnego rodzaju specyficzne promotory oraz adekwatne podjednostki σ . Oprócz kanonicznej podjednostki σ^{70} rozpoznającej większość typowych promotorów, u bakterii występują także alternatywne podjednostki σ (Tabela 1) [15]:

Tabela 1. Podjednostki σ i anty- σ występujących u bakterii *E. coli*.

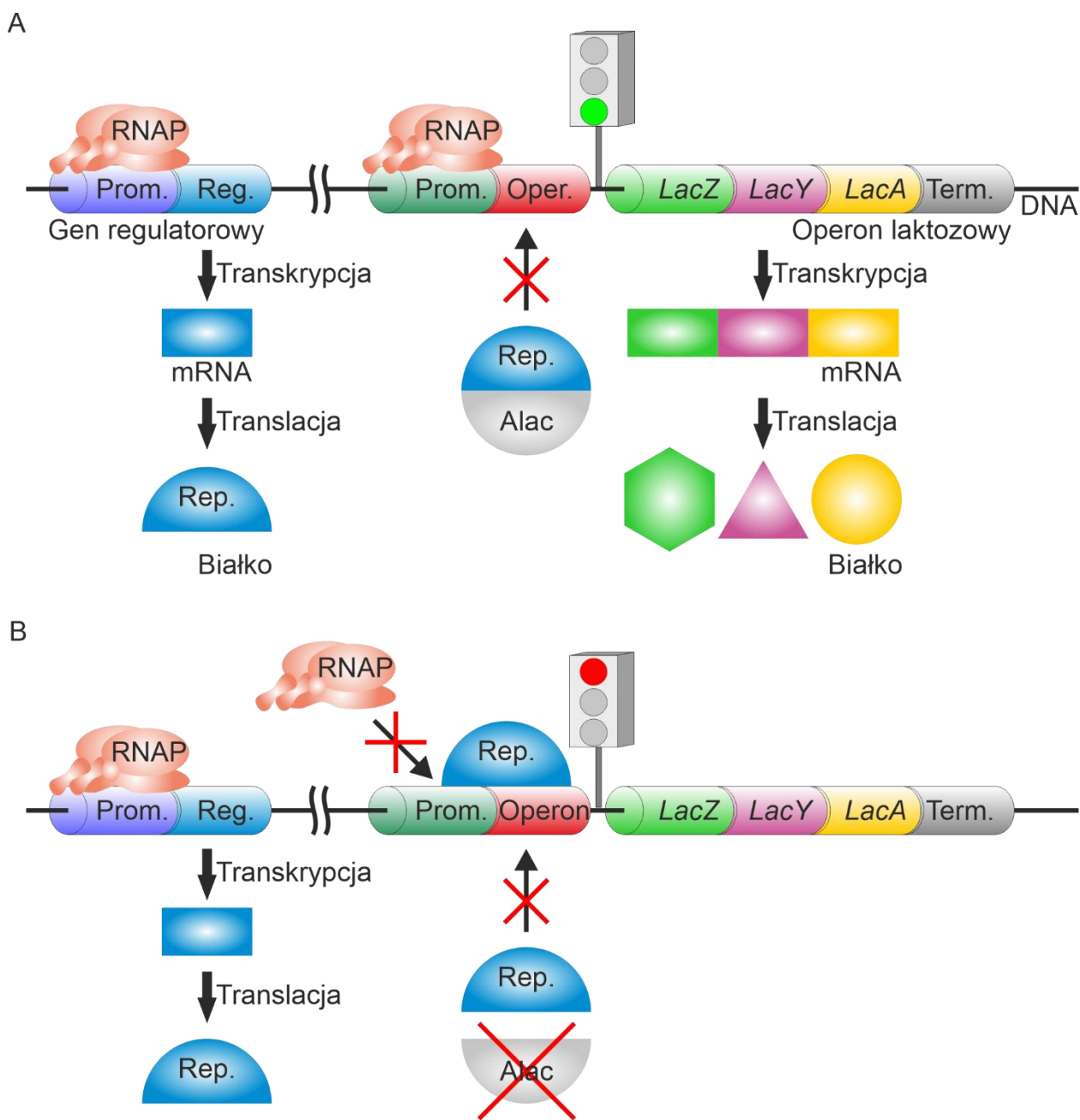
Czynnik σ	Gen	Anty- σ	Kontrolowany proces
σ^{70}	RpoD	Rsd i HscC	Metabolizm podstawowy, wzrost i rozwój
σ^{19}	FecI	FecR	Transport żelaza
σ^{24}	RpoE	RseA	Skrajny szok cieplny, stres zewnątrzkomórkowy, sporulacja
σ^{28}	RpoF	FlgM	Synteza wici, chemotaksja
σ^{32}	RpoH	Dnak	Shok cieplny
σ^{38}	RpoS	RssB	Stresy, głód, faza stacjonarna
σ^{54}	RpoN	EBPs	Brak azotu

Każda z podjednostek σ z dużą wydajnością rozpoznaje sekwencję specyficznych promotorów, występujących w genach pełniących w komórce wyspecjalizowane funkcje, np. związane z różnymi stanami fizjologicznymi. Dzięki ekspresji takich genów możliwe jest przetrwanie w niekorzystnych warunkach środowiskowych lub optymalne wykorzystanie zasobów, gdy nadarza się odpowiednia okazja. W ten sposób transkrypcji ulegają geny kodujące białka szoku cieplnego, chaperony, różnego rodzaju transportery, czy też specyficzne enzymy. O tym jak istotną rolę pełnią podjednostki σ dla przeżycia bakterii świadczy fakt, że *E. coli* z uszkodzonym genem *rpoE* (kodującym podjednostkę σ^{24}) nie są w stanie przeżyć w temperaturze powyżej 42°C [16].

Warto jednak pamiętać, że nadekspresja tego typu genów byłaby niewskazana, gdyż koszt biologiczny biosyntezy białek przez nie kodowanych byłby nieproporcjonalnie wysoki w stosunku do pożytku w optymalnych warunkach. Dlatego oprócz systemu różnych podjednostek σ , komórki bakteryjne wykształciły także czynniki anty- σ (Tabela 1) [17]. Ich mechanizm działania polega na bezpośrednim związaniu danej podjednostki σ , co w konsekwencji uniemożliwia jej interakcje z kompleksem polimerazy i inhibicję transkrypcji pozwalając na jeszcze ściślejszą kontrolę wyboru promotora.

2.1.3 Promotory indukowane i operony

Obok promotorów konstytutywnych, będących aktywnych niemal przez cały czas, istnieją także promotory indukowane. Kontrolują one ekspresję tych genów, których produkty białkowe są potrzebne tylko w konkretnych warunkach lub etapach rozwoju bakterii. Ich aktywacja bądź inhibicja zależy od dodatkowych białek zwanych czynnikami transkrypcyjnymi, które mogą spełniać funkcje aktywatorów lub represorów transkrypcji. Czynniki transkrypcyjne bardzo często są białkami allosterycznymi, co oznacza, że do pełnienia swojej funkcji wymagają związania odpowiednio koaktywatora (induktora) lub korepresora (inhibitora). Koaktywatory i korepresory to najczęściej niewielkie cząsteczki, które po związaniu do aktywatora lub represora zmieniają ich konformacje i modulują ich funkcję. Tego typu kontrola ekspresji genów jest charakterystyczna dla operonów, czyli zespołu wspólnie transkrybowanych, regulowanych i funkcjonalnie powiązanych genów (Rysunek 2 A) [18]. Geny tworzące operon posiadają wspólny promotor, z którego powstaje jeden transkrypt. Operony przypominają w swojej strukturze zwykłe geny. Istotną różnicą jest występowanie sekwencji operatora, które stanowi miejsce przyłączenia represora. Operator najczęściej zlokalizowany jest pomiędzy promotorem (do którego bezpośrednio przylega) a miejscem startu transkrypcji. Przyłączenie represora do operatora stanowi fizyczną przeszkodę dla polimerazy, która w ten sposób nie może związać sekwencji promotora i przeprowadzić transkrypcji (Rysunek 2 B). Sam represor jest kodowany przez gen regulatora, który jest zlokalizowany poza operonem i nie podlega jego kontroli.



Rysunek 2. Budowa i mechanizm działania operonów bakteryjnych na przykładzie operonu *lacZYA*. A) Działanie operonu z nieaktywnym represorem. B) Działanie operonu z aktywnym represorem. RNAP – Polimeraza RNA. Prom. – promotor, Reg. – gen regulatorowy, Oper. – operator, Term. – terminator. Rep. – represor, Alac – allolaktoza (korepresor).

Regulacja ekspresji genów może być zarówno negatywna (wyciszenie genu po związaniu represora) jak i pozytywna (aktywacja genu po związaniu aktywatora). Ponadto regulacja może mieć charakter indukcyjny (gen jest aktywowany po związaniu represora/aktywatora przez induktor) lub represyjny (gen jest wyciszony po związaniu represora/aktywatora przez inhibitor).

- Regulacja negatywna indukcyjna
Przykładem jest operon laktozowy, w którego skład wchodzi trzy geny kodujące białka transportujące i metabolizujące laktozę [8]. W warunkach normalnych represor pozostaje związany operatorem, uniemożliwiając transkrypcję (Rysunek 2 A). Jeżeli natomiast laktoza staje się dostępna dla komórki, wzrasta jej stężenie, a wraz z nią jej produkt – allolaktoza, która jest induktorem. Po związaniu induktora, represor oddysocjowuje od operatora, co aktywuje ekspresję genów operonu (Rysunek 2 B).
- Regulacja negatywna represyjna
Przykładem jest operon tryptofanowy, składający się z pięciu genów zaangażowanych w biosyntezę tryptofanu [19]. W tym przypadku operon jest aktywny w sytuacji niedoboru tryptofanu w komórce, ponieważ represor pozostaje niezwiązany. Jeżeli natomiast stężenie tryptofanu jest wystarczające, to wiąże się on do represora (funkcjonuje jako inhibitor) i w tym stanie wiąże operator, wyciszając transkrypcję operonu.
- Regulacja pozytywna indukcyjna
Tego typu regulacja występuje w operonie laktozowym. Białkowy aktywator katabolizmu CAP (ang. *catabolite activator protein*) pełni funkcję aktywatora operonu (niezależnie od represora) [20]. W stanie niezwiązanym pozostaje nieaktywny, natomiast ulega aktywacji po związaniu cyklicznego AMP (cAMP), pełniącego funkcję induktora. Stężenie komórkowe cAMP wzrasta wraz ze spadkiem stężenia glukozy, co jest sygnałem do aktywacji operonu laktozowego. Białko CAP po związaniu cAMP rozpoznaje miejsce wiązania CAP (ang. *CAP-binding site*) zlokalizowane powyżej sekwencji promotora, co pozwala na interakcję z RNAP, ułatwiając jest przyłączenie do promotora.
- Regulacja negatywna represyjna
Tego typu system kontroli ekspresji operonów nie został jak dotąd odkryty w naturze, natomiast został sztucznie stworzony. W warunkach naturalnych represor TetR wiąże operator *tetO* (TetA zapewniający odporność na działanie tetracykliny) hamując jego transkrypcję [21]. Jeżeli w środowisku pojawi się tetracyklina, wiąże się ona z TetR (tetracyklina pełni funkcję induktora), a ekspresja genu zostaje przywrócona. Przedstawia on więc regulację indukowaną pozytywną. By stworzyć pozytywny system represyjny, Gossen i Bujard połączyli represor TetR z domeną aktywującą transkrypcję (ang. *transcriptional activation domain*) VP16, otrzymując transaktywator tetracyklinowy (tTA, ang. *tetracycline-controlled transactivator*) [22]. W stanie wolnym tTA funkcjonuje jako aktywator transkrypcji, pozostając związanym

się z operatorem *tetO*, natomiast po interakcji z tetracykliną oddysocjowuje, wyciszając ekspresję docelowych genów.

Oprócz elementów regulatorowych zlokalizowanych w bezpośrednim sąsiedztwie promotorów, bakterie wykształciły także dystalne elementy, przypominające eukariotyczne enhancery, aktywujące ekspresję docelowych genów poprzez związanie aktywatora [23]. Warto jednak pamiętać, że enhancery należą do rzadkości w królestwie bakterii.

2.1.4 Małe bakteryjne RNA (sRNA)

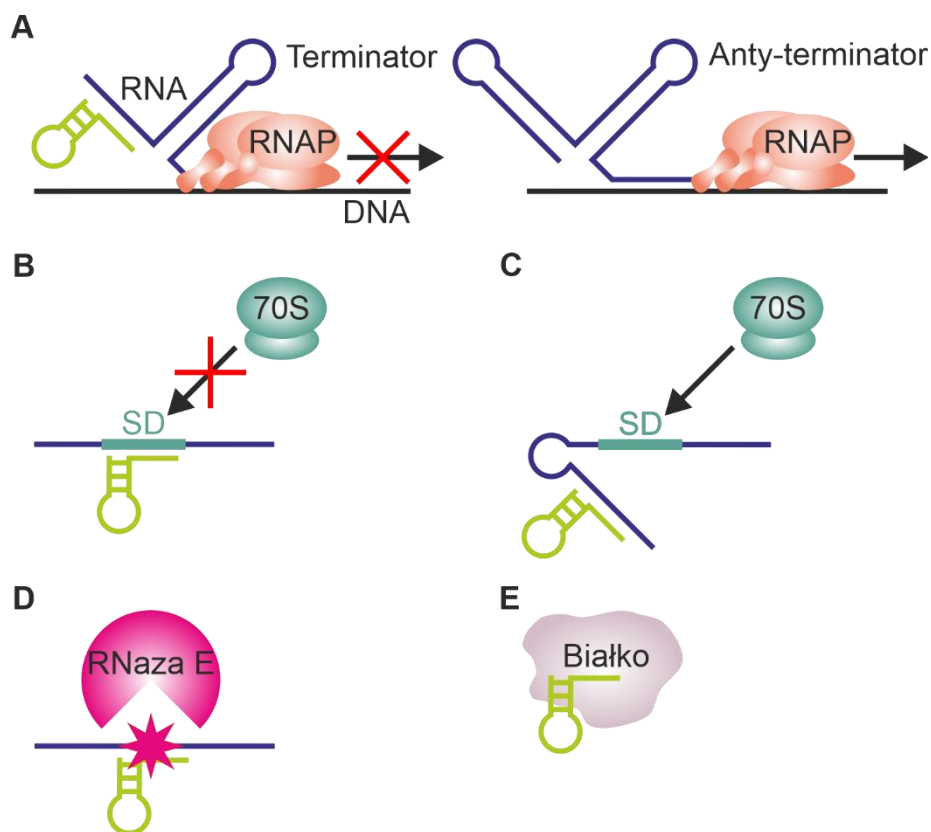
Małe bakteryjne RNA (sRNA, ang. *small RNA*) należą do grupy małych niekodujących RNA (snRNA, ang. *small noncoding RNA*). Charakteryzują się długością od 50-500 nt oraz wysokim stopniem ustrukturyzowania (średnio, co ok. 100 nt) [24]. Pełnią one kluczową rolę w kontroli ekspresji takich genów jak geny odpowiedzi na stres, wirulencji, czy *quorum sensing* [25]. Swoje funkcje regulatorowe mogą pełnić poprzez oddziaływanie na zasadzie komplementarności (antysensu). Pod pewnymi względami sRNA stanowią funkcjonalny ekwiwalent eukariotycznych krótkich interferujących RNA (siRNA, ang. *small interfering RNA*) i mikroRNA (miRNA). Ze względu na relację między miejscem syntezy a sekwencją docelową można mówić o sRNA kodowanych *cis*, gdy cząsteczka sRNA jest kodowana na komplementarnej nici względem swojego celu (w obrębie tego samego genu) oraz *trans*, gdy cząsteczka docelowa dla sRNA jest kodowana w odległej lokalizacji. W konsekwencji, sRNA działające w układzie *cis* są perfekcyjnie (lub prawie perfekcyjnie) komplementarne do swojej cząsteczki docelowej, natomiast *trans* sRNA są w różnym stopniu komplementarne, co sprawia, że do swojego prawidłowego działania i specyficznego rozpoznania docelowego RNA wymagane jest wsparcie ze strony białka opiekuńczego Hfq (ang. *host factor for Q beta*) [26]. Białko to zapewnia ochronę przed degradacją oraz stabilizuje strukturę sRNA, wspomagając interakcję z docelowym RNA [27]. sRNA działające w układzie *trans* często przybierają charakterystyczną strukturę [24]. Pierwsze kilkanaście nukleotydów od końca 5' stanowi region *seed*, odpowiedzialny za hybrydyzację do cząsteczki docelowej. Następnie w pobliżu spinki terminacyjnej znajduje się miejsce wiązania białka Hfq. Na końcu 3' cząsteczki sRNA znajduje się spinka terminacyjna z traktem poli-U. Funkcją tej struktury jest zapobieganie degradacji oraz inicjacja oddziaływań z cząsteczką docelową poprzez oddziaływania pętli apikalnej typu *kissing loop*. Ponadto trakt poli-U stanowi miejsce zaczepu dla białka Hfq.

Funkcje regulatorowe sRNA w komórce bakterii są realizowane za pośrednictwem bardzo szerokiego repertuaru różnych mechanizmów. Zasadniczo sRNA działają na zasadzie antysensu wiążąc się bezpośrednio (lub z pomocą białka Hfq) z docelową cząsteczką RNA lub też poprzez sekwestrację różnych białek. Różnego rodzaju interakcje z sRNA mogą zarówno wyciszać, jak i aktywować ekspresję genów lub modulują funkcje.

Niektóre cząsteczki sRNA biorą udział w regulacji transkrypcji poprzez kontrolę jej terminacji. W tym wypadku związanie cząsteczki sRNA stymuluje formowanie spinki terminacyjnej (Rysunek 3 A) [28]. Większość sRNA wiąże się w okolicach regionu nieulegającego translacji 5' (5'UTR, ang. *5' untranslated region*) transkryptów bakteryjnych, ze szczególnym uwzględnieniem miejsca wiązania rybosomu (RBS, ang. *ribosome-binding site*), u bakterii zwanej sekwencją Shine-Dalgarno (SD), co wyklucza wiązanie rybosomu i w konsekwencji obniża poziom biosyntezy białek (Rysunek 3 B) [29]. Jednak sRNA mogą mieć także pozytywny wpływ na translację. RBS może być wyjściowo zamknięty w strukturze dwuniciowej, a przez to niedostępny dla aparatu translacyjnego komórki (Rysunek 3 C) [30]. Dopiero po związaniu docelowej sekwencji przez sRNA, RBS zostaje uwolniony. Nie tylko koniec 5' transkryptu jest celem działania sRNA. Sekwencja docelowa może być także zlokalizowana w obrębie otwartej ramki odczytu (ORF, ang. *open reading frame*). W takiej sytuacji translacja zachodzi bez zakłóceń, bez względu na to czy zostanie dołączony docelowy sRNA czy też nie. Natomiast oddziaływanie z sRNA indukuje degradację mRNA za pomocą RNazy E, pełniącej w tej sytuacji funkcję rekrutującą i aktywującą (Rysunek 3 D) [31]. Obniżona stabilność transkryptu ma swoje przełożenie na zredukowany poziom translacji. Z drugiej strony sRNA może stabilizować i chronić mRNA przed degradacją ze strony RNazy E [32]. sRNA może także kontrolować Rho-zależną terminację transkrypcji poprzez konkurencję o wiązanie RBS z rybosomem. Zahamowanie translacji powoduje odseparowanie rybosomów od polimerazy RNA (polarność transkrypcyjna), odsłania wcześniej zakryte miejsce *rut*, co z kolei rekrutuje czynnik Rho, powodujący przedwczesną terminację transkrypcji [33].

Oprócz możliwości wiązania kwasów nukleinowych na zasadzie antysensu, sRNA mogą także oddziaływać z białkami dzięki sekwencjom rozpoznającym białka (Rysunek 3 E). Typowym przykładem takiego sRNA jest CsrB z *E. coli* [34]. Wiąże się on z białkiem CsrA, które w komórce pełni funkcję inhibitora translacji (oddziałuje z RBS) oraz stymuluje degradację różnych mRNA. W takim układzie CsrB pełni funkcję bezpośredniego kompetitora CsrA.

Niekiedy zamiast dezaktywować białko, sRNA może modulować jego działanie. Na przykład sRNA 6S wiąże σ^{70} -RNAP, odpowiedzialną za transkrypcję genów metabolizmu podstawowego [35]. 6S swoją strukturą naśladuje cząsteczkę DNA podczas transkrypcji, dlatego też pełni funkcję inhibitora polimerazy. Jak się jednak okazuje, tylko pewna część promotorów ulega wyciszeniu, podczas gdy reszta zdaje się być niewrażliwa na efekt tego sRNA.



Rysunek 3. Mechanizmy działania bakteryjnych sRNA. A) Terminacja transkrypcji. B) Blokowanie translacji. C) Aktywacja translacji. D) Indukcja cięcia przez RNazę E. E) Inhibicja/modulacja funkcji białka. RNAP – polimeraza RNA, SD – sekwencja Shine-Dalgarno.

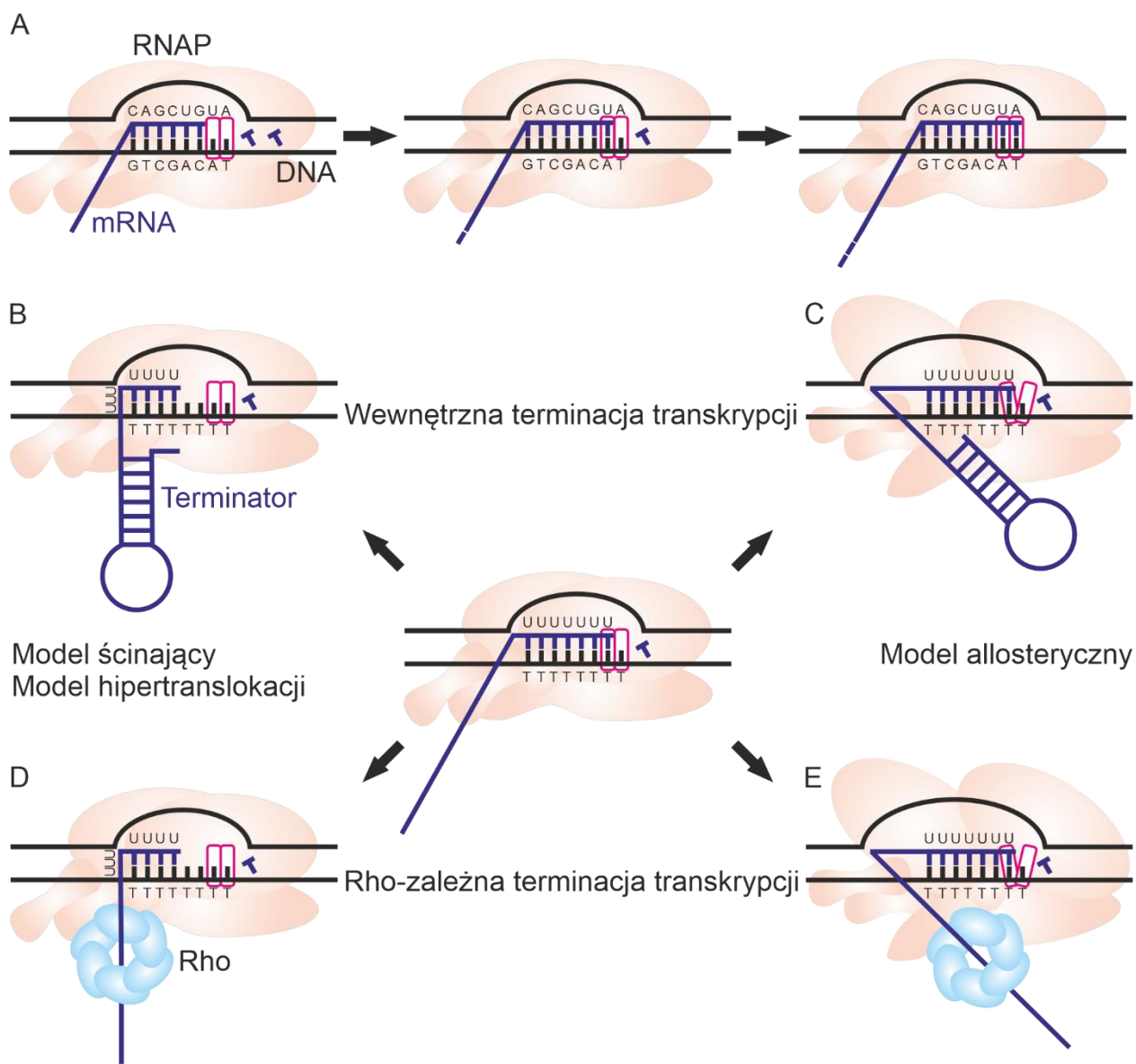
2.1.5 Wewnętrzna terminacja transkrypcji (Rho-niezależna)

Geny bakteryjne rozciągają się pomiędzy promotorem a terminatorem, które to wyznaczają miejsce początku i końca procesu transkrypcji. Wyżej wymienione mechanizmy kontroli ekspresji genów dotyczą pierwszego etapu transkrypcji – inicjacji. Choć regulacja ekspresji na tym etapie niesie istotne korzyści w postaci niewielkich nakładów energetycznych, to niemniej istotnym etapem regulacji u prokariotów jest terminacja transkrypcji. W normalnych okolicznościach, polimeraza RNA po przyłączeniu się do sekwencji promotora rozpoczyna syntezę mRNA na matrycy DNA (elongacja transkrypcji) tak długo,

aż nie napotka sygnału terminacji transkrypcji (terminatora) (Rysunek 4 A). Terminator to specyficzna struktura drugorzędowa, jaką przyjmuje nowo zsyntetyzowana cząsteczka mRNA – struktura spinki do włosów (ang. *hairpin*). Spinka ta jest zazwyczaj zbudowana z około 7-20 par zasad (bp) bogatych w pary GC, tworzących trzon spinki oraz pętli apikalnej długości ok. 4-8 nt [36]. Tuż za sekwencją spinki znajduje się trakt poli-U długości ok. 7-9 nukleotydów, głównie urydynowych. Podczas transkrypcji polimeraza RNA obejmuje 12-14 nukleotydów, w konsekwencji mniej więcej -15 nukleotyd jest pierwszym opuszczającym polimerazę [37]. Natychmiast po syntezie spinki terminacyjnej polimeraza RNA zaczyna oddziaływać z RNAP, co powoduje jej chwilowe zatrzymanie [38]. Zatrzymanie kompleksu polimerazy RNA zbiega się w czasie z transkrypcją traktu poli-U. Zatrzymanie RNAP w miejscu niestabilnego heterodupleksu poli-U (RNA) z poli-A (DNA) stymuluje rozplecenie obu nici, destabilizację kompleksu polimerazy i w konsekwencji terminację transkrypcji.

Istnieją trzy hipotezy tłumaczące rolę spinki terminacyjnej w procesie terminacji transkrypcji. Pierwszy model ścinający (ang. *shearing model*) zakłada, że formująca się spinka terminatora „wyciąga” nić RNA z kompleksu TEC, zrywając (ścinając) w ten sposób wiązania heterodupleksu RNA:DNA (Rysunek 4 B) [39]. Według drugiego modelu hipertranslokacji (ang. *hypertranslocation model*) spinka terminacyjna wywiera presję na RNAP, powodując przesunięcie kompleksu wzdłuż nici DNA, jednak bez dołączenia kolejnych nukleotydów do mRNA (Rysunek 4 B) [40]. W trzecim modelu allosterycznym (ang. *allosteric model*) terminator oddziałuje z kanałem wyjścia RNA, powodując rearanżację w strukturze kompleksu TEC i oddysocjowanie poszczególnych podjednostek kompleksu (Rysunek 4 C) [41].

Terminator może oddziaływać bezpośrednio z kompleksem polimerazy (z podjednostką β' na RNAP), co dodatkowo osłabia stabilność kompleksu [42] jak i pośrednio, poprzez białko NusA, które oddziałuje zarówno ze spinką terminacyjną jak i podjednostką α oraz β lub β' polimerazy [43]. Obecność białka NusA w istotny sposób wzmacnia terminację transkrypcji poprzez dłuższe zatrzymanie polimerazy RNA [44]. Jednak w obecności innych czynników, jak NusG, NusB, NusE czy też białek N lub Q faga λ , pełni funkcję antyterminacyjną zarówno w przypadku Rho-zależnej jak i wewnętrznej terminacji transkrypcji [45]. Miejsce terminacji transkrypcji (TTS, ang. *transcription termination site*) przypada najczęściej po 6, 7 lub 8 cząsteczce uracylu licząc od zakończenia trzonu terminatora [38,39]. Im bardziej homogenny jest trakt poli-U (im więcej U w sekwencji), tym silniejszy sygnał terminacji transkrypcji.



Rysunek 4. Modele terminacji transkrypcji u bakterii. A) Prawidłowo przebiegająca transkrypcja. B) Model ścinający/hipertranslokacji wewnętrznej terminacji transkrypcji. C) Model allosteryczny wewnętrznej terminacji transkrypcji. D) Model ścinający/hipertranslokacji Rho-zależnej terminacji transkrypcji. E) Model allosteryczny Rho-zależnej terminacji transkrypcji. Granatowe T – Kolejne nukleotydy, różowe ramki – miejsca aktywne.

2.1.6 Rho-zależna terminacja transkrypcji

Terminacja transkrypcji zależna od białka Rho jest drugim obok terminacji wewnętrznej mechanizmem kontroli terminacji transkrypcji [46]. Szacuje się, że około 20-30% zdarzeń terminacji transkrypcji zachodzi z udziałem czynnika Rho [47]. Jest to białko zbudowane z sześciu identycznych podjednostek (monomerów) tworzących symetryczny pierścień (heksamer), z których każda podjednostka posiada domenę wiążącą RNA (PBS, ang. *primary binding site*) oraz domenę ATPazową (ang. *ATP-hydrolysis domain*) [48]. Czynniki Rho pełni funkcję helikazy RNA. W postaci heksameru rozpoznaje miejsce *rut* (ang. *Rho utilization site*), sekwencję długości 60-90 nt, bogatą w pirymidyny. Domeny PBS preferencyjnie wiążą dinukleotydy YC, gdzie Y oznacza pirymidynę [49], przedzielone *spacerem*, długości 12-14 nt [50,51]. Ponadto sekwencja *rut* musi być wolna od struktur drugorzędowych, a także nie może być aktywna translacyjnie [52]. W przeciwieństwie do sekwencji wewnętrznego terminatora, którego lokalizację relatywnie łatwo zidentyfikować oraz komputerowo przewidzieć, w sekwencjach genomowych nieokreślona natura sekwencji *rut* sprawia, że komputerowe przewidywanie tych miejsc w genomach stanowi wyzwanie [53]. Po rozpoznaniu sekwencji *rut* i nawinięciu RNA na heksamer białka Rho następuje translacja kompleksu wzdłuż nici RNA w kierunku końca 3' i rozplatanie nici RNA, przy wykorzystaniu energii pochodzącej z hydrolizy ATP. Terminacja transkrypcji następuje w momencie, gdy białko Rho „dogania” aktywny transkrypcyjnie kompleks polimerazy. Dzieje się to w chwili, gdy RNAP, z różnych przyczyn, ulega zatrzymaniu. W takiej sytuacji możliwe jest, że w miarę przesuwania się wzdłuż nici RNA czynnik Rho napotyka kompleks RNAP.

Proponowane są trzy modele, analogiczne do tych wspomnianych powyżej, opisujące bezpośredni mechanizm terminacji transkrypcji z udziałem białka Rho. Pierwszy z nich (model ścinający) zakłada, że czynnik Rho powoduje zerwanie wiązań pomiędzy DNA i RNA poprzez wyciągnięcie cząsteczki mRNA z TEC (Rysunek 4 D) [45]. Według drugiego modelu (model hipertranslokacji) czynnik Rho przesuwa się z wystarczającą siłą by spowodować translację RNAP bez wbudowania kolejnych nukleotydów, co destabilizuje kompleks (Rysunek 4 D) [54]. Trzeci model postuluje allosterycznie indukowane zmiany konformacyjne w kompleksie polimeraz, powodujące naruszenie miejsca aktywnego i dysocjację kompleksu (Rysunek 4 E) [55]. Oprócz funkcji jednostkowej kontroli ekspresji genów, czynnik Rho pełni także istotne całogenomowe funkcje. Zapewnia integralność replikowanego genomu poprzez zapobieganie kolizji widełek replikacyjnych z RNAP oraz poprzez usuwanie pętli R (ang. *R-loops*) – trójniciowych kompleksów DNA:RNA, przez rehybrydyzację nowopowstałej cząsteczki RNA

do DNA powodujących dwuniciowe pęknięcia nici DNA [56]. Zapobiega dalszej transkrypcji w sytuacji nieprawidłowej translacji (np. w przypadku mutacji nonsensowej) [57] oraz nadmiernej transkrypcji antysensowej [58]. Efekt terminacyjny, zarówno *in vivo* i *in vitro*, jest wzmacniany przez białko NusG, które oddziałuje zarówno z czynnikiem Rho jak i RNAP [59], stymulując terminację transkrypcji o ok. 20% [58]. Jednak w przypadku braku czynnika Rho, NusG oddziałuje zarówno z nicią kodującą DNA – wspomagając ponowne przyłączenie DNA (ang. *reannealing*) [59] oraz chroniąc przed ponownym przyłączeniem podjednostki σ [60] jak i z podjednostką 30S rybosomu – promując parowanie transkrypcji z translacją za pośrednictwem białka NusE – S10 [61]. W konsekwencji skutkuje działaniem antyterminacyjnym zarówno w przypadku Rho-zależnej jak i wewnętrznej terminacji.

2.1.7 Atenuacja

Atenuatorem nazywamy, w szerokim sensie, element regulatorowy mRNA działający w układzie *cis*, zlokalizowany w 5'UTR, przyjmujący dwie alternatywne struktury – terminatora lub antyterminatora. Terminator ten musi być Rho-niezależny (wewnętrzna terminacja transkrypcji), a zmiana struktury terminator/antyterminator następuje pod wpływem różnych czynników zarówno fizycznych lub chemicznych, stanowiących molekularne sygnały odzwierciedlające stan komórki. Atenuacja jest możliwa dzięki szczególnej własności RNA do tworzenia różnorodnych struktur drugo- i trzeciorzędowych, co z kolei pozwala na specyficzne wiązanie docelowych cząsteczek. Rozpoznanie takich molekularnych sygnałów bezpośrednio przez sekwencję atenuatora powoduje rearanżację jej struktury, promując utworzenie terminatora bądź antyterminatora i umożliwiając w ten sposób transdukcję istotnych dla przeżycia bakterii sygnałów. System atenuacji jest z jednej strony bardzo wydajny, z drugiej zaś strony niezwykle oszczędny, a przez to korzystny dla bakterii, gdyż do swego działania nie wymaga żadnych dodatkowych czynników białkowych.

U bakterii należących do typu Firmicutes (np. *B. subtilis*) atenuacja stanowi ponad 90% wszystkich przypadków terminacji transkrypcji, podczas gdy u Proteobakteria (np. *E. coli*) system atenuacji jest równie często wykorzystywany co terminacja zależna od czynnika Rho [62]. Uważa się, że średnio 1,6% genów bakteryjnych jest kontrolowanych przez mechanizm atenuacji, jednak procent ten waha się od 0,6% dla Actinobacteria do 2,6% dla Firmicutes. U najintensywniej badanych bakterii, jak *E. coli* czy *B. subtilis* wykazano, że atenuacja kontroluje odpowiednio 2,1% genów i 3,3% operonów oraz 3,2% genów i 5% operonów [62]. Znacznie

wyższe wartości niż średnia sugerują prawdopodobne niedoszacowanie wynikające z braku informacji. Najpewniej u niektórych gatunków bakterii nawet 10% genów i operonów może być kontrolowana za pośrednictwem atenuacji.

2.1.7.1 Atenuacja operonów aminokwasowych

Biosynteza poszczególnych aminokwasów często jest kontrolowana w ściśle określony sposób poprzez mechanizm atenuacji. Sensorem jest sekwencja mRNA bogata w kodony konkretnego aminokwasu (którego mRNA koduje enzymy zaangażowane w biosyntezę tego aminokwasu). Jako że u organizmów prokariotycznych translacja zachodzi kotranskrypcyjnie, w normalnych okolicznościach (gdy aminokwasów jest pod dostatkiem), przemieszczający się wzdłuż nici mRNA rybosom podąża w niewielkiej odległości od RNAP, co uniemożliwia uformowanie się spinki antyterminacyjnej i w konsekwencji prowadzi do powstania drugiej spinki (spinki terminacyjnej) i przedwczesnej terminacji transkrypcji. Jeżeli w cytoplazmie komórki brakuje danego aminokwasu, brakuje także aminoacylo-tRNA, a w związku z tym aktywny translacyjnie rybosom nie może wydajnie włączać kolejnych aminokwasów do łańcucha polipeptydowego, co go istotnie spowalnia i zwiększa odległość od TEC. Pozwala to na uformowanie się w pierwszej kolejności spinki antyterminacyjnej, która wyklucza powstanie terminatora, a transkrypcja wraz z translacją mogą przebiegać bez zakłóceń.

Klasycznym przykładem atenuatora, a zarazem atenuatorem *sensu stricto*, jest element kontrolujący występujący w operonie tryptofanowym [63]. Elementem regulatorowym jest tutaj transkrypt liderowy (ang. *lider transcript*) *trpL* długości ok. 130 bp, poprzedzający właściwy operon tryptofanowy. Koduje on krótki polipeptyd o długości 14 aminokwasów, z których najważniejsze są dwa tryptofany występujące jeden za drugim. Tryptofan uchodzi za dość rzadki aminokwas o częstości występowania średnio 1 na 100 aminokwasów. W przypadku braku tryptofanu (a właściwie Trp-tRNA^{Trp}), rybosom ulega zatrzymaniu na obu kodonach, oddalając się przy tym od RNAP, co daje dostateczny czas i możliwość ukształtowania się spinki antyterminacyjnej.

2.1.7.2 Termsensory RNA

Zmiany temperatury wymagają zdecydowanej odpowiedzi ze strony komórki, gdyż cały metabolizm jest ściśle zależny od temperatury otoczenia. Dostosowanie bakterii do konkretnej temperatury możliwe jest dzięki szerokiemu wachlarzowi białek wspierających przeżycie bakterii. Zasadniczo geny, których ekspresja zależna jest od temperatury należą do trzech grup: szoku cieplnego, zimna i wirulencji. W szlaku transdukcji sygnału w odpowiedzi na zmianę temperatury mogą brać bezpośrednio udział lipidy, białka, DNA i RNA [64]. Jednak największy udział przypada białkom, które pod wpływem podwyższonej temperatury ulegają rozpleceniu bądź innego rodzaju zmianom strukturalnym. W większości przypadków zmiany temperatury nie są wykrywane w sposób bezpośredni, lecz poprzez konsekwencje zmian dokonanych w wyniku działania nieoptymalnej temperatury [65]. W związku z tym, odpowiedź na bodziec temperaturowy jest opóźniony, a efekt regulatorowy odłożony w czasie. Natomiast szybką i bezpośrednią odpowiedzią charakteryzują się sekwencje zwane termometrami RNA lub termosensorymi (RNATs, ang. *RNA thermometers*). Sekwencje te w odpowiedzi na zmianę temperatury ulegają rearanżacjom strukturalnym w taki sposób, że w niższej/wyższej temperaturze, sekwencja RBS lub SD staje się mniej lub bardziej dostępna dla aparatu translacyjnego komórki, co istotnie modyfikuje poziom biosyntezy danego białka. RNATs charakteryzują się bardzo dużą precyzją działania i potrafią wykryć i odpowiedzieć na różnicę temperatur równą 1°C [66].

Opisuje się dwa rodzaje (modele) termosensory. Pierwszy z nich to model zamka błyskawicznego (ang. *zipper model*), gdzie poszczególne pary zasad tworzące strukturę dwuniciową ulegają stopniowemu rozpleceniu wraz ze wzrostem temperatury. Przykładem takiego termometru RNA, a zarazem najczęstszym, jest element ROSE (ang. *repression of heat shock gene expression*) [67]. Element ten składa się średnio z 60 – 70 nukleotydów tworzących kilka struktur spinki, z czego ostatnia spinka od końca 3', obejmująca sekwencję SD, jest stabilna tylko w niskiej temperaturze. Niestabilność ta wynika z obecności kilku niekanonicznych par zasad. Sekwencja SD jest całkowicie zamknięta w strukturze dwuniciowej w temperaturze 30°C, częściowo otwarta w 37°C umożliwiając częściową translację, by ostatecznie, w temperaturze 42°C, ulec całkowitemu rozpleceniu, zapewniając pełny dostęp rybosomu do sekwencji SD [68].

Innym rodzajem RNAT działającym zgodnie z modelem zamka błyskawicznego kontrolującym niektóre geny wirulencji oraz geny szoku cieplnego jest termometr FourU (4U, ang. *fourU element*). Element taki występuje w 5'UTR genu *lcrF* kodującego czynnik wirulencji u *Yersinia pestis* [69]. Ekspresja genu *lcrF* zachodzi w temperaturze 37°C,

ale nie zachodzi w niższych temperaturach. Wzrost temperatury do 37°C jest dla bakterii sygnałem, że znajduje się we wnętrzu organizmu ssaka, co stanowi doskonałą okazję do rozpoczęcia infekcji. Termometr FourU charakteryzuje się prostą budową dwóch spinek do włosów długości odpowiednio 57 i 46 nt (w przypadku *Y. pestis*). W drugiej spince znajduje się wysoce zakonserwowany trakt czterech urydyn komplementarnych z sekwencją 5'-AGGA-3', stanowiącą fragment sekwencji SD. To właśnie ten element jest wrażliwy termicznie i ulega rozpleceniu w podwyższonej temperaturze.

Drugi model RNAT to model przełącznika (ang. *RNA switch*), gdzie dwie odrębne i ekskluzywne struktury drugorzędowe występują w różnych temperaturach. Tego typu mechanizm kontroluje ekspresję genu *cspA* (ang. *cold shock protein A*) w *E. coli*. Transkrypt tego genu w temperaturze 37°C jest bardzo niestabilny (okres półtrwania to zaledwie 20 sekund), a SD jest zamknięta w strukturze dwuniciowej [70]. Natomiast po obniżeniu temperatury o 10°C następuje reorganizacja struktury mRNA, co skutkuje znacznie wydłużonym czasem półtrwania (30 minut). Ponadto SD staje się częściowo otwarta i dostępna dla rybosomu.

2.1.7.3 pH-metry RNA

Ciekawym elementem regulatorowym, reagującym na zmiany pH są pH-metry RNA (PRE, ang. *pH-responsive RNA element*). Taki element został odkryty w 2009 roku u bakterii *E. coli* w sekwencji liderowej genu *alx* [71]. Prawdopodobną funkcją tego genu jest regulacja potencjału oksydoredukcyjnego środowiska komórki bakterii. W przeciwieństwie do termometrów RNA, wzrost pH nie powoduje bezpośredniej zmiany struktury RNA, który to decydowałby o dalszej ekspresji informacji genetycznej. W warunkach optymalnych, czyli gdy pH środowiska komórkowego jest bliskie neutralnego, transkrypcja przebiega w normalnym tempie, przez co element liderowy tworzy strukturę, w której sekwencja SD jest zamknięta i przybiera formę dwuniciową, co hamuje translację. W warunkach podwyższonego pH do ponad 8,0 w trakcie transkrypcji RNAP zatrzymuje się w kilku miejscach, co pozwala na uformowanie się alternatywnej, aktywnej formy transkryptu, z dostępną strukturą SD. Intrygującą kwestią jest mechanizm hamowania transkrypcji w warunkach zasadowego pH. Prawdopodobną przyczyną jest zwiększona niestabilność dupleksu RNA:DNA, zmienione oddziaływania z białkami regulatorowymi oraz zmiana procesywności samej polimerazy RNA.

2.1.7.4 Elementy T-box

Unikatową klasę regulatorowych RNA stanowią elementy T-box. Są to *cis*-regulatorowe sekwencje, występujące u bakterii Gram-dodatnich, które dzięki strukturze wiążą nieaminoacylowany tRNA. Obecność takich cząsteczek w komórce jest sygnałem niedoboru aminokwasów, dlatego oddziaływanie T-box:tRNA powoduje aktywację genów prowadzących do uzupełnienia zapasów aminokwasów. Należą do nich geny biosyntezy aminokwasów, transportery, aminoacylo-tRNA sytetazy (aaRS) oraz inne geny regulatorowe [72].

Rozpoznanie właściwego tRNA przez T-box możliwe jest dzięki kilku specyficznym interakcjom, do jakich dochodzi między tRNA a T-box'em. Generalnie elementy T-box zbudowane są z trzech struktur spinek do włosów połączonych pętlą centralną oraz pseudowęzłem [73]. W pętli wewnętrznej spinki I zlokalizowana jest przypominająca kodon sekwencja specyfikatora (ang. *specifier sequence*), która oddziałuje z antykodonem tRNA. Sekwencja ta koresponduje z aminokwasem kodowanym poniżej elementu T-box i jest odpowiedzialna za specyficzność względem danego tRNA. Kolejnym istotnym elementem jest sekwencja antyterminatora pełniąca bardzo istotną funkcję dla kontroli ekspresji genu. Zawiera ona sekwencję konsensusową 5'-UGGN-3', oddziałującą na zasadzie komplementarności z ramieniem akceptorowym NCCA. W ten sposób sprawdzana jest obecność aminokwasu osadzonego na cząsteczce tRNA i obecność nawet najmniejszego aminokwasu, jakim jest glicyna wyklucza możliwość oddziaływania z antyterminatorem. Natomiast związanie aminoacylo-tRNA przez T-box powoduje zmianę struktury w taki sposób, że antyterminator wyklucza możliwość powstania spinki terminacyjnej, uruchamiając ekspresję genów znajdujących się poniżej. Do niedawna uważano, że dwa wyżej wymienione miejsca oddziaływać są jedynymi występującymi w elementach T-box. Jak się jednak okazało, sekwencja liderowa T-box tworzy dodatkowe oddziaływania z cząsteczką tRNA, niespecyficzne względem konkretnego tRNA [74]. Pętla apikalna wraz z wybrzuszeniem (ang. *bulge*) spinki I oddziałują z ramieniem D i T cząsteczki tRNA. Oddziaływanie to zdaje się być istotne dla poprawnego przebiegu antyterminacji, choć jego rola wciąż pozostaje zagadką. Zdecydowana większość elementów T-box należy do ryboprzełączników transkrypcyjnych, a jedynie drobna ich część stanowi ryboprzełączniki translacyjne [75]. T-box są najbardziej charakterystyczne dla typu Firmicutes (np. *B. subtilis*). Mogą one kontrolować ekspresję ponad 1% genów i reprezentują wszystkie 20 aminokwasów kanonicznych [72].

2.2 Ryboprzełączniki

Powyższe rozdziały pokazały, że zdolność do reagowania na zmieniające się warunki życia poprzez regulację ekspresji genów jest fundamentalna dla przetrwania wszystkich żywych organizmów, z bakteriami na czele. Jednocześnie zróżnicowanie owych mechanizmów regulatorowych pozwalają w precyzyjny i dynamiczny sposób reagować na wszelkie negatywne zmiany w ich środowisku naturalnym, stanowiące zagrożenie dla życia bakterii lub maksymalizować wykorzystanie dostępnych zasobów w sprzyjających okolicznościach. A wszystko to poprzez wyciszenie bądź aktywację ekspresji poszczególnych genów i biosyntezę wyspecjalizowanych białek. Olbrzymia liczebność oraz różnorodność gatunków bakterii stanowi dowód doskonałych zdolności adaptacyjnych pozwalających dopasować się do niemal wszelkich warunków życia. Do realizacji swoich biologicznych celów bakterie wykorzystują pełen repertuar wyrafinowanych mechanizmów kontroli ekspresji genów. Cechą charakterystyczną tych systemów jest jednak fakt, że do swojego działania wymagają na którymś etapie obecności białek. Wyjątkowym mechanizmem w tej materii są ryboprzełączniki (ang. *riboswitches*), które ze względu na swoje unikatowe własności, zasługują na szczególną uwagę.

Ryboprzełączniki są to silnie ustrukturyzowane domeny mRNA, zdolne do bezpośredniego wiązania niskocząsteczkowych metabolitów, co w konsekwencji prowadzi do rearanżacji struktury drugorzędowej RNA i zmiany poziomu ekspresji danego genu w układzie *cis*. Tak scharakteryzowane ryboprzełączniki są zgodne z definicją zaproponowaną przez Ronalda Breaker'a w 2002 roku [76], która klasyfikuje je jako rodzaj atenuacji. Jest to zarazem najwęższa definicja ryboprzełącznika, uwzględniająca wyłącznie oddziaływanie RNA z niskocząsteczkowymi metabolitami (do 900 Da, graniczna wartość dyfuzji przez błony biologiczne). Często rozszerza się ów opis o elementy T-box wiążące tRNA, których masa najczęściej waha się między 25 kDa a 30 kDa, więc nie mogą być zaliczone do niskocząsteczkowych metabolitów. Najszersza definicja, choć relatywnie rzadko używana, obejmuje wszystkie mechanizmy regulacji ekspresji oparte o zmianę struktury RNA pod wpływem dowolnych bodźców fizjologicznych (oprócz wyżej wymienionych cząsteczek uwzględnia się także czynniki fizyczne jak temperatura w przypadku termometrów RNA, czy też pH w przypadku sensorów pH) [77]. Takie ujęcie ryboprzełączników przypomina opis atenuacji, z wyjątkiem klasycznych atenuatorów aminokwasowych. Na potrzeby niniejszej pracy, zasadniczo używana będzie klasyczna (najwęższa) definicja ryboprzełącznika, czyli struktura RNA, która wiąże tylko niskocząsteczkowe metabolity, stanowiąca rodzaj atenuacji.

2.2.1 Historia odkrycia ryboprzełączników

Za początek badań nad kontrolą ekspresji genów u organizmów prokariotycznych można uznać rok 1960, kiedy to pojawiła się pierwsza praca opisująca działanie operonu laktozowego kontrolowanego represorem [18]. O doniosłości odkrycia świadczy fakt, że w 1965 roku została za to odkrycie przyznana Nagroda Nobla w dziedzinie fizjologii lub medycyny. Od tego momentu odkryto wiele kolejnych genów czy operonów kontrolowanych za pośrednictwem białek. Z czasem okazało się, że nie tylko białka potrafią pełnić funkcje regulatorowe w komórce, ale także inne cząsteczki.

W 1974 roku wykazano istnienie struktury drugorzędowej w cząsteczce RNA bakteriofaga R18 [78]. Co więcej, pokazano, że ten fragment RNA jest specyficznym rozpoznawany i wiązany przez wirusowe białko płaszczka, jednak nie za pośrednictwem sekwencji (jak wcześniej sądzono) a struktury drugorzędowej RNA. Był to pierwszy bezpośredni dowód istnienia specyficznej struktury RNA rozpoznawanej przez konkretne białko i pełniącej funkcję biologiczną podczas translacji.

Badania Charlesa Yanofsky'ego prowadzone w latach 70 i na początku lat 80 XX wieku nad cząsteczką mRNA operonu tryptofanowego u *E.coli* doprowadziły do przełomowego odkrycia zjawiska atenuacji u bakterii [63,79,80]. W tym wypadku sygnał terminacji transkrypcji był zapisany w strukturze regionów niekodujących 5'UTR, choć do pełnej egzekucji owego sygnału niezbędny jest udział rybosomu (polarność transkrypcyjna).

Kolejne badania rozszerzyły jeszcze bardziej wiedzę na temat właściwości RNA. Jak się wkrótce okazało, RNA nie tylko pełni funkcję przekazującą informację genetyczną z DNA na białka. W 1982 roku Thomas Cech odkrył, że RNA może posiadać także funkcje katalityczne [81]. Jego badania nad orzęskiem *Tetrahymena thermophila* doprowadziły do odkrycia samowycinających się w obecności GTP intronów grupy I – pierwszego poznanego rybozomu. Rok później Sidney Altman badając bakterię *E. coli* zidentyfikował właściwości katalityczne RNAzy P – enzymu (endorybonukleazy) odpowiedzialnego za generowanie końca 5' tRNA [82]. Choć zbudowana jest ona zarówno z łańcucha RNA jak i polipeptydu (oba elementy są niezbędne dla zachowania funkcji enzymu), to wykazano, że właściwości katalityczne pochodzą wyłącznie od cząsteczki RNA (białko pełni jedyne funkcję strukturalną). Był to pierwszy odkryty rybozym, zdolny do wielokrotnego obrotu; jednocześnie jeden z dwóch dotąd poznanych (drugim takim rybozymem okazał się być rybosom). Kilka lat później odkryto inną właściwość kwasów nukleinowych, jaką jest specyficzne wiązanie docelowych cząsteczek.

W roku 1990 Jack Szostak wraz ze współpracownikami przy użyciu selekcji *in vitro* (SELEX, ang. *systematic evolution of ligands by exponential enrichment*) zdołał wygenerować i zsyntetyzować pierwszą cząsteczkę oligonukleotydu DNA (długości 100 nt) wiążącą specyficznie i z wysokim powinowactwem barwniki organiczne [83]. W tym samym roku Laboratorium Larry'ego Gold'a, przy użyciu technologii SELEX zsyntezowało oligonukleotydy RNA oddziałujące z wirusową polimerazą DNA T4 [84]. Dwa lata później firma Gilead Sciences wygenerowała oligonukleotyd DNA wiążący naturalnie występującą cząsteczkę – trombinę [85]. Cząsteczki te zostały nazwane aptamerami, czyli oligonukleotydami posiadającymi zdolność do specyficznego wiązania niskocząsteczkowych ligandów. Z czasem definicję aptameru rozszerzono na syntetyczne oligonukleotydy XNA (ang. *xeno nucleic acid*) oraz oligopeptydy. Jednak w tamtym czasie nie były znane żadne naturalnie występujące aptamery.

Badania prowadzone od lat 70 nad witaminami u bakterii wykazały, że szlaki biosyntezy witamin mogą być regulowane przez stężenie ich produktów końcowych lub ich pochodnych [86,87]. Wzrost stężenia witamin w komórce powodował zahamowanie transportu do komórki oraz wyciszenie ekspresji niektórych genów związanych z biosyntezą czy metabolizmem owych witamin. Jednak pomimo lat badań, dla szlaku biosyntezy trzech witamin u niektórych bakterii tj. tiaminy (witamina B1) [88], ryboflawiny (witamina B2) [89] i kobalaminy (witamina B12) [90] nie udało się zidentyfikować żadnych białek regulatorowych. Jednakże regiony niekodujące z końca 5' owych transkryptów okazały się być silnie ustrukturyzowane, zakonserwowane ewolucyjnie, a mutacje wprowadzone w tym regionie powodowały zniesienie regulacji ze strony witamin, powodując znaczą nadekspresję genów /operonów.

Co więcej, na przełomie XX i XXI wieku pojawiły się pierwsze doniesienia sugerujące, że regiony niekodujące niektórych transkryptów związanych z biosyntezą witamin mogą bezpośrednio wykrywać pochodne witamin [88,91]. Dokładniejsze badania metodą próbkowania strukturalnego wykazały ponadto, że wiązanie owych ligandów przez RNA powoduje zmiany strukturalne w rejonie niekodującym i wyciszenie ekspresji genów [92]. Pomimo udanego eksperymentu w warunkach *in vivo*, wraz z suplementacją adenozylokobalaminy (aktywna forma kobalaminy, AdoCbl), badaczom nie udało się uzyskać pozytywnych rezultatów w warunkach *in vitro*, a co za tym idzie wykazać bezpośredniego oddziaływania AdoCbl z mRNA. Brak wiązania kobalaminy do sekwencji liderowej mRNA w warunkach *in vitro* oraz brak zmian struktury błędnie zasugerowały istnienie hipotetycznego komórkowego czynnika pośredniczącego w oddziaływaniach, który mógł zostać pominięty w eksperymencie *in vitro*. Wynik taki znalazł uzasadnienie w pracy Nou i Kadner'a, którzy także pracowali nad kontrolą ekspresji genów

metabolizmu kobalaminy [93]. Okazało się, że obecność kobalaminy wpływa na wiązanie rybosomu do mRNA, ale tylko jeżeli rybosomy podczas izolacji były przepłukiwane buforem o niskim stężeniu soli. Przepłukiwanie rybosomów wysokim stężeniem soli sprawiało, że traciły one zdolność wiązania RBS, jednak odzyskiwały ją po ponownym połączeniu rybosomów z materiałem odzyskanym podczas płukania. Sugerowało to istnienie czynnika wiążącego rybosom (ang. *ribosome-associated factor*), który podczas przygotowywania rybosomów był wypłukiwany wraz buforem o wysokim stężeniu soli. Owego hipotetycznego czynnika nigdy nie udało się zidentyfikować.

Pierwsze eksperymentalne potwierdzenie bezpośredniego oddziaływania niskocząsteczkowych metabolitów z RNA, a zarazem odkrycie pierwszych naturalnie występujących aptamerów zostało dokonane w 2002 roku przez dwa zespoły: Ronald'a Breaker'a i Evgeny Nudler'a. Zdołali oni wykazać, że AdoCbl [76], mononukleotyd flavinowy (FMN) [94] i pirofosforan tiaminy (TPP) [95] są bezpośrednio wiązane przez sekwencje liderowe odpowiednich RNA i kontrolują ekspresję operonów witamin, odpowiednio B12, B2, B1. Breaker jako pierwszy użył terminu „ryboprzełącznik” na określenie nowoodkrytych sekwencji. Wykazał, że po suplementacji odpowiednimi witaminami nie tylko wyciszeniu ulega ekspresja danych operonów, ale także, że towarzyszy temu zmiana struktury w regionie 5'UTR. Co więcej, identyczne wyniki uzyskano w eksperymentach *in vitro*, co pozwoliło wykluczyć obecność innych niż RNA czynników biorących udział w zmianie struktury i regulacji ekspresji genów. Badaczom nie umknął uwadze również fakt, że ryboprzełączniki, jako elementy regulatorowe wymagające do swojego działania jedynie produktów końcowych szlaków metabolicznych, stanowią najprostszy możliwy układ samoregulacyjny, a co za tym idzie prawdopodobnie najstarszy mechanizm kontroli ekspresji genów. Dwa lata później, w roku 2004 istnienie oraz architektura ryboprzełączników zostały dodatkowo potwierdzone przez rozwiązanie pierwszych struktur krystalicznych, zarówno w stanie wolnym, jak i związanym [96,97]. Do dziś odkrytych i eksperymentalnie potwierdzonych jest około różnych 45 klas ryboprzełączników (Tabela 2) [98].

2.2.2 Ryboprzełączniki a hipoteza świata RNA

Biolodzy od pokoleń próbują rozwiązać jedną z największych tajemnic świata organizmów żywych, jakim jest powstanie życia. Niezwykle istotnym problemem w tej kwestii jest pewien paradoks dotyczący ewolucji chemicznej. Otóż współcześnie przyjmuje się, że nośnikiem informacji genetycznej jest DNA, który koduje wszystkie białka niezbędne do replikacji DNA. Paradoks polega na tym, że żadna z cząsteczek nie potrafi się replikować samoczynnie – obie cząsteczki są niezbędne do samopowielenia, zatem nierozstrzygalnym zdaje się być problem dotyczący pierwszeństwa pochodzenia którejs z nich. Uważa się, że rozwiązaniem tego paradoksu jest RNA, który mógłby być pierwotną cząsteczką względem DNA czy białek, posiadającą zarówno zdolności kodowania informacji genetycznej jak i zdolności enzymatyczne. Spośród wielu argumentów przemawiających za słusznością tej hipotezy jednym z najmocniejszych dowodów jest istnienie ryboprzełączników.

Ryboprzełączniki pozwalają na wydajną a jednocześnie najprostszą możliwą kontrolę ekspresji genów, wykorzystując do tego celu jedynie własną strukturę i metabolit, będący produktem ekspresji kontrolowanego przez siebie genu. Ponadto ryboprzełączniki, a zwłaszcza ryboprzełącznik TPP, są rozpowszechnione i ewolucyjnie zakonserwowane wśród wszystkich domen życia, co wskazuje na ich starożytne pochodzenie. Co niezwykle istotne, znaczną część ligandów stanowią cząsteczki będące rybonukleotydami lub ich pochodnymi i tego typu ryboprzełączniki są najbardziej rozpowszechnionymi klasami z największą liczbą reprezentantów. Z powyższych względów przyjęło się sądzić, że ryboprzełączniki wraz z rybosomem i innymi rybozymami mogą stanowić swoisty molekularny relikwitu świata RNA [99].

2.2.3 Różnorodność i występowanie ryboprzełączników

Ryboprzełączniki dzielimy na klasy ze względu na strukturę oraz wiązany przez nie ligand (Tabela 2). Dlatego też niektóre ryboprzełączniki oddziałujące z tym samym ligandem mogą należeć do różnych klas, jak to ma miejsce w przypadku ryboprzełącznika S-adenozylometioninowego (SAM). Do tej pory poznano sześć różnych klas ryboprzełącznika SAM oraz SAM-SAH (S-adenozylhomocysteina) [100]. Z drugiej zaś strony istnieją ryboprzełączniki o identycznej strukturze różniące się zaledwie jednym nukleotydem w sekwencji aptameru, co wystarczy by całkowicie zmienić specyficzność względem ligandu. Takim przykładem może być ryboprzełącznik guaninowy, który oddziałuje z trzema nukleotydami aptameru: U22, U51, C74, natomiast substytucja C74>U74 powoduje przełączenie specyficzności z guaninę na adeninę [101]. Pozostałe alteracje w powyższej trójce nukleotydów, obecne w niektórych wariantach ryboprzełącznika guaninowego, prawdopodobnie również zmieniają specyficzność w kierunku jeszcze niepoznanych jak dotąd ligandów. Metabolity, które są rozpoznawane przez poszczególne ryboprzełączniki należą do wielu grup związków chemicznych, takich jak koenzymy (w tym witaminy i ich pochodne), nukleotydy i ich pochodne, cząsteczki sygnałowe, jony, czy też aminokwasy.

Klasy ryboprzełączników różnią się istotnie zarówno frekwencją jak i występowaniem filogenetycznym. Najczęstszym i najpowszechniejszym ryboprzełącznikiem, obecnym w niemal wszystkich liniach bakterii jest ryboprzełącznik TPP (ligandem jest pirofosforan tiaminy). Bioinformatyczna analiza wykazała obecność w metagenomach bakteryjnych niemal 16 700 różnych reprezentantów ryboprzełącznika TPP [98]. Bywają też klasy ryboprzełączników niezwykle rzadkie, jak choćby ryboprzełącznik 2'-deoksyguanozynowy I (2'-dG-I), obecny jedynie w czterech kopiach, wyłącznie u bakterii *Mesoplasma florum* [102]. Zróżnicowane jest także wykorzystywanie ryboprzełączników przez różne grupy bakterii. Typ Firmicutes wykorzystuje je bardzo powszechnie, z 13 500 reprezentantami należącymi do niemal wszystkich znanych klas ryboprzełączników, natomiast w genomach takich bakterii jak Chlamydiae ryboprzełączniki, jako element regulatorowy występują niezwykle rzadko – zaledwie 8 reprezentantów należących do dwóch klas.

Znaczną część ligandów ryboprzełączników stanowią cząsteczki będące pochodną RNA. Ta obserwacja potwierdza starożytne pochodzenia ryboprzełączników, jako reliktu z czasów „świata RNA”. Ryboprzełączniki w przeważającej większości występują u bakterii, jednak niektóre klasy są także charakterystyczne dla innych domen życia.

U Archea licznie występuje ryboprzełącznik TPP oraz mniej licznie – fluorkowy (F). Do 2013 roku uważano, że na tym zamyka się lista ryboprzełączników u archeonów [103], jednak okazało się, że sporadycznie możemy znaleźć ryboprzełączniki wiążące takie ligandy jak: mononukleotyd flawinowy (FMN), jon magnezowy-I (Mg^{2+} -I) i guanidynowy-II. Ryboprzełącznik TPP jest także jedynym znanym ryboprzełącznikiem występującym u eukariotów, zwłaszcza w królestwie roślin i grzybów. 72 takie sekwencje zidentyfikowano u grzybów (np. *Neurospora crassa*, *Aspergillus oryzae*), 23 u roślin wyższych (np. *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Pinus taeda*), cztery u alg (np. *Chlamydomonas reinhardtii*) i siedem u Protista *Perkinsus marinus*. Uważa się, że ryboprzełączniki nie występują w królestwie zwierząt. Jedynym jak dotąd znanym wyjątkiem to pojedyncza kopia ryboprzełącznika TPP u stułbi *Hydra magnipapillata*. Ponadto pojedyncze kopie ryboprzełącznika wiążącego cykliczne cząsteczki c-di-GMP-I [104] oraz aminokwas glutaminę wykryto w genomach wirusowych [98]. Uważa się, że około 4% genów i operonów bakteryjnych może być kontrolowanych za pośrednictwem ryboprzełączników [105].

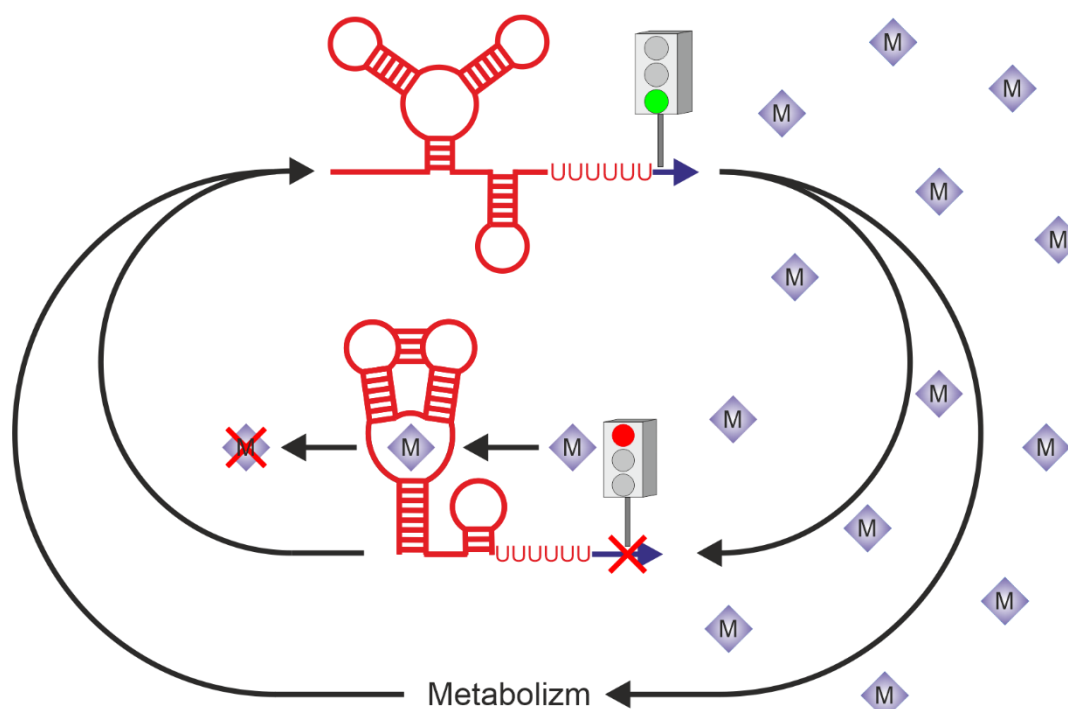
Jak dotąd nie są znane żadne ryboprzełączniki występujące u człowieka, chociaż zidentyfikowano sekwencje RNA zdolne do binarnej zmiany swojej struktury pod wpływem bodźców zewnętrznych. Przykładem takiej regulatorowej RNA jest sekwencja zlokalizowana w 3'UTR transkryptu czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego A (VEGF, ang. *vascular endothelial growth factor*) w komórkach szpiku, który reaguje na stres hipoksji oraz interferon γ za pośrednictwem białek odpowiednio hnRNP (ang. *heterogenous nuclear ribonucleoprotein L*) oraz kompleks GAIT (ang. *IFN- γ -activated inhibitor of translation*) [106]. W normalnych warunkach białko hnRNP L ulega degradacji, co umożliwia kompleksowi GAIT przyłączenie się do struktury RNA i blokowanie translacji. Natomiast w warunkach hipoksji białko hnRNP L pozostaje na wysokim poziomie i samo wiąże się do 3'UTR, wykluczając oddziaływanie z kompleksem GAIT. I chociaż zmiana struktury pod wpływem związków chemicznych jest analogiczna jak w przypadku ryboprzełączników (podobnie jak efekt regulatorowy), to jednak zachodzi on w sposób niezależny od stężenia metabolitu będącego rezultatem ekspresji kontrolowanego mRNA, a w odpowiedzi na sygnały pochodzące z zewnątrz pośredniczą białka.

Tabela 2. Lista znanych klas ryboprzelączników.

Nr	Grupa	Klasa	Ligand	Reprezentanci	Referencje
1	Koenzymy	TPP	Pirofosforan Tiaminy (TPP, B1)	16 690	[95]
2		AboCbl	Adenozylokobalamina (AdoCbl, B12)	14 336	[76]
3		AqCbl	Akwakobalamina (AqCbl)	582	[107]
4		SAM-I	S-adenozylometionina (SAM)	6 749	[108]
5		SAM-IV	S-adenozylometionina (SAM)	732	[109]
6		SAM-I/IV	S-adenozylometionina (SAM)	1 184	[110]
7		SAM-II	S-adenozylometionina (SAM)	6 095	[111]
8		SAM-V	S-adenozylometionina (SAM)	982	[112]
9		SAM-III	S-adenozylometionina (SAM)	936	[113]
10		SAM-VI	S-adenozylometionina (SAM)	17	[100]
11		SAM/SAH	S-adenozylometionina (SAM), S-adenozylhomocysteina(SAH)	139	[110]
12		SAH	S-adenozylhomocysteina (SAH)	926	[114]
13		FMN	Mononukleotyd flawinowy (FMN, B2)	5 544	[115]
14		FMN Var	Analog mononukleotydu flawinowego (FMN, B2)	2	[101]
15		THF-I	Tetrahydrofolian (THF)	1 433	[116]
16		THF-II	Tetrahydrofolian (THF)	86	[117]
17		Moco	Kofaktor molibdenowy (Moco)	1 021	[118]
18		Wco	Kofaktor wolframowy (Wco, Tuco)	715	[118]
19	Cząsteczki sygnalowe	ZTP	Rybonukleotyd aminoimidazolokarboksyamidu (ZTP, AICAR)	2 229	[119]
20		c-di-GMP-I	5'-3'-cykliczny di-GMP (c-di-GMP)	6 414	[104]
21		c-di-GMP-II	5'-3'-cykliczny di-GMP (c-di-GMP)	1 147	[120]
22		c-AMP-GMP	5'-3'-cykliczny AMP-GMP (c-AMP-GMP)	107	[121]
23		c-di-AMP	5'-3'-cykliczny di-AMP (c-di-AMP)	3 098	[122]
24		ppGpp	Tetrafosforan Guanozyny (ppGpp)	105	[123]
25	Aminokwasy	Glutaminowy	Glutamina (Gln, Q)	1 567	[124]
26		Glicynowy	Glicyna (Gly, G)	7 516	[125]
27		Lizynowy	Lizyna (Lys, K)	4 114	[126]
28	Nukleotydy i pochodne	Guaninowy	Guanina (G)	2 334	[127]
29		Adeninowy	Adenina (A)	99	[127]
30		2'-dG-I	2'-deoksyguanozyna (2'-dG)	4	[102]
31		2'-dG-II	2'-deoksyguanozyna (2'-dG)	12	[101]
32		PreQ ₁ -I	Prekweozyna ₁ (PreQ ₁)	2 387	[128]
33		PreQ ₁ -II	Prekweozyna ₁ (PreQ ₁)	263	[129]
34		PreQ ₁ -III	Prekweozyna ₁ (PreQ ₁)	86	[130]
35		PRPP	Pirofosforan fosforybozylu (PRPP)	257	[131]
36		(d)ADP/(d)CDP	di-fosforany nukleozydów: ADP, dADP, CDP, dCDP	46	[132]
37	Jony	Mg ²⁺ -I	Kation magnezu (Mg ²⁺)	971	[133]
38		Mg ²⁺ -II	Kation magnezu (Mg ²⁺)	101	[134]
39		Ni ²⁺ /Co ²⁺	Kation niklu (Ni ²⁺), Kation kobaltu (Co ²⁺)	491	[135]
40		F ⁻	Anion fluoru (F ⁻)	2 583	[136]
41		Mn ²⁺	Kation manganu (Mn ²⁺)	4 383	[133]
42	Inne metabolity	glmS	Glukozamino-6-fosforan (GlcN-6-P)	2 126	[137]
43		Azaaromatyczny	Związki azaaromatyczne	743	[138]
44		Guanidynowy-I	Guanidyna	867	[139]
45		Guanidynowy-II	Guanidyna	610	[140]
46		Guanidynowy-III	Guanidyna	237	[141]

2.2.4 Mechanizm działania ryboprzełączników

Większość ryboprzełączników działa na zasadzie sprzężeń zwrotnych ujemnych, tj. w wyniku ekspresji danego mRNA powstaje metabolit (bądź jest aktywnie importowany do wnętrza komórki), który to po osiągnięciu stężenia granicznego zaczyna oddziaływać z domeną aptamerową, co prowadzi do wyciszenia ekspresji tego mRNA (Rysunek 5). W konsekwencji prowadzi to do stabilizacji stężenia tego metabolitu w komórce na optymalnym poziomie. Tego typu szlak regulatorowy jest charakterystyczny dla genów odpowiedzialnych za import, biosyntezę lub metabolizm niezbędnych cząsteczek. Natomiast pozytywna regulacja z udziałem ryboprzełączników występuje rzadziej i charakteryzują geny zaangażowane w degradację lub eksport nadmiernych lub toksycznych związków chemicznych.



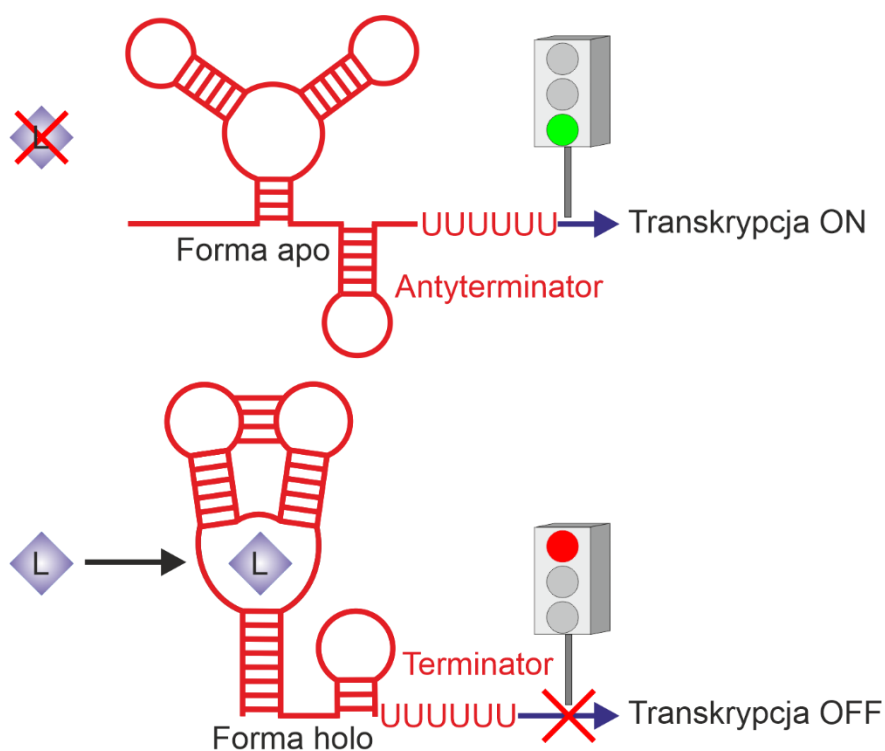
Rysunek 5. Sprzężenia zwrotne ujemne z udziałem ryboprzełączników. M – metabolit (ligand).

Ryboprzełączniki wykorzystują szerokie spektrum mechanizmów kontroli ekspresji genów działających na różnych etapach. I tak, interakcja ligand-ryboprzełącznik może zarówno wyciszać jak i aktywować ekspresję genu będącego pod kontrolą ryboprzełącznika. Regulacja może się odbywać na etapach transkrypcji, translacji, degradacji mRNA, splicingu oraz jako sRNA [142]. Wyraźnie obserwowana jest preferencja poszczególnych grup organizmów do konkretnych mechanizmów kontroli ekspresji za pośrednictwem ryboprzełączników, co odzwierciedla ewolucyjnie niezależne losy ryboprzełączników. Przeważającym mechanizmem

działania ryboprzełączników u bakterii Gram-dodatnich jest terminacja transkrypcji, u bakterii Gram-ujemnych – kontrola translacji, organizmy eukariotyczne zaś stosują niemal wyłącznie kontrolę splicingu [143].

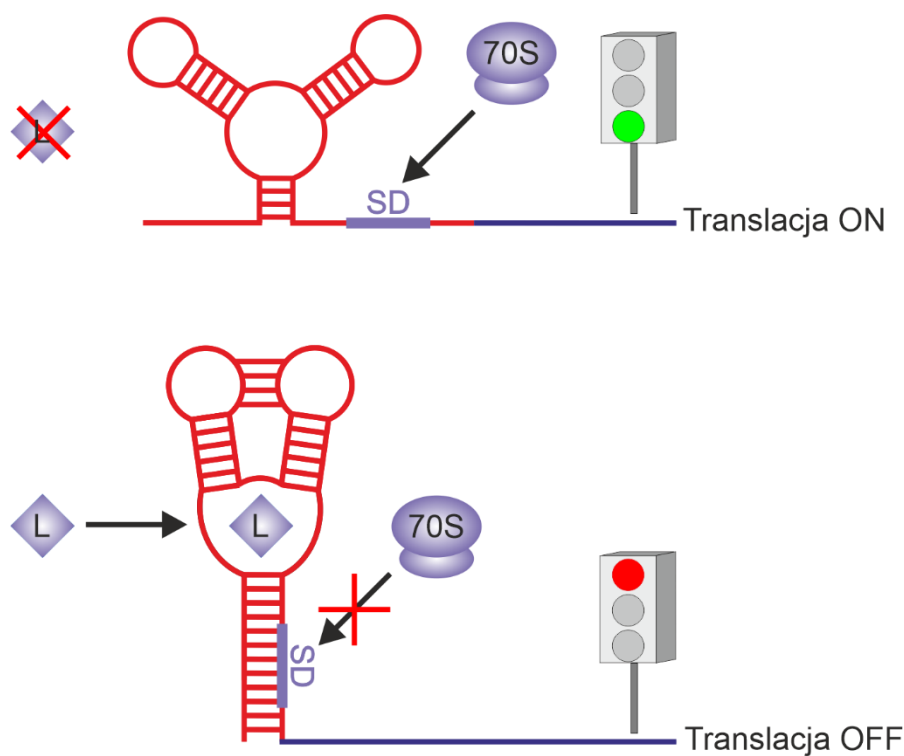
2.2.4.1 Ryboprzełączniki prokariotyczne

Najbardziej rozpowszechnionym mechanizmem regulacji ekspresji genów przez ryboprzełączniki u prokariotów jest przedwczesna terminacja transkrypcji. Ryboprzełącznik po związaniu ligandu (forma holo) przyjmuje alternatywną strukturę spinki terminacyjnej, po której następuje trakt poli-U. W konsekwencji, transkrypcja zostaje przedwcześnie zahamowana i zamiast pełnej długości funkcjonalnego transkryptu powstaje produkt skrócony (Rysunek 6). Obok klasycznej, wewnętrznej terminacji transkrypcji ryboprzełączniki niekiedy wykorzystują także Rho-zależną terminację. Za przykład może posłużyć gen *ribB* u *E. coli* kontrolowany przez ryboprzełącznik FMN. Związanie ligandu powoduje uwolnienie miejsca wiązania białka Rho, które przemieszczając się wzdłuż nici RNA napotyka RNAP uwalniając niekompletny transkrypt [144].



Rysunek 6. Mechanizm działania ryboprzełączników transkrypcyjnych. L – ligand.

Innym częstym mechanizmem kontroli ekspresji genów zależnym od ryboprzełączników jest kontrola translacji. W tym wypadku po przyłączeniu ligandu sekwencja SD ulega uwolnieniu bądź sekwestracji w strukturze dwuniciowej, przez co staje się dostępna/niedostępna dla aparatu translacyjnego komórki (Rysunek 7). Przykładem może być pierwszy odkryty ryboprzełącznik AdoCbl zlokalizowany w sekwencji liderowej mRNA *btuB* u *E.coli* kodującej białko transportera witaminy B12. Związanie AdoCbl przed domenę aptamerową powoduje wyciszenie ekspresji tego genu, czyniąc sekwencję SD niedostępną dla rybosomów [76]. Zdarza się, że ten sam ryboprzełącznik, kontrolujący ten sam gen u jednej bakterii kontroluje jego ekspresję przez terminację transkrypcji (*B. subtilis*) a u innej translację oraz stabilność mRNA (*E.coli*) [145].



Rysunek 7. Mechanizm działania ryboprzełączników translacyjnych. L – ligand, 70S – rybosom bakteryjny, SD – sekwencja Shine-Dalgarno.

Zupełnie inny mechanizm kontroli ekspresji jest wykorzystywany przez ryboprzełącznik wiążący glukozamino-6-fosforan (GlcN-6-P) zlokalizowany w genie *glmS* u *B. subtilis* kodującego aminotransferazę GlcN-6-P [137]. Funkcjonuje on jednocześnie, jako ryboprzełącznik oraz rybozym, przeprowadzający autokatalityczne cięcie własnej cząsteczki wykorzystując ligand GlcN-6P jako katalizator. Taki przecięty produkt ulega następnie szybkiej degradacji przez RNazę J. Inne katalityczne ryboprzełączniki po związaniu danego metabolitu przeprowadzają reakcję alternatywnego wycinania intronów w pre-mRNA, przez co z transkryptu zostaje usunięta sekwencja RBS [145].

Ryboprzełączniki mogą także kontrolować splicing. U bakterii *Clostridium difficile* samowycinający się intron grupy I jest sprzężony z ryboprzełącznikiem wiążącym cząsteczkę sygnałową cykliczny diguanozynomonofosforan (c-di-GMP) [120]. W formie apo zachodzi wycięcie intronu z użyciem dystalnego miejsca splicingowego, czego rezultatem jest skrócony transkrypt z niekompletnym miejscem SD. Natomiast w formie holo, preferowane jest proksymalne miejsce splicingowe połączone z jednoczesnym samowycięciem się krótkiego intronu w taki sposób, że dwie części rozdzielonego wcześniej intronu zostają połączone, co umożliwia powstanie miejsca SD i zajście prawidłowej translacji.

Choć zdecydowana większość ryboprzełączników działa w układzie *cis*, w wyjątkowych przypadkach mogą regulować ekspresję genów w układzie *trans*. U bakterii *Listeria monocytogenes* dwa geny metabolizmu siarki: *sreA* i *sreB* są kontrolowane ryboprzełącznikiem SAM, gdzie w obecności ligandu transkrypt ulega przedwczesnej terminacji [146]. Jak się okazało, te skrócone transkrypty są w dużej mierze komplementarne do sekwencji mRNA genu *prfA* i mogą funkcjonować w sposób analogiczny do sRNA (poprzez interakcje sens-antysens). Takie bezpośrednie oddziaływanie prowadzi do wyciszenia ekspresji *prfA*, który to pełni zróżnicowane funkcje związane z wirulencją bakterii. Takie powiązanie stężenia SAM w komórce z wirulencją ma istotne znaczenie dla *L. monocytogenes*, jako bakterii patogennej. Podwyższone stężenie SAM jest sygnałem, że bakteria znalazła się w środowisku obfitującym w składniki odżywcze *ergo* w organizmie człowieka, co stanowi dogodne warunki i może aktywować ekspresję genów wirulencji.

2.2.4.2 Ryboprzełączniki eukariotyczne

Na szczególną uwagę zasługuje jedna klasa ryboprzełączników – TPP, której występowanie nie ogranicza się jedynie do domeny Prokaryota. Występuje ona także u eukariotów, takich jak rośliny czy grzyby, a nawet zwierząt niższych. Jak dotąd jednak żadne badania nie potwierdziły obecności ryboprzełączników w genomach zwierząt wyższych, w tym ludzi [147]. Grupa eukariotycznych ryboprzełączników TPP posiada kilka unikatowych cech. W przeciwieństwie do bakteryjnych ryboprzełączników, te eukariotyczne nie występują tylko w 5'UTR, ale także w intronach ORF (u grzybów i zieleni) lub w 3'UTR (rośliny wyższe). Ponadto zamiast kontroli transkrypcji lub translacji, swoje funkcje regulatorowe w komórce pełnią poprzez alternatywny splicing.

U grzybów, m. in. *Neurospora crassa*, transkrypt genu *NMT1* posiada kilka różnych ramek odczytu [148]. W warunkach niskiego stężenia TPP wycięciu ulega niefunkcjonalna uORF (ang. *upstream ORF*), dlatego też może dojść do prawidłowej ekspresji kompletnej ORF tego genu (alternatywne miejsca splicingowe pozostają ukryte). Natomiast w sytuacji, kiedy TPP jest w komórce obecny, zmiana struktury ryboprzełącznika odblokowuje alternatywne miejsca splicingowe, które są preferencyjnie wybierane przez splicesom, czego skutkiem jest transkrypcja wyłącznie niefunkcjonalne uORF.

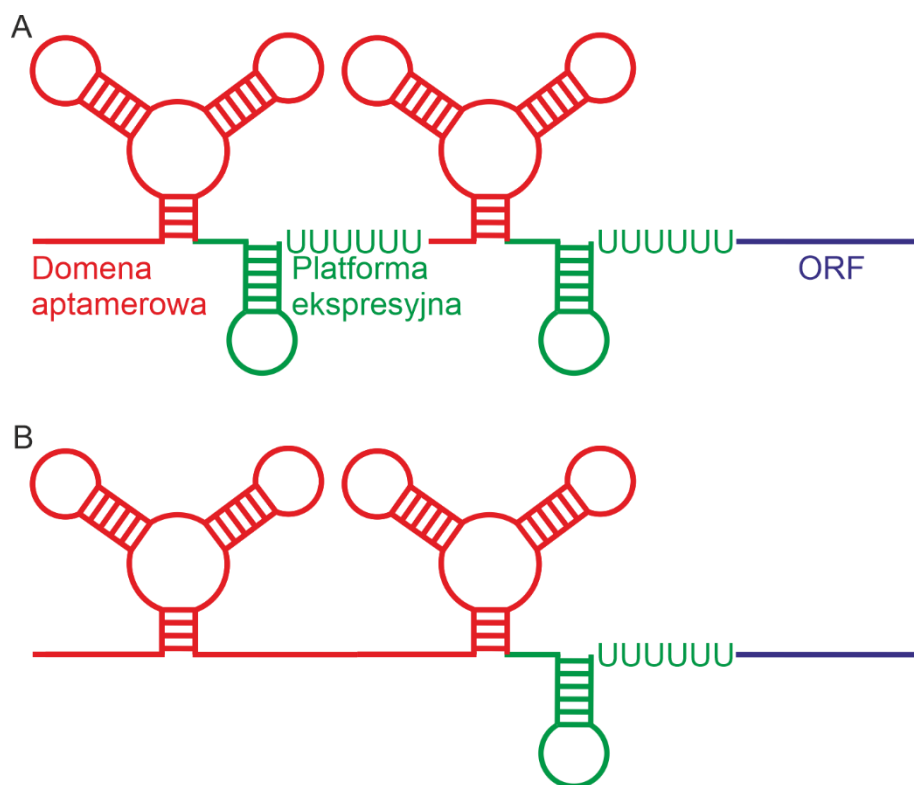
U roślin niższych, takich jak zielenice *Chlamydomonas reinhardtii*, ryboprzełącznik TPP kontrolujący ekspresję genu *THIC* znajduje się w intronie zlokalizowanym w ORF [149]. W środowisku niskiego stężenia TPP wycięciu ulega cały intron wraz z sekwencją ryboprzełącznika. Po związaniu TPP przez ryboprzełącznik ujawniają się dwa alternatywne miejsca splicingowe, co skutkuje retencją fragmentu intronu wraz z przedwczesnym kodonem stop, skutkującym biosyntezą niekompletnego i niefunkcjonalnego białka.

Z kolei u roślin wyższych, takich jak *Arabidopsis thaliana*, ryboprzełącznik TPP genu *THIC* jest umiejscowiony w 3'UTR [150]. W warunkach niskiego stężenia TPP miejsce splicingowe pozostaje zamknięte w strukturze dwuniciowej i niedostępne dla splicesomu, dlatego też powstały transkrypt posiada krótki 3'UTR wraz z sygnałem poliadenylacji (poli-A), zapewniający stabilność mRNA. W obecności TPP natomiast, miejsce splicingowe zostaje odsłonięte, co skutkuje usunięciem sygnału poli-A. Taki transkrypt charakteryzuje się zwiększoną podatnością na degradację i zmniejszoną stabilność, przekładając się bezpośrednio na obniżoną produkcję białka. Badania wykazały, że transkrypty z długim 3'UTR, dodatkowo pozbawionym ochronnych właściwości ogona poli-A, są potencjalnym celem dla NMD (ang. *nonsense-mediated decay*) [151].

2.2.4.3 Ryboprzełączniki tandemowe

Ryboprzełączniki mogą także funkcjonować w bardziej skomplikowanych podwójnych układach, jako ryboprzełączniki tandemowe, stanowiące wyrafinowane bramki logiczne. Funkcją takiego rozwiązania ryboprzełączników jest ściślejsza kontrola ekspresji, większy zakres dynamiki (ang. *dynamic range*) lub zmiana/rozbudowa specyficzności.

W układzie tandemowym mogą także występować całe ryboprzełączniki (dwa aptamery wraz z dwiema platformami ekspresyjnymi), jak to ma miejsce w przypadku ryboprzełączników TPP kontrolujących gen *tenA* u *Bacillus anthracis* (Rysunek 8 A) [95]. W tym wypadku dopiero związanie obu aptamerów skutkuje wyłączeniem ekspresji *tenA*. Z kolei ryboprzełącznik glicynowy u *B. subtilis* (ale także u wielu innych bakterii), kontrolujący ekspresję operonu *gcvT*, składa się z dwóch domen aptamerowych, po których występuje wspólna platforma ekspresyjna (Rysunek 8 B) [125]. Efekt regulatorowy jest wywoływany dopiero po związaniu glicyny przez oba aptamery, a ponieważ geny wchodzące w skład operonu są odpowiedzialne za degradację glicyny, związanie ligandu powoduje aktywację operonu. Przez wiele lat postulowano kooperatywne działanie tych aptamerów, jednak nowsze badania rzucają cień na proponowany model, czyniąc debatę o kooperatywności oraz funkcji takiego układu wciąż aktualną [152].



Rysunek 8. Ryboprzełączniki tandemowe. A) Dwa niezależne ryboprzełączniki poprzedzające wspólny ORF. B) Dwie domeny aptamerowe poprzedzające wspólną platformę ekspresyjną. ORF – otwarta ranka odczytu.

Nieco bardziej skomplikowany układ możemy zaobserwować w genie *metE* u *Bacillus clausii*. W sekwencji liderowej transkryptu *metE* znajdują się dwa różne ryboprzełączniki SAM i AdoCbl [153]. Aby doszło do ekspresji genu *metE* kodującego kobalamino-niezależną syntezę metioniny zarówno ryboprzełącznik SAM jak i AdoCbl muszą pozostać niezwiązane. Taki układ pozwala zwiększyć specyficzność kontroli ekspresji, do sytuacji, w której brakuje zarówno metioniny (konwertowanej następnie do SAM) oraz kobalaminy. W sytuacji, kiedy kobalamina jest dostępna, dla bakterii bardziej opłacalna jest synteza katalitycznie wydajniejszej, kobalamino-zależnej syntezy metioniny, kodowanej przez zupełnie inny gen, *metH*, kontrolowany jedynie przez ryboprzełącznik SAM [154]. Natomiast tandemowe ryboprzełączniki SAM w genie *bhmT* występujące u *Candidatus Pelagibacter ubique* należą do dwóch różnych klas: SAM-II i SAM-V [112]. Ów układ tandemowych umożliwia kontrolę ekspresji genów na dwóch poziomach: transkrypcji (SAM-II) i translacji (SAM-V).

Niezwykle złożona jest kontrola szlaku biosyntezy puryn *de novo* u *Bacillus megaterium*. Geny są zaangażowane w ten szlak metaboliczny przez układ dwóch aptamerów ze wspólną platformą ekspresyjną, podobnie jak w przypadku genu *gcvT* u bakterii *B. subtilis*. Wiążą one jednak zupełnie inne ligandy: guaninę oraz 5-fosforybozylo-1-pirofosforan (PRPP) [131]. Wraz z innymi genami kontrolowanymi przez ryboprzełącznik wiążący tetrafosforan guanozyny (PPGPP) tworzą złożoną sieć regulatorową, pozwalającą na precyzyjną i zniuansowaną regulację biosyntezy nukleotydów w warunkach zróżnicowanej dostępności substratów, przekierowując ze szlaku biosyntezy *de novo* na szlak odzysku puryn (ang. *purine salvage*) i odwrotnie.

Podobnie jak zwykle ryboprzełączniki, także elementy T-box mogą występować tandemowo. Najczęściej tworzą układ T-box:T-box, gdzie współwystępują dwa kompletne T-box'y, wiążące cząsteczki tRNA tego samego rodzaju, a następnie sekwencja ORF [155]. Czasem jednak mogą tworzyć pary z klasycznymi ryboprzełącznikami; cały T-box wraz z całym ryboprzełącznikiem poprzedzające wspólną sekwencję ORF [131]

2.2.5 Struktura ryboprzełączników

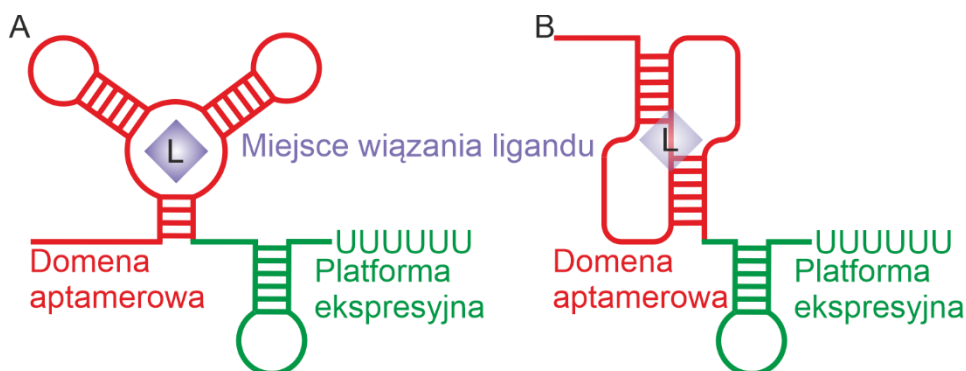
Ryboprzełączniki mogą pełnić swoje funkcje regulatorowe dzięki strukturze przestrzennej, jaką przyjmują, analogicznej do tej występującej w białkach. Jednak w przeciwieństwie do białek, które do swojej dyspozycji mają 20 aminokwasów o różnych chemicznych właściwościach i kształtach, cząsteczki RNA są ograniczone jedynie

do czterech nukleotydów. Ponadto nukleotydy nie wykazują aż takiego zróżnicowania, jeśli chodzi o właściwości biochemiczne czy kształt cząsteczek jak aminokwasy, co dodatkowo ogranicza możliwości strukturalne kwasów nukleinowych. Pomimo tych ograniczeń ryboprzełączniki pozwalają na kontrolę ekspresji genów w precyzyjny i efektywny sposób, nie ustępując w tym względzie białkom regulatorowym.

2.2.5.1 Budowa ryboprzełączników

We wszystkich ryboprzełącznikach możemy wyróżnić dwie funkcjonalnie i strukturalnie odrębne domeny: domenę aptamerową i platformę ekspresyjną (Rysunek 9). Pierwsza z nich jest odpowiedzialna za bezpośrednie interakcje z ligandem. Ze względu na pełnione przez nią funkcje (wiązanie danego metabolitu i jednocześnie dyskryminację pomiędzy podobnymi cząsteczkami), domena ta jest ewolucyjnie zakonserwowana, a zwłaszcza miejsca bezpośredniego oddziaływania z ligandem. W wyniku związania ligandu zmianie konformacyjnej ulega druga, znacznie słabiej zakonserwowana ewolucyjnie, część ryboprzełącznika – platforma ekspresyjna, odpowiedzialna za efekt regulatorowy genu, w którym się znajduje.

Ze względu na dominującą strukturę drugorzędową domeny aptamerowej ryboprzełączniki dzielimy na dwa rodzaje: łącznikowe, z pętlą centralną (ang. *junctional*) (Rysunek 9 A) oraz pseudowęzłowe (ang. *pseudoknotted*) (Rysunek 9 B). Pierwsze z nich są zbudowane z centralnie położonej pętli, od której promieniście rozchodzą się dwuniciowe struktury spinek do włosów. Liczba spinek może się wahać od dwóch dla ryboprzełącznika adeninowego [127] do sześciu dla ryboprzełącznika FMN [156]. Pewne ryboprzełączniki przyjmują alternatywną architekturę, w której pętla centralna jest położona peryferyjnie, a z helisą P1 oddziałuje przez oddalone elementy struktury trzeciorzędowej, czego przykładem może być ryboprzełącznik wiążący tetrahydrofolian (THF) [157]. Ryboprzełączniki pseudowęzłowe charakteryzują się występowaniem dominującej struktury pseudowęzła tj. struktury, gdzie pętla pierwszej spinki RNA paruje się z ramieniem spinki drugiej, natomiast pętla drugiej spinki z ramieniem pierwszej. Przykładem takiego ryboprzełącznika jest SAM-II [158].



Rysunek 9 Budowa ryboprzełączników. A) Ryboprzełączniki z pętlą centralną. B) Ryboprzełączniki pseudowęzłowe. L – ligand.

Poszczególne elementy struktury drugorzędowej, takie jak spinki do włosów, pseudowęzły, czy struktury typu *kissing-loop* tworzą kieszeń wiążącą, ściśle dopasowaną do konkretnego ligandu, co zapewnia wysoką specyficzność i powinowactwo. Miejsce wiązania ligandu najczęściej zlokalizowane jest w pobliżu pętli centralnej lub w środku pseudowęzła. Aptamery ryboprzełączników mogą bardzo istotnie różnić się wielkością. Najmniejszy znany ryboprzełącznik należy do klasy preQ₁-I, zbudowany jest z zaledwie jednej krótkiej spinki tworzącej pseudowęzeł typu H o długości 34 nt [128]. Największe ryboprzełączniki, takie jak lizynowe [145] czy AdoCbl [159], mogą mieć długość ponad 200 nt.

2.2.5.2 Wiązanie ligandu

Ryboprzełączniki charakteryzują się bardzo wysokim stopniem specyficzności względem ligandu i potrafią rozróżniać nawet bardzo podobne chemicznie i strukturalnie metabolity. I tak na przykład ryboprzełączniki SAM wiążą ligand ze 100- do 1000-krotnie większym powinowactwem w porównaniu do SAH, która różni się od SAM jedynie brakiem jednej grupy metylowej [160]. Ryboprzełącznik SAH z kolei, wiąże SAH z 1000-krotnie większą skutecznością niż cząsteczkę SAM [114]. Jest to bardzo istotne w tej sytuacji, bowiem w normalnych warunkach komórkowe stężenie SAM jest znacznie większe niż SAH, co w przypadku niższego powinowactwa mogłoby skutkować deregulacją metabolizmu metioniny. Ryboprzełączniki wykazują bardzo wysokie powinowactwo do swojego natywnego metabolitu. Stała wiązania (K_d) większości ryboprzełączników zazwyczaj wykazuje wartości rzędu nM. Jednak w szczególnych przypadkach K_d ryboprzełączników może przyjmować bardzo niskie wartości wynoszące zaledwie 10 pM (np. ryboprzełącznik c-di-GMP-I u *Vibrio cholerae*) [161], po tak wysokie wartości jak 200 μ M (ryboprzełącznika GlcN-6-P) [137].

Wysoki stopień specyficzności jest realizowany z wykorzystaniem różnych strategii. Najprostszą z nich jest dopasowanie kształtu i rozmiaru kieszeni wiążącej do konkretnego ligandu. Ryboprzełącznik glicynowy na przykład formuje tak małą kieszeń wiążącą, że żaden inny aminokwas się nie zmieści w jej wnętrzu, z drugiej strony kieszeń ryboprzełącznika lizynowego naśladuje wydłużony kształt lizyny i choć mniejsze ligandy mieszczą się w kieszeni wiążącej, to nie mogą zrealizować wszystkich oddziaływań niezbędnych do przełączenia struktury RNA [162]. Kieszeń wiążąca może być bardzo dopasowana i ciasno otaczać metabolit, jak w przypadku ryboprzełącznika lizynowego otoczonego aptamerem w 98% [162] lub przyjmuje półotwartą architekturę, oddziałując tylko częściowo z ligandem, czego przykładem może być ryboprzełącznik TPP [163]

W przypadku białek dla poprawnego wiązania ligand-kieszeń wiążąca bardzo istotne są oddziaływania hydrofobowe, bowiem wiele aminokwasów ma właśnie takie własności. Jednak w przeciwieństwie do białek, RNA zawiera wiele heteroatomów zdolnych do oddziaływań elektrostatycznych czy wodorowych, co sprawia, że udział oddziaływań hydrofobowych jest znikomy. Istotnym jest natomiast fakt, że większość ligandów również zawiera heteroatomy. Dlatego też ligandy oddziałują z aptamerem poprzez kilka typów oddziaływań, takich jak oddziaływania elektrostatyczne, van der Waalsa, warstwowe, oddziaływania jon-dipol i wiązania wodorowe. Nie bez znaczenia jest fakt, że duża część ligandów to pochodne RNA, których zasady azotowe chętnie tworzą wiązania wodorowe z innymi nukleotydami [164]. Niektóre ligandy-nukleotydy wykorzystują krawędź Watsona-Cricka (ang. *Watson-Crick edge*) do tworzenia kanonicznych oddziaływań typu Watson-Crick (ryboprzełączniki: adeninowy, guaninowy, 2'-dG, c-di-GMP-I, PreQ₁-I, FMN), ale także do niekanonicznych oddziaływań Hoogsteen'a z krawędzią Hoogsteen'a (ang. *Hoogsteen edge*) (THF), krawędzią cukrową (ang. *sugar edge*) (SAM-I, TPP, c-di-GMP-II, SAM-III) lub cząsteczkami wody (c-di-GMP-I). Jako że ryboprzełączniki należące do różnych klas wiążące ten sam ligand (jak SAM, PreQ₁, czy c-di-GMP) wykazują odmienną architekturę, tworzą zupełnie różny układ wiązań wodorowych, co sugeruje ich ewolucyjnie niezależne pochodzenie. Kolejną konsekwencją faktu, że większość ligandów stanowią pochodne nukleotydów lub inne związki aromatyczne jest możliwość tworzenia oddziaływań warstwowych π - π . O ile praktycznie wszystkie tego typu ligandy tworzą wiązania π - π z aptamerem, to w przypadku niektórych ryboprzełączników jest to istotny element dyskryminacji pomiędzy pokrewnymi cząsteczkami (np. FMN, TPP, PreQ₁-I).

Ważną kwestią jest rozpoznawanie ujemnie bądź dodatnio naładowanych cząsteczek ligandów. Wiele ligandów zawiera ujemnie naładowane grupy karboksylowe i fosforanowe (TPP, FMN, c-di-GMP). Aby było możliwe skuteczne oddziaływanie z RNA, ładunek ten musi być zneutralizowany. Najczęściej do tego celu wykorzystywany jest kation Mg^{2+} , który to pośredniczy w oddziaływaniach ligand-aptamer, zarówno bezpośrednio jak i za pośrednictwem cząsteczek wody [164]. Jony Mg^{2+} są także istotne dla poprawnego sfałdowania samej struktury ryboprzełącznika oraz zapewnienia stabilności motywów tworzących kieszeń wiążącą. W niektórych przypadkach Mg^{2+} jest niezbędnym elementem dla poprawnego uformowania się aptameru i pełnienia funkcji regulatorowych. W innych przypadkach Mg^{2+} jedynie wspierają poprawnie sfałdowanie ryboprzełącznika, przesuwając równowagę w kierunku stanu holo (przy podwyższonym stężeniu Mg^{2+} wystarczą niższe stężenia ligandu by uzyskać efekt regulatorowy). Innymi wykorzystywanymi przez ryboprzełączniki jonami mogą być: Mn^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Na^+ , K^+ . O ile w niektórych przypadkach różne jony mogą pełnić swoją funkcję zamiennie, to niektóre ryboprzełączniki wymagają konkretnego jonu, jak na przykład K^+ dla ryboprzełącznika lizynowego [162]. Zdarza się, że niektóre ligandy, takie jak F^- są całkowicie koordynowane przez trzy cząsteczki Mg^{2+} , które to bezpośrednio pośredniczą w oddziaływaniach z aptamerem [165]. Dodatnio naładowane fragmenty ligandów stanowią bardzo istotną, charakterystyczną cechę, specyficznie rozpoznawaną przez poszczególne ryboprzełączniki. Dodatnio naładowany łańcuch boczny lizyny dopasowuje się do negatywnie naładowanego fragmentu kieszeni wiążącej, natomiast grupa metylowa połączona z atomem siarki nadaje ładunek dodatni cząsteczce SAM, co jest podstawą dyskryminacji pomiędzy SAM i SAH.

Choć w znakomitej większości pojedyncze aptamery wiążą jedną cząsteczkę ligandu, to istnieją także istotne wyjątki od tej reguły. Dotyczy to zwłaszcza niewielkich ligandów, takich jak jony nieorganiczne (Mg^{2+} lub NiCo), THF czy guanidyna. Badania strukturalne wykazały między innymi, że ryboprzełącznik magnezowy wiąże przynajmniej osiem jonów Mg^{2+} , skoncentrowanych w trzech skupiskach, natomiast aptamer NiCo wiąże cztery jony w jednej kieszeni wiążącej [135,166]. Ryboprzełączniki THF i guanidynowy-II, jako że ich ligandy są większe niż jony metali, zawierają dwie kieszenie wiążące metabolit [157,167]. Podejrzuje się, że wiązanie wielu pozwala na kooperatywne działanie ryboprzełącznika [168].

2.2.6 Identyfikacja nowych ryboprzełączników

Istotnym wyzwaniem w badaniach nad ryboprzełącznikami jest identyfikacja nowych ryboprzełączników, zarówno w kontekście nowych klas jak i nowych reprezentantów klas już znanych. Z oczywistych powodów, trudniejszym wyzwaniem jest identyfikacja nowych klas ryboprzełączników. W takiej sytuacji niemożliwe jest proste porównywanie sekwencji w poszukiwaniu podobieństw do znanych ryboprzełączników. Analiza musi być zatem oparta o bardziej uniwersalne cechy jakimi charakteryzuje się większość ryboprzełączników (lub nawet wszystkie). Do predykcji nowych klas ryboprzełączników bierze się pod uwagę szereg cech, pozwalających wyodrębnić ryboprzełączniki spośród innych ncRNA [133]:

- Lokalizacja

Pierwszą cechą istotnie upraszczającą i skracającą czas trwania przeszukiwania kandydatów jest lokalizacja ryboprzełączników. W przypadku organizmów prokariotycznych zdecydowana większość jest zlokalizowana regionach 5'UTR.

- Długość 5'UTR

Większość bakteryjnych 5'UTR ma średnią długość 150 nt. Te zawierające ryboprzełączniki są zdecydowanie dłuższe - ich średnia długość wynosi 330 nt.

- Motywy RNA

Domeny aptamerowe ryboprzełączników posiadają stabilne struktury spinek do włosów (od dwóch do sześciu) lub obecność pseudowęzłów. Co istotne, motywy te powinny być skomponowane z wykorzystaniem wszystkich czterech nukleotydów w mniej więcej równej proporcji (niewskazane są ciągi powtórzeń jednonukleotydowych). Innym ważnym elementem dla ryboprzełączników transkrypcyjnych jest obecność struktury spinki terminacyjnej. Jeżeli jest ona zlokalizowana bardzo blisko miejsca wiązania ligandu (lub częściowo się z nią pokrywa), to związanie ligandu spowoduje aktywację ekspresji (ligand destabilizuje terminator) [169], natomiast spinka terminatora oddalona od aptameru wskazuje na negatywną kontrolę ze strony metabolitu [170].

- Alternatywne struktury

Sekwencje potencjalnych ryboprzełączników muszą tworzyć dwie stabilne energetycznie struktury drugorzędowe o zbliżonej, choć różnej końcowej energii swobodnej. Ponadto muszą być one rozdzielone barierą potencjału, do przewyciężenia, której niezbędne jest zaistnienie czynnika zewnętrznego, jak na przykład związanie ligandu czy temperatura.

Niewskazane jest także by sekwencje tworzyły więcej niż dwie alternatywne struktury, gdyż zmniejszałoby to jednoznaczność sygnałów od ligandów odpowiedzi regulatorowej.

- Zakonserwowanie ewolucyjne

Ryboprzełączniki są sekwencjami zakonserwowanymi ewolucyjnie zarówno strukturalnie (motywy strukturalne tworzące architekturę kieszeni wiążącą) jak i sekwencyjnie (miejsca kontaktu z ligandem). To zakonserwowanie, w przeciwieństwie do białek regulatorowych, jest bardzo wysokie, nawet pomiędzy daleko spokrewnionymi gatunkami bakterii.

- Ortologi

Współwystępowanie danego motywu RNA z danym genem u różnych grup bakterii (ortologi) oznacza duże prawdopodobieństwo pełnienia roli regulatorowej. Podobnie wielokrotne występowanie danego motywu w pojedynczym genomie wskazuje na istnienie zdefiniowanego regulonu (zespołu genów regulowanych przez wspólny czynnik).

Wiele istotnych przeszkód komplikuje próby przewidywania występowania nowych klas ryboprzełączników. Porównywanie sekwencji oraz struktury RNA (ang. *alignment*) prowadzi do wykrywania wielu różnych motywów ncRNA, mogących pełnić funkcje regulatorowe inne niż za ryboprzełączniki. Jednak nawet w sytuacji, kiedy jesteśmy w stanie wykluczyć inne możliwości, bioinformatyczne przewidywania struktury muszą znaleźć eksperymentalne potwierdzenie (biochemiczne, genetyczne, krystalograficzne). Najtrudniejszym, a zarazem niezbędnym etapem jest wykazanie związku pomiędzy RNA a kontrolowanym genem, tj. znalezieniem w puli potencjalnych metabolitów właściwego ligandu oddziałującego z aptamerem. Motywy RNA, które posiadają większość z powyższych cech (czyli z dużym prawdopodobieństwem są ryboprzełącznikami), a których nie udało się jeszcze potwierdzić metodami biochemicznymi, tj. nie znaleziono właściwego im ligandu, nazywamy ryboprzełącznikami sierocymi (ang. *orphan riboswitches*) [171]. Wiele spośród wytypowanych kandydatów na ryboprzełączniki w istocie okazało się być ryboprzełącznikami [133]. Nie mniej jednak, na potwierdzenie niektórych z nich trzeba było czekać blisko 15 lat [139]. Rozwój bioinformatycznych metod poszukiwania nowych klas i reprezentantów ryboprzełączników poskutkowało stworzeniem różnych programów pozwalających na automatyczne wyszukiwanie potencjalnych ryboprzełączników w genomach [172] bazujących na przewidywaniu motywów strukturalnych: HAMMER, Infernal, Riboswitch Finder, RibEx, RiboSW, DRD, Riboswitch Scanner; na przewidywaniu struktury drugorzędowej: RNAfold, RNAstructure, SFold/Srna, RNAalifold, IPknot; na przewidywaniu struktury trzeciorzędowej: iFoldRNA, ModeRNA, , FARNA/FARFAR, Vfold Model, RNAComposer, 3dRNA, SimRNA.

2.2.7 Praktyczne zastosowanie ryboprzełączników

Ryboprzełączniki posiadają szereg niezwykle przydatnych cech, które mogą mieć zastosowanie w różnych dziedzinach zarówno nauki, medycyny jak i przemysłu, zwłaszcza biotechnologii. Ich prostota budowy i działania pozwalają na względnie łatwą manipulację zarówno specyficnością jak i efektem regulatorowym. Szeroki repertuar znanych klas pozwala na dobór odpowiedniego ligandu do konkretnych celów. Jednak wybór ten nie ogranicza się jedynie do naturalnie występujących aptamerów. W 2004 roku zsyntetyzowano pierwszy całkowicie sztuczny ryboprzełącznik wiążący teofilinę [173], a dzięki technologii SELEX możliwości generowania aptamerów zdają się być praktycznie nieograniczone. Inną istotną zaletą ryboprzełączników jest niezwykła oszczędność, bowiem do poprawnego działania wymagana jest relatywnie krótka sekwencja RNA oraz niskocząsteczkowy metabolit. Także możliwości manipulowania samymi ligandami stanowią niewyczerpane źródło możliwości wykorzystywania ryboprzełączników w celach użytecznych dla człowieka. Wiele takich zastosowań zostało opisanych [174-176] i prawdopodobnie jeszcze wiele znajdzie zastosowanie w przyszłości.

2.2.7.1 Cel antybiotykoterapii

Ryboprzełączniki mają potencjał by stać się celem dla nowych antybiotyków. Najistotniejszą ich cechą w kontekście antybiotykoterapii jest fakt, iż kontrolują one kluczowe dla przeżycia bakterii szlaki metaboliczne [177]. Jednocześnie, mogą one być z łatwością zablokowane przez podanie analogów ich natywnych ligandów, które wiążą ryboprzełącznik i wyciszają ekspresję kontrolowanych genów, same natomiast nie są metabolicznie funkcjonalne. Ponadto ligandy dla ryboprzełączników są niskocząsteczkowymi, prostymi związkami, dobrze przenikającymi do komórek bakteryjnych, dla których względnie łatwo zaprojektować podobne cząsteczki. Inną cechą takiego podejścia jest względne bezpieczeństwo, nie są bowiem jak dotąd poznane żadne ryboprzełączniki występujące u ludzi. W niektórych przypadkach bakteriom trudniej wytworzyć antybiooporność przeciwko analogom ligandów dla ryboprzełączników, ponieważ ta sama klasa ryboprzełącznika może kontrolować więcej niż jeden gen, przez co pojedyncza substytucja w genomie jest niewystarczająca dla zablokowania działania antybiotyku.

Wiele badań w tej dziedzinie przeprowadzono dla ryboprzełącznika wiążącego FMN. Kontroluje on geny biosyntezy i transportu ryboflawiny. FMN stanowi grupę prostetyczną wielu enzymów uczestniczących w reakcjach redoks. Natomiast rozeoflawina (RoF), wytwarzana przez *Streptomyces davawensis* jest jedynym znanym naturalnym antybiotykiem wycelowanym

w ryboprzełącznik [178]. Fakt ten zainspirował naukowców do poszukiwania innych analogów ryboflawiny o lepszych właściwościach antybiotykowych i mniejszej toksyczności, nakierowanych na ryboprzełącznik FMN. Spośród różnych kandydatów szczególnie obiecujący zdaje się być 5FDQD [179]. Związek ten został zaprojektowany i zsyntetyzowany, jako alternatywa dla starszej generacji antybiotyków, jak metronidazol lub wankomycyna, przeciwko infekcjom wywołanym przez *Clostridium difficile*. Zasadniczą wadą dotychczas stosowanych antybiotyków jest ich zbyt szerokie spektrum działania, co w konsekwencji prowadzi do zmian ilościowych i jakościowych mikrobiomu jelit. Niska specyficzność antybiotyków przyczynia się do wzrostu zachorowań w wyniku infekcji innymi patogenami oraz wysokim ryzykiem nawrotu choroby, szacowanym nawet na 25% po odbytej terapii [180,181]. Badania wskazują, że właściwości 5FDQD takie jak K_d , okres półtrwania czy sposób wiązania się do ryboprzełącznika są bardzo podobne do FMN, co czyni ten związek dobrym kandydatem do testów *in vitro* i *in vivo* [179]. Właściwości antybakteryjne 5FDQD są porównywalne z wankomycyną, a jednocześnie analizy wykazały, że efekt ten jest uzyskiwany szybciej niż w przypadku wankomycyny (99,9% redukcji ilości bakterii już po 4h). Eksperymenty na modelu mysim, zainfekowanym *C. difficile*, dowodzą skuteczności, także w warunkach fizjologicznych. Co istotne, mikroflora jelitowa po terapii 5FDQD nie została naruszona, ani ilościowo ani jakościowo, w przeciwieństwie do innych antybiotyków.

Inny związek o właściwościach bakteriobójczych, którego celem molekularnym jest ryboprzełącznik, Ribocil, zsyntetyzowany został przez firmę Merck & Co [182]. Ribocil wiąże się do ryboprzełącznika FMN genu *ribB* z wysokim powinowactwem wynoszącym 6,6 nM (dla natywnego metabolitu FMN K_d wynosi 1,2 nM). Gen *ribB* jest zaangażowany w biosyntezę ryboflawiny, kofaktora niezbędnego dla przeżycia bakterii. W testach *in vitro* stężenie Ribocil inhibujące wzrost *E. coli* (IC_{50}) wynosiło 0,3 μ M, natomiast MIC (ang. *minimum inhibitory concentration*) wynosił 2 μ g/ml. Właściwości przeciwbakteryjne zostały wykazane także dla innych patogennych bakterii, takich jak *Pseudomonas aeruginosa* czy *Acinetobacter baumannii*. Testy na modelach zwierzęcych potwierdziły skuteczność niewiele gorszą od tej osiągniętej przez komercyjnie stosowany antybiotyk cyprofloksacynę. Ribocil nie jest strukturalnym analogiem FMN, dlatego też w przeciwieństwie do chociażby rozeoflawiny nie powoduje inhibicji innych szlaków metabolicznych związanych z witaminą B12. Kolejne badania dowiodły antybiotycznych właściwości zarówno Ribocilu jak i RoF wobec innych patogenów stanowiących wyzwanie współczesnej medycyny, takich jak odporne na metycylinę szczepy *Staphylococcus aureus* (MRSA, ang. *methicillin-resistant Staphylococcus*

aureus), *Enterococcus faecalis* czy *Streptococcus pyogenes* [183]. Badacze wykazali, że oba związki niezależnie inaktywują dwie ścieżki metaboliczne pozwalające na uzupełnienie rezerwuaru ryboflawiny, import do komórki jak i biosynteza ryboflawiny *de novo*.

2.2.7.2 Ryboselektory

Syntetyczne układy ryboprzełączników wraz z odpowiednio dobraną sekwencją kodującą czynnik selekcyjny pozwalają na stworzenie samopolepszającego się układu do produkcji różnego rodzaju metabolitów czy bioproduktów. Tego typu „biologiczne urządzenie” nazywamy ryboselektorem (ang. *riboselector*) [184]. Ryboselektor składa się z dwóch modułów: ryboprzełącznika i genu stanowiącego czynnik selekcyjny. Ryboselektory pozwalają na skuteczną optymalizację szlaków metabolicznych poprzez łączenie wewnątrzkomórkowego stężenia określonego metabolitu z przeżyciem komórki pod presją selekcyjną. Ryboselektor opracowany przez Yang i współpracowników składał się z represyjnego ryboprzełącznika lizynowego genu *lysC E. coli* i markera selekcyjnego *tetA*, zapewniającego jednocześnie odporność na działanie tetracykliny i wrażliwość na toksyczny NiCl_2 [185]. Dzięki podwójnemu układowi selekcyjnemu (selekcji pozytywnej i negatywnej) powtarzanemu kilkukrotnie możliwe jest wyselekcjonowanie najbardziej wydajnych produkcyjnie bakterii. Selekcja pozytywna w obecności tetracykliny i braku metabolitu (w tym przypadku lizyny) pozwala na przeżycie tylko tym bakteriom, które posiadają stosowny plazmid zawierający gen odporności na antybiotyk – *tetA*. Z kolei negatywna selekcja w obecności toksycznych soli NiCl_2 pozwala przetrwać tylko osobnikom produkującym największe ilości lizyny, która to po związaniu przez ryboprzełącznik wycisza ekspresję genu *tetA*. Gen ten, oprócz odporności na tetracyklinę, warunkuje także zwiększoną przepuszczalność dla toksycznego NiCl_2 . Klony bakteryjne wytwarzające największe ilości lizyny były zdolne do represji genu *tetA*, a zatem mogły przetrwać i replikować. W tym systemie osiągnięto 75% wzrost poziomu lizyny po czterech cyklach procesu selekcji. Podsumowując, ryboselektory mogą dawać przewagę nad produkcyjnymi szczepami poprzez modulowanie ekspresji selekcyjnego genu markerowego.

2.2.7.3 Rybosensory

Biosensor jest urządzeniem analitycznym służącym do wykrywania analitu, które łączy składnik biologiczny z detektorem fizykochemicznym. Istnieje wiele różnorodnych związków biologicznych wykorzystywanych jako elementy rozpoznania, w tym: enzymy, przeciwciała, receptory, RNA, DNA, organelle, tkanki i całe komórki [186]. Rozpoznanie danej cząsteczki

zazwyczaj wyzwała uwolnienie sygnału elektrochemicznego lub optycznego zebranego i skwantyfikowanego przez detektor. Najczęściej stosowanym typem biosensora jest enzymatyczny, niemniej jednak wytwarzanie dużej ilości enzymów jest kosztowne i wymaga skrupulatnego oczyszczenia [187].

W 2009 opracowano zupełnie nowy typ biosensora wykrywający teofilinę, lek przeciwastmatyczny, którego przedawkowanie może mieć poważne konsekwencje zdrowotne, jak napady padaczki czy zaburzenia rytmu serca. Biosensor ten składał się z domeny aptamerowej wiążącej teofilinę jako czujnik połączonej z końcem 5' sekwencji kodującej GFP, białka zdolnego do emisji sygnału świetlnego (ang. *green fluorescence protein*) [188]. Badania wykazały, że w obecności teofiliny ów biosensor podowuje zależne od dawki wyciszenie ekspresji GFP, osiągając pięciokrotny spadek sygnału przy 1 mM stężeniu teofiliny.

Inne podejście, nie wymagające nawet biosyntezy GFP, zaprezentowali naukowcy z Cornell University w Nowym Jorku [189]. Domeny aptamerowe różnych ryboprzełączników (TPP, andeninowy, guaninowy, SAM) sprzężono z 84-nukleotydowym aptamerem Spinach. Tego typu aptamery zostały pierwotnie stworzone celem zlokalizowania konkretnego RNA w komórce. Aptamer Spinach strukturalnie imituje białko GFP [190], co pozwala na równie wydajnie wiązanie fluoroforów podobnych do tych natywnie wiązanych przez GFP, takich jak DFHBI. Co bardzo ważne, tego typu fluorofory wykazują właściwości fluorescencyjne tylko po związaniu przez aptamer Spinach. W obecności fluoroforu cząsteczka RNA wyposażona w sekwencję Spinach może być z łatwością wizualizowana w mikroskopie fluorescencyjnym. Sprzężenie aptameru dla wybranego metabolitu z sekwencją Spinach pozwala na detekcję owego metabolitu w komórce. W stanie apo domena wiążąca DFHBI jest niepoprawnie sfałdowana, co nie pozwala na wiązanie fluoroforu i wytworzenie sygnału świetlnego. Dopiero przyłączenie odpowiedniego ligandu powoduje emisję sygnału świetlnego. Uzyskany konstrukt charakteryzuje się zbliżoną specyficznością i powinowactwem jak naturalny ryboprzełącznik TPP o EC_{50} równym 9 μ M oraz K_d równym 600 nM. Cały konstrukt osiągnął wysoką wydajnością i czułość, powodując 16-krotny wzrost fluorescencji przy komórkowym stężeniu TPP 100 μ M.

2.2.7.4 Indukowalne układy kontroli ekspresji

Uwadze naukowców nie uszła podstawowa własność ryboprzełączników, czyli zdolność do indukowanej kontroli ekspresji genów. Takie układy eksperymentalne są szczególnie ważne podczas badania funkcji genów, kiedy to aktywacja lub wyciszenie ekspresji zgodnie z wolą eksperymentatora ułatwiają poznanie funkcji oraz mechanizmów regulacji.

Współczesne, zoptymalizowane i wyselekcjonowane (komputerowo jak i biochemiczne) osiągają poziom indukcji niemal 400-krotny u *E. coli* [191]. Ponadto uczeni opracowali nowe oraz zoptymalizowali dotychczasowe syntetyczne aptamery: teofilinowy, tetrametylorodaminowy, dopaminowy, tyroksynowy, 2,4-dinitrotoluenowy, co dodatkowo zwiększa możliwości ich przyszłego praktycznego wykorzystania. Ryboprzełączniki znajdują zastosowanie także w układach eukariotycznych, pomimo, że natywne eukariotyczne ryboprzełączniki są ograniczone do TPP. Metodami inżynierii genetycznej udało się stworzyć indukowany układ kontroli ekspresji genów u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Z wykorzystaniem aptamerów tetracyklinowych i neomycynowych kontrolujących skanowanie rybosomu udało się osiągnąć poziom indukcji odpowiednio sześć- i siedmiokrotnym [192,193]. Podobne układy udało się stworzyć także w organizmach roślinnych [194] i wirusowych [195].

2.2.7.5 Wirusy onkolityczne

W latach 50 i 60 XX wieku naukowcy zainteresowali się potencjalnymi właściwościami naturalnie występujących onkolitycznych wirusów oraz ich medycznym zastosowaniem. Przy tego typu terapii problematyczne są kwestie bezpieczeństwa związane z niekontrolowaną replikacją, nadmierną ekspresją wprowadzonych genów, czy ryzykiem wzmożonej odpowiedzi immunologicznej. Dlatego też podjęto wysiłek, by zaprojektować system kontroli ekspresji genów wirusowych i ich replikacji oparty na ryboprzełącznikach. Badacze z zespołu Nettelbeck'a z Niemieckiego Centrum Badań nad Rakiem w Heidelbergu zaprojektowali dwa genetycznie zmodyfikowane onkolityczne wirusy: adenowirus (AdV) i wirus odry (MeV), których geny znajdują się pod kontrolą ryboprzełącznika wiążącego teofilinę [195]. Konstrukty te powstały przez połączenie dwóch ryboprzełączników o właściwościach autokatalitycznych, umieszczonych na końcu 5' i 3' odpowiednich genów (E1A u AdV i glikoproteiny F u MeV). W warunkach normalnych geny ulegają ekspresji, a replikacja i infekcyjność wirusa pozostaje bez zmian. Natomiast po dodaniu do środowiska teofiliny ryboprzełącznik ulega aktywacji, a z transkryptu zostaje wycięty odpowiedni ORF. Badania wykonane na AdV wykazały 200-krotnie obniżoną produkcję białka E1A. Eksperyment przeprowadzony z użyciem komórek SK-MEL-28 (komórki czerniaka złośliwego) wykazał dużą skuteczność antynowotworową wirusa (przeżywalność komórek wynosiła 10%). Jednocześnie, po podaniu teofiliny przeżywalność wzrastała do 80%, w sposób zależny od dawki. Zmodyfikowany MeV także wykazywał skuteczne działanie *in vivo* w odpowiedzi na teofilinę, powodując 11- i 6-krotny spadek produkcji wirionów, odpowiednio w Verocells i SK-MEL-28.

3 Cel i Uzasadnienie Podjętej Tematyki Pracy

Za cel pracy obrałem trzy szczegółowe zagadnienia badawcze:

- 1) Opracowanie nowej metody identyfikacji ryboprzełączników transkrypcyjnych.**
- 2) Opracowanie zestawu prostych i precyzyjnych testów eksperymentalnej weryfikacji kandydatów na ryboprzełączniki.**
- 3) Opracowanie nowej metody analizy aktywności transkrypcyjnej ryboprzełączników.**

Od początku odkrycia ryboprzełączników w 2002 roku, liczba znanych ryboprzełączników ustawicznie wzrastała wraz z postępami w sekwencjonowaniu genomów i metagenomów bakteryjnych. Na dzień dzisiejszy znanych jest ponad 100 000 reprezentantów ryboprzełączników, lecz jedynie skromny ułamek tej puli został zweryfikowany eksperymentalnie. Zważywszy na istotną rolę, jaką ryboprzełączniki pełnią w życiu bakterii oraz liczne potencjalne zastosowania w najróżniejszych dziedzinach medycyny, nauki czy biotechnologii (Rozdział 2.2.7), widzimy, iż identyfikacja nowych ryboprzełączników jest niezwykle ważną kwestią. Każdy bowiem nowoodkryty ryboprzełącznik może okazać się przełomowy w rozwiązaniu danego problemu lub też stać się kluczową inspiracją do stworzenia nowych, niezastąpionych narzędzi molekularnych.

Dotychczasowo wszystkie znane motywy zidentyfikowano z użyciem metod bioinformatycznych, poprzez analizę porównawczą zachowawczości struktur drugorzędowych RNA w rejonach 5'UTR powiązanych ze sobą funkcjonalnie genów [196]. Głównym ograniczeniem tej metody jest brak możliwości detekcji ryboprzełączników, które wykazują za dużą zmienność, występują bardzo rzadko lub są zbyt krótkie by mogły być wykryte poprzez analizę porównawczą [197]. Stąd potrzeba opracowania nowej metody, pozbawionej powyższych ograniczeń. Moja praca doktorska podejmie próbę opracowania bezpośredniej metody identyfikacji ryboprzełączników opartej na danych eksperymentalnych, w przeciwieństwie do obecnie stosowanych metod opartych o przeszukiwanie genomów *in silico*.

Inspiracją do opracowania metody identyfikacji ryboprzełączników opartej na wysokowydajnym sekwencjonowaniu były opublikowane prace dotyczące ryboprzełącznika wiążącego SAM, w której autorzy wykazali bardzo wyraźną zależność pomiędzy dostępnością ligandu oraz długością mRNA obserwowaną techniką Northern-blot [198]. Wyniki te dowodzą, że skrócona forma transkryptu spowodowana terminacją transkrypcji przez ryboprzełącznik jest stabilna w komórce i jako taka może zostać zaobserwowana podstawowymi technikami biologii molekularnej. W takim przypadku uprawnione wydaje się wnioskowanie, że skrócona forma powinna być również zauważalna w eksperymentach wysokowydajnego sekwencjonowania. Hipoteza ta została pozytywnie zweryfikowana poprzez analizę obliczeniową publicznie dostępnych danych pochodzących z eksperymentu profilowania ekspresji genów z wykorzystaniem RNA-Seq z *Bacillus halodurans*. Okazało się, że dla genów zawierających ryboprzełączniki SAM można zaobserwować wyraźne różnice w akumulacji odczytów pomiędzy rejonem 5'UTR a sekwencją kodującą związane z powstawaniem znacznych ilości skróconej formy transkryptu. Wynik ten upewnił nas w tym, że jest możliwe zaobserwowanie swoistych sygnatur ryboprzełączników w danych, uzyskanych z wysokoprzepustowego sekwencjonowania.

Pierwszym celem moich badań jest opracowanie nowej metody identyfikacji ryboprzełączników transkrypcyjnych. Zamiar ten chcę osiągnąć poprzez jednoczesne zastosowanie kombinacji dwóch różnych typów sekwencjonowania RNA nowej generacji. W pierwszej kolejności RNA użyte do przygotowania biblioteki cDNA zostanie zmodyfikowany przy użyciu odczynnika NAI w warunkach *in vivo* celem przeprowadzenia sekwencjonowania typu SHAPE-seq (Rozdział 4.1.3) (Rysunek 15). Sekwencjonowanie tego typu nastawione jest na poznanie struktury drugorzędowej badanych cząsteczek RNA. Odczynnik NAI acyluje nukleotydy znajdujące się w regionach jednoniciowych RNA, dlatego też w trakcie odwrotnej transkrypcji z wykorzystaniem specyficznego startera *reverse* powstają fragmenty cDNA o długości odpowiadającej miejscom modyfikacji licząc od końca 3'. Dzięki analizie końców 5' otrzymanych fragmentów zlokalizowanych w regionach 5'UTR uzyskujemy informację na temat struktury drugorzędowej regionów.

Jednocześnie zastosowane zostanie sekwencjonowanie typu Term-seq, które pozwala na precyzyjne ustalenie pozycji naturalnych końców 3' transkryptów. W przeciwieństwie do standardowej procedury przygotowania biblioteki cDNA, pierwszym etapem jest ligacja specyficznych adapterów do 3' końców wszystkich transkryptów w mieszaninie, poprzedzającym fragmentację mRNA. Takie podejście pozwala na ustalenie naturalnych końców 3' transkryptów (a nie powstałych sztucznie, np. w trakcie fragmentacji RNA), zarówno pełnej długości jak i tych

powstałych w wyniku działania ryboprzełączników transkrypcyjnych (lub innych mechanizmów wykorzystujących zjawisko przedwczesnej terminacji transkrypcji).

Przyglądając się ilości odczytów mapujących do regionu 5'UTR w stosunku do tych mapujących do ORF otrzymujemy informację dotyczącą aktywności transkrypcyjnej potencjalnych ryboprzełączników (Rysunek 15). Efekt ten może być wzmocniony poprzez przygotowanie biblioteki z hodowli bakterii prowadzonej w dwóch warunkach: w obecności odpowiedniego metabolitu oraz bez. Dzięki temu możliwe jest obserwowanie zmian w poziomie transkryptów pełnej długości jak i skróconych transkryptów (i ich wzajemnego stosunku).

Tak przygotowane sekwencjonowanie nowatorską metodą Term-SHAPE-seq pozwoli na wytypowanie nowych sekwencji mogących być kandydatami na ryboprzełączniki. Ponadto umożliwi szybkie i proste scharakteryzowanie wszystkich najważniejszych aspektów ryboprzełączników w transkryptomicznej skali, takich jak miejsce terminacja transkrypcji (Term-seq), struktura drugorzędowa (SHAPE-seq) czy zmiany aktywności transkrypcyjnej pod wpływem danego ligandu (ligand-/ligand+).

Aby rzetelnie ocenić potencjał nowej metody, zostanie ona przetestowana na modelu, za jaki posłużą mi transkrypcyjne ryboprzełączniki SAM-I bakterii *Bacillus subtilis*. W genomie tej bakterii występuje 11 takich ryboprzełączników kontrolujących geny/operony związane z metabolizmem metioniny. Ze względu na dużą powszechność ryboprzełączniki te będą dobrym modelem badawczym. Aby zapewnić najlepszej możliwej jakości analizy wyników sekwencjonowania planowane jest użycie szczepu *B. subtilis* str. 168, zsekwencjonowanej w 2009 roku oraz będącej obecnie najlepiej adnotowanym genomem bakterii Gram-dodatniej.

Drugim krokiem, po wstępnej identyfikacji i charakterystyce potencjalnych kandydatów na ryboprzełączniki, będzie ich eksperymentalna weryfikacja oraz identyfikacja właściwych ligandów. W tym celu planowane jest opracowanie kilku prostych, szybkich, a jednocześnie czułych i precyzyjnych testów, które pozwolą jednoznacznie rozstrzygnąć czy wytypowana sekwencja w istocie jest ryboprzełącznikiem, czy też może innym elementem regulatorowym opierającym się na mechanizmie przedwczesnej terminacji transkrypcji.

Pierwszy z testów – terminacji transkrypcji *in vitro*, pozwoli odpowiedzieć na pytanie, czy pod wpływem ligandu następuje ilościowa zmiana transkryptów pełnej długości jak i skróconych (Rozdział 4.2.1) (Rysunek 22). Następnie zweryfikowana zostanie struktura drugorzędowa z wykorzystaniem techniki SHAPE (Rozdział 4.2.2) (Rysunek 27). Pozwoli to na skonfrontowanie i porównanie wyników z tymi uzyskanymi w trakcie

sekwencjonowania metodą Term-SHAPE-seq. Ponadto możliwe będzie także zbadanie rearanżacji strukturalnych wywołanych związaniem ligandu. Ostatni test obejmuje wyznaczenie stałej dysocjacji K_d (Rozdział 4.2.3) (Rysunek 30). Jako że ryboprzełączniki uchodzą za sekwencje wiążące ligand z wysoką specyficznością i powinowactwem, parametr ten jest wart określenia i porównania go z tymi wyznaczonymi dla znanych ryboprzełączników. Wyznaczone K_d mieszczące się w typowym dla ryboprzełączników zakresie (1 nM do 1 μ M) pozwoli dodatkowo uwiarygodnić wyniki weryfikacji ryboprzełączników (Rozdział 2.2.5.2).

Powyższe metody weryfikacji w pierwszej kolejności zostaną przetestowane na znanym ryboprzełączniku SAM-I, kontrolującym ekspresję genu *metE* w bakterii *B. subtilis*. Pomimo mocnych przesłanek sugerujących, że lider genu *metE* posiada ryboprzełącznik, sekwencja ta nie została dobrze scharakteryzowana strukturalnie i funkcjonalnie. Pozytywne przejście wszystkich procedur weryfikacyjnych przez zaproponowaną sekwencję modelową potwierdzi ich skuteczność i adekwatność. Dzięki temu możemy mieć pewność, że ewentualna negatywna weryfikacja potencjalnych kandydatów na ryboprzełączniki nie będzie konsekwencją braków czy błędów metodologicznych.

Trzecim celem badawczym niniejszej pracy doktorskiej jest stworzenie metody pozwalającej na wiarygodną analizę ilościową aktywności transkrypcyjnej ryboprzełączników. Bódcem do opracowania nowej metody były braki metodologiczne prowadzące do pomijania, niosących bardzo ważne informacje, skróconych transkryptów, będących produktem przedwczesnej terminacji transkrypcji. Zdecydowana większość badaczy ryboprzełączników podczas eksperymentów skupia się jedynie na ilości pełnej długości transkryptów i jej zmiany w zależności od stężenia analizowanego niskocząsteczkowego metabolitu, ignorując jednocześnie ilość skróconych transkryptów. Takie podejście rodzi jednak pewien istotny problem. Otóż obserwowany potencjalny wzrost/spadek poziomu transkrypcji, może nie wynikać z indukcji ryboprzełącznika a z innych mechanizmów stojących za zimną ekspresją genu, takich jak choćby aktywacja białek regulatorowych, wpływających na całkowity poziom ekspresji genu. Dlatego też zaistniała potrzeba opracowania nowej metody, która umożliwiłaby precyzyjną ocenę ilościową obu typów transkryptów.

Jednak, aby tego typu analiza ilości transkryptów była w ogóle możliwa, wszystkie cząsteczki mRNA muszą zostać przepisane na cDNA w odpowiedni sposób. Proces odwrotnej transkrypcji prowadzi do znacznych zniekształceń ilości odczytów (pokrycia) wzdłuż transkryptu. Wykorzystanie starterów specyficznych dla danego genu bądź starterów poli-T skutkuje względną nadreprezentacją końca 3' transkryptu, kosztem niedoszacowania końca 5'.

Przyczyną tego zjawiska jest większa wydajność przepisywania na cDNA fragmentu w pobliżu użytego startera, czyli z końca 3'. Ponadto użycie startera poli-T do analizy bakteryjnych mRNA jest nieadekwatne, bowiem zaledwie od kilku do kilkunastu procent transkryptów bakteryjnych jest poliadenylowanych [199]. Dlatego też niezbędne jest użycie heksametrów o losowej sekwencji (N_6 , ang. *random hexamers*). Jednak także i w tym wypadku mamy do czynienia z odchyleniem od oczekiwanej ilości odczytów wzdłuż transkryptu. Tym razem natomiast nadreprezentowany jest 5' koniec transkryptu względem 3' końca (Rysunek 37) [200]. Przyczyną tego zjawiska jest fakt, że choć owe heksamery hybrydują niemal jednorodnie wzdłuż transkryptu, to z powodu kierunku reakcji od końca 3' do 5' (względem transkryptu) to istnieje spore prawdopodobieństwo, że fragmenty w pobliżu końca 3' nie zawsze zostaną przepisane na cDNA, natomiast koniec 5' ma niemal statystyczną pewność przepisania dla każdego transkryptu (Rysunek 38). W ostateczności wszystko to przekłada się na zmniejszą liczbę odczytów z końca 3' przy jednoczesnej względnej nadreprezentacji końca 5' analizowanego transkryptu. Im większa odległość pomiędzy badanymi fragmentami tym większe obserwowane odchylenia.

Biorąc pod uwagę fakt, że ryboprzełączniki są niemal zawsze zlokalizowane w 5'UTR powyższy efekt będzie istotnie wpływał na ich analizę ilościową. Tyczy się to zwłaszcza transkryptów pełnej długości, których długość jest znaczna (np. wielogenowe operony) i mogłaby się przyczynić do sztucznego zawyżenia ilości odczytów pochodzących od starterów, komplementarnych do sekwencji ryboprzełącznika.

Dlatego aby wyeliminować efekt względnej nadreprezentacji końca 5' w stosunku do 3' dla pełnej długości cząsteczek, postanowiłem wprowadzić dodatkowy etap pośredni w przygotowywaniu cDNA. Etap ten obejmuje zastosowanie sekwencyjnie specyficznego cięcia (hydrolizy) transkryptów w pobliżu miejsca naturalnej terminacji transkrypcji, z wykorzystaniem RNazy H. W tym celu zostaną zaprojektowane *in silico* oligomery DNA, komplementarne do sekwencji RNA poniżej terminatora, tak by cięcie enzymatyczne imitowało terminację spowodowaną działaniem ryboprzełącznika (Rozdział 4.4.2) (Rysunek 39). Dzięki temu etapowi uzyskujemy pulę stanowiących sumę wszystkich transkryptów odrębną od transkryptów pełnej długości.

Do analizy ilościowej transkryptów zostanie wykorzystana technika ddPCR, pozwalająca na oznaczenie ich absolutnych stężeń w przeciwieństwie do standardowo stosowanej techniki RT-qPCR. W tym celu zostaną zaprojektowane trzy pary starterów. Pierwsza para (Startery 1) będzie komplementarna do sekwencji aptameru ryboprzełącznika w 5'UTR, w regionie powyżej miejsca

przewidywanej terminacji; druga para starterów (Startery 2) obejmie miejsce terminacji transkrypcji, trzecia para (Startery 3) zostanie zaprojektowana tak, aby wiązać się do sekwencji ORF (Rysunek 39). W ten sposób sygnał od Starterów 1 będzie korespondować z sumą transkryptów wszystkich transkryptów; Startery 2 stanowi kontrolę procesu enzymatycznego cięcia/terminacji transkrypcji; natomiast Startery 3 da nam informację, na temat stężenia transkryptów pełnej długości. Dzięki temu różnica pomiędzy sygnałem od Starterów 1 i Starterów 3 daje nam informację na temat stężenia skróconych transkryptów, będących rezultatem aktywności ryboprzełączników. Ponadto Startery 1 i 3 pary zostały zaprojektowane tak, by były w podobnej odległości od końca 3'; w przypadku Starterów 1 od miejsca terminacji transkrypcji/cięcia RNAzą H, w przypadku Starterów 3 od naturalnego końca transkryptu. Dzięki temu możliwe jest wyeliminowanie wpływu odległości od końca 3' na ilości odczytów.

W ramach realizacji projektu pracy doktorskiej planowane jest nie tylko opracowanie nowej metody analizy transkrypcyjnej ryboprzełączników, ale także wykorzystanie jej do rozwiązania realnego problemu badawczego. Dysponując tak opracowaną metodą przeanalizowane zostaną ryboprzełączniki SAM w bakterii *B. subtilis* w kontekście ich odpowiedzi na stres braku metioniny w środowisku. Planowana analiza obejmie oznaczenie stężeń transkryptów FL jak i T oraz oznaczenie współczynnika indukcji zdefiniowanego, jako stosunek transkryptów FL do T w formie apo do formy holo. Wyniki eksperymentu zostaną porównane z tymi otrzymanymi bez etapu cięcia RNAzą H, oraz co pozwoli na rzetelną ocenę skuteczności i przydatności opracowanej metody.

4 Wyniki i Dyskusja

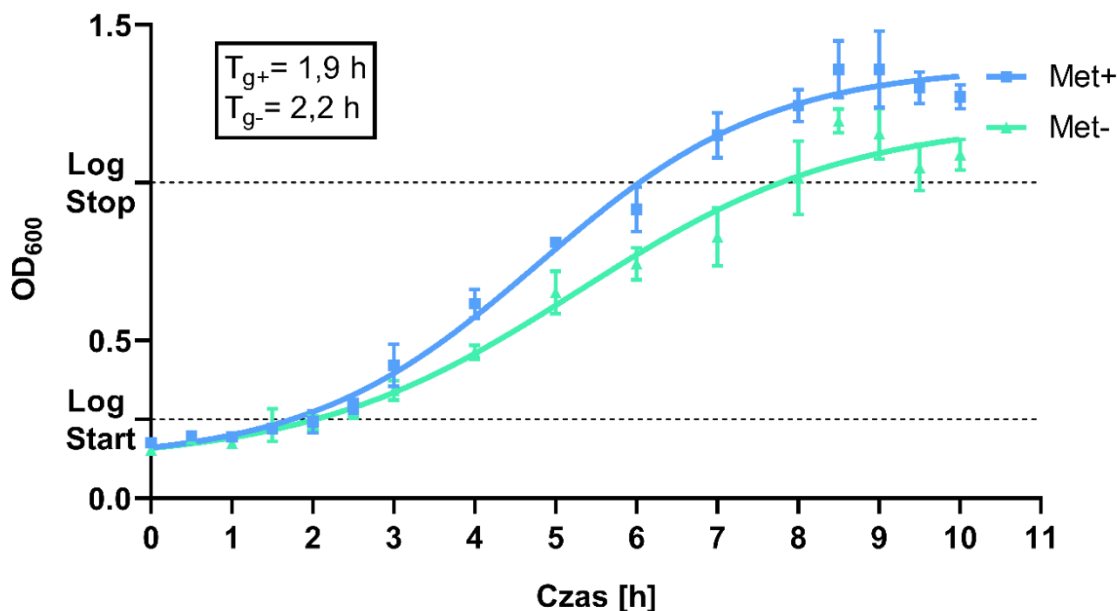
4.1 Sekwencjonowanie metodą Term-SHAPE-Seq

Opracowanie nowej metody sekwencjonowania, która z jednej strony pozwala na identyfikację zdarzeń terminacji transkrypcji będącej rezultatem działania ryboprzełączników transkrypcyjnych, a z drugiej na identyfikację struktury drugorzędowej badanych regionów, stanowi istotne metodyczne wyzwanie tej pracy. Zastosowanie sekwencjonowania końców 3' transkryptów (Term-seq) w kombinacji z sekwencjonowaniem zmodyfikowanych nukleofilem cząsteczek RNA (SHAPE-seq) w technologii NGS (ang. *new generation sequencing*) wymagało zarazem nowatorskiego podejścia do przygotowania bibliotek cDNA, jak i dużej skrupulatności w jej wykonaniu. A ponieważ bardzo istotnym elementem sekwencjonowania transkryptomu jest także analiza ilościowa poszczególnych cząsteczek RNA, szczególną uwagę poświęcono eliminacji wszelkich źródeł odchyień ilości odczytów. Sprostanie wszystkim tym oczekiwaniom wymagało, aby każdy etap poprzedzający sekwencjonowanie był bardzo dobrze opracowany i sprawdzany, począwszy od przygotowania warunków hodowli bakterii, poprzez optymalizację indukcji ryboprzełączników, modyfikację i izolację RNA *in vivo*, na przygotowaniu bibliotek kończąc. Skuteczność opracowywanej metody była monitorowana z wykorzystaniem ryboprzełączników SAM w *B. subtilis*, jako modelu badawczego. Ryboprzełącznik ten kontroluje 11 jednostek transkrypcyjnych (genów lub operonów) stanowiących istotną część metabolizmu metioniny, a także innych powiązanych szlaków metabolicznych (łącznie 26 różnych genów). Powszechność i różnorodność genów pod kontrolą ryboprzełącznika SAM czynią z niego idealny model do testowania i optymalizacji niniejszej metody identyfikacji nowych ryboprzełączników.

4.1.1 Krzywa wzrostu bakterii

Techniki sekwencjonowania RNA wymagają wysokiej jakości i czystości RNA. Z tego powodu preferowana jest izolacja RNA z bakterii w fazie logarytmicznego wzrostu, kiedy to w pożywce jest niewiele zanieczyszczeń czy martwych komórek. Ponadto większość genów pod kontrolą ryboprzełączników jest najbardziej aktywna transkrypcyjnie w tej fazie, dlatego też pierwszym etapem było wykreślenie krzywej wzrostu oraz wyznaczenie gęstości optycznej mierzonej przy długości fali 600 nm (OD , ang. *optical density*) dla tej fazy wzrostu.

W tym celu, w pierwszej kolejności bakterie *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 pobrane ze kultury pierwotnej posiano na podłożu stałym (płytką agarową) i pozostawiono do wyrośnięcia w temperaturze 37°C. Następnie pobrano pojedynczą kolonię bakterii i namnożono w zdefiniowanej pożywce płynnej z dodatkiem metioniny o stężeniu 50 µg/ml, w warunkach tlenowych. Po całonocnej hodowli zmierzono OD_{600} , bakterie rozdzielono do dwóch falkonów, zwirowano i zawieszono w świeżej pożywce: jednej z dodatkiem metioniny (Met+), drugiej bez metioniny (Met-). Tak przygotowane dwie hodowle bakterii rozcieńczano odpowiednim medium hodowlanym do $OD_{600} \approx 0,2$, po czym rozpoczęto hodowlę w warunkach tlenowych. Co godzinę pobierano próbkę wielkości 2 ml, z każdej z nich. Hodowlę prowadzono do momentu uzyskania fazy stacjonarnej wzrostu lub fazy zaniku. Wyniki dla obu hodowli *B. subtilis* przedstawiono na wykresie (Rysunek 10). Krzywe wzrostu oraz czas generacji zostały obliczone z wykorzystaniem programu GraphPad Prism 8. Analizując i porównując krzywe wzrostu zaobserwowano, że czas generacji (T_g) jest krótszy w przypadku hodowli suplementowanej metioniną (T_{g+}) w porównaniu z hodowlą eliminacyjną (T_{g-}) i wynosi 1,9 h (2,2 h dla hodowli Met-). Różnice te nie są jednak duże, eliminacja metioniny z pożywki powoduje ~14% spadek tempa podziału komórek *B. subtilis*. Wynik ten jest zgodny z tym opisywanym w literaturze naukowej [201]. Faza logarytmicznego wzrostu rozpoczyna się ok. 2 h od momentu rozpoczęcia hodowli (przy $OD_{600}=2,5$), kończąc się pomiędzy 7 a 8 h, w zależności od warunków hodowli (przy $OD_{600}=1$).



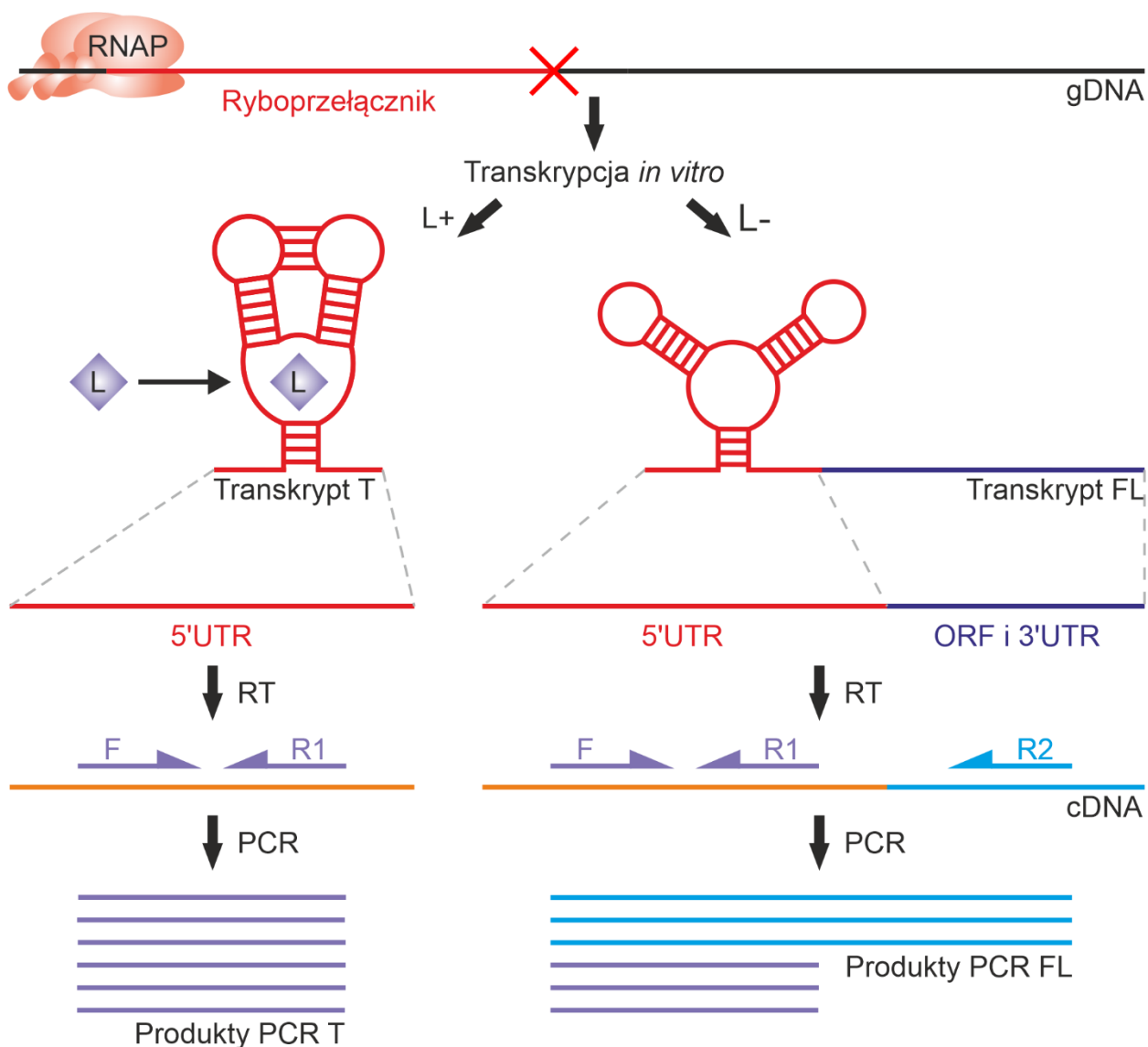
Rysunek 10 . Krzywa wzrostu bakterii *B. subtilis*. „Met-” - hodowla bez metioniny, „Met+” - hodowla z metioniną. T_g – czas generacji.

4.1.2 Określenie współczynnika indukcji ryboprzełączników

Pierwszym etapem była hodowla bakterii w zróżnicowanych przedziałach czasowych (0,5 – 16 h) celem określenia czasu hodowli, przy którym współczynnik indukcji ryboprzełącznika, czyli stosunek formy apo do formy holo (IR, ang. *induction ratio*) był jak największy. W pierwszej kolejności bakterie otrzymane z kultury pierwotnej zostały posiane na podłoże stałe (płytki agarowa) w celu wyodrębnienia pojedynczej kolonii. Pobraną kolonię przeniesiono do zdefiniowanej pożywki płynnej i hodowano w warunkach tlenowych aż do uzyskania $OD_{600}=0,8 - 1$, odpowiadającemu końcowce fazy wykładniczego wzrostu. Pożywka była suplementowana metioniną o stężeniu końcowym $50 \mu\text{g/ml}$, celem indukcji ryboprzełączników SAM. Takie stężenie metioniny pozwala z jednej strony na wysycenie miejsc wiążących ligand w aptamerach SAM, z drugiej zaś strony nie wpływa hamująco na rozwój bakterii. Metionina, aktywnie pobierana przez *B. subtilis*, jest szybko konwertowana do SAM, stanowiącego właściwy ligand dla ryboprzełączników kontrolujących ekspresję genów metabolizmu metioniny. Bezpośrednia aplikacja SAM byłaby nieskuteczna w kontekście aktywacji ryboprzełączników, gdyż z powodu braku transportera SAM w błonach komórkowych *B. subtilis*, nie jest możliwe jej aktywne pobieranie ze środowiska [202,203]. Po osiągnięciu odpowiedniego wzrostu, zastosowano hodowlę eliminacyjną. W tym celu bakterie zwirowano, zdekantowano supernatant,

a osad bakterii zawieszono w świeżej pożywce pozbawionej metioniny. Jako kontrola, posłużyła hodowla zawieszona w świeżej pożywce suplementowanej metioniną. Po zmianie pożywki pobierano próbki hodowli w następujących punktach czasowych: 0 h, 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 16 h; zarówno z hodowli właściwej (Met⁻) jak i kontrolnej (Met⁺). Następnie z każdej hodowli bakterii wyizolowano całkowite RNA, według procedury opisanej w Rozdziale 6.6.2. Analiza ilościowa i jakościowa została przeprowadzona przy użyciu spektrofotometru NanoDrop oraz z wykorzystaniem elektroforezy w 8% żelu poliakryloamidowym. Stosunek absorbancji mierzonej przy długości fali 260 nm do absorbancji mierzonej przy długości fali 280 nm ($A_{260/280}$) i stosunek absorbancji mierzonej przy długości fali 260 nm do absorbancji mierzonej przy długości fali 230 nm ($A_{260/230}$) wynosiły ok. 2,0 – 2,2 co wskazuje na wysoką czystość próbek. Każdą z próbek RNA [1 µg] przepisano na cDNA w reakcji odwrotnej transkrypcji z wykorzystaniem zestawu SuperScript IV, według procedury opisanej w Rozdziale 6.6.9.

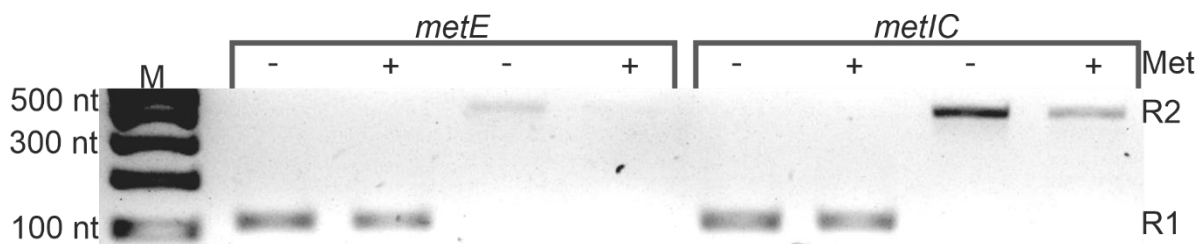
Chcąc wstępnie ustalić zmiany ilości określonych transkryptów RNA w różnych warunkach dostępności metioniny, na matrycy cDNA utworzonej z RNA (Met⁻ lub Met⁺) przeprowadzono reakcję PCR z wykorzystaniem starterów według schematu (Rysunek 11). W pierwszej kolejności zaprojektowałem zestawy starterów dla każdego z badanych genów (Tabela 9). Startery *forward* F1 i *reverse* R1 są zaprojektowane w taki sposób, że amplifikują zarówno transkrypty skrócone w wyniku działania ryboprzełącznika (T, ang. *truncated*) jak i fragmenty pochodzące z pełnej długości transkryptów (FL, ang. *full-length*). Stąd, obserwowany w żelu sygnał R1 stanowi sumę obu typów transkryptów. Startery *forward* F1 *reverse* R2 amplifikują wyłącznie sygnał pochodzący z transkryptów pełnej długości. Na tej podstawie można obserwować zmiany w występowaniu transkryptów pełnej długości i przedwcześnie terminowanych w zróżnicowanych warunkach dostępności ligandu.



Rysunek 11. Schemat zaprojektowanych starterów do reakcji RT-qPCR. Czerwony X – miejsce terminacji transkrypcji, RNAP – polimeraza RNA, L – ligand, F – starter *forward*, R – starter *reverse*, FL – fragmenty pełnej długości, T – fragmenty skrócone.

W pierwszym etapie przeprowadziłem reakcje PCR z użyciem DreamTaq PCR Master Mix (2X) dla dwóch wybranych genów kontrolowanych przez ryboprzełącznik SAM. Produkty zwizualizowano w 2% żelu agarozowym (Rysunek 12). Krótsze produkty pary starterów *metE* qPCR F i R1 oraz *metIC* qPCR F i R1 (oznaczone na rysunku jako R1), korespondujące z sekwencją skróconego transkryptu (będącego wynikiem terminacji transkrypcji) nie wykazują istotnych zmian pomiędzy warunkami *Met*⁻ i *Met*⁺. Jednakowy sygnał w obu warunkach hodowli bakterii (*Met*⁻ i *Met*⁺) wskazuje, iż całkowity poziom transkrypcji genów pod kontrolą ryboprzełączników jest względnie stały. Zmienia się natomiast stosunek transkryptów pełnej długości do skróconych w wyniku działania ryboprzełącznika (FL/T). Dlatego też widzimy

wyraźne zmiany sygnału dla pary starterów *metIC* qPCR F i R2 oraz *metE* qPCR F i R2 (zwanymi R2), dających sygnał jedynie w przypadku występowania transkryptów pełnej długości (koresponduje z ilością transkryptów pełnej długości). Stąd wniosek, że eliminacja metioniny z pożywki powoduje wyraźny spadek ekspresji pełnej długości transkryptów w stosunku do kontroli.



Rysunek 12. Produkty PCR dla genów *metE* i *metIC*. M – marker wielkości, R1 – produkty starterów zaprojektowanych do sekwencji ryboprzełącznika, R2 – produkty starterów zaprojektowanych do sekwencji ORF. „-” – hodowla z metioniną, „+” – hodowla bez metioniny.

Ponieważ PCR jest metodą półilościową, celem właściwego oznaczenia stężeń poszczególnych transkryptów oraz określenia współczynnika indukcji ryboprzełączników IR, przeprowadzono reakcję ilościowego PCR w czasie rzeczywistym poprzedzonym reakcją odwrotnej transkrypcji (RT-qPCR, ang. *reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*). Eksperyment został przeprowadzony dla wszystkich 11 znanych genów/operonów kontrolowanych przez ryboprzełącznik SAM (Rysunek 36). Wartości C_t udało się określić dla dziewięciu genów operonów (Tabela 3). W dwóch przypadkach (gen *yxjH* i operon *yoaDCB*) nie udało się oznaczyć stężeń tą metodą, prawdopodobnie z powodu zbyt małej ilości transkryptów.

Tabela 3 Wartości C_t poszczególnych rodzajów transkryptów dla poszczególnych genów/operonów w ośmiu punktach czasowych (0 h, 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 16 h). FL – transkrypty pełnej długości, T – skrócone transkrypty, ND – nie oznaczono, SD – odchylenie standardowe, „Met–” – hodowla bez metioniny, „Met+” – hodowla z metioniną.

Gen	Met	0 h		0,5 h		1 h		2 h	
		FL+T [C_t ±SD (normalizator)	FL [C_t ±SD	FL+T [C_t ±SD (normalizator)	FL [C_t ±SD	FL+T [C_t ±SD (normalizator)	FL [C_t ±SD	FL+T [C_t ±SD (normalizator)	FL [C_t ±SD
<i>samT</i>	–	30,92±0,24	31,06±0,15	29,63±0,17	29,91±0,2	31,4±0,18	31,86±0,07	23,64±0,09	31,45±0,16
	+	31,2±0,2	32,12±0,3	31,93±0,2	34,2±0,22	31,82±0,08	32,19±0,22	26,04±0,07	34,87±0,13
<i>metIC</i>	–	33,62±0,26	33,99±0,02	30,71±0,19	29,4±0,23	28,58±0,23	26,46±0,11	36,11±0,25	30,87±0,18
	+	34,47±0,14	32,75±0,01	31,39±0,1	33,33±0,06	31,84±0,01	32,88±0,07	29,74±0,25	33,69±0,36
<i>metE</i>	–	28,54±0,12	33,25±0,48	24,51±0,25	31,59±0,03	23,91±0,63	31,19±0,17	23,21±0,23	34,43±0,02
	+	29,83±0,16	32,63±0,07	26,9±0,19	34,87±0,54	26,12±0,09	33,43±0,02	24,8±0,02	38,38±0,11
<i>mtnKA</i>	–	28,53±0,02	33,35±0,14	24,27±0,15	32,13±0,06	25,55±0,28	32,88±0,11	20,74±0,04	34,17±0,2
	+	30,27±0,1	32,78±0,07	27,73±0,27	34,19±0,32	25,93±0,22	33,88±0,16	20,95±0,01	35,15±0,1
<i>mtnWXBD</i>	–	29,39±0,12	30,02±0,16	26,11±0,23	29,13±0,24	25,04±0,35	30,21±0,17	26,91±0,09	28,8±0,18
	+	29,69±0,09	30,39±0,17	30,69±0,07	31,9±0,08	29,4±0,1	31,32±0,04	29,34±0,04	31,36±0,07
<i>cysH operon</i>	–	28,56±0,01	31,59±0,24	27,41±0,17	30,39±0,13	28,04±0,17	32,39±0,14	19,28±0,02	26,52±0,25
	+	30,31±0,26	31,98±0,1	30,75±0,03	32,9±0,27	28,58±0,2	31,92±0,08	19,97±0,07	27,02±0,1
<i>yoaDCB</i>	–	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>metK</i>	–	28,58±0,24	37,88±0,27	26,36±0,2	36,47±0,06	28,36±0,46	37,9±0,53	21,02±0,27	32,81±0,24
	+	28,89±0,08	36,92±0,02	29,95±0,35	38,53±0,43	28,7±0,03	37,84±0,02	22,15±0,03	34,16±0,29
<i>metNPQ</i>	–	34,1±0,41	32,12±0,34	31,88±0,11	30,84±0,29	33,66±0,52	31,65±0,13	30,79±0,18	30,71±0,11
	+	33,66±0,12	32,06±0,2	34,24±0,09	33,22±0,78	34,53±0,22	32,61±0,04	32,48±0,2	32,85±0,26
<i>yxjH</i>	–	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>yxjG</i>	–	32,33±0,11	31,62±0,19	29,93±0,1	29,92±0,14	32,1±0,3	31,38±0,06	20,76±0,14	25,81±0,28
	+	32,71±0,19	31,75±0,11	33,76±0,02	33,06±0,22	33,26±0,27	32,55±0,3	22,86±0,19	27,97±0,14

cd.

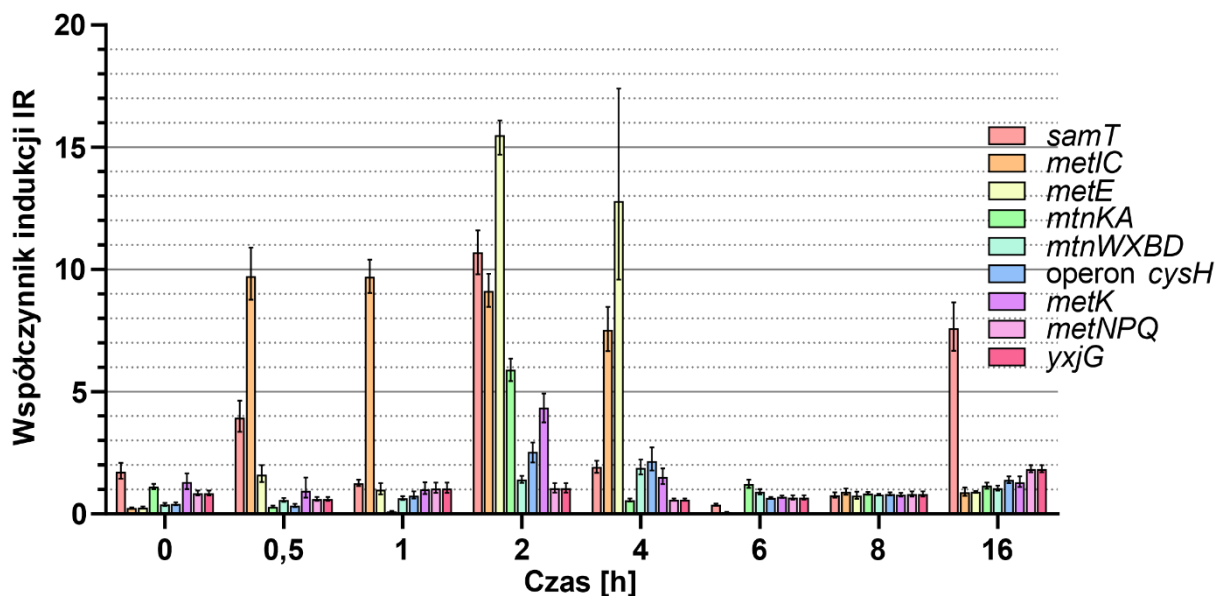
Gen	Met	4 h		6 h		8 h		16 h	
		FL+T [C _i ±SD (normalizator)	FL [C _i ±SD	FL+T [C _i ±SD (normalizator)	FL [C _i ±SD	FL+T [C _i ±SD (normalizator)	FL [C _i ±SD	FL+T [C _i ±SD (normalizator)	FL [C _i ±SD
<i>samT</i>	-	27,81±0,13	32,64±0,25	29,92±0,05	30,59±0,1	28,89±0,12	28,46±0,13	29,87±0,16	32,87±0,06
	+	26,88±0,03	32,65±0,16	29,26±0,22	28,57±0,17	30,17±0,21	29,33±0,2	30,95±0,18	36,88±0,17
<i>metIC</i>	-	34,79±0	26,96±0,18	29,95±0,05	32±0,08	31,64±0,15	30,03±0,06	29,83±0,25	30,84±0,19
	+	30,01±0,03	34,92±0,22	31,64±0,25	29,99±0,15	32,99±0,01	31,32±0,28	27,69±0,25	28,54±0,28
<i>metE</i>	-	22,03±0,09	31,8±0,23	24,87±0,08	31,52±0,14	26,94±0,12	29±0,13	26,24±0,03	30,34±0,06
	+	18,86±0,12	32,39±0,69	27,25±0,1	29,29±0,06	28,26±0,09v	29,71±0,1	24,98±0,03	28,93±0,07
<i>mtnKA</i>	-	25,87±0,18	32,02±0,16	28,67±0,16	31,57±0,22	27,22±0,14	29,65±0,12	29,91±0,08	28,46±0,15
	+	26,9±0,06	32,84±0,04	27,38±0,09	29,9±0,32	28,75±0,05	30,51±0,24	27,76±0,2	26,48±0,12
<i>mtnWXBD</i>	-	30,87±0,12	35,08±0,17	28,6±0,24	29,07±0,04	26,59±0,13	27,14±0,05	29,86±0,17	28,6±0,12
	+	32,54±0,11	35,95±0,01	26,67±0,22	27,45±0,05	27,92±0,1	28,22±0,03	27,9±0,11	26,85±0,16
<i>operon cysH</i>	-	24,87±0,21	31,12±0,07	28,89±0,17	30,74±0,25	27,08±0,07	28,38±0,01	27,62±0,11	29,37±0,12
	+	27,63±0,13	34,79±0,25	26,59±0,15	28,29±0,09	28,11±0,06	29,06±0,05	26,04±0,09	27,87±0,17
<i>yoaDCB</i>	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>metK</i>	-	25,3±0,49	32,96±0,06	28,24±0,08	36,29±0,09	26,06±0,12	34,3±0,1	28,28±0,01	31,79±0,07
	+	25,63±0,11	34,47±0,15	25,86±0,03	33,36±0,02	27,06±0,08	34,6±0,09	26,86±0,17	30,84±0,15
<i>metNPQ</i>	-	34,71±0,25	34,06±0,22	32,66±0,1	30,81±0,1	30,36±0,1	28,73±0,07	36,81±0,2	29,98±0,02
	+	34,84±0,27	34,78±0,24	30,99±0,02	28,64±0,1	31,79±0,17	29,8±0,04	35,69±0,17	29,25±0,26
<i>yxjH</i>	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>yxjG</i>	-	28,23±0,03	30,83±0,06	31,46±0,24	30,65±0,19	29,79±0,17	28,41±0,31	28,9±0,06	29,33±0,05
	+	31,85±0,17	33,67±0,02	29,74±0,15	28,29±0,14	30,84±0,19	29,38±0,09	27,92±0,1	29,23±0,15

Współczynnik IR wyraża stosunek stężeń transkryptów FL do sumy transkryptów FL i T w warunkach Met⁻ do Met⁺. Został obliczony zgodnie z równaniem:

$$IR = \frac{\frac{R2_{Met-}}{R1_{Met-}}}{\frac{R2_{Met+}}{R1_{Met+}}} = \frac{\frac{FL_{Met-}}{FL_{Met-} + T_{Met-}}}{\frac{FL_{Met+}}{FL_{Met+} + T_{Met+}}}$$

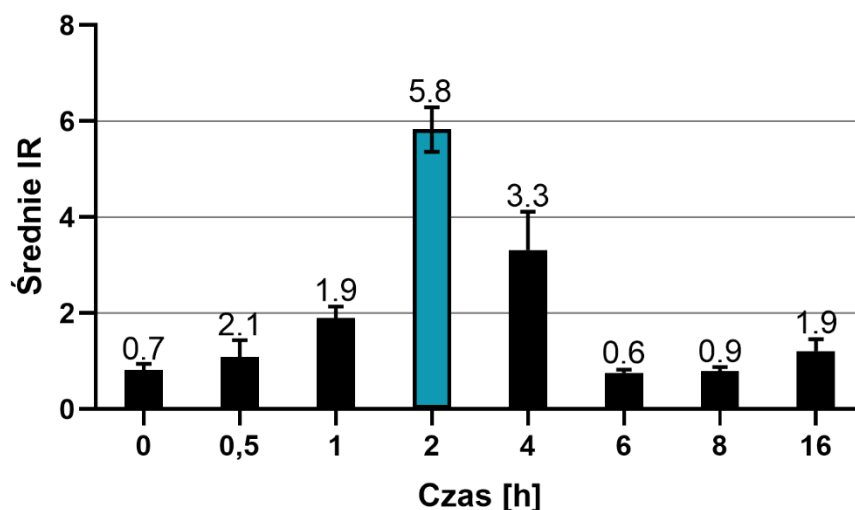
Równanie 1. Współczynnik Indukcji IR.

Wyniki przedstawiające wartości współczynnika indukcji przedstawiono na wykresie (Rysunek 13). Widać wyraźnie, że współczynnik indukcji dla różnych genów metabolizmu metioniny zmienia się w czasie oraz posiada indywidualny przebieg. Obserwacja ta jest o tyle interesująca, że wszystkie geny są kontrolowane przez ryboprzełącznik należący do tej samej klasy, SAM-I, co sugerowałoby raczej podobny (przynajmniej do pewnego stopnia) sposób odpowiedzi ryboprzełącznika na podanie ligandu. Z tego też względu dane uzyskane z tego początkowego eksperymentu zostały w dalszej części pracy poddane głębszej i bardziej wnikliwej analizie opisaną w Rozdziale 4.3.



Rysunek 13. Zmiany współczynnika indukcji IR genów/operonów kontrolowanych ryboprzełącznikiem SAM w ośmiu punktach czasowych (0 h, 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 16 h).

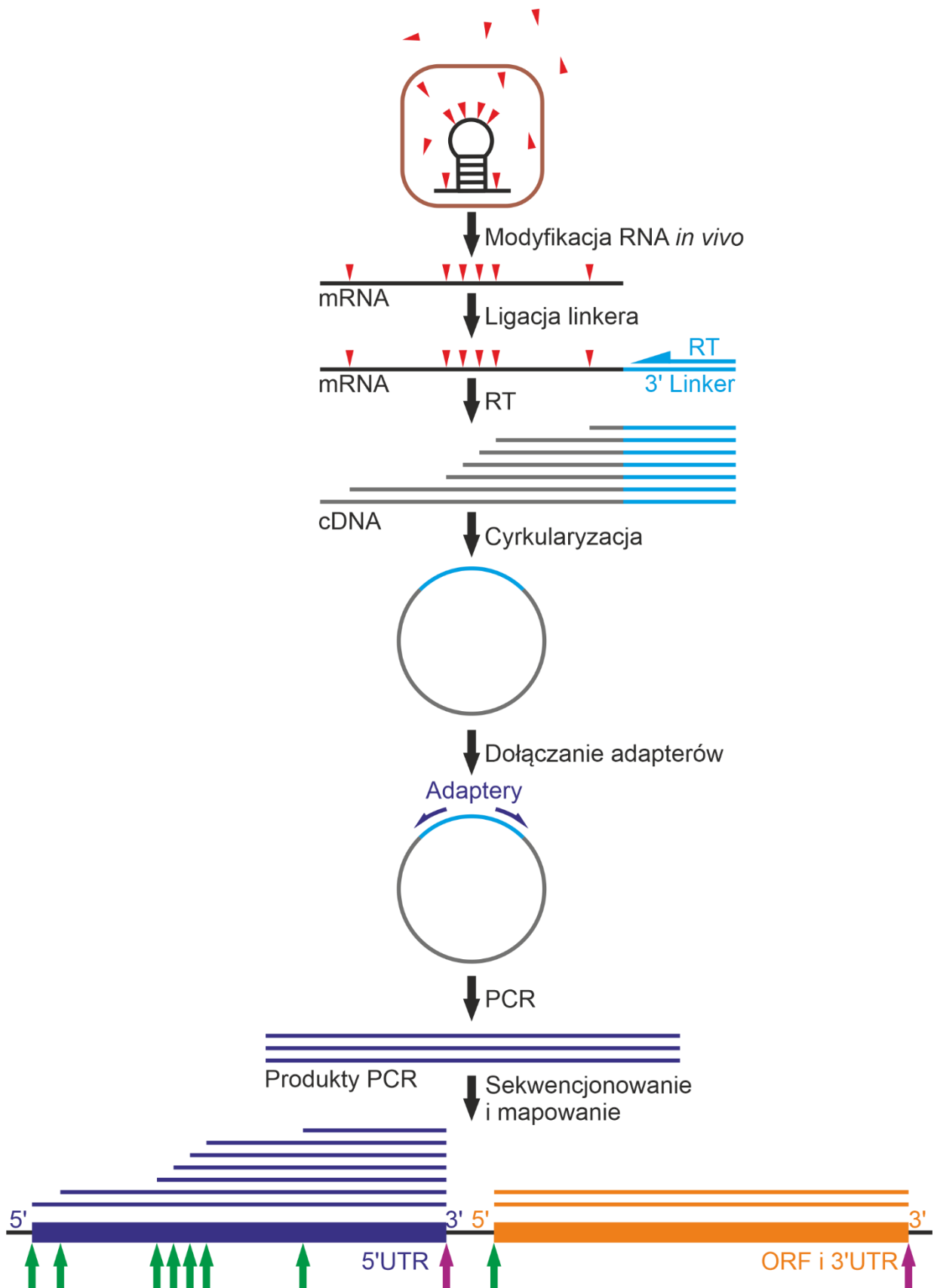
Na potrzeby sekwencjonowania metodą Term-Seq, wyciągnięto następujące prawidłowości dotyczące globalnego współczynnika indukcji dla ryboprzełączników SAM. Po uśrednieniu współczynników indukcji dla wszystkich punktów czasowych, najniższy charakteryzował punkty czasowe: 0 h, 6 h, 7 h, 8 h, 16 h (Rysunek 14). Dla tych punktów czasowych IR wahał się pomiędzy 0,6 – 0,8. IR dla punktów czasowych 0,5 h, 1 h, 4 h oraz 16 h przyjmował średnie wartości z zakresu między 1,9 a 3,3. Największa średnia indukcja ryboprzełączników SAM nastąpiła po 2 h od eliminacji metioniny z pożywki, gdzie średnia wartość dla wszystkich ryboprzełączników SAM wynosiła $IR=5,8$ i te warunki czasowe zostały wykorzystane podczas przygotowywania bibliotek cDNA do sekwencjonowania Term-Seq.



Rysunek 14. Średnie wartości współczynnika indukcji IR genów/operonów kontrolowanych ryboprzełącznikiem SAM w ośmiu punktach czasowych (0 h, 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 16 h)

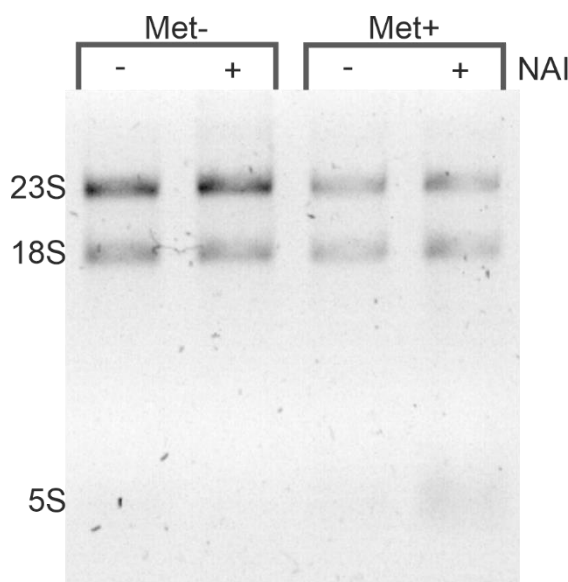
4.1.3 Przygotowanie bibliotek cDNA do sekwencjonowania Term-SHAPE-Seq

Dysponując zoptymalizowanymi warunkami wzrostu bakterii oraz indukcji ryboprzełączników, przygotowano właściwą hodowlę bakterii, stanowiącą punkt wyjścia dla biblioteki do sekwencjonowania, w analogiczny sposób jak powyżej. Bardzo istotnym celem eksperymentu jest poznanie natywnej struktury drugorzędowej, jaką przyjmują cząsteczki mRNA w komórce bakterii (struktury *in vivo*). W tym celu zdecydowałem się na użycie techniki acylacji grup 2'-hydroksylowych analizowanej za pomocą reakcji odwrotnej transkrypcji (SHAPE, ang. *selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension*) w procesie przygotowania biblioteki cDNA, zgodnie z procedurą opisaną w Rozdziale 6.6.17 (Rysunek 15).



Rysunek 15. Przygotowanie biblioteki cDNA oraz sekwencjonowanie wraz z analizą. Czerwone trójkąty – NAI, zielone strzałki – miejsca modyfikacji, fioletowe strzałki – miejsce terminacji transkrypcji, RT – Starter RT.

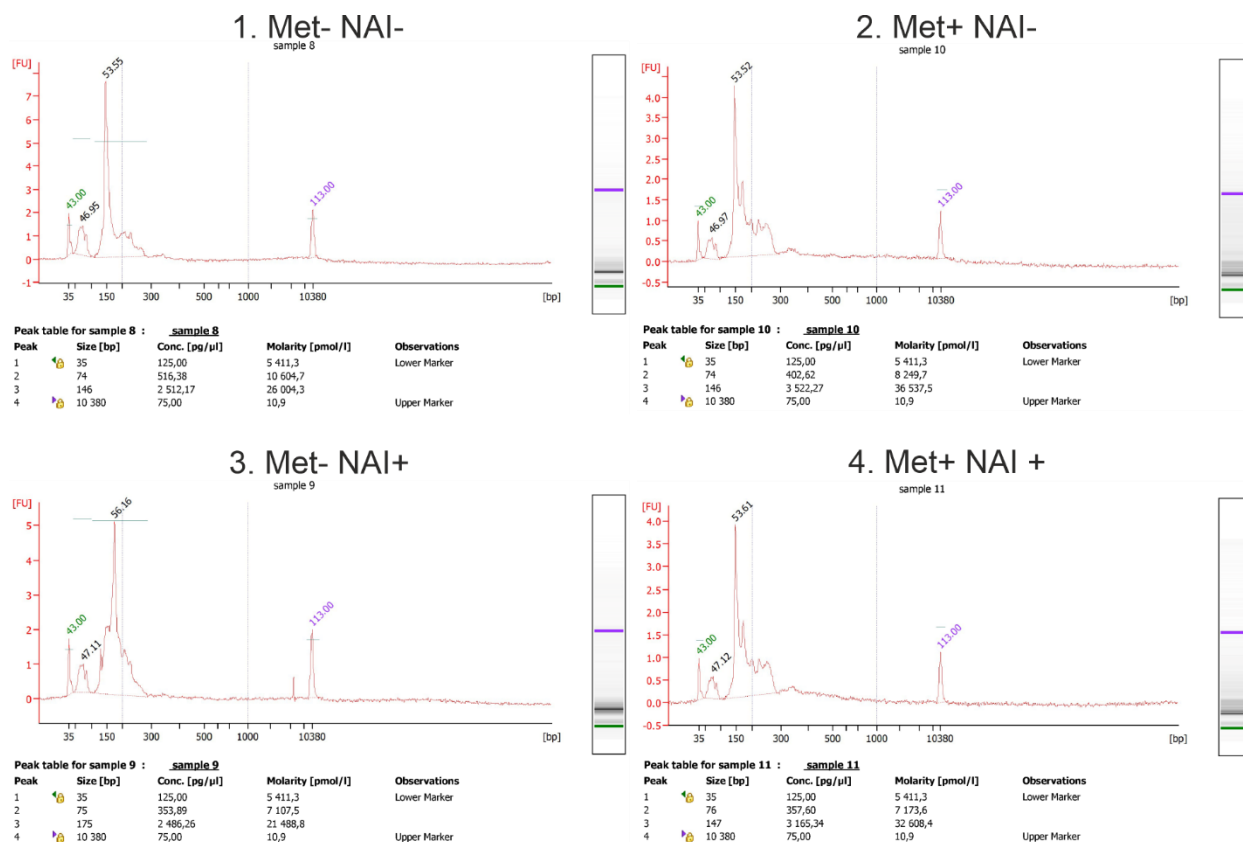
Pierwszym etapem jest chemiczna modyfikacja (acylacja) cząsteczek RNA przy użyciu odczynnika (nukleofilu), zdolnego do penetracji ściany i błony komórkowej i ostatecznie modyfikacji mRNA. Z tego powodu wszystkie próbki hodowli zwirowano, po czym do osadu bakterii dodano odczynnik modyfikujący – imidazolid kwasu 2-metylonikotynowego (NAI), rozpuszczony w DMSO lub tylko DMSO, jako kontrola. Odczynnik ten został zsyntetyzowany w naszym laboratorium, zgodnie z procedurą opisaną w Rozdziale 6.6.13. Podanie tego nukleofilu acyluje grupy 2'-OH reszt rybozy w regionach jednoniciowych RNA, nawet w środowisku komórki. Modyfikację prowadzono przez 15 min. Z tak przygotowanych bakterii wyizolowano całkowity RNA. Następnie jakość oraz ilość RNA zostały określone z wykorzystaniem spektrofotometru NanoDrop oraz w 0,5% żelu agarozowym (Rysunek 16). Parametry $A_{260/280}$ i $A_{260/230}$ mieściły się w przedziale 2,0-2,2, co wskazuje na odpowiednią czystość próbki RNA po modyfikacji NAI. Wyraźnie widoczne prążki w żelu agarozowym odpowiadające rRNA, przy jednoczesnym braku smugi poniżej wskazują na integralność RNA.



Rysunek 16. Rozdział elektroforetyczny całkowitego RNA z komórki *B. subtilis*. „Met-” - hodowla bez metioniny, „Met+” - hodowla z metioniną.

Następnie, celem wzbogacenia biblioteki o cząsteczki mRNA usunięto rRNA z wykorzystaniem zestawu Ribo-Zero rRNA Removal Kit, zgodnie z procedurą opisaną w Rozdziale 6.6.17. Następnie do RNA został dołączony 3' Linker (Tabela 13), zawierający sekwencję komplementarną dla Startera RT niezbędnego dla przeprowadzenia odwrotnej transkrypcji. Kolejna selekcja fragmentów pozwoliła na wyizolowanie tylko tych cząsteczek RNA, do których została dołączona cząsteczka 3' Linkera. W następnej reakcji cząsteczki RNA z każdej z bibliotek zostały przepisane na cDNA w reakcji odwrotnej transkrypcji

z wykorzystaniem zestawu SuperScript II oraz startera RT (Tabela 13). Tak przygotowane cząsteczki również zostały poddane selekcji pod kątem rozmiarów na 12% żelu PAA, celem wyeliminowania nieprzepisanych na cDNA fragmentów RNA oraz niewykorzystanych starterów RT. Otrzymane biblioteki cDNA zostały poddane cyrkularyzacji przy użyciu cyrkularnej ligazy w celu uniknięcia odchylenia ilości odczytów spowodowanych różną wydajnością przyłączania adapterów [204]. W ostatnim etapie do wszystkich bibliotek zostały dołączone adaptory Illumina (Tabela 13). Startery te zostały zaprojektowane w sposób dywergentny, tj. są zwrócone „od siebie”, dzięki czemu amplifikacja fragmentu DNA może zajść jedynie w cząsteczkach cyrkularnych. Tak przygotowane biblioteki zostały oczyszczone z wykorzystaniem zestawu kolumnkowego MinElute PCR Purification Kit firmy Qiagen a następnie poddanie analizie jakościowej i ilościowej przy użyciu analizatora kapilarnego Agilent 2100 Bioanalyzer System (Rysunek 17). Eksperyment wykazał skuteczne namnożenie fragmentów DNA o oczekiwanej długości ampliconu od 150 do 300 nt.



Rysunek 17. Analiza czterech bibliotek cDNA z wykorzystaniem analizatora kapilarnego Agilent 2100 Bioanalyzer.

4.1.4 Sekwencjonowanie

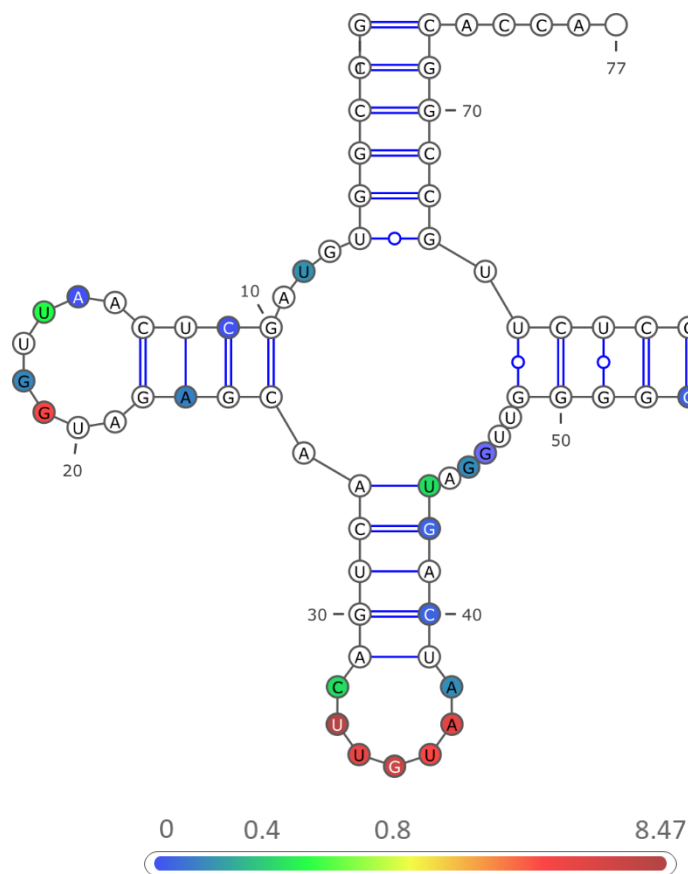
Wszystkie cztery przygotowane biblioteki zostały rozcieńczone do stężenia 0,3 fmol/ μ l i zsekwencjonowane z wykorzystaniem systemu MiSeq firmy Illumina. Sekwencjonowanie zostało wykonane w Pracowni Technologii Wysokoprzepustowych na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Odczyty zmapowano do sekwencji referencyjnego genomu *B. subtilis*, GenBank: AL009126.3. Analiza wyników sekwencjonowania wykazała skuteczność zaproponowanej metody w identyfikacji zdarzeń terminacji transkrypcji w transkryptomie *B. subtilis*. Zaobserwowałem bowiem charakterystyczne sygnatury w odczytach mogące świadczyć o tym, iż ekspresja danego genu może być kontrolowana z wykorzystaniem mechanizmu przedwczesnej terminacji transkrypcji (Rysunek 15). Charakterystyczna była między innymi zwiększona akumulacja odczytów mapujących do 5'UTR niektórych genów, co do których podejrzewa się ze źródeł literaturowych, że są kontrolowane właśnie w ten sposób. Ponadto odczyty te są zakończone niemal dokładnie w tej samej pozycji z końca 3', co świadczy o precyzyjnym i nieprzypadkowym mechanizmie ich powstawania.

Tego typu sygnatury możemy znaleźć między innymi w sekwencji liderowej L20 powyżej operonu *infC-rpmI-rplT*, kodującego odpowiednio: translacyjny czynnik inicjacyjny IF-3, białko rybosomalne L35 oraz białko rybosomalne L20. Uważa się, że lider L20 kontroluje ekspresję tego operonu za pośrednictwem mechanizmu atenuacji transkrypcji, wykorzystującym białko L20 jako czynnik wywołujący zmianę struktury RNA [205].

Opracowana metoda Term-SHAPE-Seq pozwala także na zidentyfikowanie znanych ryboprzełączników transkrypcyjnych. Analogiczne do powyższych sygnatury terminacji transkrypcji zostały także zaobserwowane choćby w 5'UTR operonu *metNPQ* kodującego zależny od ATP transporter metioniny (permeazę metioninową), którego ekspresja jest kontrolowana za pośrednictwem ryboprzełącznika transkrypcyjnego SAM. Zgrupowanie transkryptów równo zakończonych tuż za sekwencją terminatora dowodzi, że jest możliwe przy udziale sekwencjonowania RNA zidentyfikowanie ryboprzełączników.

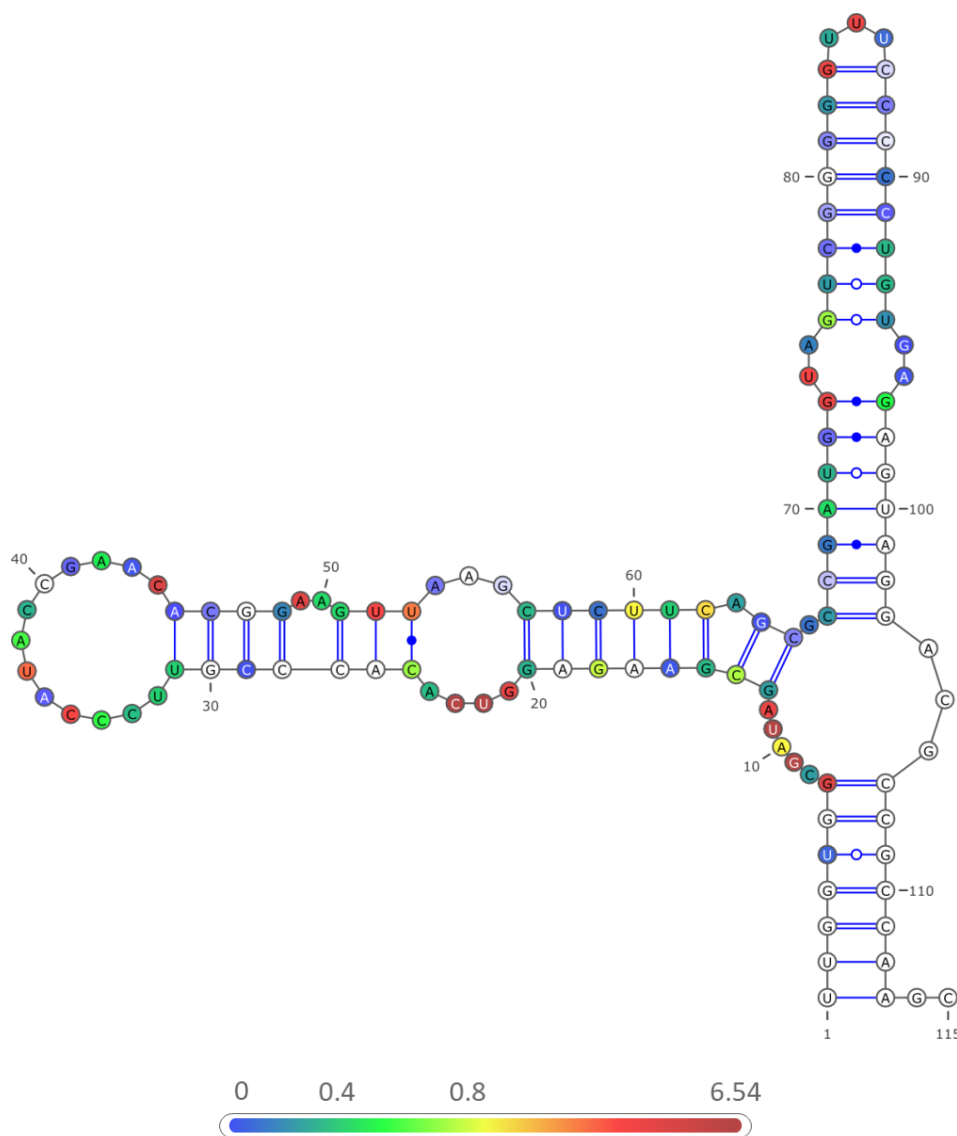
Jednocześnie poprzez analizę końców 5' odczytów zlokalizowanych w 5' UTR możliwe jest określenie struktury drugorzędowej wybranych cząsteczek mRNA, jako że wygenerowane fragmenty 5' odczytów odzwierciedlają miejsca modyfikacji jednoniciowych regionów RNA przez NAI. Porównanie reaktywności pomiędzy próbkami NAI- i NAI+ umożliwiło określenie struktury drugorzędowej RNA na etapie sekwencjonowania. Struktury wygenerowano z użyciem programu RNAstructure 5.6, a następnie zwizualizowano w programie VARNA 3.9.3.

Dobrym przykładem poprawnie określonej struktury za pomocą metody Term-SHAPE-seq jest cząsteczka tRNA treoninowego. Nukleotydy o zwiększonej reaktywności ściśle korespondują z jednoniciowymi rejonami w strukturze tRNA (Rysunek 18). Jest to szczególnie widoczne w pętli antykodonowej cząsteczki tRNA, gdzie zdecydowana większość nukleotydów wykazuje maksymalną reaktywność. Ponadto nukleotydy zaangażowane w oddziaływania Watsona-Cricka charakteryzują się zerową bądź minimalną reaktywnością.



Rysunek 18. Struktura drugorzędowa tRNA^{Thr} wygenerowana na podstawie danych z Term-SHAPE-seq. Kolory nukleotydów – reaktywność zgodnie ze skalą.

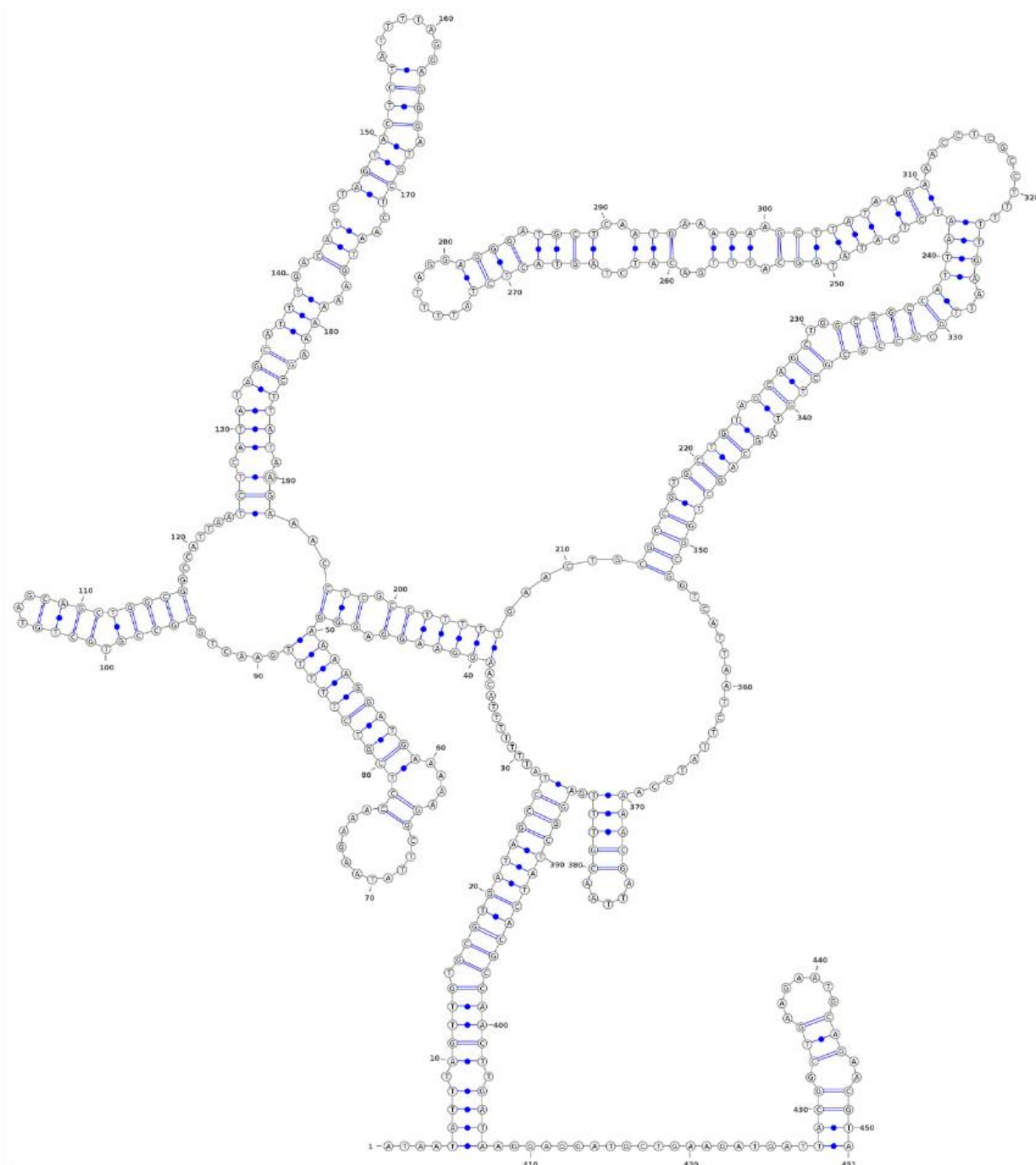
Metoda ta jest także skuteczna przy określaniu struktury dłuższych cząsteczek RNA. Przykładem dobrze określonej struktury jest 5S rRNA o długości blisko 120 nt (Rysunek 19). Również i w tym przypadku widzimy, że wzrost reaktywności nukleotydów koresponduje z regionami jednoniciowymi, przy minimalnej reaktywności regionów dwuniciowych.



Rysunek 19. Struktura drugorzędowa 5S rRNA wygenerowana na podstawie danych z Term-SHAPE-seq. Kolory nukleotydów – reaktywność zgodnie ze skalą.

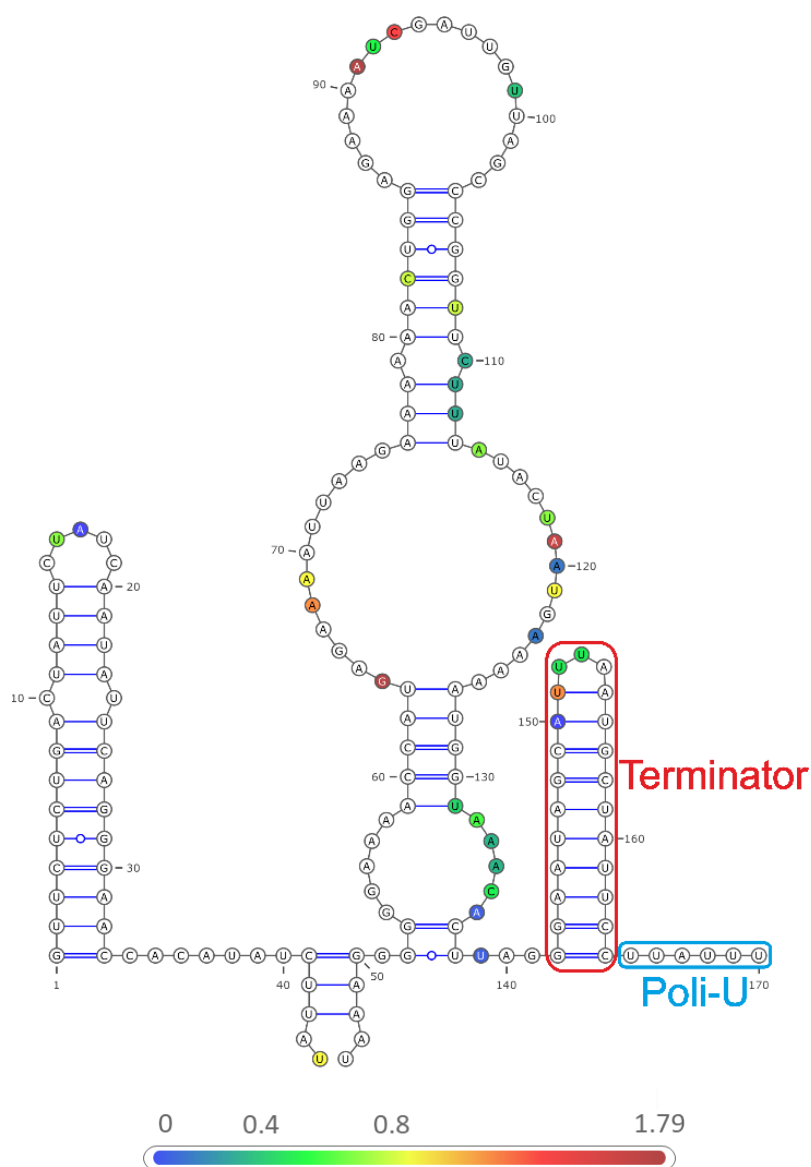
Mając do dyspozycji metodę o potwierdzonej skuteczności, zdolnej do jednoczesnej detekcji zdarzeń terminacji transkrypcji oraz określania struktury drugorzędowej postanowiłem ją wykorzystać do identyfikacji nowych ryboprzełączników. W kolejnym etapie zostały przeanalizowane dane pod kątem występowania sekwencji wskazujących na zajście przedwczesnej terminacji transkrypcji, mogących być rezultatem aktywności ryboprzełączników transkrypcyjnych, pośród genów o niezidentyfikowanym mechanizmie regulacji. W ten sposób udało się wyłonić dwie sekwencje regulatorowe mogące być nowymi ryboprzełącznikami, bądź innymi regulatorami wykorzystującymi terminację transkrypcji.

Pierwszym kandydatem na ryboprzełącznik jest sekwencja liderowa *srIX*, BSU_39890 zlokalizowana w 5'UTR operonu *asnH* (*yxbB*, *yxA*, *yxB*, *asnH*, *yxaM*). Tak jak w pozostałych przypadkach również i tu zostało zidentyfikowane istotne nagromadzenie odczytów mapujących do regionu 5' UTR. Odczyty te mają ten sam koniec 3', co sugeruje, iż zostały one wygenerowane w wyniku przedwczesnej terminacji transkrypcji. Na podstawie sekwencji został wygenerowany model struktury drugorzędowej tego regionu (Rysunek 20).



Rysunek 20. Struktura drugorzędowa *srIX* wygenerowana na podstawie danych z Term-SHAPE-seq.

Drugim wytypowanym dzięki metodzie kandydatem na ryboprzełącznik jest locus BSU07480 – sekwencja liderowa genu *yfmG*, którego funkcja jest nieznana. Tak jak poprzedni kandydat, posiada on wszystkie cechy wskazujące na to, iż ekspresja tego genu jest kontrolowana z wykorzystaniem mechanizmu przedwczesnej terminacji transkrypcji. Ponadto analiza strukturalna regionu wykazała, że posiada on stabilną strukturę drugorzędową z kilkoma pętlami i strukturami spinki do włosów (Rysunek 21). Widzimy także wzrost reaktywności nukleotydów występujących w obszarach jednoniciowych oraz brak reaktywnych nukleotydów w regionach dwuniciowych. Dodatkowo, obecna jest spinka terminacyjna, tuż za którą, występuje trakt poli-U.



Rysunek 21. Struktura drugorzędowa sekwencji liderowej *yfmG* wygenerowana na podstawie danych z Term-SHAPE-seq. Kolory nukleotydów – reaktywność zgodnie ze skalą.

4.1.5 Dyskusja wyników przedstawionych w rozdziale 4.1

W powyższym rozdziale przedstawiono wyniki wskazujące na opracowanie skutecznej metody identyfikacji nowych elementów regulatorowych wykorzystujących mechanizm przedwczesnej terminacji transkrypcji, w tym ryboprzełączników. Dzięki temu, iż metoda opiera się na technologii NGS, możliwe jest identyfikowanie nowych ryboprzełączników z dużą przepustowością. Pomimo że w niniejszej pracy został zsekwencjonowany pojedynczy genom bakterii *B. subtilis*, to metoda ta nie wykazuje żadnych przeciwwskazań by analizować również metagenomy bakteryjne. A ponieważ detekcja ta nie bazuje na porównywaniu sekwencji, pozwala ona na identyfikację ryboprzełączników sekwencyjnie odrębnych czy też ewolucyjnie nowych, których zidentyfikowanie poprzez analizę porównawczą stanowi duże wyzwanie. Ponadto możliwe jest także wykrywanie krótkich sekwencji ryboprzełączników lub występujących rzadko, co także jest problematyczne przy korzystaniu jedynie z tradycyjnego podejścia (sekwencjonowanie porównawcze).

Oczywiście podejście typu Term-seq było z powodzeniem wykorzystywane do identyfikacji nowych sekwencji regulatorowych występujących w genomach bakterii [206]. Jednak moim innowacyjnym wkładem w rozwój tej technologii jest sprzężenie dwóch odrębnych typów sekwencjonowania: Term-seq oraz SHAPE-seq tak, by zmaksymalizować ilość istotnych informacji, jakie można uzyskać w jednym eksperymencie. Jest to o tyle ważne, że za swój cel badawczy wybrałem identyfikację szczególnych typów elementów regulatorowych, jakimi są ryboprzełączniki. A ich charakterystyczną cechą jest struktura drugorzędowa, która ulega rearanżacjom pod wpływem działania ligandów. Dlatego też uzyskanie choćby częściowych informacji na temat struktury badanego regionu pozwala znacząco wzmocnić, osłabić lub nawet wykluczyć hipotezę dotyczącą istnienia potencjalnego ryboprzełącznika.

Suplementacja hodowli bakterii konkretnym związkiem chemicznym (w mojej pracy była to metionina) pozwala na wyodrębnienie tych elementów regulatorowych (ryboprzełączników), które są związane z odpowiedzią na daną cząsteczkę. Jednak jak się okazało, dodatek metioniny do pożywki jedynie wzmocnił sygnały z ryboprzełączników SAM, ułatwiając ich identyfikację. Natomiast wyraźny był także wzrost ilości odczytów od innych elementów regulatorowych, kompletnie niezależnych od stężenia SAM, takich jak choćby lider L20. Dzieje się tak dlatego, że tego typu regulatory bardzo rzadko działają z zero-jedynkową dokładnością, co znaczy, że bez względu na warunki obserwujemy jednocześnie skrócone jak i pełnej długości transkrypty, a poszczególne czynniki zmieniają jedynie ich wzajemną proporcję. W kontekście

ryboprzełączników oznacza to, iż metoda ta jest bardziej rekomendowana w celu wyszukiwania nowych reprezentantów znanych klas, bądź nowych klas wiążących znany ligand (zastosowany podczas hodowli bakterii), jednak nie wyklucza ona detekcji nieznanymi klas ryboprzełączników.

W efekcie zastosowania mojej autorskiej metody Term-SHAPE-seq, zostały zidentyfikowane dwie sekwencje regulatorowe mogące być potencjalnie nowymi ryboprzełącznikami. Pierwsza z nich to sekwencja *srlX*, powyżej operonu *asnH*. Sekwencja ta była opisywana w literaturze naukowej, jako element regulatorowy o nieznanym funkcji [207]. Charakterystyczną cechą tego zagadkowego elementu jest jego nietypowo duży rozmiar (blisko 400 nt), składający się z trzech tandemowo powtórzonych sekwencji. Jedynym genem tego operonu o znanej i potwierdzonej funkcji jest *asnH* kodujący syntazę asparaginową (UniProt P42113). Natomiast białko kodowane przez pierwszy gen w operonie – *yxbB*, wykazuje podobieństwo do metylotransferaz, zawierającą domenę wiążącą SAM (UniProt P46326). Stąd wniosek, że produkt białkowy tego genu może pełnić funkcję SAM-zależnej metylotransferazy. Mogłoby to wskazywać, że potencjalnym elementem regulatorowym tego operonu jest ryboprzełącznik SAM. Jednak biorąc pod uwagę nietypowy rozmiar, sekwencję i strukturę 5' UTR oraz brak spinki terminacyjnej zdaje się być mało prawdopodobne by region *srlX* pełnił funkcję ryboprzełącznika. Zatem zasadnicze pytanie dotyczące funkcji, jaką może pełnić owa sekwencja pozostaje nadal otwarte.

Drugą sekwencją mogącą potencjalnie pełnić funkcję ryboprzełącznika jest lider genu *yfmG* kodującego białko nieznanego funkcji. Analiza porównawcza wykazuje obecność domeny FGE-sulfatazy (ang. *formylglycine-generating enzyme*), występującej w enzymach zaangażowanych konwersję cysteiny do formyloglicyny (UniProtKB O34722). Na tej podstawie trudno jednak wydedukować potencjalny ligand dla ryboprzełącznika, jako że żaden dotąd znany ryboprzełącznik nie był funkcjonalnie powiązany z tym szlakiem metabolicznym (Rysunek 36). Co istotne, region ten posiada stabilną strukturę drugorzędową. Struktura ta składa się z kilku fragmentów jednoniciowych zdolnych do tworzenia różnych oddziaływań, a co za tym idzie, możliwe jest uformowanie kieszeni wiążącej ligand oraz zmiany strukturalne decydujące o aktywności transkrypcyjnej. Ponadto udało się zidentyfikować potencjalną spinkę terminacyjną wraz z traktem poli-U, ok. 40 nt powyżej kodonu start. Zważywszy na te cechy, lider *yfmG* zdaje się być dobrym kandydatem na ryboprzełącznik. Dlatego też moja uwaga badawcza zostanie poświęcona właśnie tej sekwencji, czyniąc go podmiotem dalszych badań mających na celu zweryfikowanie hipotezy o jego potencjalnej funkcji, jako ryboprzełącznika (lub ewentualnie jako inny element regulatorowy bazujący na terminacji transkrypcji).

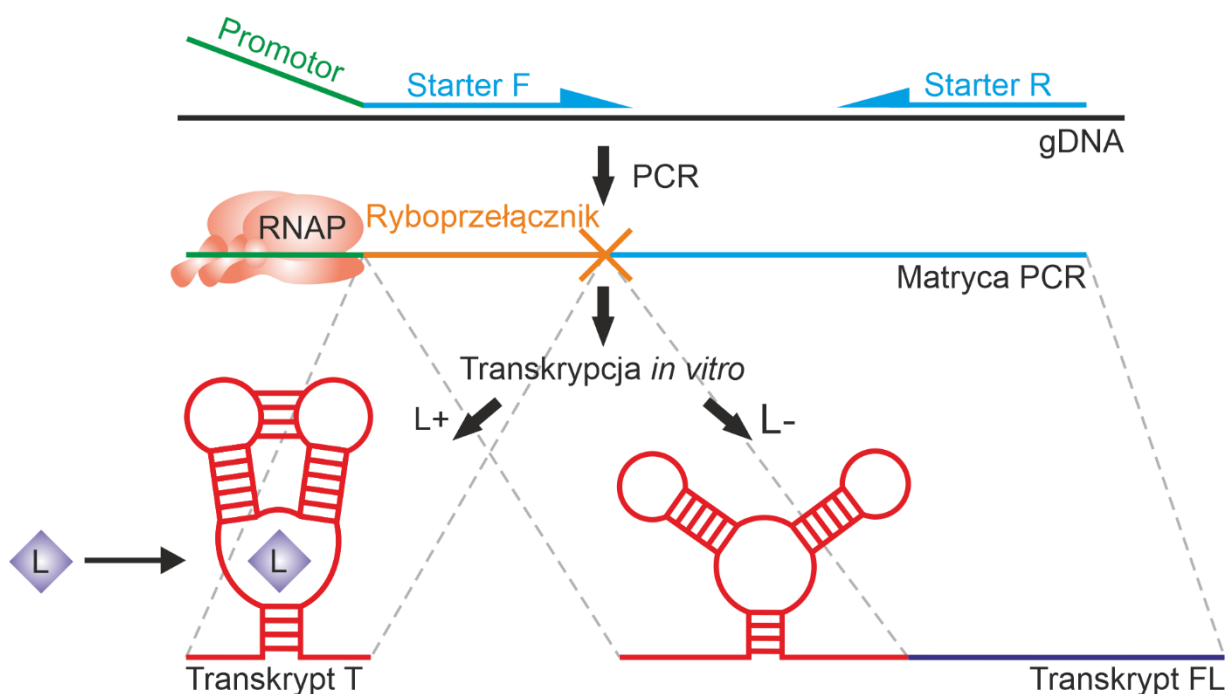
Pomimo istotnych obserwacji wynikających z opracowania i zastosowania nowatorskiej metody Term-SHAPE-Seq warto zaznaczyć, że w mojej pracy zastosowałem sekwencjonowanie o względnie niższej przepustowości, mającej zweryfikować adekwatność opracowanego i zastosowanego podejścia. Przed wykorzystaniem Term-SHAPE-Seq na szeroką skalę (z użyciem głębszego sekwencjonowania), wskazana jest poprawa wydajności przygotowywania bibliotek. Jak się bowiem okazało, bardzo istotnym problemem uniemożliwiającym wytypowanie większej ilości kandydatów było niskie pokrycie genomu odczytami. Najbardziej prawdopodobną tego przyczyną, mając poparcie w doniesieniach literaturowych, była niska wydajność cyrkularyzacji cDNA bądź ligacji. Z tych względów dalsze wysiłki badawcze w Zespole Transkryptomiki Funkcjonalnej, gdzie przygotowywałem swoją rozprawę doktorską, koncentrują się na poprawieniu wydajności reakcji, jako że opracowana przeze mnie metoda Term-SHAPE-seq, co do zasady, działa i jest bardzo obiecująca. W niedalekiej przyszłości planowane jest wykorzystanie tej metody do głębszego sekwencjonowania z użyciem, jako modelu badawczego bakterii *Staphylococcus aureus* odpornej na metycylinę (MRSA). Bakteria ta stanowi istotne wyzwanie współczesnej medycyny (jak i cały problem antybiotykoodporności), dlatego też zakładam, że moja metoda znajdzie także bardziej praktyczne zastosowanie i pozwoli na pogłębienie wiedzy z zakresu medycyny.

4.2 Metody walidacji potencjalnych ryboprzełączników

Przedstawiona metoda Term-SHAPE-Seq dostarcza informacje na temat aktywności transkrypcyjnej ryboprzełączników oraz struktury drugorzędowej. Jednak informacje te nie dają stuprocentowej pewności, że mamy do czynienia z ryboprzełącznikiem. Jak pokazały wcześniejsze wyniki, metoda ta zdolna jest do wykrywania wszystkich elementów regulatorowych opartych na przedwczesnej terminacji transkrypcji. Dlatego też kolejnym, acz niezbędnym krokiem jest eksperymentalna weryfikacja kandydatów przy użyciu dodatkowych metod biochemicznych. W tym celu opracowałem trzy eksperymentalne procedury pozwalające jednoznacznie rozstrzygnąć czy mamy do czynienia z ryboprzełącznikiem: (Rozdział 4.2.1, Rozdział 4.2.2, Rozdział 4.2.3) Wszystkie one zostały opracowane i zoptymalizowane w taki sposób, by były jak najprostsze i najszybsze do wykonania. Jest to o tyle istotne, że tego analizy wysokoprzepustowe mogą dostarczyć bardzo wiele potencjalnych kandydatów, a każdy kandydat może wymagać przetestowania wielu potencjalnych ligandów. Z tego powodu możliwość przystosowania zastosowanych metod walidacji do wysokiej przepustowości jest jak najbardziej wskazana. Jednocześnie, zaproponowane przeze mnie metody cechuje duża wiarygodność i precyzja, co pozwala na rzetelną identyfikację potencjalnych ryboprzełączników.

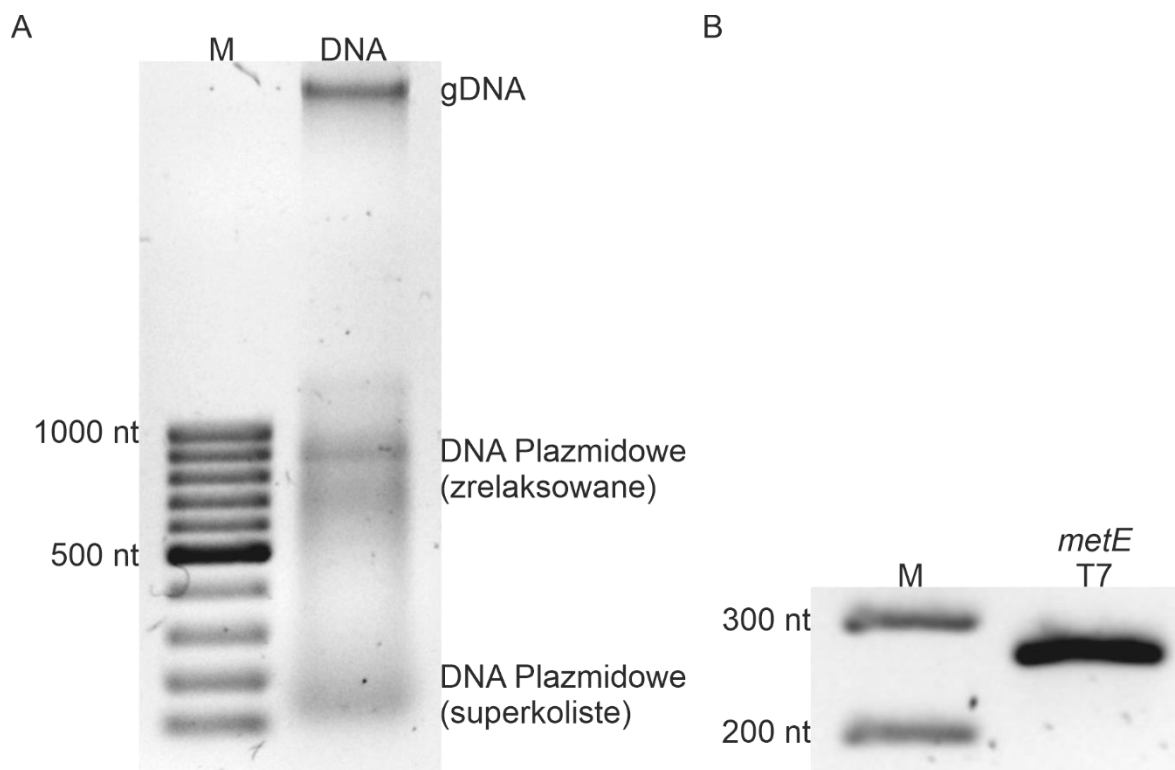
4.2.1 Terminacja transkrypcji *in vitro*

Unikatową cechą ryboprzełączników jest zdolność do wywoływania terminacji transkrypcji w warunkach *in vitro*, jedynie przy udziale odpowiedniego ligandu. Tego typu reakcja jest na tyle charakterystyczna, że jej pozytywny wynik stanowi bardzo mocny dowód na to, że analizowana sekwencja w istocie funkcjonuje jako ryboprzełącznik. Dlatego opracowałem eksperyment pozwalający w łatwy i szybki sposób rozstrzygnąć, czy mamy do czynienia z ryboprzełącznikiem. Jedyńm ograniczeniem metody jest fakt, iż do wywołania odpowiedzi ryboprzełącznika niezbędna jest znajomość właściwego ligandu. Polega ona na przeprowadzeniu szeregu reakcji transkrypcji w warunkach *in vitro* we wzrastającym gradiencie stężenia ligandu dla badanego ryboprzełącznika. Wraz ze wzrostem stężenia struktura spinki terminacyjnej zaczyna dominować i powstaje coraz więcej transkryptów skróconych kosztem transkryptów pełnej długości (Rysunek 22).



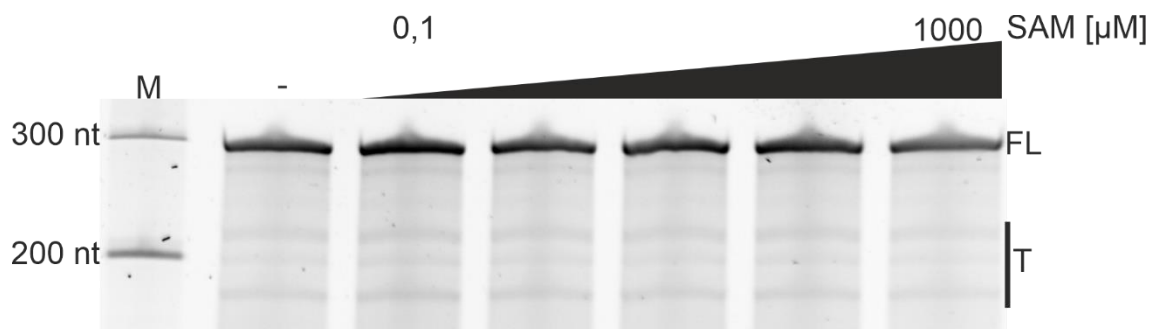
Rysunek 22. Terminacji transkrypcji *in vitro*. Pomarańczowy X – miejsce terminacji transkrypcji, RNAP – polimeraza RNA, L – ligand. FL – transkrypty pełnej długości, T – transkrypty skrócone.

Do przetestowania możliwości metody wykorzystałem znany ryboprzełącznik SAM (SAM-I) kontrolujący ekspresję genu *metE* u bakterii *B. subtilis*, jednak niescharakteryzowany jak dotąd pod kątem właściwości terminacyjnych czy struktury. Celem syntezy cząsteczki RNA zawierającej ryboprzełącznik, w pierwszej kolejności wygenerowałem odpowiednią matrycę DNA w reakcji PCR przy użyciu startera *forward* zawierającego sekwencję promotora dla polimerazy T7 (Tabela 11) oraz genomowego DNA (gDNA) zgodnie z procedurą opisaną w Rozdziale 6.6.10. gDNA służące jako matryca dla reakcji PCR zostało wyizolowane z bakterii *B. subtilis* zgodnie z procedurą opisaną w Rozdziale 6.6.1 (Rysunek 23 A).



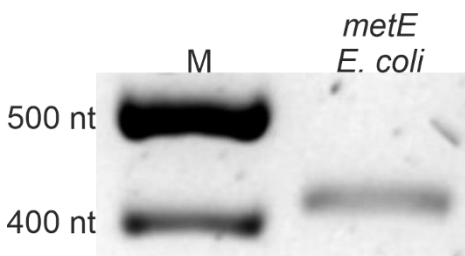
Rysunek 23. A) Genomowy DNA. B) Matryca PCR *metE* do transkrypcji *in vitro* z wykorzystaniem wirusowej polimerazy T7. M – marker wielkości

Wykorzystując przygotowane matryce PCR (Rysunek 23 B) przeprowadziłem szereg reakcji transkrypcji *in vitro* w obecności wzrastającego stężenia SAM, zgodnie z procedurą opisaną w Rozdziale 6.6.7 (Rysunek 24). Po przeprowadzeniu rozdzielania elektroforetycznego zsyntetyzowanych produktów RNA widoczny był wyraźny prążek korespondujący z transkryptami FL we wszystkich warunkach. Jednak jak się okazało, obecność nawet najwyższego stężenia SAM (1 mM) nie wywołała terminacji transkrypcji. Przy wyższym stężeniu SAM (10 mM), cała reakcja transkrypcji *in vitro* uległa zahamowaniu – nie powstawały żadne transkrypty. Potencjalną przyczyną było użycie wirusowej polimerazy z faga T7 zamiast polimerazy pochodzenia bakteryjnego, która bardziej odzwierciedlałaby warunki komórkowe.



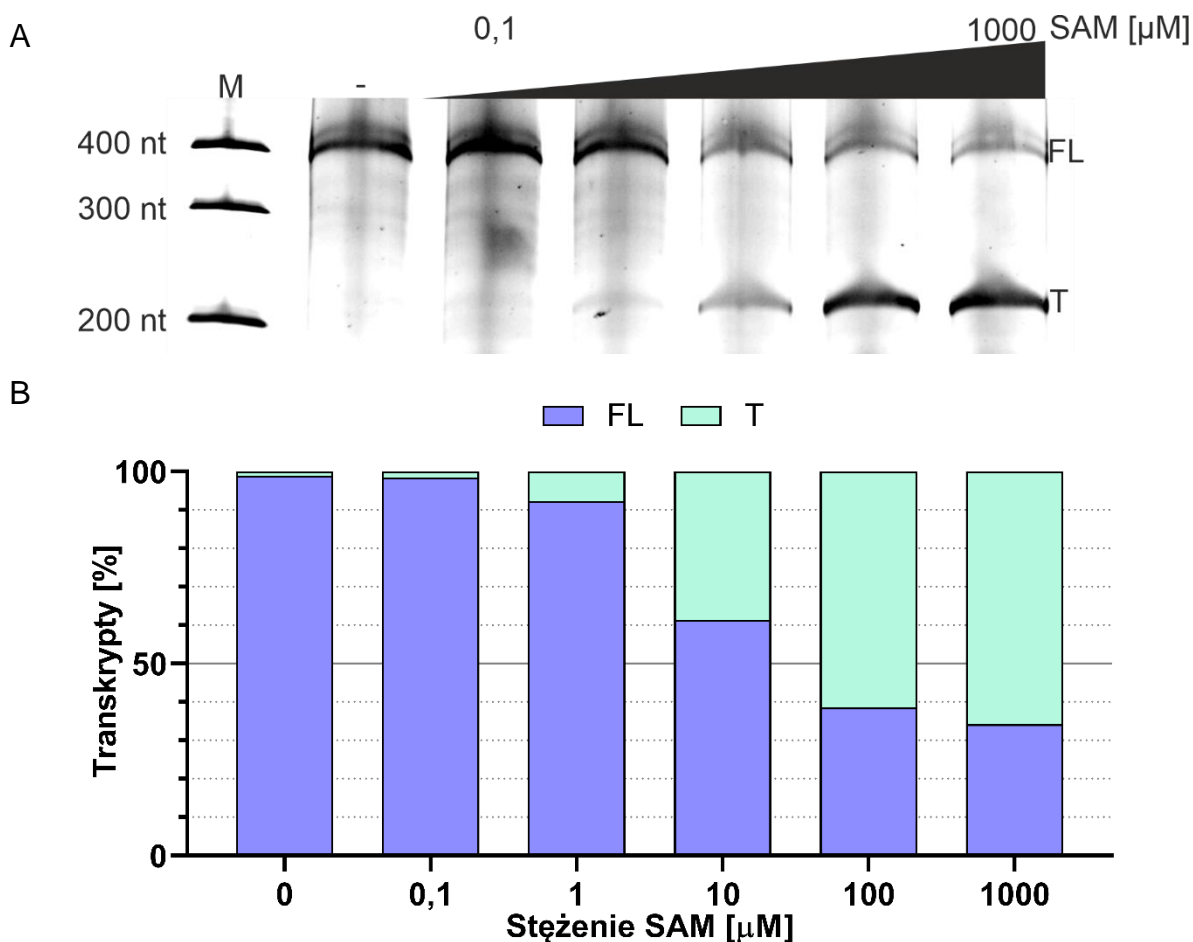
Rysunek 24. Terminacja transkrypcji *in vitro* *metE* z użyciem wirusowej polimerazy T7. Elektroforeza przedstawiająca produkty terminacji transkrypcji w gradiencie stężeń SAM. M – marker wielkości, FL – transkrypty pełnej długości, T – transkrypty skrócone.

Dlatego też w kolejnym eksperymencie postanowiłem wykorzystać nieco niestandardowy wariant transkrypcji *in vitro* z użyciem bakteryjnej polimerazy z *E. coli*. (*E. coli* RNA Polymerase, Holoenzym). W skład tego enzymu wchodzi wszystkie podjednostki polimerazy oraz podjednostka σ^{70} . Podjednostka ta rozpoznaje najsilniejsze promotory genów metabolizmu podstawowego, co również zapewnia wysoką wydajność transkrypcji. Celem użycia bakteryjnej polimerazy przygotowano nową matrycę PCR, zawierającą sekwencję promotora dla RNAP σ^{70} z *E. coli* *gapA*P1. Produkty reakcji zostały zwizualizowane na 8% żelu PAA (Rysunek 25).



Rysunek 25. Matryca PCR *metE* do transkrypcji *in vitro* z wykorzystaniem bakteryjnej polimerazy *E. coli*. M – marker wielkości.

W wyniku reakcji otrzymano zarówno transkrypty FL jak i T (Rysunek 26 A). Ponadto, wraz ze wzrostem stężenia SAM zmniejszała się ilość pełnej długości transkryptów FL, a wzrastała ilość skróconych transkryptów T w sposób zależny od stężenia. O ile dla najniższych stężeń SAM nie obserwowałem właściwie w ogóle skróconych transkryptów o tyle przy 1 mM stężeniu stanowiły one 65% puli wszystkich transkryptów (Rysunek 26 B).

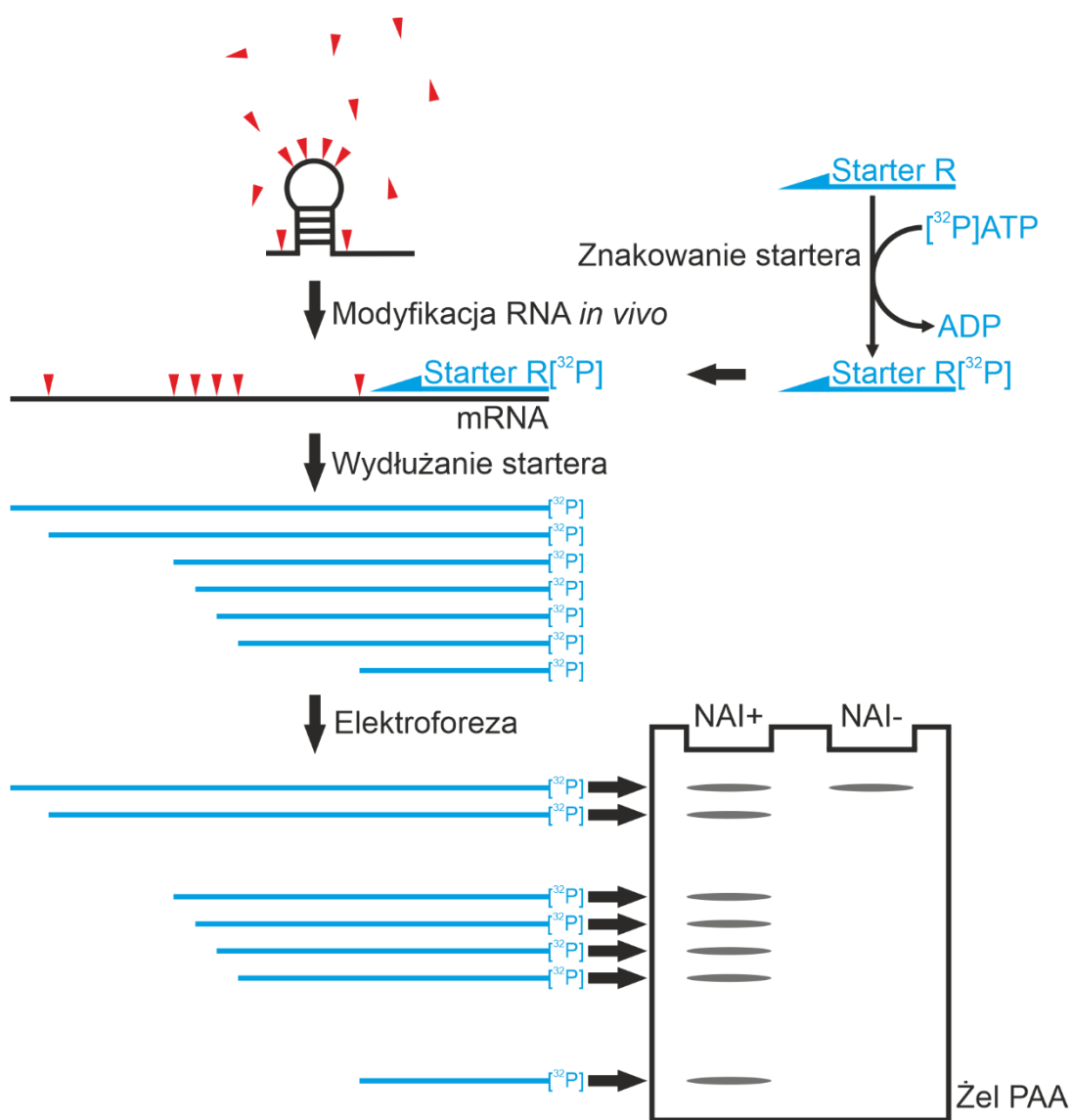


Rysunek 26. Terminacja transkrypcji *in vitro metE* z wykorzystaniem bakteryjnej polimerazy *E. coli*. (A) Elektroforeza przedstawiająca produkty terminacji transkrypcji w gradiencie stężeń SAM. M – marker wielkości, FL – transkrypty pełnej długości, T – transkrypty skrócone. (B) Udział procentowy poszczególnych transkryptów w gradiencie stężenia SAM.

4.2.2 Określanie struktury drugorzędowej metodą SHAPE *in vitro*

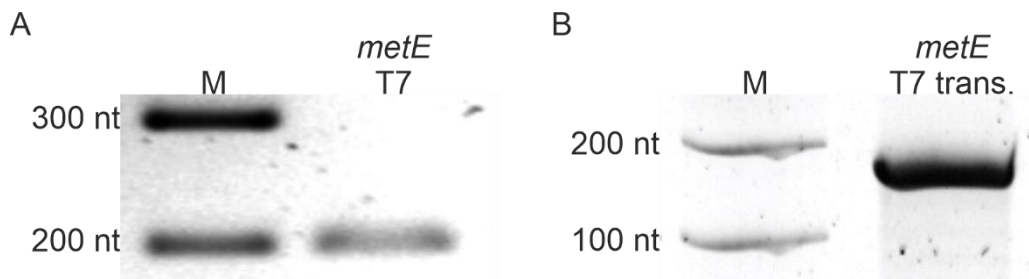
Ryboprzełączniki mogą pełnić swoją regulatorową funkcję dzięki specyficznej strukturze, jaką przyjmują w komórce, która ulega istotnej rearanzacji po związaniu swoistego ligandu. Struktura ryboprzełącznika jest także podstawą ich taksonomii i przynależności do konkretnej klasy. Wiele technik identyfikacji ryboprzełączników jest oparta o analizy porównawcze struktur regionu 5'UTR transkryptów bakteryjnych. Wszystkie te fakty świadczą o kluczowej roli struktury sekwencji liderowej transkryptu w procesie identyfikacji ryboprzełączników. Stąd potrzeba opracowania techniki pozwalającej na wiarygodne określenie struktury drugorzędowej, a także zdolnej do dyskryminacji pomiędzy formami apo i holo ryboprzełącznika. Istotne, aby nowo opracowana metoda była zdolna i adekwatna także do walidacji wyników (struktur) uzyskanych podczas sekwencjonowania metodą Term-SHAPE-seq. Stąd wybór techniki SHAPE z wykorzystaniem odczynnika NAI. Metoda ta polega

na chemicznej modyfikacji reszt hydroksylowych nukleotydów RNA w sekwencjach jednoniciowych (Rysunek 27). Przedtem RNA jest inkubowane we wzrastającym gradiencie stężenia ligandu, co skutkuje zmianą struktury drugorzędowej (pewne miejsca z jednoniciowych stają się dwuniciowe i odwrotnie). Tak przygotowane RNA jest poddawane reakcji wydłużania startera, w trakcie której, odwrotna transkryptaza jest blokowana po napotkaniu zmodyfikowanego nukleotydu, tworząc krótsze fragmenty cDNA o długości od startera do miejsca modyfikacji. Po rozdiale elektroforetycznym fragmentów cDNA możliwe jest prześledzenie zmian w poszczególnych rejonach RNA, jakie zaszły pod wpływem ligandu.



Rysunek 27. Mapowanie struktury drugorzędowej metodą SHAPE *in vitro* z wykorzystaniem odczynnika NAI. Czerwone trójkąty – NAI, [^{32}P] – radioaktywny izotop fosforu.

Reakcję SHAPE przeprowadzono dla ryboprzełącznika SAM-I kontrolującego ekspresję genu *metE* u bakterii *B. subtilis*. Procedurę rozpoczęto od syntezy matrycy PCR do transkrypcji (Rysunek 28 A) a następnie przeprowadzono samą reakcję transkrypcji *in vitro* (Rysunek 28 B) w sposób analogiczny jak to opisano w rozdziale 4.2.1.



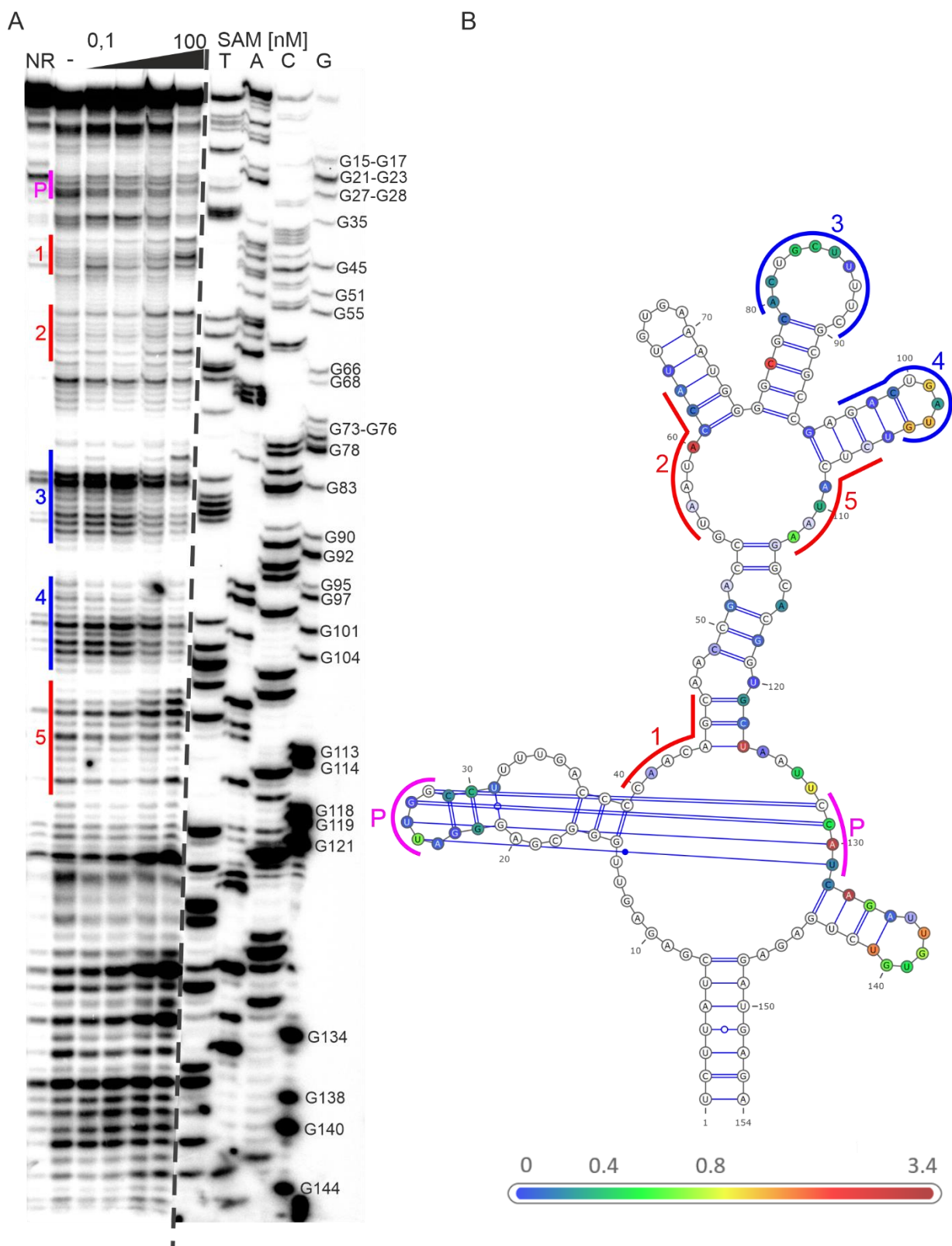
Rysunek 28. A) Matryca PCR *metE* do transkrypcji *in vitro* z wykorzystaniem wirusowej polimerazy T7. B) Produkt transkrypcji *in vitro* z wykorzystaniem wirusowej polimerazy T7. M – marker wielkości, tran. – transkrypt.

Otrzymany RNA zawierający sekwencję ryboprzełącznika był inkubowany w 37°C przez 24 h w gradiencie stężenia SAM: 0,1 mM, 1 mM, 10 mM lub 100 mM. Tak przygotowane próbki zostały poddane modyfikacji z użyciem odczynnika NAI zgodnie z procedurą opisaną w Rozdziale 6.6.14. Miejsca modyfikacji identyfikowałem za pomocą reakcji odwrotnej transkrypcji (RT, ang. *reverse transcription*) z wykorzystaniem enzymu odwrotnej transkryptazy SuperScript IV, przy pomocy startera DNA znakowanego na końcu 5' izotopem [γ - 32 P]ATP. Fragmenty cDNA były rozdzielane elektroforetycznie w warunkach denaturujących w 8% żelu poliakryloamidowym. Model struktury drugorzędowej został wygenerowany przez program RNAstructure 5.6, a następnie zwizualizowany w programie VARNA 3.93, z uwzględnieniem danych mapowania struktury, otrzymanych za pomocą metody SHAPE.

Analizując otrzymany autoradiogram, widzimy istotny wzrost reaktywności – czarne prążki, korespondujące z obszarami jednoniciowymi, zmodyfikowanymi przez NAI porównując próbkę bez reakcji (NR, ang. *no reaction*) ze ścieżką zmodyfikowaną (-) (Rysunek 29 A). Świadczy to o skutecznej modyfikacji transkryptu przy użyciu NAI. Co istotne, wraz ze wzrostem stężenia SAM zmienia się profil reaktywności poszczególnych obszarów. Niektóre z regionów jednoniciowych takie jak 3 lub 4 (spadek reaktywności) zaczynają się angażować w oddziaływania z innymi fragmentami jednoniciowymi, bądź samym ligandem. Struktura innych obszarów RNA, takich jak 1, 2 i 5 ulega rozpleceniu pod wpływem działania SAM (wzrost reaktywności). Widoczny jest także pseudowęzeł (P), którego reaktywność maleje wraz ze wzrostem stężenia SAM. Oba typy rearanżacji strukturalnych manifestują się przez

odpowiednio zwiększenie reaktywności (wzrost intensywności prążków w stosunku do kontroli) i spadek reaktywności (zmniejszenie intensywności prążków).

Na podstawie wzoru modyfikacji (SAM-) oraz sekwencji określona została struktura drugorzędowa ryboprzełącznika (Rysunek 29 B). Struktura ta przyjmuje kształt trójlistnej koniczyny składającej się z dwuniciowego trzonu i trzech struktur spinki do włosów. Jest on bardzo charakterystyczny dla ryboprzełączników klasy SAM-I. W środkowej, najdłuższej spince możemy wyróżnić kolejną strukturę trójlistnej koniczyny zbudowanej z trzech krótszych spinek. Wraz ze wzrastającym stężeniem SAM obserwujemy spadek reaktywności jednoniciowych pętli, co sugeruje, że pod wpływem ligandu zaczynają one oddziaływać ze sobą bądź z cząsteczką SAM. Możliwe jest także zidentyfikowanie pseudowęzła pomiędzy pętlą spinki 1 a jednoniciowym obszarem pętli centralnej pomiędzy pętlą 2 a 3.

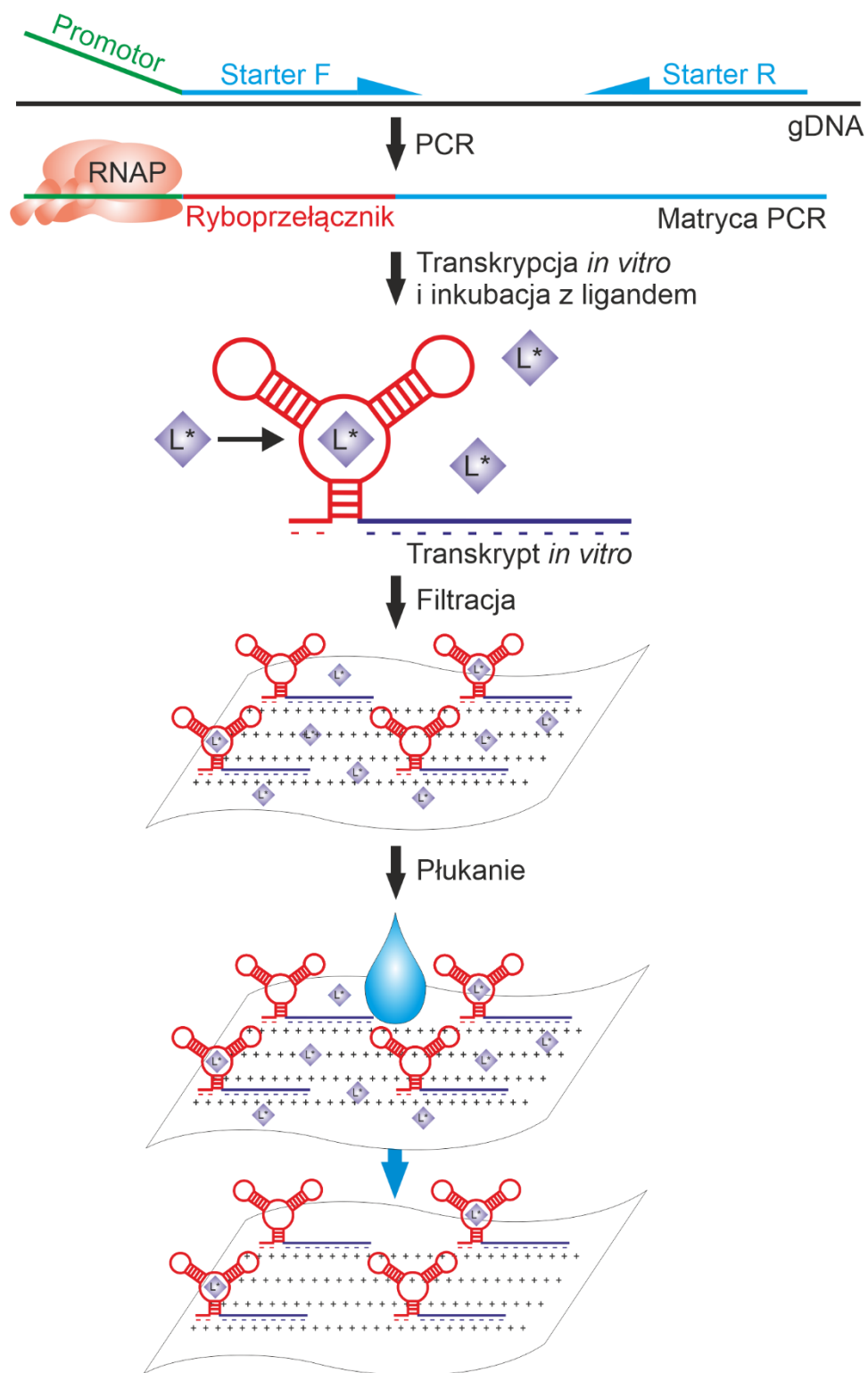


Rysunek 29. A) Mapowanie struktury drugorzędowej metodą SHAPE dla ryboprzełącznika SAM-I *metE*. B) Struktura drugorzędowa ryboprzełącznika SAM-I *metE* wygenerowana na podstawie danych z mapowania metodą SHAPE. P – pseudowęzeł, niebieskie regiony 3, 4 – spadek reaktywności ze wzrostem stężenia SAM, czerwone regiony 1, 2, 5 – spadek reaktywności ze wzrostem stężenia SAM, kolory nukleotydów – reaktywność zgodnie ze skalą.

4.2.3 Wyznaczanie K_d metodą filtracji membranowej

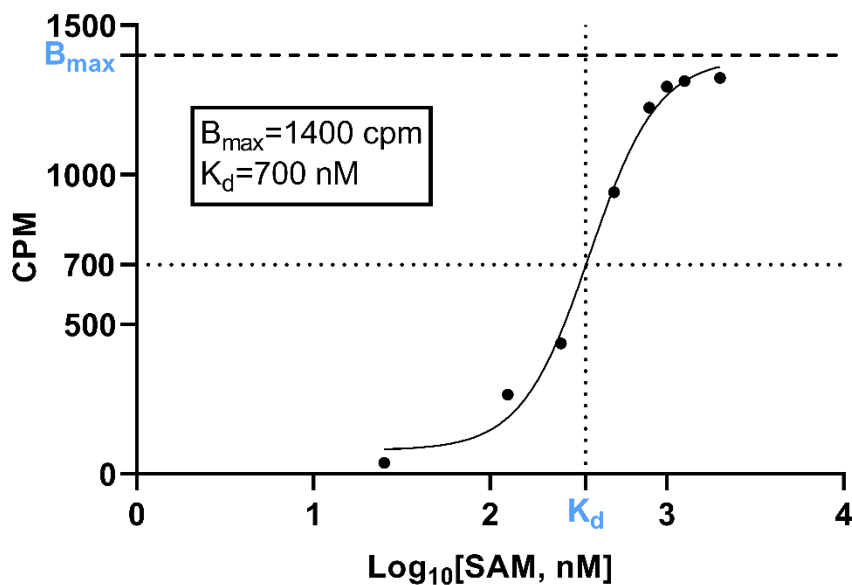
Zdecydowana większość ryboprzełączników wykazuje wysokie powinowactwo do swojego natywnego ligandu. Najczęstszą i najbardziej adekwatną miarą oddziaływań ryboprzełącznik:ligand jest stała dysocjacji K_d . Wartość tę można interpretować jako stężenie molowe wolnego ligandu, przy którym połowa cząsteczek ryboprzełącznika jest związana (w stanie holo). Im wartość K_d niższa, tym silniejsze powinowactwo ligandu do ryboprzełącznika, a co za tym idzie także specyficzność i stopień dyskryminacji. Dla większości ryboprzełączników K_d nie przekracza 1 μM , co świadczy o wysokim powinowactwie do wiązanej cząsteczki.

Metodę wyznaczania krzywej wiązania ryboprzełącznik:ligand, służącej do określenia K_d , oparłem na procedurze sączenia membranowego (Rysunek 30). W tym przypadku układ sączący składał się z pompy, sączka oraz membrany mającej zdolność wiązania kwasów nukleinowych. Do tego celu posłużyła membrana Amersham Hybond-N+. Jest ona dodatnio naładowana, dzięki czemu może skutecznie wiązać cząsteczki RNA na swojej powierzchni. Na szereg takich membran nakładamy mieszaniny ryboprzełącznika (o stałym stężeniu) z radioaktywnie znakowanym ligandem (rosnący gradient stężenia). Następnie membrany te, po związaniu ryboprzełącznika, są przepłukiwane w celu usunięcia niezwiązanych z aptamerem ligandów. Analizując szereg takich membran możemy wykreślić krzywą wiązania ryboprzełącznik:ligand, a następnie obliczyć stałą dysocjacji K_d



Rysunek 30. Procedura wyznaczania K_d metodą filtracji membranowej. RNAP – polimeraza RNA, L^* – radioaktywnie wyznakowany ligand, niebieska kropla – bufor przepłukujący membranę. „-” i „+” – ładunki elektrostatyczne.

Metodę opracowano z wykorzystaniem ryboprzełącznika SAM genu *metE* z bakterii *B. subtilis* jako modelu badawczego. Dlatego też w pierwszej kolejności sprawdziłem powinowactwo radioaktywnie znakowanego trytem metabolitu – [metyl-³H]SAM do membrany bez obecności RNA. Okazało się, że po nałożeniu na membranę odczyt licznika scyntylicyjnego wynosił 2 000 cpm, natomiast po opłukaniu odczyt wynosił 50 cpm. Świadczy to o minimalnym powinowactwie czystego SAM do membrany, co sugeruje, że odczyt z licznika będzie korespondował z właściwą ilością związanego ryboprzełącznika przez SAM. Odpowiednie cząsteczki ryboprzełącznika zostały wygenerowane przy użyciu transkrypcji *in vitro* z wykorzystaniem polimerazy T7, na matrycy PCR (cząsteczki ryboprzełącznika wygenerowane w identyczny sposób jak w rozdziale 4.2.2.). Następnie każda reakcja zawierająca ryboprzełącznik (2,5 nM) była inkubowana ze wzrastającym stężeniem [metyl-³H]SAM, od 28 do 1 800 nM, wraz z szeregiem kontrolnych reakcji bez ryboprzełącznika, zgodnie z procedurą opisaną w Rozdziale 6.6.15. Po inkubacji każdą reakcję naniesiono na osobną membranę unieruchomioną na sączku, po czym przepłukiwano buforem. Wszystkie membrany zanurzono w płynie scyntylicyjnym i wykonano pomiar radioaktywności na liczniku scyntylicyjnym. Wyniki znormalizowanych pomiarów przedstawiono na wykresie (Rysunek 31) Krzywa wiązania i stała dysocjacji zostały wyznaczone z użyciem programu GraphPad Prism 8.



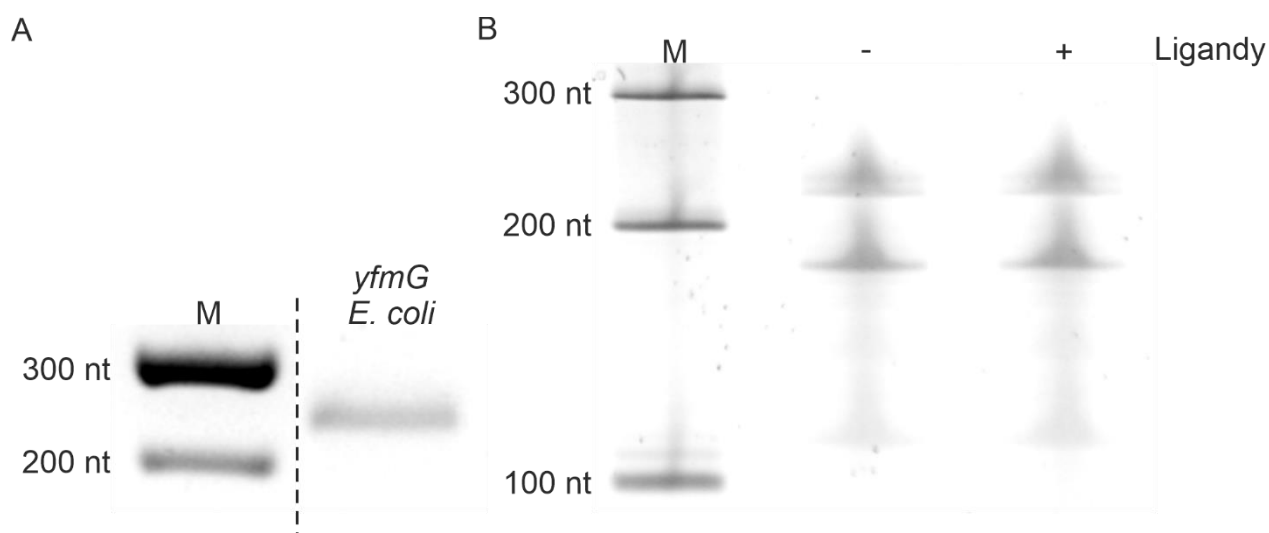
Rysunek 31. Krzywa wiązania ryboprzełącznik:ligand *metE*. B_{\max} – maksymalne wiązanie, K_d – stała dysocjacji.

4.2.4 Eksperymentalna weryfikacja kandydata na ryboprzełącznik wyłonionego podczas sekwencjonowania Term-SHAPE-Seq

Wszystkie opisane w tym rozdziale procedury eksperymentalne wykazały skuteczność w walidacji znanego ryboprzełącznika. Ponadto, pozwoliły na adekwatny oraz wnikliwy opis jego własności funkcjonalnych jak i strukturalnych. Dlatego też dysponując odpowiednio opracowanymi i zoptymalizowanymi procedurami postanowiłem eksperymentalnie zweryfikować lider genu *yfmG* pod kątem obecności ryboprzełącznika.

W pierwszej kolejności został wykonany eksperyment terminacji transkrypcji *in vitro*. Eksperyment ten jest o tyle istotny, że pozwala sprawdzić, czy konkretny ligand jest w stanie wywołać przedwczesną terminację transkrypcji w odpowiedzi na niego. W tym celu została przygotowana matryca PCR z wykorzystaniem starterów zawierających sekwencję promotora *E. coli*, analogicznie jak opisano w Rozdziale 4.2.1 (Rysunek 32 A).

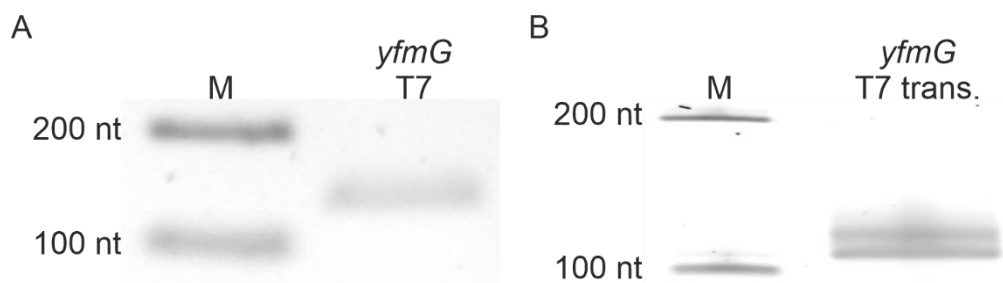
Na tak przygotowanej matrycy PCR została przeprowadzona reakcji transkrypcji *in vitro* z wykorzystaniem RNAP *E.coli*. Jako że ligand jest nieznan, została wykorzystana mieszanina, w której skład wchodziły wszystkie aminokwasy będące ligandem znanych ryboprzełączników, tj. lizyna, glicyna, glutamina oraz cysteina i SAM. Każdy z ligandów był w stężeniu 1 mM. Po wizualizacji na 8% żelu PAA widzimy transkrypty pełnej długości jak i produkty przedwczesnej terminacji transkrypcji (Rysunek 32 B). Brak jest natomiast różnic pomiędzy ścieżkami - i + oraz ilościowych transkryptów FL jak i T. Świadczy to tym, że żaden ze związków chemicznych w mieszaninie ligandów nie jest właściwym ligandem dla sekwencji liderowej *yfmG*, bądź zawiera ona inny element regulatorowy oparty na terminacji transkrypcji.



Rysunek 32. A) Matryca PCR *yfmG* do transkrypcji *in vitro* z wykorzystaniem bakteryjnej polimerazy *E. coli*. B) Terminacja transkrypcji *in vitro yfmG* z wykorzystaniem bakteryjnej polimerazy *E. coli*. M – marker wielkości, „-” – kontrola bez ligandów, „+” – próba z ligandami.

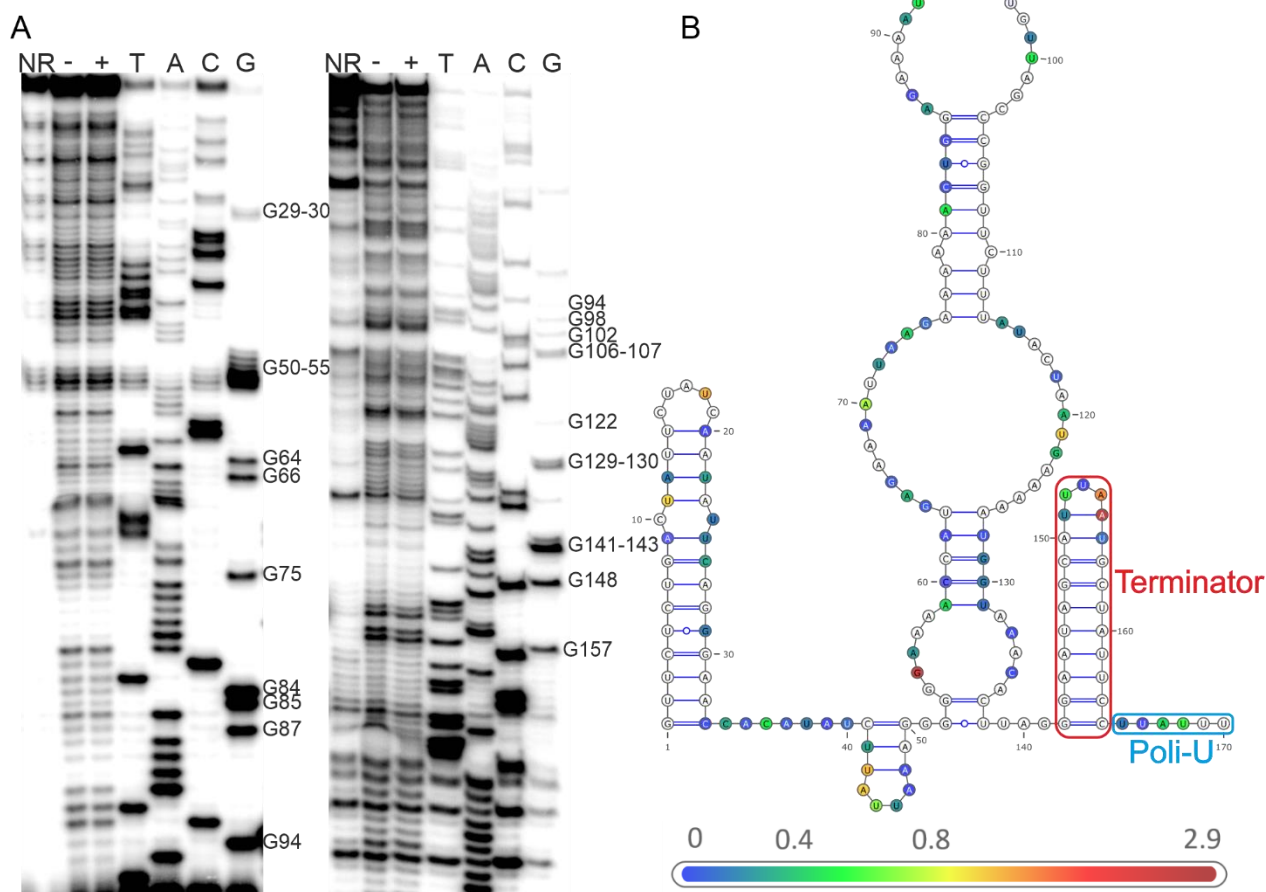
Drugim etapem weryfikacji sekwencji liderowej *yfmG* było potwierdzenie struktury wygenerowanej podczas sekwencjonowania z wykorzystaniem bardziej precyzyjnej metody jaką jest SHAPE w warunkach *in vitro*. Zważywszy na nowatorski charakter metody Term-SHAPE-seq warto sprawdzić czy wyniki pokryją się z tym otrzymanymi z wykorzystaniem standardowego protokołu reakcji SHAPE.

W pierwszej kolejności została wygenerowana matryca PCR z wykorzystaniem starterów zawierających sekwencję promotora T7 oraz gDNA, analogicznie jak to opisano w Rozdziale 4.2.2 (Rysunek 33 A). Następnie tak przygotowana matryca PCR posłużyła do przeprowadzenia reakcji transkrypcji *in vitro* z wykorzystaniem RNAP T7 analogicznie, jak to opisano w Rozdziale 4.2.2 (Rysunek 33 B).



Rysunek 33. A) Matryca PCR *yfmG* do transkrypcji *in vitro* z wykorzystaniem wirusowej polimerazy T7. B) Produkt transkrypcji *in vitro* z wykorzystaniem wirusowej polimerazy T7. M – marker wielkości, trans. – transkrypt.

Na podstawie uzyskanych informacji dotyczących reaktywności poszczególnych nukleotydów (Rysunek 34 A) udało się wygenerować strukturę tego regionu za pomocą programu RNAstructure 5.6, a następnie zwizualizowanych w programie VARNA 3.9.3 (Rysunek 34 B). Okazało się, że struktura otrzymana metodą SHAPE jest identyczna z tą otrzymaną metodą Term-SHAPE-seq (Rysunek 21). Również i tutaj widzimy kilka pętli i struktur spinki do włosów wraz ze spinką terminacyjną. Możemy zaobserwować wyraźny wzrost reaktywności nukleotydów występujących w obszarach jednoniciowych z niewielką reaktywnością nukleotydów w regionach dwuniciowych. Jedyna różnica pomiędzy metodami dotyczyła siły i ilości modyfikowanych nukleotydów na korzyść techniki SHAPE *in vitro*. Dodanie mieszaniny ligandów nie wpłynęło na zmianę struktury drugorzędowej badanej sekwencji, co potwierdza przypuszczenia wysunięte w trakcie eksperymentu terminacji transkrypcji *in vitro*, dotyczące braku związku analizowanej sekwencji z jakimkolwiek z ligandów w mieszaninie.



Rysunek 34. A) Mapowanie struktury drugorzędowej metodą SHAPE dla ryboprzelącznika SAM-I *yfmG*. B) Struktura drugorzędowa ryboprzelącznika SAM-I *yfmG* wygenerowana na podstawie danych z mapowania metodą SHAPE. Kolory nukleotydów – reaktywność zgodnie ze skalą.

4.2.5 Dyskusja wyników przedstawionych w rozdziale 4.2

Wszystkie trzy przedstawione metody zostały opracowane z myślą o szybkiej i dokładnej weryfikacji kandydatów na ryboprzełączniki. Ich prawidłowe i skuteczne działanie wykazałem dla sekwencji znanego ryboprzełącznika jakim jest sekwencja liderowa genu *metE*. Zaprezentowane w mojej pracy procedury eksperymentalne można z powodzeniem zastosować do różnych sekwencji, co do których mamy uzasadnione podejrzenia, że mogłyby one pełnić funkcję ryboprzełącznika bądź innej sekwencji regulatorowej opierającej swe działanie o mechanizm przedwczesnej terminacji transkrypcji. Każdy z eksperymentów potwierdził i opisał inny, acz kluczowy aspekt ryboprzełączników transkrypcyjnych.

Terminacja transkrypcji *in vitro* wykazała funkcjonalność ryboprzełącznika poprzez bezpośrednią terminację transkrypcji w odpowiedzi na podanie ligandu – SAM. A ponieważ reakcja była przeprowadzona w warunkach *in vitro*, efektu terminacyjnego nie można przypisać innym czynnikom, jakie potencjalnie mogłyby znajdować się w komórce. Jednak zjawisko to stało się obserwowalne dopiero po zastosowaniu bakteryjnej polimerazy z *E. coli*. Polimeraza RNA pochodząca z faga T7 charakteryzuje się bardzo wysoką wydajnością, a przede wszystkim procesywnością, dla której wewnętrzne terminatory nie stanowią istotnej przeszkody podczas transkrypcji. Polimeraza ta jest niewrażliwa na przełączającą się strukturę ryboprzełącznika, generując jedynie pełnej długości transkrypty z niewielką, niezależną od stężenia SAM frakcją krótkich transkryptów. Ponadto zastosowanie gradientu stężeń SAM pokazuje, że efekt terminacyjny ryboprzełącznika jest zależny od stężenia SAM.

Zastosowana technika SHAPE pozwoliła określić strukturę badanego ryboprzełącznika. Wykorzystany w tej reakcji odczynnik NAI pozwolił na uzyskanie wyników o wysokiej wiarygodności i jakości, jako że udowodniono wyższość NAI w porównaniu z innymi stosowanymi odczynnikami w kontekście siły sygnału i braku tła [208].

Zbadany przeze mnie ryboprzełącznik posiada pętlę centralną, od której odchodzą trzy struktury spinki do włosów oraz dość długi, dwuniciowy trzon. Ten kształt, przypominający trójlistną koniczynę jest bardzo charakterystyczny dla ryboprzełączników klasy SAM-I. Natomiast unikatową cechą tego ryboprzełącznika jest budowa drugiej spinki. Jest ona bowiem bardzo duża i rozbudowana, tworzy kolejną strukturę trójlistnej koniczyny zbudowanej z trzech mniejszych spinek, zaangażowanych w różne oddziaływania w stanie związanym. Ponadto w formie holo, pętla pierwszej spinki tworzy pseudowęzeł z fragmentem pętli centralnej

między drugą a trzecią spinłą, stanowiący kolejną istotną cechę charakteryzującą ryboprzełączniki klasy SAM-I [108]. W zaproponowanym modelu widać wyraźne podobieństwa strukturalne, dotyczące zarówno rozkładu struktur spinek do włosów jak i obecności pseudowęzła. Dodatkowo, wynik eksperymentu SHAPE potwierdził zmiany struktury drugorzędowej dokonane pod wpływem ligandu – SAM, w sposób zależny od stężenia. Jest to jeden z najistotniejszych argumentów, świadczący o tym, iż badana sekwencja jest w istocie ryboprzełącznikiem wiążącym dany ligand.

Zgodnie z moją najlepszą wiedzą, jest to pierwsza struktura ryboprzełącznika SAM *metE* w *B. subtilis*. Określono co prawda pokrewną strukturę ryboprzełącznika SAM genu *metE*, jednak w innej bakterii – *Bacillus clausii* [153]. Ryboprzełącznik SAM *metE* w tej bakterii istotnie różni się od tego z *B. subtilis*, jako że występuje w układzie tandemowym z ryboprzełącznikiem AdoCbl oraz posiada wyraźnie inną spinłą drugą. Ponadto został on uzyskany techniką próbkowania strukturalnego z użyciem odczynnika DMS.

Jako że naturalne ryboprzełączniki charakteryzują się dużym powinowactwem oraz specyficznością wobec swoich ligandów, wyznaczenie stałej wiązania ligandu to kolejny eksperyment pozwalający na zweryfikowanie potencjalnego kandydata na ryboprzełącznik. Moja metoda z wykorzystaniem sączenia oraz membrany Amersham Hybond-N+ okazała się skuteczna w wyznaczeniu K_d dla ryboprzełącznika SAM genu *metE*. Dla tego ryboprzełącznika K_d zostało oszacowane na 700 nM. Wartość ta mieści się w typowym zakresie dla innych znanych ryboprzełączników, co czyni ten wynik wiarygodnym i prawdopodobnym (Rozdział 2.2.5.2). Jednak uzyskana przez zespół Tomšič'a et al. wartość K_d dla tego ryboprzełącznika wynosiła 20 μ M [198]. Warto mieć na uwadze fakt, że stała K_d została otrzymana z wykorzystaniem innej membrany (Nanosept 3K), nieposiadającej ładunku elektrostatycznego na swojej powierzchni, co zmniejsza powinowactwo RNA do membrany i może tłumaczyć uzyskane różnice. W niektórych okolicznościach moja metoda z wykorzystaniem membrany Amersham Hybond-N+ może wykazywać pewne ograniczenia związane z elektrostatycznymi właściwościami. Jako że jest ona naładowana dodatnio, może niespecyficycznie absorbować ujemnie naładowane ligandy, prowadząc niekiedy do nieprecyzyjnych pomiarów.

Ostatecznym sprawdzianem skuteczności i sensowności powyższych metod było ich zastosowanie do walidacji sekwencji liderowej *yfmG*, wyłonionej podczas sekwencjonowania metodą Term-SHAPE-seq. Inną bowiem kwestią jest testowanie procedur dla znanej sekwencji, kiedy wyniki eksperymentów można do pewnego stopnia przewidzieć. Znacznie większe wyzwanie stanowi natomiast weryfikacja sekwencji o nieznannej funkcji,

zwłaszcza w sytuacji, kiedy potencjalny ligand jest nieznany i trudny do przewidzenia (ze względu na nieznaną funkcję genu kontrolowanego przez badaną sekwencję). Mimo tych trudności udało się uzyskać wiele cennych informacji na temat sekwencji *yfmG*.

Terminacja transkrypcji *in vitro* wykazała, że równolegle generowane są dwa typy transkryptów o różnej długości. Dłuższa cząsteczka RNA odpowiada transkryptowi pełnej długości. Krótsza natomiast ma długość ok. 180 nt, co koresponduje z odległością od miejsca startu transkrypcji do traktu poli-U, tuż za 3' końcem domniemanej spinki terminacyjnej (Rysunek 32). Wskazywałoby to na produkt terminacji transkrypcji. Jednak brak różnic we wzajemnej ilości poszczególnych transkryptów pomiędzy ścieżkami - i + świadczy o tym, iż terminacja transkrypcji nie została wywołana żadnym z ligandów zawartych w mieszaninie. Nie dyskwalifikuje to jednak sekwencji liderowej *yfmG* jako ryboprzełącznika, najczęściej bowiem obecne są równolegle oba typy transkryptów bez względu na obecność właściwego ligandu bądź jego brak. W przyszłości planowane jest przetestowanie naszego kandydata pod kątem szerszego wachlarza różnych ligandów, celem wyłonienia właściwego.

Struktura otrzymana dzięki metodzie SHAPE jest identyczna z tą wygenerowaną na podstawie danych z sekwencjonowania. Eksperymentalnie potwierdziłem obecność kilku struktur spinek do włosów oraz dużej pętli centralnej. Nukleotydy pętli apikalnych tych struktur oraz pętli centralnej charakteryzują się podwyższoną reaktywnością. Wzór reaktywności częściowo pokrywa się z tym pochodzących z Term-SHAPE-seq.

Pomimo przeprowadzenia powyższych eksperymentów (terminacji transkrypcji *in vitro*, oraz SHAPE) nie udało się zidentyfikować właściwego ligandu dla potencjalnego ryboprzełącznika *yfmG*. Dlatego też próba wyznaczenia stałej dysocjacji ryboprzełącznik:ligand stała się bezzasadna, w związku z tym eksperyment ten nie został wykonany.

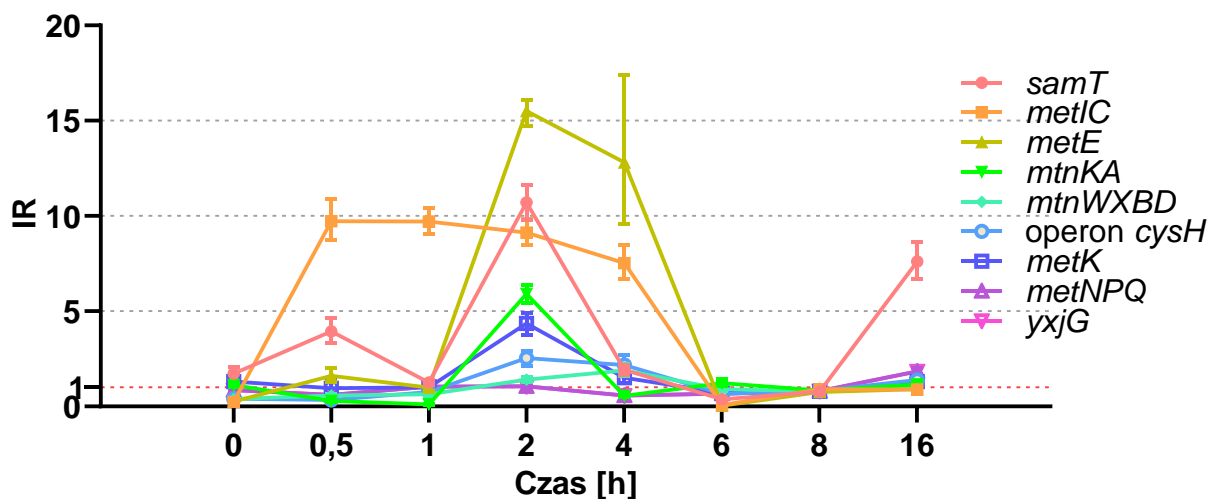
Pomimo kilku eksperymentalnych prób, nie udało się jednoznacznie wykazać, że lider genu *yfmG* w istocie zawiera sekwencję ryboprzełącznika. Dlatego też niezbędne będzie przeprowadzenie dalszych testów, aby ostatecznie rozstrzygnąć czy ta cząsteczka jest ryboprzełącznikiem. Jednak nawet jeśli kandydat na ryboprzełącznik nie okaże się prawdziwy, wciąż istnieje duże prawdopodobieństwo, że odkryliśmy inny, niezidentyfikowany wcześniej element regulatorowy, kontrolujący ekspresję genu z wykorzystaniem mechanizmu terminacji transkrypcji, co już samo w sobie stanowi istotne odkrycie.

4.3 Zmienność współczynnika indukcji ryboprzełącznika SAM

Obserwacje poczynione podczas optymalizacji hodowli bakterii pod kątem największego współczynnika indukcji IR, opisane w Rozdziale 4.1.2 skłoniły mnie do bardziej wnikliwej analizy danych uzyskanych podczas eksperymentu RT-qPCR. Jak się bowiem okazało, ryboprzełączniki SAM kontrolujące istotną część genów metabolizmu metioniny u *B. subtilis*, należące do tej samej klasy SAM-I i charakteryzujące się zbliżoną sekwencją i strukturą, wykazują indywidualną charakterystykę odpowiedzi na obecność ligandu. Różnice te dotyczą zarówno czasu, w jakim pojawia się odpowiedź ryboprzełącznika jak i siły odpowiedzi.

4.3.1 Analiza współczynnika indukcji ryboprzełącznika SAM

W pierwszym etapie zostały dokładnie przeanalizowane wyniki analizy współczynnika indukcji IR w różnych punktach czasowych, uzyskane metodą RT-qPCR w Rozdziale 4.1.2. Okazało się bowiem, że ekspresja każdego z genów charakteryzuje się indywidualną dynamiką, pomimo obecności tego samego ryboprzełącznika SAM (Rysunek 35). Jedną mimo swoistego charakteru widoczne są także pewne bardziej ogólne prawidłowości.



Rysunek 35. Dynamika zmian współczynnika indukcji genów/operonów kontrolowanych ryboprzełącznikiem SAM w ośmiu punktach czasowych (0 h, 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 16 h).

Właściwie do momentu 2 h od eliminacji metioniny nie zaobserwowano istotnego wzrostu IR dla większości analizowanych genów/operonów (Tabela 4). Wyjątkiem są gen *samT* oraz operon *metIC*, których IR po pół godzinie wzrósł odpowiednio 4- i 10-krotnie. Geny te są odpowiedzialne za syntezę homocysteiny z cysteiny (*metIC*) oraz metioniny z homocysteiny (*samT*) (Rysunek 36). Zdecydowana większość badanych genów/operonów wykazywała zwiększony poziom indukcji po 2 h od momentu eliminacji metioniny z pożywki. Najwyższy, prawie 16-krotny wzrost IR zaobserwowano dla genu *metE*. Gen ten odgrywa zasadniczą funkcję w produkcji metioniny, ponieważ koduje on główną syntazę metioninową. Ekspresja operonu *metIC* oraz *samT* była również silnie indukowana w tym punkcie czasowym, osiągając ok. 10-krotny wzrost IR. Kolejne analizowane operony: *mtnWXBD*, *metNPQ* charakteryzowały się wzrostem współczynnika indukcji IR w punkcie czasowym 2 h, odpowiednio 6- i 4,5-krotnym. Enzymy kodowane przez tę grupę genów są zaangażowane w dalsze etapy metabolizmu metioniny, takie jak szlak odzysku metioniny czy import metioniny do komórki (Rysunek 36). W przeciwieństwie do nich, operon *mtnKA* i *cysH* (składający się z genów: *cysH-cysP-sat-cysC-sumT-sirB-sirC*) oraz gen *metK*, nie wykazały znaczących wahań poziomu ekspresji (wzrost współczynnika indukcji wahał się pomiędzy 1,5-2,5 dla tych genów). Natomiast dla genu *yxjG* nie zaobserwowano żadnego wzrostu IR w żadnym punkcie czasowym. Co zaskakujące, operon *cysH* oraz gen *yxjG* charakteryzują się najwyższym poziomem ekspresji pełnej długości transkryptów po 2 h o wartościach $C_t \approx 27$, ≈ 28 . Natomiast poziom transkrypcji genów o najwyższym współczynniku indukcji tj. *samT*, *metIC*, *metE*, jest relatywnie niski – ich C_t waha się pomiędzy 31,5 a 34,5. Efekt indukcji ryboprzełączników zaczyna spadać w punkcie czasowym 4 h dla wszystkich testowanych genów, by osiągnąć wartości bliskie 1 po 6 i 8 godzinach. W punkcie czasowym 16h nie było aktywacji większości z testowanych transkryptów, z wyjątkiem genu *samT*.

Tabela 4. Współczynnik indukcji genów/operonów kontrolowanych przez ryboprzełącznik SAM. IR – współczynnik indukcji, SE – błąd standardowy.

Gen	0 h			0,5 h			1 h			2 h		
	IR	+SE	-SE	IR	+SE	-SE	IR	+SE	-SE	IR	+SE	-SE
<i>samT</i>	1,73	0,36	0,29	3,94	0,70	0,58	1,26	0,15	0,12	10,70	0,90	0,90
<i>metIC</i>	0,24	0,03	0,03	9,73	1,17	0,97	9,71	0,69	0,67	9,13	0,69	0,66
<i>metE</i>	0,27	0,04	0,04	1,61	0,39	0,30	1,00	0,26	0,19	15,50	0,60	0,80
<i>mtnKA</i>	0,21	0,01	0,01	0,36	0,06	0,04	1,53	0,29	0,25	1,96	0,10	0,10
<i>mtnWXBD</i>	1,12	0,12	0,10	0,30	0,04	0,03	0,10	0,02	0,02	5,90	0,45	0,46
operon <i>cysH</i>	0,39	0,06	0,06	0,57	0,09	0,07	0,65	0,08	0,07	1,41	0,15	0,14
<i>metK</i>	0,41	0,07	0,06	0,35	0,07	0,06	0,76	0,16	0,12	2,54	0,39	0,44
<i>metNPQ</i>	1,31	0,35	0,29	0,95	0,54	0,28	1,01	0,29	0,19	4,35	0,58	0,61
<i>yxjG</i>	0,85	0,11	0,09	0,61	0,08	0,08	1,04	0,25	0,18	1,06	0,20	0,19

cd.

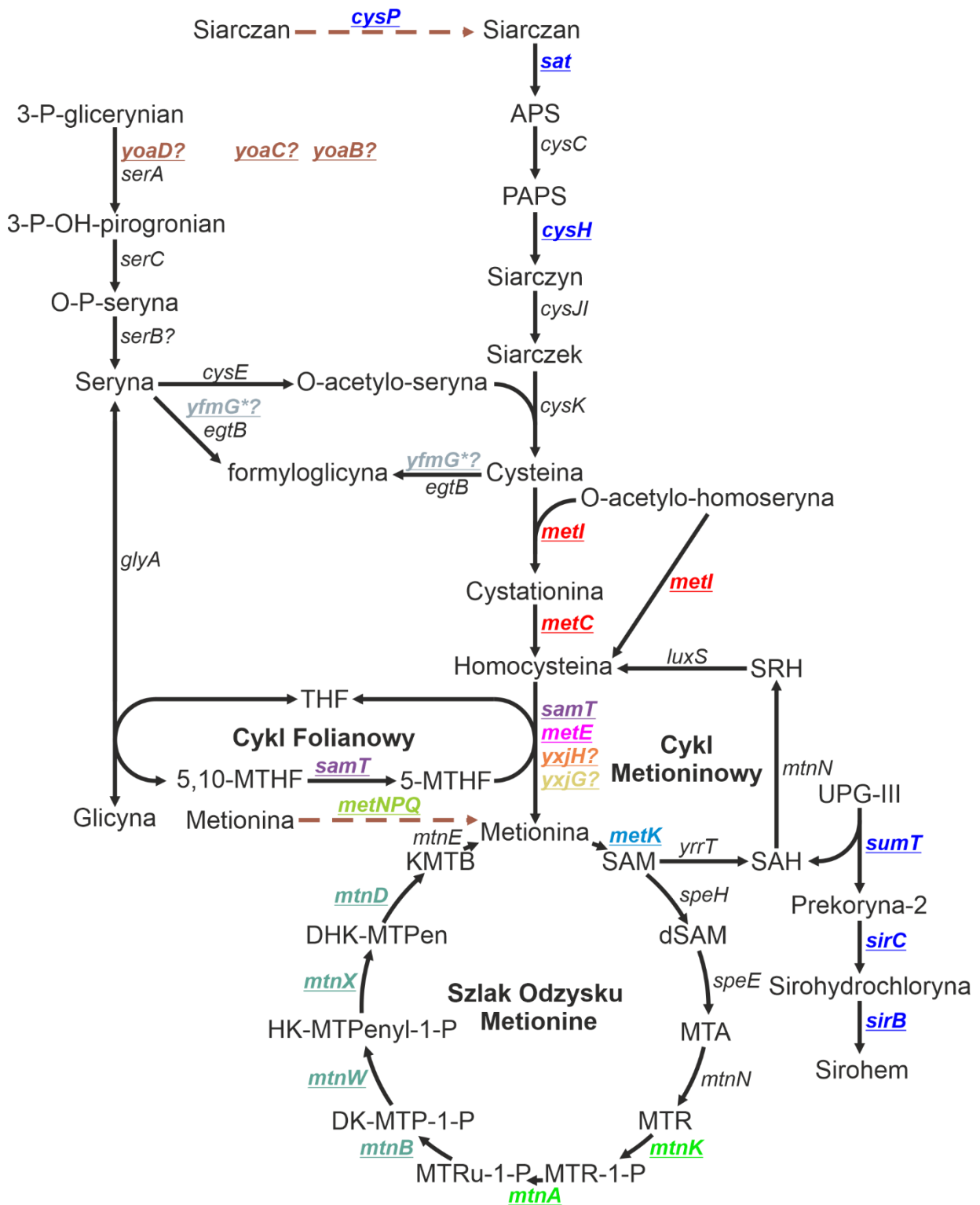
Gen	4 h			6 h			8 h			16 h		
	IR	+SE	-SE	IR	+SE	-SE	IR	+SE	-SE	IR	+SE	-SE
<i>samT</i>	1,92	0,26	0,24	0,38	0,05	0,04	0,77	0,11	0,10	7,60	1,05	0,92
<i>metIC</i>	7,53	0,95	0,86	0,08	0,01	0,01	0,91	0,14	0,12	0,89	0,19	0,15
<i>metE</i>	12,80	4,60	3,22	0,04	0,00	0,00	0,76	0,15	0,13	0,91	0,04	0,04
<i>mtnKA</i>	0,87	0,09	0,09	0,72	0,11	0,09	0,61	0,06	0,06	1,12	0,15	0,13
<i>mtnWXBD</i>	0,57	0,07	0,06	1,23	0,17	0,16	0,84	0,05	0,05	1,16	0,13	0,13
<i>cysH</i> operon	1,89	0,33	0,27	0,91	0,11	0,11	0,79	0,03	0,03	1,06	0,10	0,10
<i>metK</i>	2,17	0,55	0,39	0,66	0,03	0,03	0,82	0,07	0,07	1,39	0,15	0,13
<i>metNPQ</i>	1,51	0,35	0,29	0,71	0,05	0,05	0,79	0,07	0,07	1,30	0,24	0,20
<i>yxjG</i>	0,58	0,05	0,04	0,67	0,10	0,09	0,81	0,11	0,09	1,84	0,16	0,13

4.3.2 Dyskusja wyników przedstawionych w rozdziale 4.3

Pierwszą istotną obserwacją jaka płynie z analizy zmian współczynnika indukcji w czasie jest fakt, że dla różnych genów, choć są kontrolowane z wykorzystaniem tego samego mechanizmu jakim jest ryboprzełącznik SAM-I, profil ekspresji jest zupełnie inny. Każdy z genów charakteryzuje się swoistą dynamiką zmian poziomu ekspresji i współczynnika indukcji w czasie, co dotyczy się zarówno siły indukcji jak i momentu, w którym owa indukcja następuje. Biorąc pod uwagę te dwie cechy, wszystkie analizowane operony/geny możemy przypisać do czterech grup. Podział ten odzwierciedla fizjologiczne funkcje, jakie pełnią poszczególne geny w metabolizmie metioniny, siarki i powiązanych szlaków metabolicznych.

Pierwszą grupę stanowią geny wczesnej odpowiedzi, których ekspresja jest indukowana już po 0,5 h od eliminacji metioniny z pożywki. Należą do niej gen *samT* oraz operon *metIC*. Geny te zajmują centralne miejsce w metabolizmie metioniny, jako że kodują enzymy odpowiedzialne za syntezę metioniny lub jej bezpośrednich substratów. Aktywacja tych genów na wczesnym etapie głodu metioninowego jest mechanizmem adaptacyjnym pozwalającym na szybkie uzupełnienie braków tego niezbędnego aminokwasu, chroniąc przed niebezpiecznymi dla przeżycia bakterii konsekwencjami.

Kolejna grupa to geny/operony silnej odpowiedzi na brak metioniny w środowisku. Do tej grupy należą wyżej wymienione *metIC* i *samT* oraz *metE*. Wszystkie osiągają blisko 10-krotny wzrost współczynnika indukcji IR po eliminacji metioniny z pożywki. Enzymy przez nie kodowane pełnią centralną rolę w szlaku metabolizmu metioniny, gdyż są odpowiedzialne za syntezę homocysteiny i metioniny (Rysunek 36). Stanowią one swoisty punkt kontrolny, decydujący o uruchomieniu pełnej mocy produkcyjnej bakterii szlaku biosyntezy i metabolizmu metioniny i siarki (a także wielu innych procesów mniej lub bardziej powiązanych z tym szlakiem metabolicznym). Dlatego też ich kontrola jest ściśle zależna od stężenia metioniny w komórce, gdyż w przypadku braku takiego mechanizmu ekspresja niepotrzebnych genów prowadziłyby do niepotrzebnych acz istotnych strat energetycznych.



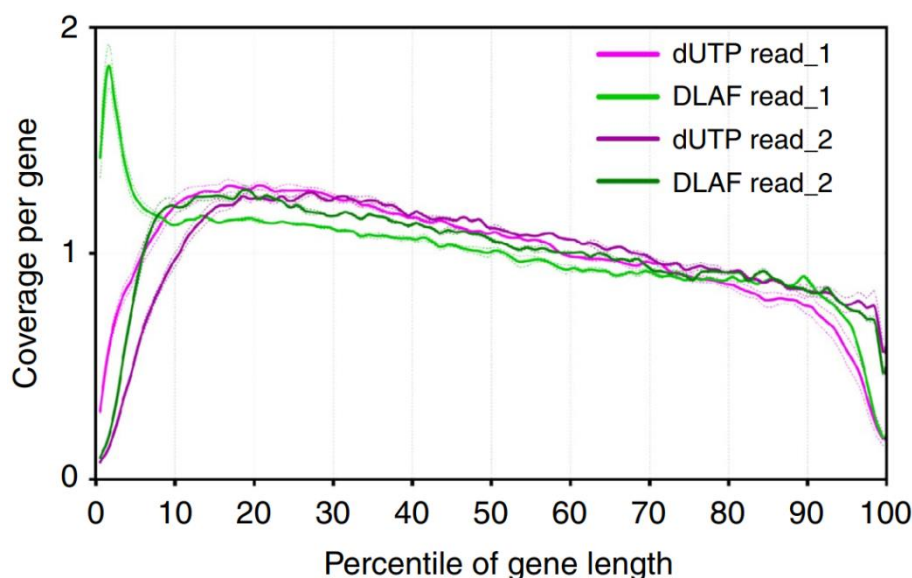
Rysunek 36. Szlak metabolizmu i biosyntezy metioniny. Kolorami zaznaczono geny/operony kontrolowane przez rybo przelącznik SAM oraz kandydata *yfmG*. Brązowa, przerywana strzałka – transport przez błony. APS – adenosyl-5-fosfosiaraczan, PAPS – 3-fosfoadenosyl-5-fosfosiaraczan, THF – tetrahydrofolian, MTHF – metyloTHF, SAM – S-adenozylometionina, dSAM – dekarboksylowany SAM, SAH – S-adenozylhomocysteina, SRH – S-rybulozohomocysteina, MTA – 5-metyloadenozyna, MTR – 5-metylotioryboza, MTR-1-P – MTR-1-fosforan, MTRu-1-P – 5-metylotiorybulozo-1-fosforan, DK-MTP-1-P – 2,3-diketo-5-metylotiopentan-1-fosforan, HK-MTPPenyl-1-P – 2-hydrokso-3-keto-5-metylotiopentyl-1-fosforan, DHK-MTPPen – 1,2-dihydrokso-3-keto-5-metylotiopent-1-fosforan, KMTB – 2-keto-4-metylotiomasłan, UPG-III – uroporfirynogen-III.

Dwa kolejne geny/operony: *mtnWXBD*, *metNPQ* stanowią grupę umiarkowanej odpowiedzi na brak metioniny. Ich produkty białkowe są zaangażowane w dalsze etapy cyklu metioninowego oraz transport metioniny ze środowiska. Ze względu na fakt, że geny te nie pełnią aż tak istotnej dla przetrwania bakterii roli, ich kontrola nie musi być tak ściśle zależna od stężenia metioniny, jak w przypadku dwóch pierwszych grup.

Ostatnią grupę stanowią geny słabej odpowiedzi. Wśród nich znajdziemy takie geny, których ekspresja wzrasta jedynie w niewielkim stopniu wraz ze wzrostem deficytu metioniny w komórce. Są to geny niezwiązane bezpośrednio z biosyntezą metioniny takie jak choćby operon *cysH*, gdzie pierwsze cztery kodowane białka odpowiedzialne są za transport siarczanów i ich redukcję do siarczków, a pozostałe trzy za transformację uroporfirynogenu-III do sirohemu, stanowiącego grupę prostetyczną reduktazy siarczynowej. Pomimo, iż bazowy poziom ekspresji tego operonu jest najwyższy spośród analizowanych genów (operonów) to jego ekspresja w bardzo niewielkim stopniu zależy od SAM. Przyczyną może być fakt, że jako operon jest on bardziej związany z biosyntezą cysteiny niż metioniny i jest kontrolowany w większym stopniu stężeniem cysteiny i O-acetyloseryny niż metioniny poprzez białko represora CymR [209,210]. Być może mamy tutaj do czynienia z sytuacją, gdzie pierwotny element regulatorowy – ryboprzełącznik jest stopniowo wypierany (funkcjonalnie) przez nowszy i bardziej wydajny system oparty o wyspecjalizowane białko regulatorowe. Ryboprzełącznik funkcjonowałby w takich okolicznościach jako swoisty relik, pozbawiony presji selekcyjnej, stopniowo tracący regulatorowe właściwości. Kolejne geny tej grupy to *mtnK* i *mtnA* biorące udział w szlaku odzysku metioniny. Nie są to kluczowe dla przetrwania bakterii geny, więc ich ekspresja nie musi być tak ściśle kontrolowana przez stężenie SAM. Natomiast *metK* kodujący syntazę SAM jest o tyle istotny, że konwertuje metioninę do bardzo ważnego dla wielu enzymów kofaktora, jakim jest SAM, stanowiącego także ligand dla ryboprzełącznika. Niewielka indukcja ekspresji tego genu pod wpływem braku metioniny prawdopodobnie jest związana z kluczową funkcją, jaką pełni ten gen. Ekspresja tego genu jest niezbędna dla bakterii bez względu na podaż metioniny w środowisku komórkowym – SAM jak i jego synteza są niezbędne nawet, gdy poziom samej metioniny jest wysoki. Podobne obserwacje zostały także poczynione przez innych badaczy [198]. Gen *yxjG* natomiast zdaje się być zupełnie niewrażliwy na zmiany stężenia metioniny w komórce. Funkcja tego genu nie została eksperymentalnie potwierdzona, choć najprawdopodobniej koduje jedną z syntetaz metioniny. Stały poziom ekspresji we wszystkich punktach czasowych i warunkach wskazuje na нефункциональный charakter tego ryboprzełącznika. Być może ekspresja tego genu jest kontrolowana przez inne niż ryboprzełącznik mechanizmy.

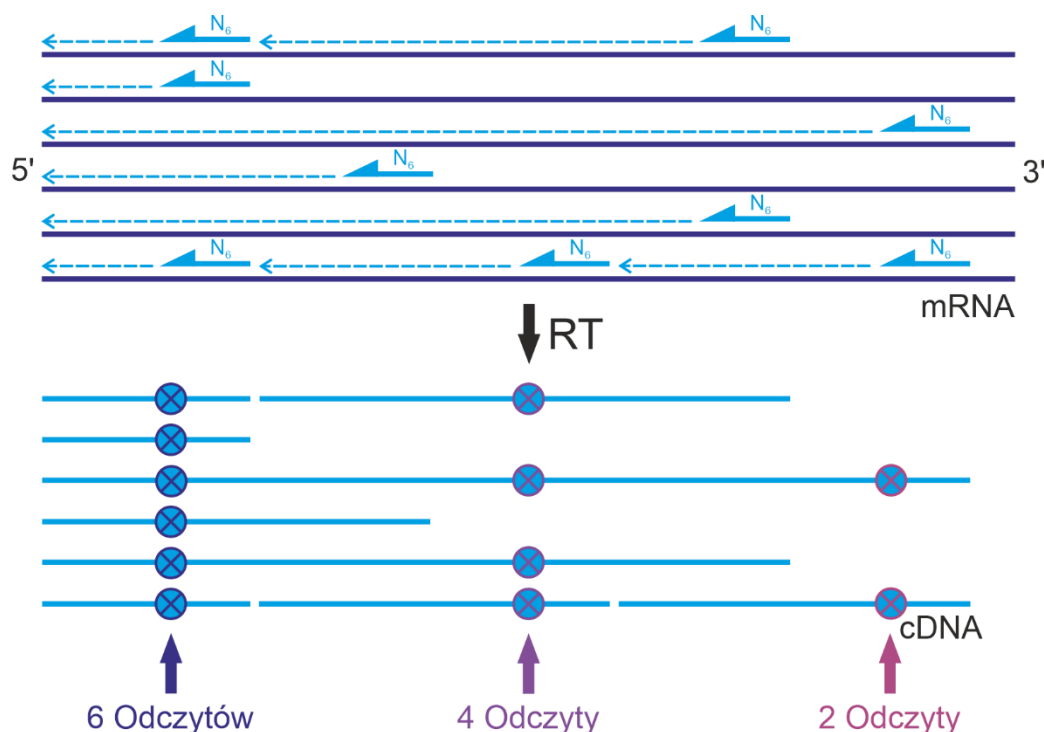
4.4 Metoda analizy aktywności transkrypcyjnej ryboprzełączników

Mając do dyspozycji nową metodę identyfikacji potencjalnych ryboprzełączników (Term-SHAPE-seq) oraz zoptymalizowane metody ich eksperymentalnej walidacji (terminacja transkrypcji *in vitro*, SHAPE z użyciem NAI oraz wyznaczenie K_d poprzez filtrację membranową), ostatnim etapem było opracowanie nowej metody analizy aktywności transkrypcyjnej ryboprzełączników. Dotychczasowe podejście, bazujące na odwrotnej transkrypcji z wykorzystaniem heksametrów o losowej sekwencji (N_6 , ang. *random hexamers*) i technice RT-qPCR, posiada kilka istotnych wad. Okazuje się bowiem, że ilość odczytów wzdłuż transkryptu może być różna. Obserwowana jest względna nadreprezentacja odczytów blisko końca 5' oraz niedoszacowanie odczytów z końca 3' [200]. Jest to szczególnie widoczne w wynikach sekwencjonowania, ale dotyczy to także innych technik opartych na RT (Rysunek 37).



Rysunek 37. Rozkład względnej ilości odczytów wzdłuż transkryptu. Na podstawie Agarwal et al. 2015 [200].

Przyczyną tego zjawiska jest sposób przepisywania RNA na cDNA przez odwrotną transkryptazę, to jest w kierunku od 3' do 5' (Rysunek 38). W konsekwencji koniec 5' jest lepiej pokryty, gdyż w wyniku reakcji RT będzie on niemal zawsze przepisany na cDNA, natomiast koniec 3' w wielu przypadkach nie zostanie w ogóle przepisany. Różnice w ilości odczytów są tym większe, im dłuższy transkrypt, a co za tym idzie większa odległość od 3' końca cząsteczki. Ponieważ ryboprzełączniki zwykle zlokalizowane są w 5'UTR, zjawisko to istotnie wpływa na oznaczanie stężenia transkryptów FL jak i T.

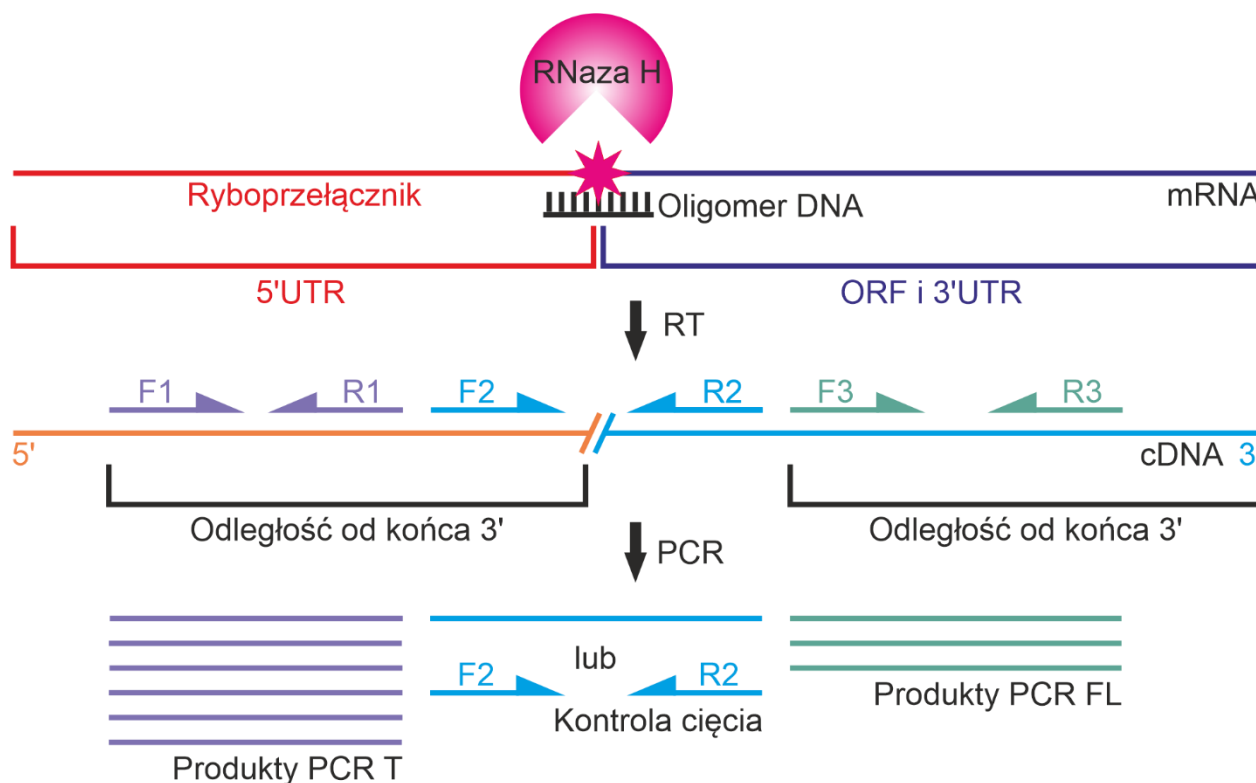


Rysunek 38. Zależność ilości odczytów od odległości od końca 3' transkryptu. Przerwane strzałki – kierunek reakcji odwrotnej transkrypcji, N_6 – heksamer o losowej sekwencji.

Drugim ograniczeniem dotychczas stosowanych metod jest niemożność określenia stężenia ilości transkryptów w jednostkach absolutnych (np. ilość kopii RNA/ μ l), a co za tym idzie, ilości skróconych transkryptów z wykorzystaniem standardowego podejścia RT-qPCR. Dlatego też niniejsza metoda została opracowana z myślą o eliminacji tych ograniczeń. Wprowadzenie do procedury dodatkowego etapu hydrolitycznego cięcia transkryptów z użyciem RNazy H oraz oligomeru DNA pozwala na eliminację wpływu odległości od końca 3' transkryptu na ilość odczytów (Rysunek 39). Natomiast w celu określenia bezwzględnej (absolutnej) ilości kwasów nukleinowych w próbce zamiast standardowego RT-qPCR wykorzystałem inną technikę, jaką jest emulsyjny PCR (ddPCR, ang. *droplet digital PCR*). Ponadto ddPCR charakteryzuje się większą precyzją i czułością niż RT-qPCR.

Dla każdego analizowanego genu (transkryptu), którego ekspresja jest kontrolowana przez ryboprzełącznik oraz genu kontrolnego *gyrA*, zostały zaprojektowane trzy pary starterów (Rysunek 39). Pierwsza para starterów (Startery 1: F1, R1) jest komplementarna do sekwencji aptameru ryboprzełącznika w 5'UTR, w regionie powyżej miejsca przewidywanej terminacji; druga para starterów (Startery 2: F2, R2) flankuje miejsce terminacji transkrypcji, trzecia para (Startery 3: F3, R3) została zaprojektowana tak, aby wiązać się do sekwencji ORF. W ten sposób sygnał od Starterów 1 koresponduje z sumą transkryptów FL i T; Startery 2 stanowią

weryfikację reakcji cięcia RNazą H; Startery 3 natomiast dają informację tylko na temat transkryptów FL. Dzięki temu różnica pomiędzy sygnałem z pierwszej pary starterów i z trzeciej pary daje nam informację na temat ilości transkryptów T będących rezultatem aktywności ryboprzełączników. Ponadto, Startery 1 i Startery 3 znajdują się w takiej samej odległości od końca 3' transkryptów w celu wyeliminowania wpływu odległości od końca 3' na ilość odczytów (Startery 1 od końca transkrypcji i/lub cięcia RNazą H, Startery 3 od naturalnego końca transkryptu).



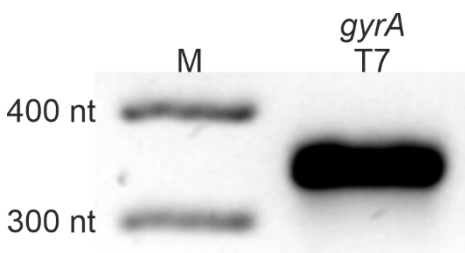
Rysunek 39. Analizy aktywności transkrypcyjnej ryboprzełączników z wykorzystaniem RNazy H. F – starter *forward*, R – starter *reverse*, FL – fragmenty pełnej długości, T – fragmenty skrócone.

4.4.1 Reakcja cięcia transkryptów *in vitro* z wykorzystaniem RNazy H

Pierwszym etapem było wykazanie, że możliwe jest wydajne cięcie cząsteczek RNA w miejscu sekwencyjnie zdefiniowanym za pośrednictwem komplementarnego oligomeru DNA. Oligomery zostały zaprojektowane tak, aby były selektywnie komplementarne do sekwencji docelowej RNA w pobliżu miejsca przedwczesnej terminacji transkrypcji na skutek działania ryboprzełączników (tj. za spinką terminacyjną i traktem poli-U). Aby móc w sposób bezpośredni zaobserwować efekt działania RNazy H, reakcja cięcia została przeprowadzona dla otrzymanej w wyniku reakcji *in vitro* cząsteczki RNA, stanowiącej fragment naturalnego transkryptu, obejmującego całą sekwencję ryboprzełącznika wraz z początkowym odcinkiem ORF.

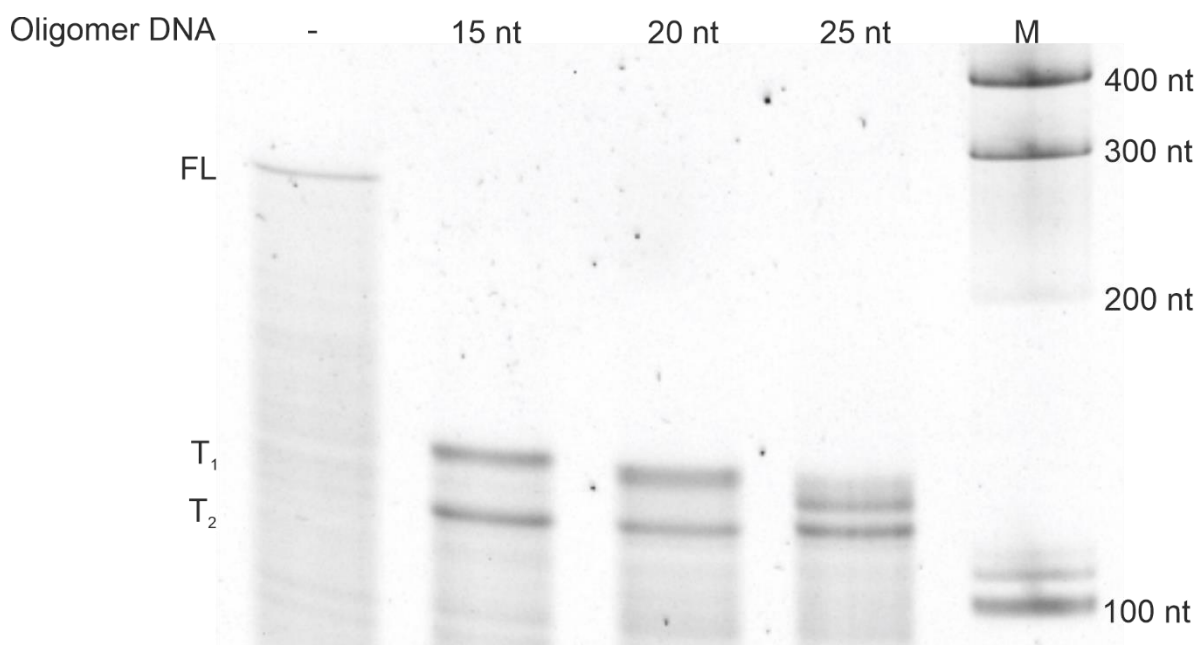
Natomiast ocena wydajności samego procesu odbyła się na podstawie analizy produktów rozdzielonych elektroforetycznie w 8% żelu PAA.

W celu zsyntetyzowania matrycy PCR użyto starteru *forward* zawierającego sekwencję dla polimerazy RNA T7 na końcu 5' (Tabela 11). Następnie z tak zaprojektowanymi starterami przeprowadzono reakcję PCR wykorzystując całkowite gDNA, wyizolowane z bakterii *B. subtilis* jako matrycę (Rysunek 40), zgodnie z procedurą opisaną w Rozdziale 6.6.1.



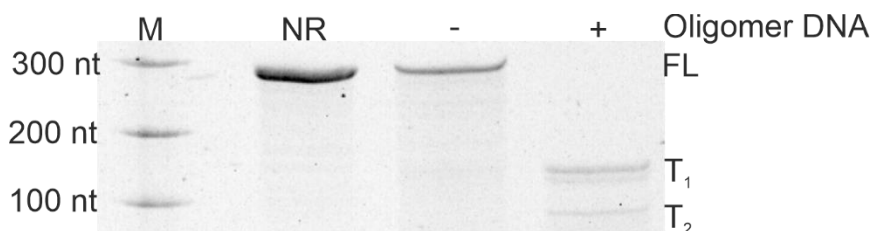
Rysunek 40. Matryca PCR *metE* do transkrypcji *in vitro* z wykorzystaniem wirusowej polimerazy T7. M – marker wielkości.

Na tak zsyntetyzowanej i oczyszczonej matrycy przeprowadzono transkrypcję *in vitro* w analogiczny sposób jak w Rozdziale 4.2.1. Każdy produkt transkrypcji *in vitro* został poddany reakcji cięcia przy użyciu RNazy H oraz odpowiednio zaprojektowanego Oligomeru DNA (Tabela 12) zgodnie z procedurą przedstawioną w Rozdziale 6.6.16. Do analizy wykorzystano transkrypt genu kodującego podjednostkę A gyrazy – *gyrA*, jako kontrolę (ekspresja tego genu nie jest kontrolowana przez ryboprzełącznik) oraz kontrolowany przez ryboprzełącznik gen *metE*. Pierwszym etapem było zbadanie wpływu długości Oligomeru DNA na efektywność cięcia. Do tego celu przetestowano trzy warianty Oligomeru o długości odpowiednio: 15, 20 oraz 25 nukleotydów, o stężeniu końcowym 10 μ M. Wyniki reakcji zostały zwizualizowane poprzez rozdział elektroforetyczny w 8% żelu PAA. W ścieżce kontrolnej (-) widać prążek odpowiadający cząsteczce RNA pełnej długości oraz produkty cięcia RNazą H w kolejnych ścieżkach (Rysunek 41). Analiza nie wykazała istotnych różnic w przebiegu reakcji. Jedynie widoczne różnice dotyczyły wielkości powstałych produktów cięcia. Dlatego też do dalszych analiz wykorzystano nukleotydy o długości ok. 20 nt.



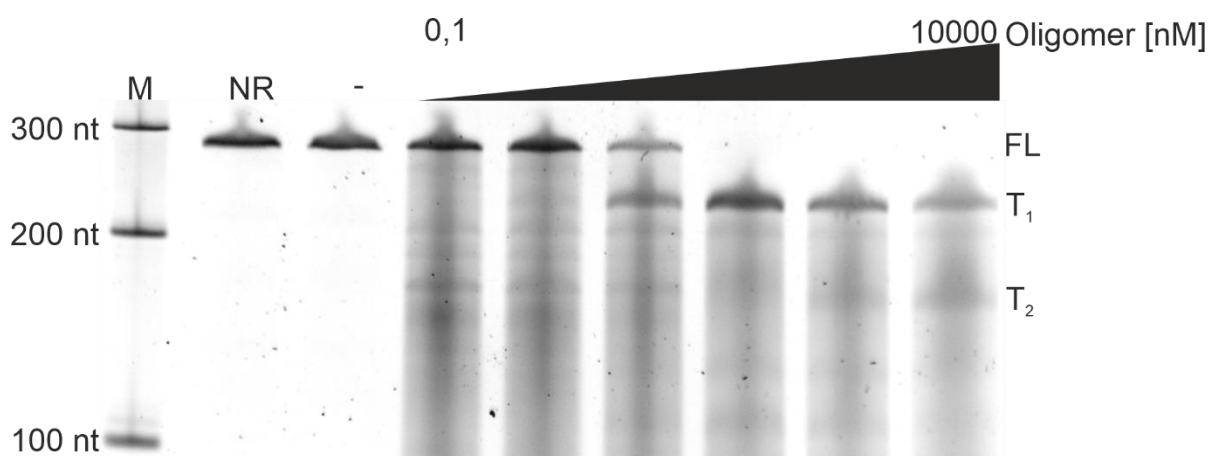
Rysunek 41. Cięcie RNazą H transkryptu *in vitro* *gyrA* z wykorzystaniem Oligomerów DNA o długości 15, 20 i 25 nt. M – marker wielkości, FL – transkrypt pełnej długości, T₁ i T₂ – produkty cięcia RNazą H. „-” – kontrola.

Następnym etapem było sprawdzenie specyficzności i czułości reakcji cięcia RNazą H transkryptów *in vitro*, ale przede wszystkim czystości próbek RNA, użytych w reakcji. W tym celu przeprowadzono eksperyment w analogiczny sposób jak powyżej, porównując wyniki reakcji z czystym transkrypcyjnym, niepoddanym żadnej reakcji (w takim samym stężeniu, 100 ng/μl) (Rysunek 42). Jak się okazało, nawet w reakcji, do której nie dodano Oligomeru DNA (Rysunek 42, Ścieżka -) możemy zaobserwować istotny spadek ilości transkryptu w porównaniu do samego transkryptu (Rysunek 42, Ścieżka NR). Wskazuje to na obecność resztek DNA mogących wywoływać niespecyficzne cięcie transkryptów: pozostałości gDNA, starterów, czy matrycy PCR do transkrypcji *in vitro*. Dlatego też do dalszych etapów próbki RNA oczyszczano trzykrotnie, za każdym razem z użyciem DNAazy.



Rysunek 42. Cięcie RNazą H transkryptu *in vitro* genu *metE* z dodatkową reakcją bez Oligomeru DNA. M – marker wielkości, NR – bez reakcji (tylko RNA), - kontrola, + reakcja.

W kolejnym eksperymencie zoptymalizowano stężenie Oligomeru DNA, a co z tym idzie, również stosunek molowy Oligomer DNA:RNA, tak by reakcja przebiegała z blisko 100% wydajnością. Wyniki wskazują, że wydajne cięcie z pełną wydajnością następuje przy stężeniu Oligomeru DNA wynoszącym 100 nM (Rysunek 43). Dalszy wzrost stężenia powodował stopniowy zanik produktu T_1 i pojawienie się jeszcze krótszego produktu, T_2 . Dla stężenia Oligomeru DNA równego 100 nM stosunek molowy RNA:DNA wynosił 10, natomiast dla $10\mu\text{M} - 0,1$. Dlatego można wysunąć wniosek, że optymalny stosunek RNA:DNA (wydajne i specyficzne cięcie) będzie oscylować wokół 1, co odpowiada stężeniu $1\mu\text{M}$ Oligomeru DNA (Rysunek 43).



Rysunek 43. Cięcie RNazą H transkryptu *in vitro metE* w rosnącym gradiencie stężenia Oligomerów DNA. M – marker wielkości, NR – bez reakcji (RNA), „-” – kontrola, FL – transkrypt pełnej długości, T_1 i T_2 – produkty cięcia RNazą H.

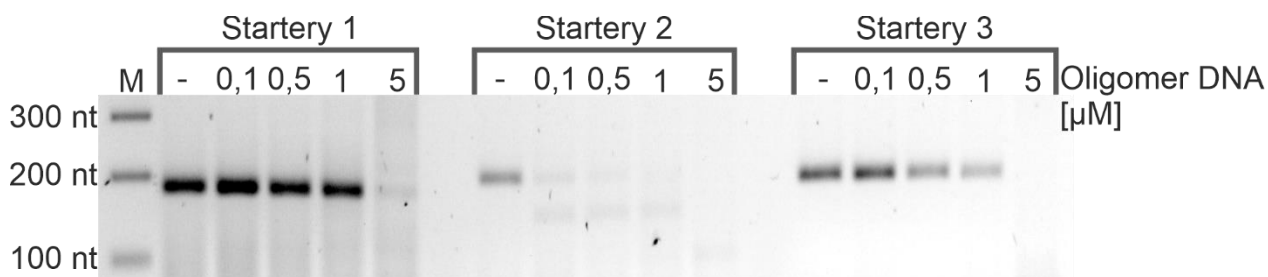
4.4.2 Reakcja cięcia transkryptów *ex vivo* z wykorzystaniem RNazy H

Powyższy eksperyment dowiódł, że zaprojektowane Oligomery DNA są w stanie wydajnie i precyzyjnie wskazywać miejsce cięcia cząsteczki RNA przez RNazę H. Jednak cięcie syntetycznych transkryptów w warunkach *in vitro* nie jest celem opracowywanej metody. Mając potwierdzone skuteczne działanie RNazy H pod kątem przecięcia transkryptów w dedykowanej sekwencji, postanowiłem sprawdzić takie podejście dla naturalnych transkryptów w puli całkowitego RNA komórki (w dalszej części pracy zwane transkryptami *ex vivo*).

RNA zostało wyizolowane z hodowli bakteryjnej eliminacyjnej, w punkcie czasowym 2h. Na tak wyizolowanym i oczyszczonym RNA przeprowadzono reakcję cięcia RNazą H, z dodatkiem odpowiedniego Oligomeru DNA (Tabela 12). Do reakcji użyto 100 ng całkowitego RNA. W tym wypadku jednak, celem wizualizacji niezbędne jest przepisanie RNA na cDNA i późniejsza amplifikacja przy użyciu reakcji PCR oraz zaprojektowanych do tego celu starterów

(Tabela 10), gdyż niemożliwe jest bezpośrednie śledzenie pojedynczego transkryptu w mieszaninie wszystkich mRNA, co było możliwe w przypadku transkryptów *in vitro*. Produkty reakcji zwizualizowano w 2% żelu agarozowym.

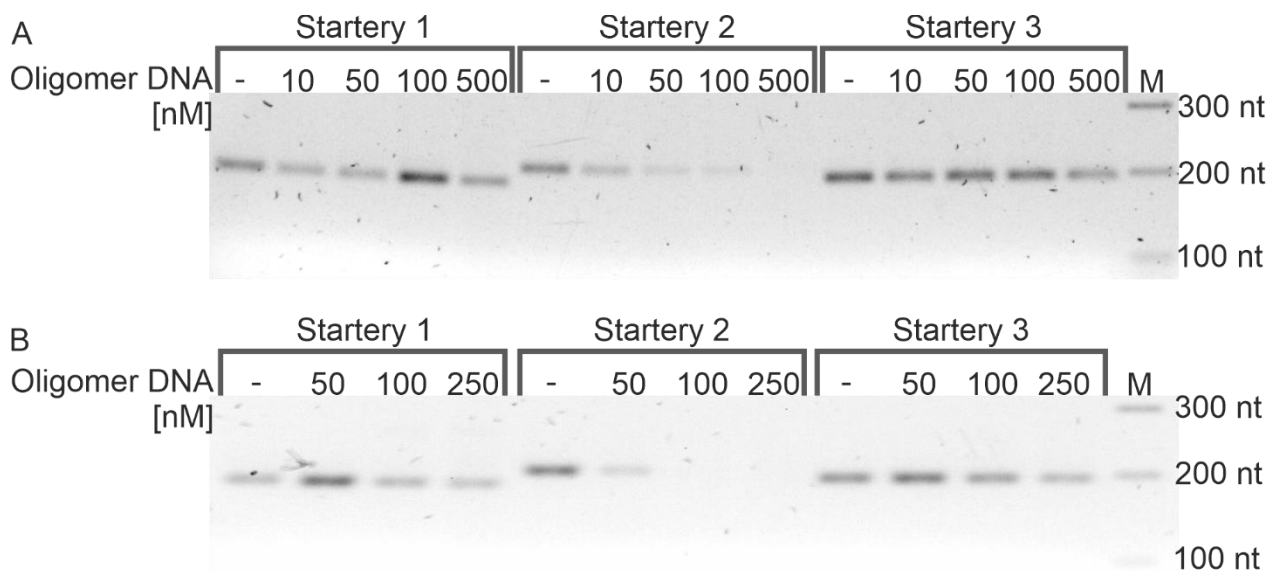
W pierwszym eksperymencie przeprowadzono analizę dla kontrolnego genu *gyrA* stosując szeroki gradient stężeń Oligomeru DNA, celem odnalezienia efektywnego zakresu. W pierwszej kolejności zostały przetestowane stężenia od 0,1 do 5 μM (Rysunek 44). Widzimy, że ilość produktu PCR Starterów 2 (flankujących miejsce cięcia) jest istotnie zredukowana już przy stężeniu 0,1 μM , co sugeruje wydajne cięcie RNA przez RNazę H. Kontrolę reakcji stanowiła próba nie zawierająca Oligomeru DNA (Rysunek 44, Ścieżka 0,1), Startery 2), w której obserwowano intensywny sygnał pochodzący od jednego, pełnej długości produktu amplifikacji. W przypadku Starterów 1, produkt reakcji jest wyraźnie widoczny przy każdym stężeniu Oligomerów DNA, z wyjątkiem stężenia 5 μM , dla którego obserwujemy zanik właściwego produktu PCR. Na jego miejscu pojawia się smuga, prawdopodobnie będąca skutkiem zbyt wysokiego stężenia Oligomeru, które powoduje zaburzenia reakcji na etapie syntezy cDNA bądź reakcji PCR. Natomiast Startery 3 wykazują stopniowy, proporcjonalny spadek produktu PCR wraz ze wzrostem stężenia Oligomeru DNA, poczynając od stężenia 0,5 μM aż do całkowitego zaniku przy 5 μM . Ponieważ w niektórych reakcjach pojawiły się niespecyficzne produkty PCR (Rysunek 44, Ścieżki 0,1 – 5, Startery 2), ilość starterów użytych do reakcji PCR została zredukowana.



Rysunek 44. Produkty PCR *gyrA* po cięciu RNazą H transkryptów *ex vivo* w rosnącym gradiencie stężenia Oligomerów DNA od 0,1 do 5 μM . M – marker wielkości.

Następnie przetestowałem stężenia Oligomeru DNA w zakresie od 10 nM do 500 nM (Rysunek 45 A). Produkt Starterów 2 maleje proporcjonalnie do wzrastającego stężenia Oligomeru DNA, przy wyraźnym, niemal całkowitym zaniku przy stężeniach 250 nM i 500 nM (Rysunek 45 B). Natomiast produkty PCR Starterów 1 i 3 nie zanikały wraz ze wzrastającym stężeniem Oligomeru DNA, z wyjątkiem najwyższego stężenia dla Starterów 3,

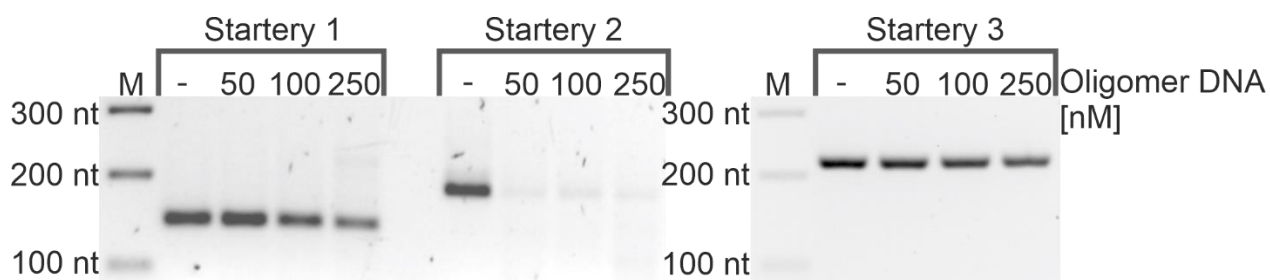
gdzie obserwujemy spadek intensywności prążka. Świadczy to o tym, że hydrolytyczne cięcie zachodzi w zdefiniowanym miejscu (wynik amplifikacji Starterów 2), a nie jest konsekwencją degradacji całego transkryptu (wynik amplifikacji Starterów 1 i 3).



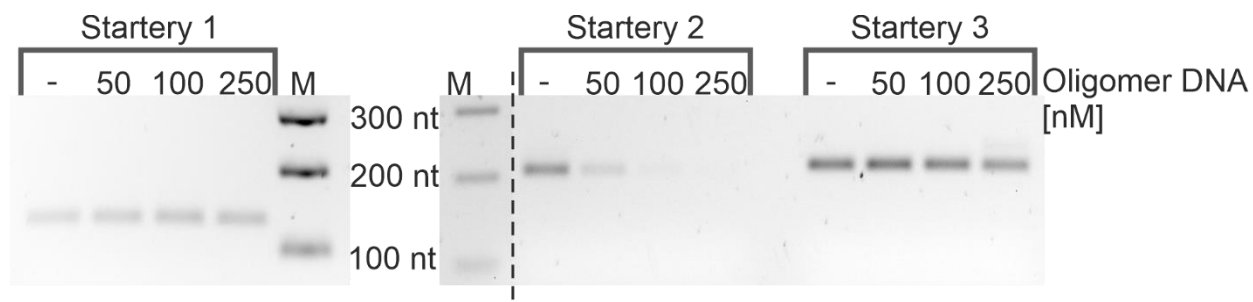
Rysunek 45. Produkty PCR *gyrA* po cięciu RNazą H transkryptów *ex vivo* w rosnącym gradiencie stężenia Oligomerów DNA. (A) Od 10 do 500 nM. (B) Od 50 do 250 nM. M – marker wielkości.

Na podstawie wszystkich wyników można oszacować, że najefektywniejsze stężenie Oligomeru DNA, które z jednej strony zapewnia specyficzne cięcie transkryptu *ex vivo*, a z drugiej strony nie powoduje niespecyficznych reakcji czy też innych zaburzeń, zawiera się w przedziale 100 – 250 nM. Z tej przyczyny do analizy cięcia transkryptów zawierających ryboprzełączniki operowałem stężeniami w zakresie od 100 do 250 nM Oligomeru DNA.

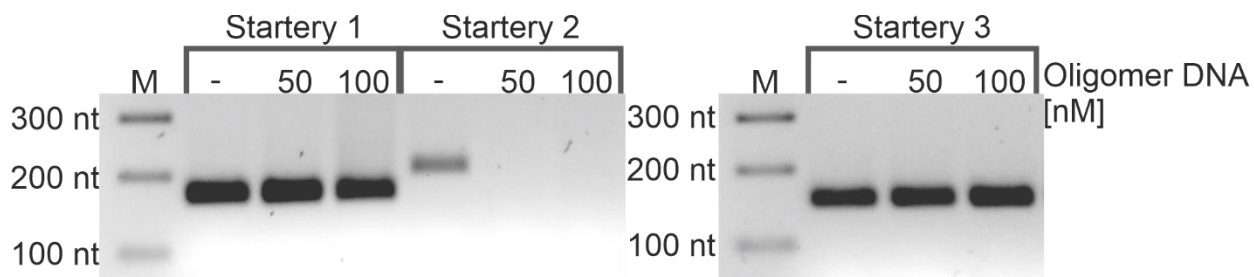
W zoptymalizowanym przedziale stężenia Oligomeru DNA eksperyment przeprowadzono dla następujących transkryptów genów: *samT*, *metIC*, *metE*, *mtnKA*. W żelu agarozowym widzimy zanikający sygnał amplifikacji Starterów 2, co świadczy o skutecznym przecięciu transkryptów *ex vivo* (Rysunek 46, Rysunek 47, Rysunek 48, Rysunek 49). Efekt ten jest widoczny dla czterech analizowanych genów zawierających ryboprzełącznik SAM. Produkty PCR Starterów 1 i 3, z pewnymi wyjątkami, nie ulegają istotnemu zmniejszeniu przy wzroście stężenia Oligomeru DNA. Najoptymalniejsze stężenie Oligomeru DNA to, w zależności od genu/operonu, 50 lub 100 nM na 100 ng całkowitego RNA. Są to warunki, dla których jednocześnie widoczna jest istotna redukcja sygnału amplifikacji Starterów 2 oraz brak zaniku sygnału Starterów 1 i 3.



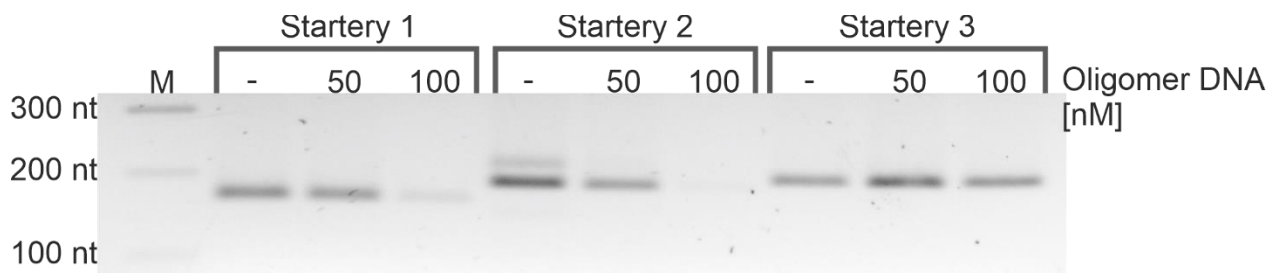
Rysunek 46. Produkty PCR *samT* po cięciu RNazą H transkryptów *ex vivo*, w rosnącym gradiencie stężenia Oligomerów DNA od 50 do 250 nM. M – marker wielkości.



Rysunek 47. Produkty PCR *metIC* po cięciu RNazą H transkryptów *ex vivo*, w rosnącym gradiencie stężenia Oligomerów DNA od 50 do 250 nM. M – marker wielkości.

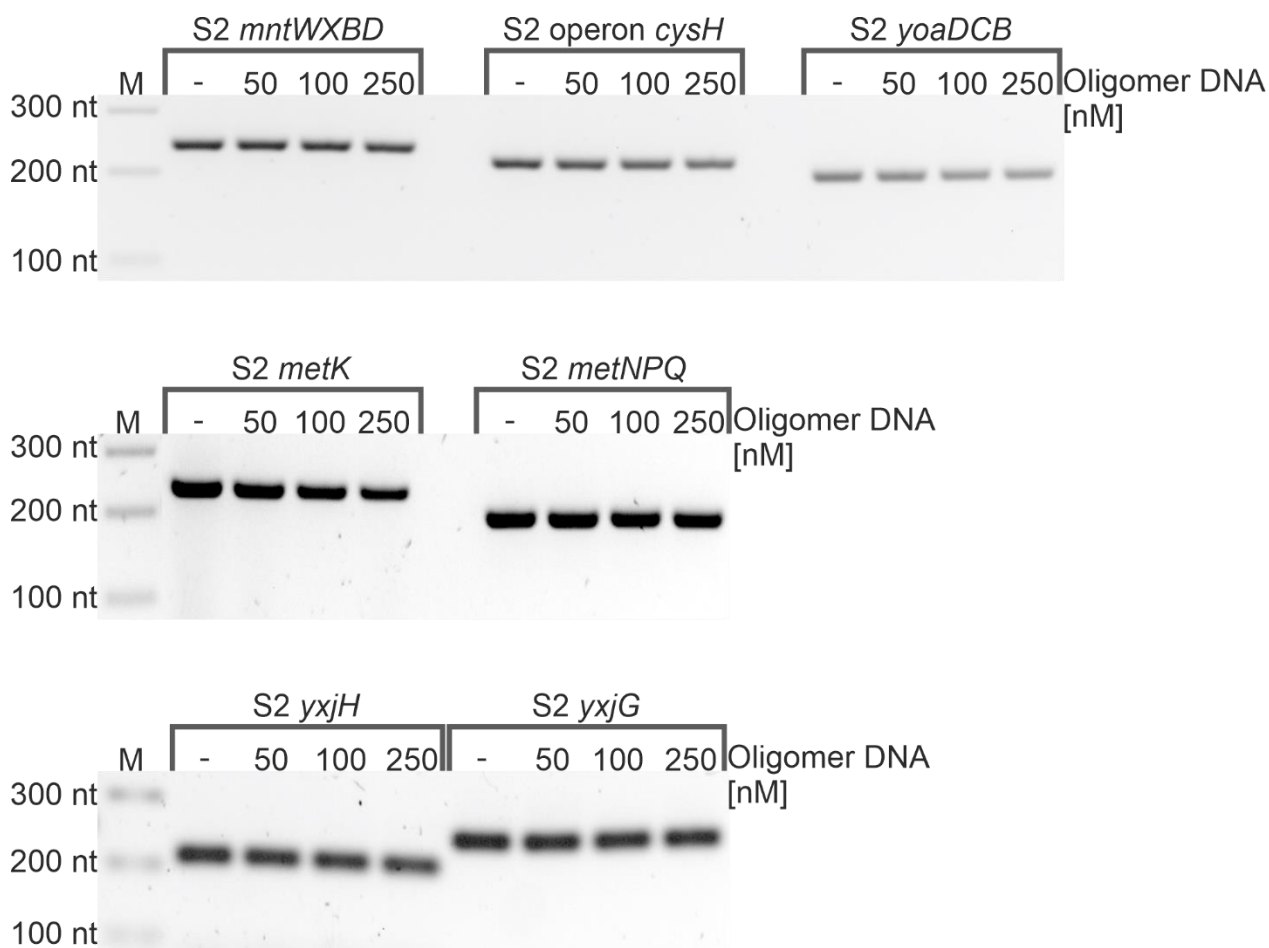


Rysunek 48. Produkty PCR *metE* po cięciu RNazą H transkryptów *ex vivo*, dla dwóch stężeń Oligomeru DNA 50 i 100 nM. M – marker wielkości.



Rysunek 49. Produkty PCR *mtnKA* po cięciu RNazą H transkryptów *ex vivo*, dla dwóch stężeń Oligomeru DNA 50 i 100nM. M – marker wielkości.

Natomiast dla pozostałych siedmiu genów/operonów, których ekspresja jest kontrolowana przez ryboprzełącznik SAM, nie udało się zaprojektować Oligomerów DNA, które byłyby zdolne do wywołania cięcia przez RNAzę H (Rysunek 50). W przypadku tych genów/operonów nie obserwujemy spadku ilości produktu PCR dla Starterów 2 (S2) wraz ze wzrostem stężenia Oligomeru DNA. Z powodu braku widocznych efektów działania RNazy H zostały one wykluczone z dalszych eksperymentów i analiz.



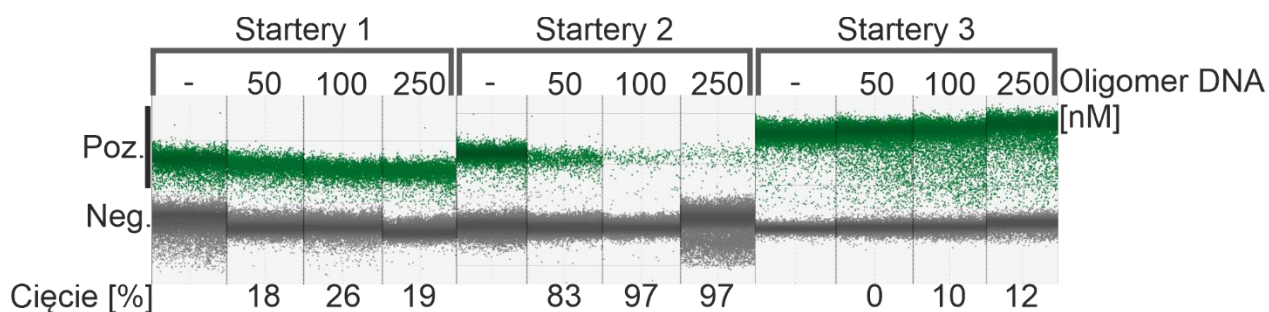
Rysunek 50. Produkty PCR: *mntWXBD*, operonu *cysH*, *yoaDCB*, *metK*, *metNPQ*, *yxjH*, *yxjG* po cięciu RNazą H transkryptów *ex vivo* w rosnącym gradiencie stężenia Oligomerów DNA od 50 do 250 nM. M – marker wielkości, S2 – Startery 2.

4.4.3 Analiza wydajności i specyficzności cięcia RNazą H z użyciem ddPCR

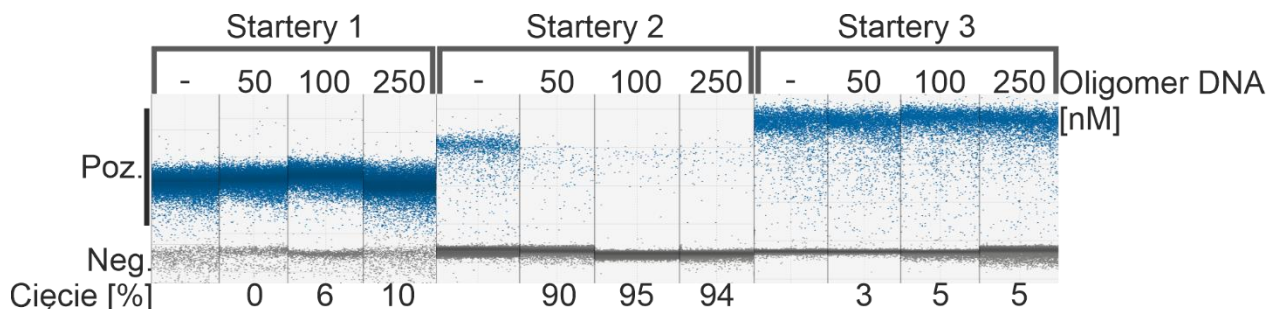
Ze względu na fakt, że analiza produktów PCR jest badaniem półilościowym, zdecydowałem o włączeniu dodatkowej analizy ilościowego PCR, celem oceny wydajności i specyficzności cięcia transkryptów *ex vivo*. Wykorzystałem technikę ddPCR, która jest bardzo czuła i precyzyjna, co jest istotne w analizach jakościowych.

Próbki cDNA zostały przygotowane w taki sam sposób jak w Rozdziale 4.4.2 z użyciem takich samych stężeń Oligomeru DNA. W kolejnym etapie zamiast standardowej reakcji PCR przeprowadzono reakcję ddPCR według procedury opisanej w Rozdziale 6.6.11. W ten sposób przeanalizowano transkrypty pięciu genów, tych samych co w Rozdziale 4.4.2 : *gyrA*, *samT*, *metIC*, *metE*, *mtnKA*. W technice ddPCR pojedyncza reakcja PCR jest rozdzielona na blisko 20 000 niezależnych kropeł zawieszonych w oleju, gdzie każda z nich zawiera wszystkie składniki mieszaniny reakcyjnej (bufor reakcyjny, startery, polimerazę oraz barwnik EvaGreen). Dla niskich stężeń transkryptu (a właściwie cDNA), przyjmuje się, że statystycznie do każdej takiej kropli trafia dokładnie jedna cząsteczka cDNA. Dla wyższych stężeń natomiast, założenie to nie jest spełnione (do jednej kropli mogą trafić dwie, trzy lub więcej kopii cDNA), dlatego też wprowadza się korektę Poisson'a dla prawidłowego oznaczenia stężenia. Podczas analizy wyników ddPCR możemy zobaczyć reprezentację dwóch populacji kropeł: pozytywnych (dodatnich), w kolorze niebieskim lub zielonym, w których zaszła reakcja PCR, oraz negatywnych (ujemnych), koloru szarego, w których brak jest produktów PCR (Rysunek 51). Krople pozytywne dzięki obecności barwnika fluorescencyjnego EvaGreen (emitującego sygnał świetlny po związaniu dwuniciowych cząsteczek DNA), jeżeli w ich wnętrzu znajduje się matryca cDNA dla reakcji PCR. Im wyższe wejściowe stężenie danego transkryptu, tym więcej kopii cDNA i tym większa liczba kropeł pozytywnych w stosunku do negatywnych.

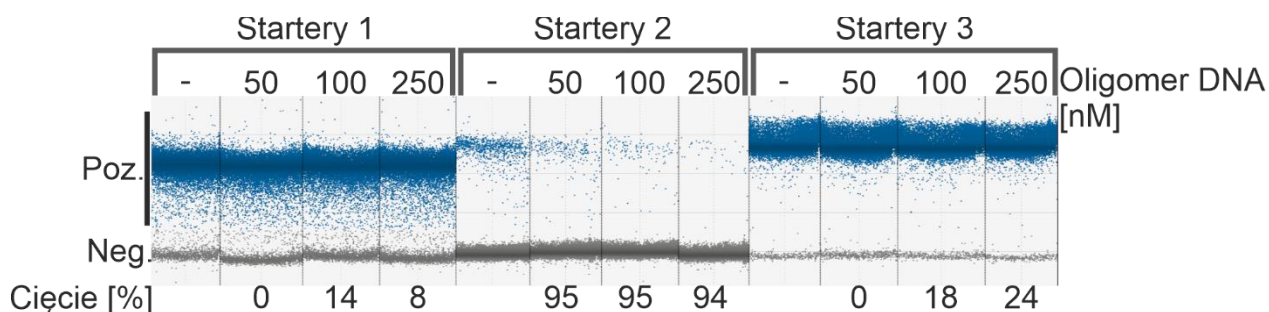
Po przeprowadzeniu reakcji widzimy, że sygnał Starterów 2 wyraźnie maleje po dodaniu nawet najmniejszej testowanej ilości Oligomeru DNA (50 nM). Nie jest natomiast obserwowany istotny spadek ilości dodatnich kropeł dla Starterów 1 i 3. Wydajność cięcia została wyrażona w procentach, jako stosunek stężenia transkryptu, (w kopiach RNA na μl [$\text{k}/\mu\text{l}$]) w badanej próbce do kontroli (Rysunek 51, Rysunek 52, Rysunek 53, Rysunek 54, Rysunek 55, Tabela 5). Średnia wydajność cięcia określona przy użyciu Starterów 2 wynosiła kolejno 91%, 96% i 95% dla stężeń Oligomeru DNA odpowiednio 50, 100 i 250 nM. Jednocześnie zmienność wydajności cięcia jest dość niska i wynosi 8 % dla poszczególnych transkryptów.



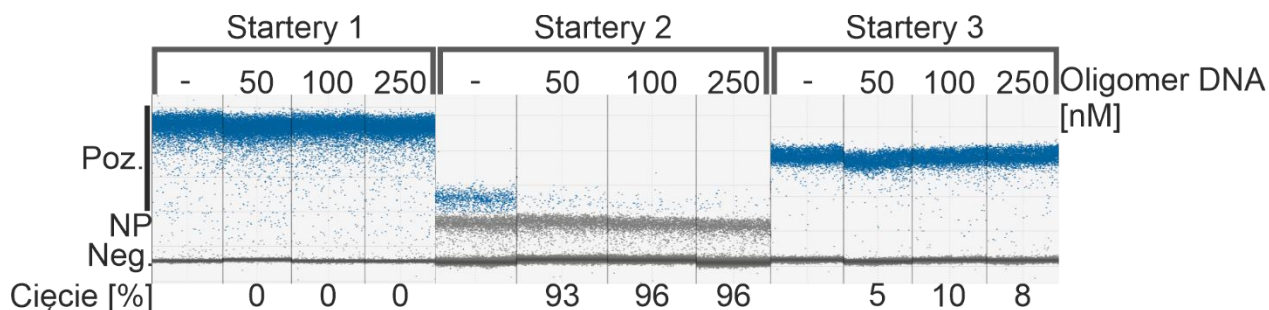
Rysunek 51. Produkty ddPCR *gyrA* po cięciu RNazą H transkryptów *ex vivo*, w rosnącym gradiencie stężenia Oligomerów DNA od 50 do 250 nM. Poz. – krople pozytywne (zielone), Neg. – krople negatywne (szare).



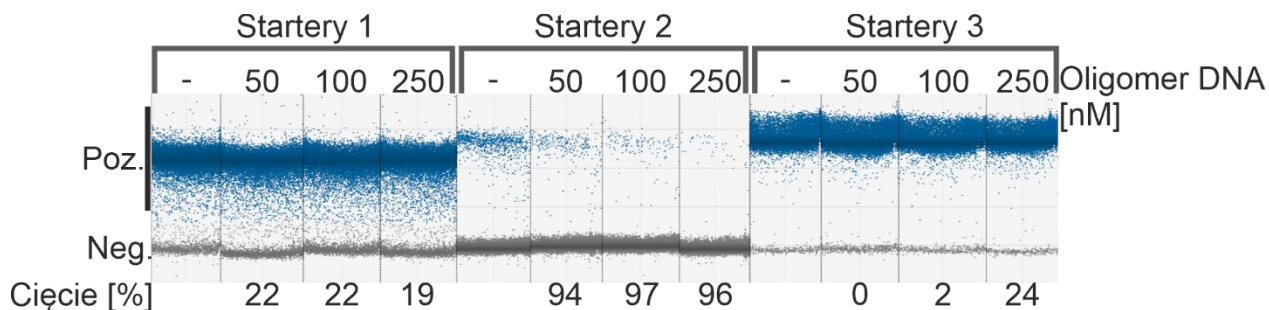
Rysunek 52. Produkty ddPCR *samT* po cięciu RNazą H transkryptów *ex vivo*, w rosnącym gradiencie stężenia Oligomerów DNA od 50 do 250 nM. Poz. – krople pozytywne (niebieskie), Neg. – krople negatywne (szare).



Rysunek 53. Produkty ddPCR *metIC* po cięciu RNazą H transkryptów *ex vivo*, w rosnącym gradiencie stężenia Oligomerów DNA od 50 do 250 nM. Poz. – krople pozytywne (niebieskie), Neg. – krople negatywne (szare).



Rysunek 54. Produkty ddPCR *metE* po cięciu RNazą H transkryptów *ex vivo*, w rosnącym gradiencie stężenia Oligomerów DNA od 50 do 250 nM. Poz. – krople pozytywne (niebieskie), Neg. – krople negatywne (szare), NP. – niespecyficzny produkt reakcji.



Rysunek 55. Produkty ddPCR *mtnKA* po cięciu RNazą H transkryptów *ex vivo*, w rosnącym gradiencie stężenia Oligomerów DNA od 50 do 250 nM. Poz. – krople pozytywne (niebieskie), Neg. – krople negatywne (szare).

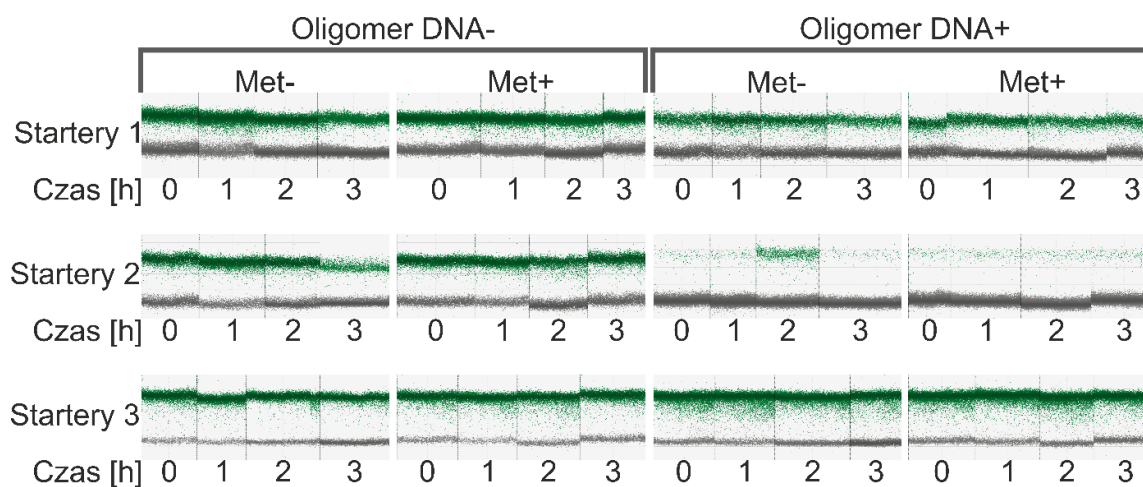
Średnia wydajność cięcia obliczona dla przy użyciu Starterów 1 wynosiła odpowiednio 8%, 14%, 11% dla stężeń Oligomeru DNA równych odpowiednio: 50, 100 i 250 nM. Dla Starterów 3 wydajność cięcia wynosiła 2%, 9% i 15%. Wyniki pochodzące z obu par starterów wskazują na niewielki udział niespecyficznego interakcji, prowadzących do przecięcia transkryptów w innych niż sekwencyjnie zdefiniowanym miejscu i jednocześnie potwierdziły wysoką wydajność i specyficzność cięcia transkryptów *ex vivo* przez RNazę H. Dla transkryptów genu *metE* widzimy dodatkowy, niespecyficzny produkt PCR dla Starterów 2 (Rysunek 54). Jednak obecność tego produktu nie wpływa na oznaczanie skuteczności cięcia, gdyż jego ilość nie zmienia się ze wzrostem stężenia Oligomeru DNA. Aby uniknąć dwuznaczności przyszłych wyników, do dalszych eksperymentów zaprojektowano nowy starter oznaczony „*” (Tabela 10)

Tabela 5. Stężenia transkryptów poszczególnych genów/operonów oraz efektywność cięcia RNazą H w rosnącym gradiencie stężenia Oligomerów DNA od 50 do 250 nM. NA – nie dotyczy.

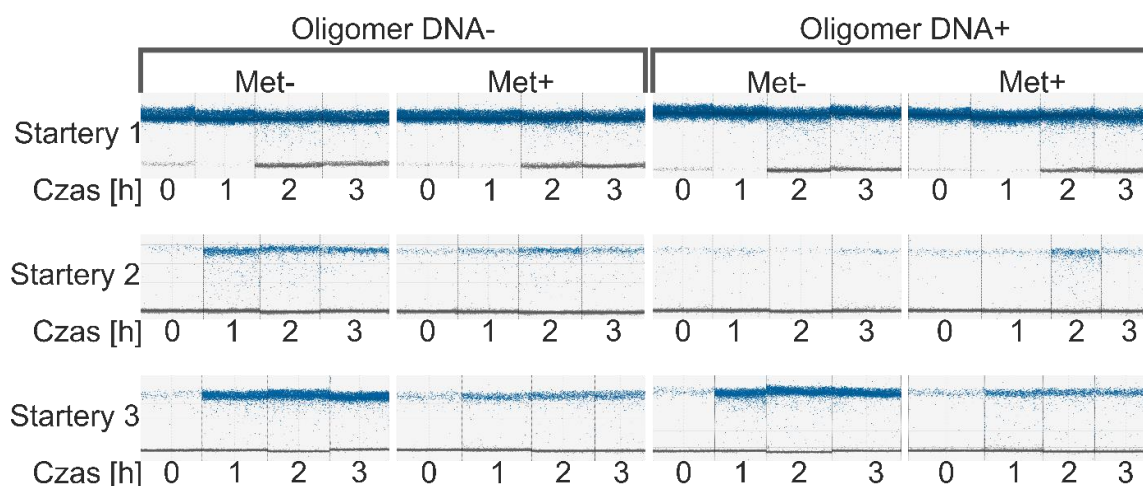
Gen	Startery 1				Startery 2				Startery 3			
	-	50 nM	100 nM	250 nM	-	50 nM	100 nM	250 nM	-	50 nM	100 nM	250 nM
<i>gyrA</i> [k/μl]	497	407	369	403	598	104	17,5	16,6	1 019	1 033	914	901
Cięcie [%]	NA	18	26	19	NA	83	97	97	NA	0	10	12
<i>samT</i> [k/μl]	3 048	3 305	2 875	2 757	132	13,2	6,7	7,41	442	429	420	418
Cięcie [%]	NA	0	6	10	NA	90	95	94	NA	3	5	5
<i>metIC</i> [k/μl]	1 073	1 238	921	992	112	5,46	6,05	6,46	1 482	1 516	1 220	1 125
Cięcie [%]	NA	0	14	8	NA	95	95	94	NA	0	18	24
<i>metE</i> [k/μl]	856	1 094	959	1 054	82,3	6,17	3,4	3,08	4 433	4 219	3 983	4 072
Cięcie [%]	NA	0	0	0	NA	93	96	96	NA	5	10	8
<i>mtnKA</i> [k/μl]	5 282	4 135	4 135	4 292	151	8,41	5,26	6,66	7 269	7 659	7 154	5 506
Cięcie [%]	NA	22	22	19	NA	94	97	96	NA	0	2	24
Średnie cięcie [%]	NA	8	14	11	NA	91	96	95	NA	2	9	15

Zoptymalizowaną i sprawdzoną metodę ddPCR zastosowałem do przebadania zmian współczynnika indukcji ryboprzełączników SAM w *B. subtilis* w czasie. Hodowla bakterii oraz próbki RNA zostały przygotowane w analogiczny sposób jak w Rozdziale 4.1.1. Korzystając z informacji uzyskanych w trakcie eksperymentu opisanego w Rozdziale 4.1.2, zdecydowałem się na wykorzystanie czterech punktów czasowych (0 h, 1 h, 2 h, 3 h), w których zachodzą najistotniejsze zmiany współczynnika indukcji dla testowanych transkryptów kontrolowanych ryboprzełącznikami SAM. Dodatkowym etapem była procedura cięcia transkryptów w puli całkowitego RNA przy użyciu RNazy H, w analogiczny sposób jak w Rozdziale 4.4.2. Do reakcji cięcia zostały użyte Oligomery DNA o stężeniu i długości zoptymalizowanej w Rozdziałach 4.4.1 i 4.4.3 (długość ok 20 nt, stężenie 100 nM). Tak przygotowane próbki RNA zostały przepisane w reakcji odwrotnej transkrypcji na cDNA. Reakcję ddPCR przeprowadzono dla transkryptów genów: *gyrA*, *samT*, *metIC*, *metE*, *mtnKA*.

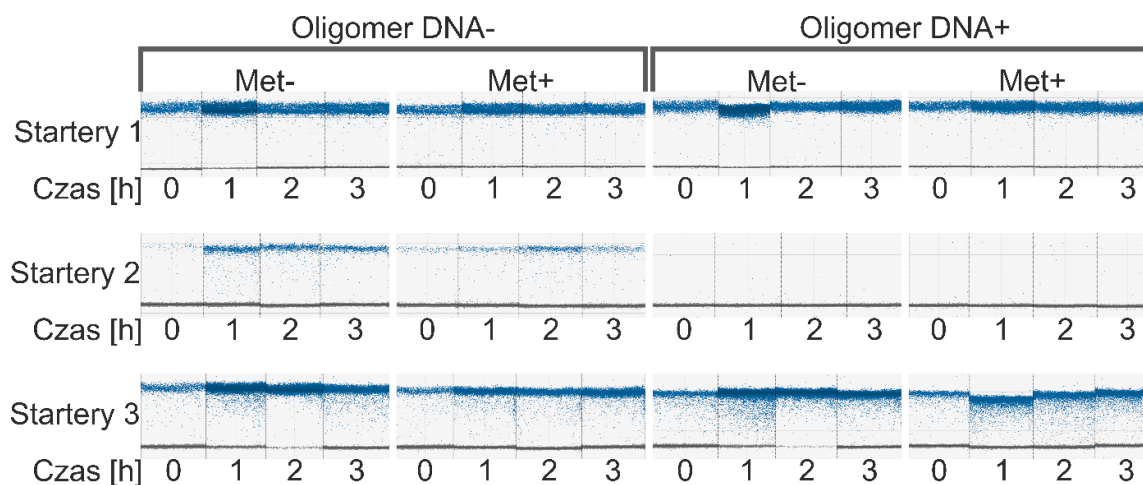
Na rysunkach (Rysunek 56, Rysunek 57, Rysunek 58, Rysunek 59, Rysunek 60) przedstawiających dane z eksperymentu ddPCR widać istotny spadek sygnału Starterów 2 dla wszystkich analizowanych transkryptów, w próbach Oligomer DNA⁺ w porównaniu z próbami Oligomer DNA⁻. Jednocześnie efekt ten nie jest widoczny dla Starterów 1 i 3, po przecięciu transkryptów przez RNazę H, w przewidywany sposób. Porównując z kolei różne warunki hodowli bakterii możemy zaobserwować wzrost ilości pozytywnych kropel w próbach Met⁻ w stosunku do Met⁺ dla Starterów 3. Jest to skutek aktywacji ekspresji genów pod kontrolą ryboprzełącznika SAM i jest szczególnie silnie widoczny w punkcie czasowym 2 h dla genów/operonów *metIC*, *metE* i *mtnKA* oraz w punkcie czasowym 3 h dla genów *metIC* i *metE*. Efekt ten jest obserwowalny w podobnym stopniu w próbach Oligomer DNA⁻ jak i Oligomer DNA⁺. Operon *mtnKA* nie wykazuje zbyt dużych różnic pomiędzy obydwooma warunkami z wyjątkiem niewielkiego spadku sygnału w 1 h. Zmiany sygnału kropel pozytywnych nie są widoczne w kontrolnym genie *gyrA* w żadnym punkcie czasowym, gdyż jego ekspresja ma charakter konstytutywny i nie podlega istotnym wahaniom pod wpływem zmian stężenia SAM.



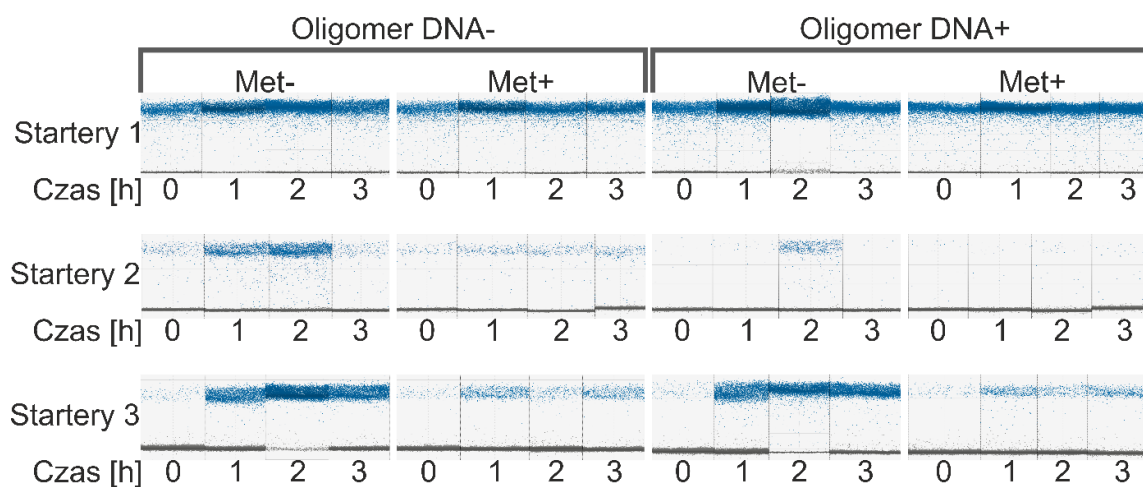
Rysunek 56. Aktywność transkrypcyjna *gyrA* w czterech punktach czasowych (0 h, 1 h, 2 h, 3 h). „Met-” – hodowla bez metioniny, „Met+” – hodowla z metioniną (kontrola).



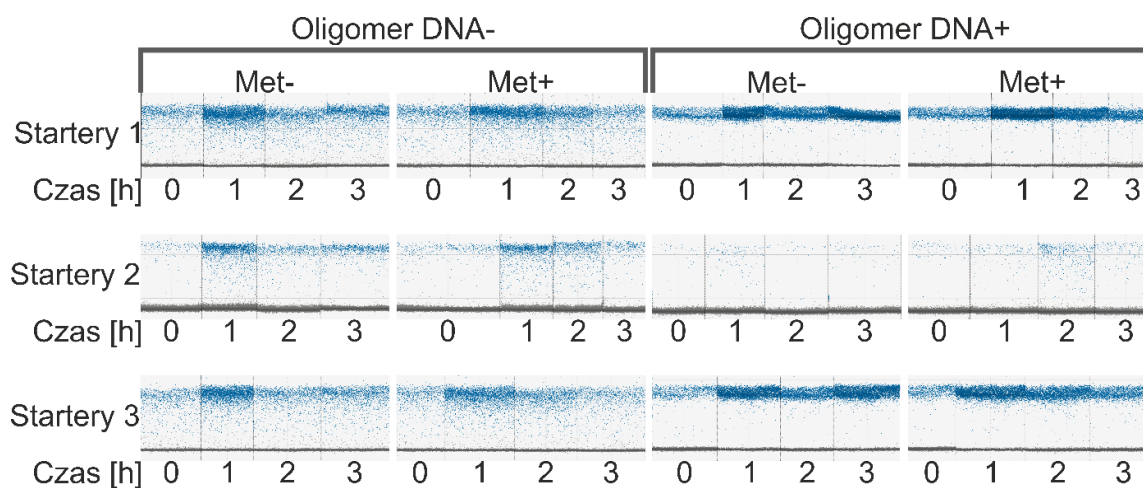
Rysunek 57. Aktywność transkrypcyjna *samT* w czterech punktach czasowych (0 h, 1 h, 2 h, 3 h). „Met-” – hodowla bez metioniny, „Met+” – hodowla z metioniną (kontrola).



Rysunek 58. Aktywność transkrypcyjna *metIC* w czterech punktach czasowych (0 h, 1 h, 2 h, 3 h). „Met-” – hodowla bez metioniny, „Met+” – hodowla z metioniną (kontrola).



Rysunek 59. Aktywność transkrypcyjna *metE* w czterech punktach czasowych (0 h, 1 h, 2 h, 3 h). „Met-” – hodowla bez metioniny, „Met+” – hodowla z metioniną (kontrola).



Rysunek 60. Aktywność transkrypcyjna *mtnKA* w czterech punktach czasowych (0 h, 1 h, 2 h, 3 h). „Met-” – hodowla bez metioniny, „Met+” – hodowla z metioniną (kontrola).

4.4.4 Analiza aktywności transkrypcyjnej ryboprzełączników SAM

Istotną korzyścią płynącą z wykorzystania techniki ddPCR jest możliwość określenia stężenia analizowanych transkryptów wyrażonych w jednostkach bezwzględnych k/ μ l. Pozwala to na łatwe określenie dokładnego stężenia skróconych transkryptów (T), będących efektem działania ryboprzełączników, jako różnicy pomiędzy stężeniem produktu uzyskanego dla Starterów 1 (S1) i Starterów 3 (S3). Dzięki temu możliwe jest obliczenie właściwego współczynnika indukcji, określanego w dalszej części pracy jako IR*, wyrażonego, jako stosunek transkryptów FL do T w warunkach Met⁻ do Met⁺:

$$IR^* = \frac{\frac{S3_{Met^-}}{S1_{Met^-} - S3_{Met^-}}}{\frac{S3_{Met^+}}{S1_{Met^+} - S3_{Met^+}}} = \frac{\frac{FL_{Met^-}}{T_{Met^-}}}{\frac{FL_{Met^+}}{T_{Met^+}}}$$

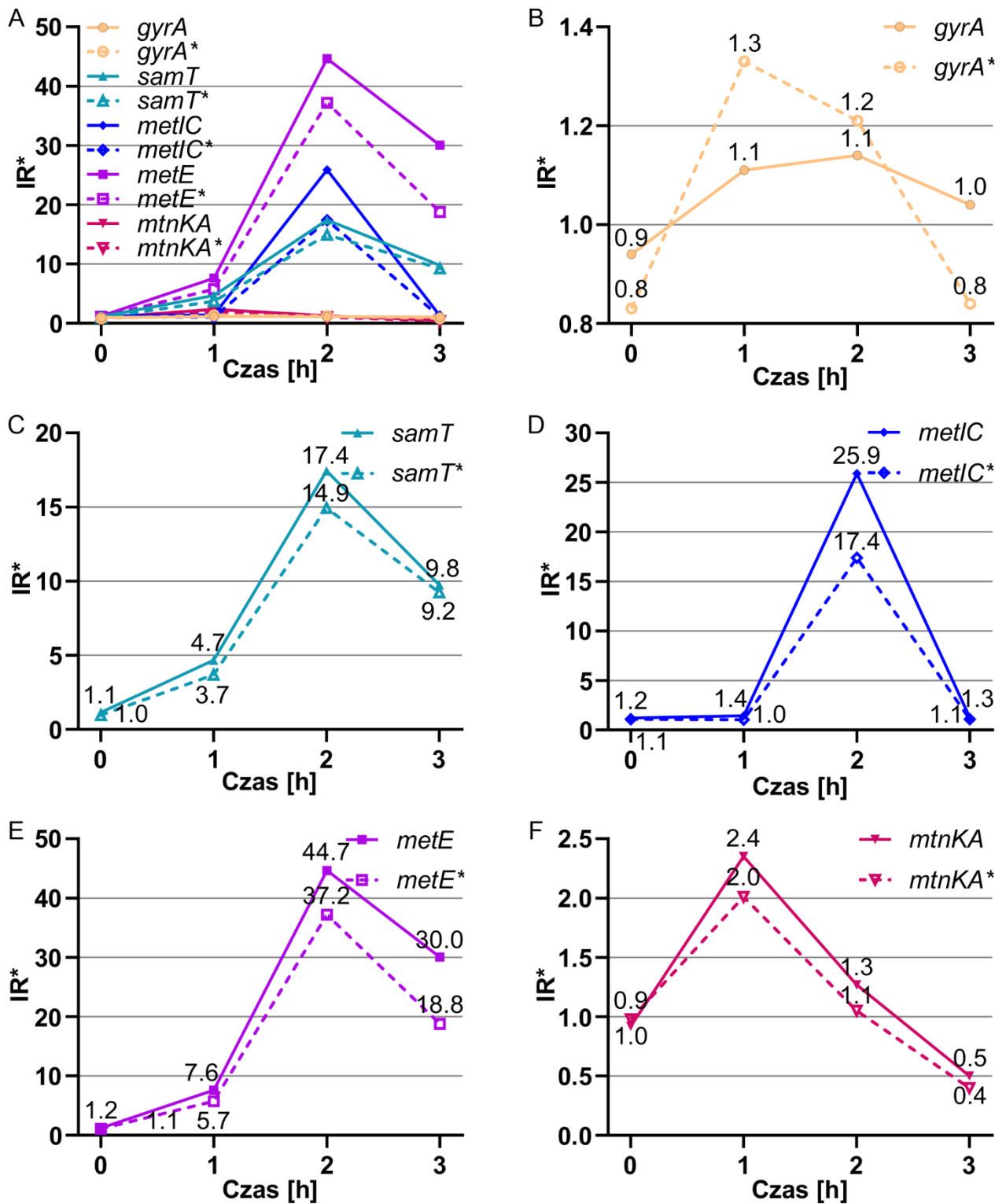
Równanie 2. Współczynnik Indukcji IR*.

Ponadto wprowadzenie procedury cięcia RNazą H na etapie przygotowania RNA pozwoliło na zastosowanie dodatkowej korekty, eliminującej wpływ odległości od 3' końca na określenie stężeń poszczególnych transkryptów. W pierwszej kolejności zostały porównane i zestawione współczynniki IR* z zastosowaniem korekty (próby Oligomer DNA⁺) i bez niej (próby Oligomer DNA⁻) (Tabela 6). Dla wszystkich genów kontrolowanych przez ryboprzełączniki wprowadzenie Oligomeru DNA i cięcia RNaząH spowodowało podwyższenie IR* w stosunku do kontroli, średnio o 23% (w zależności od genu i punktu czasowego nawet do 60%). Najwyższe różnice dotyczą tych genów/operonów i punktów czasowych, w których współczynnik indukcji jest najwyższy.

Tabela 6. Porównanie współczynników indukcji IR* poszczególnych genów/operonów w czterech punktach czasowych (0 h, 1 h, 2 h, 3 h) w próbach Oligomer DNA– i Oligomer DNA+.

Gen	Oligomer DNA	0 h	1 h	2 h	3 h
<i>gyrA</i> IR*	–	0,83	1,33	1,21	0,84
	+	0,94	1,11	1,14	1,04
Różnica [%]		14	-17	-6	25
<i>samT</i> IR*	–	0,96	3,69	14,93	9,24
	+	1,14	4,67	17,44	9,75
Różnica [%]		18	26	17	5
<i>metIC</i> IR*	–	1,07	1,02	17,38	1,07
	+	1,21	1,43	25,91	1,25
Różnica [%]		13	40	49	17
<i>metE</i> IR*	–	1,08	5,72	37,21	18,79
	+	1,21	7,60	44,66	30,02
Różnica [%]		11	33	20	60
<i>mtnKA</i> IR*	–	1,08	5,72	37,21	18,79
	+	1,21	7,60	44,66	30,02
Różnica [%]		-6	17	21	27

Wszystkie analizowane geny/operony, których ekspresja jest kontrolowana przez ryboprzełączniki wykazują stopniowy wzrost IR*, poczynając od wartości 1 dla punktu czasowego 0 h, ze szczytem w 2 h i ostatecznym spadkiem po 3 h (Rysunek 61 A). Nieco inną charakterystykę posiada operon *mtnKA*, który osiąga najwyższy IR* w 1 h, po czym obserwujemy stopniowy spadek (Rysunek 61 F). Ekspresja transkryptu genu *gyrA* nie wykazuje istotnej indukcji w żadnym punkcie czasowym (Rysunek 61 B). Najwyższy wzrost IR* charakteryzuje transkrypt genu *metE* w punkcie czasowym 2 h i wynosi on ~45 (Rysunek 61 E), następnie operon *metIC* o IR*~26 (Rysunek 61 D) i *samT* o IR*~17 (Rysunek 61 C). Operon *mtnKA* jedynie w niewielkim stopniu reaguje na zmiany stężenia metioniny, osiągając najwyższy IR*~2,5 po 1 h godzinie inkubacji (Rysunek 61 F).



Rysunek 61. Porównanie współczynników indukcji IR* dla poszczególnych genów/operonów: (A) *gyrA*, (B) *samT*, (C) *metIC*, (D) *metE*, oraz (E) *mtnKA*; uzyskanych z wykorzystaniem cięcia RNazą H oraz bez (nazwa genu/operonu*) w czterech punktach czasowych (0 h, 1 h, 2 h, 3 h).

Analiza stężeń poszczególnych transkryptów, wyrażona w k/ μ l, potwierdziła poprzednie obserwacje dotyczące stężeń frakcji transkryptów (FL i T). Otóż widzimy, że w przeważającej większości przypadków łączna ilość transkryptów (FL+T) jest dość porównywalna, z drobnymi wyjątkami, jak gen *metE* w 2 h (Tabela 7). Natomiast znaczące różnice dotyczą wzajemnych stosunków transkryptów FL do T z przesunięciem równowagi w stronę FL dla prób Met⁻ oraz przesunięciem w stronę T w próbach Met⁺. Największe zmiany w składzie ilościowym obserwowane są w punkcie czasowym 2 h. W punkcie czasowym 0 h z kolei możemy zaobserwować generalnie najniższy łączny poziom ekspresji, z wyjątkiem transkryptu genu *samT*. Warto także podkreślić fakt, iż skrócone transkrypty generowane są w bardzo dużych ilościach, nawet w próbach suplementowanych metioniną. Uśredniając, we wszystkich próbach Met⁻ stosunek T:FL wynosi blisko 2:1, natomiast w próbach Met⁺ sięga nawet 6:1. Wyjątek stanowią geny/operony o najwyższym współczynniku indukcji IR*, dla których charakterystyczna jest przewaga transkryptów FL względem T, jednak nawet w takich okolicznościach stosunek FL:T wynosi 1:2 w próbach Met⁻.

Tabela 7. Stężenia transkryptów poszczególnych genów/operonów w czterech punktach czasowych (0 h, 1 h, 2 h, 3 h). Stężenia wyrażone w kopiach RNA na μl [k/ μl].

Gen	Met	0 h			1 h			2 h			3 h		
		FL+T	T	FL	FL+T	T	FL	FL+T	T	FL	FL+T	T	FL
<i>samT</i>	-	6 120	6 075	45	7 480	6 653	827	1 531	550	981	1 998	966	1 032
	+	5 490	5 454	36	5 360	5 221	139	2 102	1 907	195	1 610	1 451	159
<i>metIC</i>	-	4 940	4 659	281	31 350	28 595	2 755	8 490	3 010	5 480	14 190	12 584	1 606
	+	4 270	4 067	203	16 190	15 171	1 019	9 550	8 923	627	10 140	9 201	939
<i>metE</i>	-	5 870	5 686	184	25 770	18 920	6 850	32 390	11 360	21 030	12 220	3 560	8 660
	+	6 330	6 165	165	23 750	22 670	1 080	13 140	12 617	523	14 140	13 080	1 060
<i>mtnKA</i>	-	2 780	670	2 110	15 700	5 550	10 150	7 390	4 640	2 750	15 840	12 490	3 350
	+	2 700	610	2 090	17 240	9 690	7 550	10 740	7 320	3 420	5 530	3 610	1 920

4.4.5 Porównanie współczynnika indukcji IR uzyskanych technikami RT-qPCR i ddPCR

Ostatnim etapem mojej pracy doktorskiej było przeanalizowanie aktywności transkrypcyjnej ryboprzełączników na podstawie wyników uzyskanych metodą ddPCR (próby DD) i porównanie ich z wynikami uzyskanymi metodą RT-qPCR (próby RT), opisanymi w Rozdziale 4.3.1. Dzięki zastosowaniu techniki ddPCR możliwa stała się wiarygodna ocena stężenia poszczególnych transkryptów FL i T w różnych punktach czasowych. Porównanie ich z uzyskanymi wcześniej wynikami za pośrednictwem techniki RT-qPCR pozwoli na ostateczną ocenę przydatności i adekwatności nowo opracowanej metody.

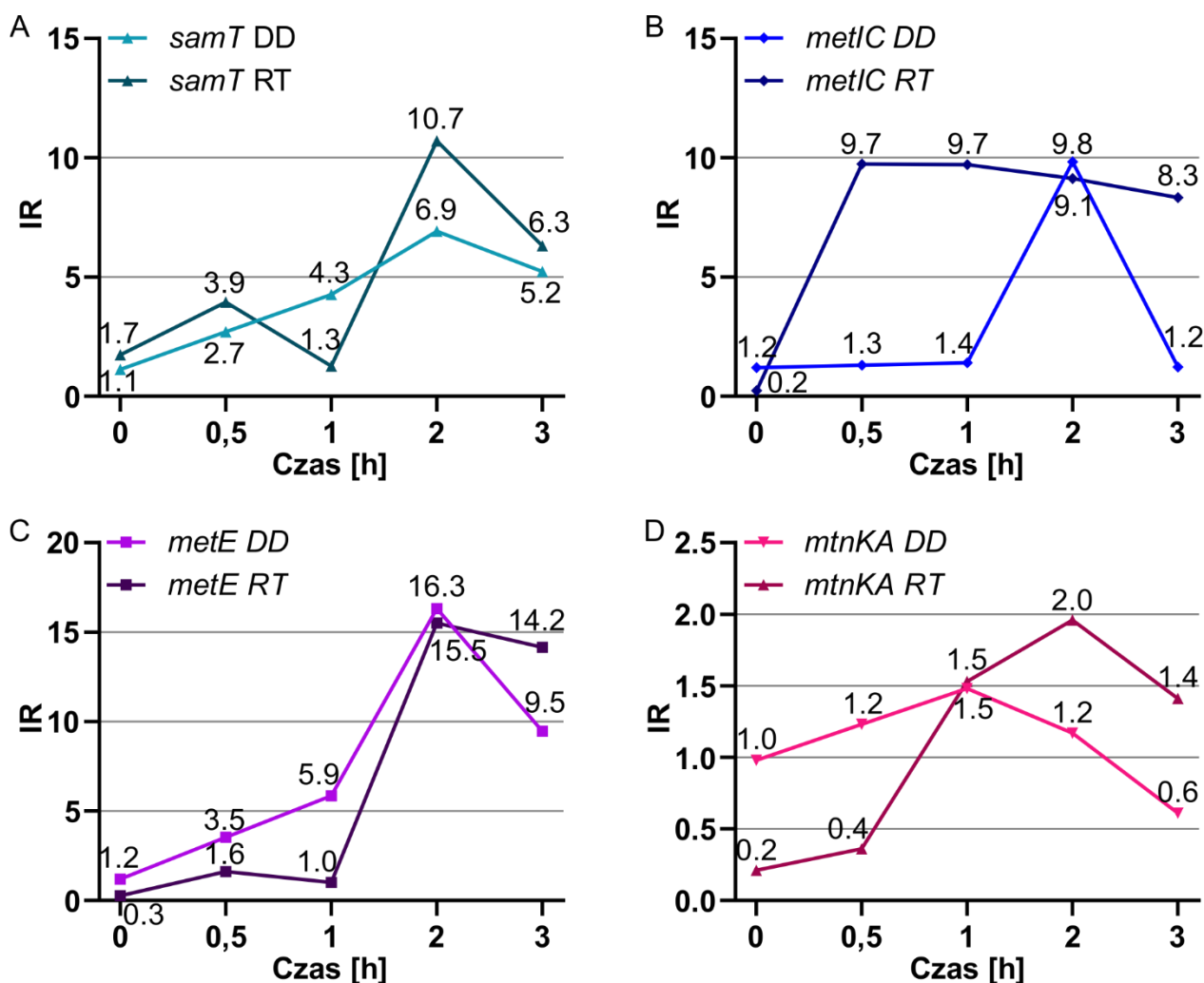
W celu porównania uzyskanych obiema metodami wyników w pierwszej kolejności muszą zostać ujednoczone współczynniki indukcji zastosowane w każdym z eksperymentów (IR vs IR*). Współczynnik indukcji IR* nie może być wyliczony z wykorzystaniem wartości C_t uzyskanych w eksperymencie RT-qPCR. Z tego względu wyliczony został współczynnik indukcji IR z danych uzyskanych metodą ddPCR (Tabela 8). Brakujące punkty czasowe dla obu eksperymentów (0,5 h dla ddPCR oraz 3 h dla RT-qPCR) zostały interpolowane przy użyciu programu GraphPaD Prism 8.

Tabela 8. Porównanie współczynników indukcji IR poszczególnych genów/operonów w pięciu punktach czasowych (0 h, 0,5 h, 1 h, 2 h, 3 h) uzyskanych technikami ddPCR i RT-qPCR.

Gen	Technika	0 h	0,5 h	1 h	2 h	3 h
<i>samT</i> IR	ddPCR	1,13	2,7	4,26	6,91	5,23
	RT-qPCR	1,73	3,94	1,26	10,7	6,31
<i>metIC</i> IR	ddPCR	1,2	1,3	1,4	9,83	1,22
	RT-qPCR	0,24	9,73	9,71	9,13	8,33
<i>metE</i> IR	ddPCR	1,2	3,53	5,85	16,31	9,45
	RT-qPCR	0,27	1,61	1	15,5	14,15
<i>mtnKA</i> IR	ddPCR	0,98	1,23	1,48	1,17	0,61
	RT-qPCR	0,21	0,36	1,53	1,96	1,41

Porównując wyniki uzyskane obiema technikami dla genu *samT* możemy zobaczyć podobny trend wzrostowy współczynnika IR aż do 2 h, ze spadkiem w 3 h (Rysunek 62 A). Wyjątkiem jest punkt czasowy 1 h, w którym obserwujemy spadek IR w próbie RT, a którego nie obserwujemy w przypadku próby DD. Ponadto próby DD charakteryzują się niższym IR we wszystkich punktach czasowych z wyjątkiem 1 h. Dla operonu *metIC* charakterystyczna była szybka indukcja w odpowiedzi na brak metioniny (IR sięgający 9), obliczona na podstawie

wyników pochodzących z metody RT-qPCR (Rysunek 62 B). Efektu tego nie obserwujemy dla wyników uzyskanych metodą ddPCR. Zamiast tego widoczny jest pojedynczy szczyt współczynnika indukcji IR po 2 h. Osiąga on niemal taką samą wartość jak dla prób RT. Dynamika zmian IR dla genu *metE* jest bardzo podobna dla obu technik, osiągając najwyższą wartość IR (16) w punkcie czasowym 2 h (Rysunek 62 C). W przypadku operonu *mtnKA* obie techniki zgodnie wskazały na brak indukcji tego operonu pod wpływem braku metioniny, we wszystkich punktach czasowych (Rysunek 62 D).



Rysunek 62. Porównanie współczynników indukcji IR dla poszczególnych genów/operonów: (A) *samT*, (B) *metIC*, (C) *metE* oraz (D) *mtnKA*. DD wyniki uzyskane techniką ddPCR (DD). RT wyniki uzyskane techniką RT-qPCR w pięciu punktach czasowych (0 h, 1 h, 2 h, 3 h).

4.4.6 Dyskusja wyników przedstawionych w rozdziale 4.4

Korzystając z unikatowych właściwości RNazy H oraz techniki ddPCR opracowałem nową metodę analizy ilościowej aktywności transkrypcyjnej ryboprzełączników. Pozwoliła ona na wyeliminowanie dotychczasowych ograniczeń metodologicznych, z jakimi musieli zmagać się badacze. Do tej pory bowiem ignorowano w badaniach nad aktywnością ryboprzełączników skrócone transkrypty, będące wynikiem przedwczesnej terminacji transkrypcji, a skupiano się jedynie na pełnej długości transkryptach [198]. W mojej metodzie zastosowanie techniki ddPCR z jednej strony umożliwia określenie stężenia transkryptów zarówno pełnej długości jak i skróconych. Z drugiej zaś strony wykorzystanie RNazy H do przecięcia w zdefiniowanej przez Oligomer DNA pozycji wyeliminowało wpływ odległości od jego końca 3' na ilość odczytów. Wszystko to pozwoliło na przeanalizowanie działania ryboprzełączników transkrypcyjnych, w sposób jak dotąd nieosiągalny.

Punktem wyjścia do opracowania tej metody było bezpośrednie sprawdzenie właściwości nukleolitycznych RNazy H. Jak się okazało, RNaza H jest zdolna do przecięcia właściwie dowolnej cząsteczki RNA z blisko 100% wydajnością. Eksperyment ten pokazał, iż reakcja cięcia jest bardzo wrażliwa nawet na najmniejsze ilości DNA w mieszaninie (Rysunek 43, Ścieżka 100 pM). Co więcej, cięcie transkryptów obserwowano również w próbach, do których Oligomer DNA nie był dodawany (Rysunek 42, Ścieżka -). Najprawdopodobniej cięcie zostało wywoływane obecnością pozostałości DNA po reakcjach PCR (gDNA, startery, matryca PCR), nawet pomimo usunięcia ich w większości z zastosowaniem DNazy.

Więszym wyzwaniem okazało się być przystosowanie metody do cięcia transkryptów *ex vivo*, kiedy to cząsteczka mRNA znajduje się w mieszaninie całkowitego RNA komórki. W takich warunkach wzrasta ryzyko niepożądanych i niespecyficznych interakcji pomiędzy poszczególnymi składnikami mieszaniny reakcyjnej, takimi jak resztki gDNA czy białek, Oligomerów DNA, a przede wszystkim olbrzymia ilość innych niż docelowa cząsteczek RNA. Warto zwrócić uwagę na fakt, iż mRNA stanowi zaledwie ~5% całkowitego RNA komórki bakteryjnej, nie wspominając już o konkretnym rodzaju transkryptu [211]. Konsekwencją tego był fakt, iż tylko dla pięciu transkryptów udało się zaprojektować w pełni działające i specyficzne Oligomery DNA. Dla pozostałych siedmiu natomiast, zaprojektowane Oligomery DNA nie wywoływały żadnej reakcji w obecności RNazy H (Rysunek 50). Jedną z przyczyn może być niedostępność komplementarnej sekwencji RNA, często przyjmującej bardzo stabilne dwuniciowe struktury. Inną – niespecyficzne oddziaływania Oligomeru DNA z różnymi RNA występującymi

w wyższych stężeniach. Może to prowadzić do nadmiernego wychwytywania Oligomeru DNA, co zmniejsza ich efektywne stężenie w mieszaninie reakcyjnej. Niemniej jednak, pokazane przykłady dowodzą, że również w warunkach *ex vivo* możliwe jest specyficzne cięcie wybranego transkryptu przy użyciu RNazy H z niemal pełną wydajnością.

Analiza ilościowa potwierdziła te obserwacje. Zastosowanie techniki ddPCR dało możliwość dokładniejszego określenia wydajności cięcia transkryptów przez RNazę H. Wartości te, wyrażone w procentach, świadczą o wysokiej skuteczności cięcia RNazą H, sięgającej blisko 100%. Analiza specyficzności cięcia (Startery 1 i 3) wykazała zdecydowanie niższe wartości wydajności cięcia. Niektóre próby charakteryzują się cięciem sięgającym nawet 26%, co mogłoby wskazywać jednak na pewną niespecyficzność metody. Jednak pomiędzy wysokimi wartościami cięcia dla Starterów 1 lub 3 a stężeniem Oligomeru DNA nie obserwujemy liniowej zależności, tzn. najwyższe wartości cięcia RNazą H nie przypadają dla najwyższego stężenia Oligomeru DNA. Wskazuje to na to, iż przyczyną pojedynczych wysokich wartości cięcia jest raczej kwestia zmienności eksperymentalnej i błędów niż faktycznie niespecyficznej reakcji.

Prawdziwym wyzwaniem dla opracowanej metody jest zastosowanie jej do rozwiązania niezależnego problemu badawczego. W tym wypadku została podjęta próba określenia stężeń transkryptów skróconych jak i pełnej długości, a także obliczenia poprawionego współczynnika indukcji IR^* . Ponadto współczynnik IR^* został określony zarówno dla prób poddanych cięciu RNazą H (Oligomer DNA+) oraz dla prób kontrolnych (Oligomer DNA-), co pozwoliło na prześledzenie wpływu metody na otrzymany wynik. Okazał się być on istotny, a wartość IR^* wzrosła średnio o 23% w wyniku trawienia RNazą H. Średni wzrost IR^* jest zgodny z założeniami teoretycznymi. Przecięcie transkryptów redukuje nadreprezentację odczytów z końca 5', co prowadzi do zmniejszenia ilości odczytów ze Starterów 1 (Równanie 2). Dodatkowo efekt ten jest tym silniejszy, im większą część transkryptów stanowią cząsteczki FL, co sprawia, że licznik równania rośnie bardziej (dla prób Met-) niż mianownik (Met+).

Wyniki otrzymane z wykorzystaniem nowo opracowanej metody mogłem porównać z tym uzyskanymi techniką RT-qPCR. Pozornie wyniki te zdają się być nie w pełni spójne, z wyjątkiem transkryptu genu *metE*, gdzie obie krzywe mają równoległy przebieg. Może to wynikać z faktu, iż ddPCR jest techniką bardziej czułą i precyzyjną, o wyższej istotności statystycznej, zwłaszcza przy niższych stężeniach oznaczanych transkryptów [212]. Jednak najważniejsze aspekty dla pozostałych transkryptów pozostają zgodne (Rysunek 62). Dla genu *samT* różnica dotyczy przede wszystkim zmian w indukcji w punkcie czasowym 1 h, gdzie dla prób RT widoczny jest istotny spadek indukcji, podczas gdy dla prób DD wzrost. Jednak w przypadku prób RT obniżony

współczynnik indukcji znajduje się pomiędzy dwoma szczytami (w 0,5 h i 2 h), co jest dość niecodziennym zjawiskiem i bardziej prawdopodobnym wynikiem zdaje się być ten uzyskany przy użyciu metody ddPCR (czyli stopniowy wzrost IR). *metIC* z kolei osiąga taką samą wartość IR po 2 godzinach inkubacji; różnica dotyczy faktu, iż dla prób DD jest to pojedynczych szczyt, natomiast dla prób DD indukcja jest bardziej rozciągnięta w czasie. Dla operonu *mtnKA* przebieg indukcji w czasie, choć nieco rozbieżny, niesie ten sam sens biologiczny, jakim jest bardzo niewielki stopień odpowiedzi na brak/obecność SAM w pożywce. Ponadto nowa metoda pozwoliła potwierdzić inną obserwację dotyczącą generalnego poziomu transkrypcji badanych genów. Otóż całkowita ilość transkryptów nie podlega dużym wahaniom pomiędzy próbkami Met⁻ i Met⁺; istotnie natomiast zmienia się stosunek frakcji FL i T.

Zważywszy na wszystkie korzyści, jakie niesie ze sobą zastosowanie niniejszej metody analizy transkrypcyjnej ryboprzełączników, wartym uwagi pomysłem byłoby rozszerzenie jej użycia na kolejne transkrypty. Jednak warto pamiętać, iż metoda ta nie musi być ograniczona do analizy jedynie ryboprzełączników transkrypcyjnych. Metoda ta sprawdzi się równie dobrze do analizy dowolnych elementów regulatorowych opartych o mechanizm terminacji transkrypcji. W przyszłości planowane jest zaprojektowanie nowych Oligomerów DNA, wycelowanych w pozostałe transkrypty posiadające ryboprzełącznik SAM, poprzedzonych dokładnym modelowaniem struktury mRNA. Dodatkowym elementem mogącym zwiększyć zakres i skuteczność metody jest zmodyfikowanie protokołu dla bardziej wymagających transkryptów np. przez zastosowanie etapu denaturacji poprzedzającym reakcję cięcia celem zwiększenia dostępności regionów dwuniciowych dla Oligomerów DNA.

5 Podsumowanie

W odpowiedzi na istniejącą potrzebę odkrywania i poznawania nowych reprezentantów i klas ryboprzełączników transkrypcyjnych, stworzyłem autorską metodę ich identyfikacji. Owa metoda oparta jest na sprzężeniu dwóch rodzajów sekwencjonowania RNA nowej generacji: Term-seq i SHAPE-seq, co pozwala na określenie odpowiednio miejsca przedwczesnej terminacji transkrypcji oraz struktury drugorzędowej potencjalnego ryboprzełącznika. Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że zaproponowane podejście w istocie pozwala na identyfikację zdarzeń przedwczesnej terminacji transkrypcji zachodzących podczas życia bakterii, co zostało wykazane na przykładzie znanych sekwencji regulatorowych działających w oparciu o ten mechanizm. Udało się także określić strukturę drugorzędową w warunkach *in vivo* niektórych cząsteczek RNA, zgodną z tą zaproponowaną w literaturze. Dzięki temu udało się wyłonić jedną sekwencję kandydata na ryboprzełącznik – lider genu *yfmG*, która została dodatkowo przetestowana eksperymentalnie. Ponadto w trakcie przygotowywania biblioteki określona została krzywa wzrostu *B. subtilis*, hodowanej w warunkach optymalnych oraz przy braku metioniny w pożywce, co pozwoliło na określenie czasu generacji wynoszącego odpowiednio T_g 1,9 i 2,2 h. Określono także czas hodowli bakterii, w którym globalny poziom indukcji ryboprzełączników był największy i wynosił 2 h od momentu eliminacji metioniny. Analiza odpowiedzi transkrypcyjnej genów/operonów pod kontrolą ryboprzełącznika SAM na brak metioniny ukazała jej złożony charakter, co posłużyło za pretekst do dalszych analiz.

Celem przetestowania wytypowanego w trakcie nowo opracowanego sekwencjonowania Term-SHAPE-seq kandydata, zostały opracowane i zoptymalizowane trzy procedury eksperymentalne. Aby sprawdzić czy metody te są adekwatne do tego celu zostały one przetestowane na znanym, acz niescharakteryzowanym w pełni ryboprzełączniku SAM kontrolującym ekspresję genu *metE* w *B. subtilis*. Pierwszą z nich był eksperyment terminacji transkrypcji z wykorzystaniem bakteryjnej polimerazy RNA pochodzącej z *E. coli*. Dzięki niemu udało się wykazać, że w układzie izolowanym, jaki zapewniają warunki *in vitro*, dodanie ligandu powoduje przedwczesną terminację transkrypcji. Istotny poziom terminacji transkrypcji można zaobserwować już przy 10 nM stężeniu SAM, osiągając maksymalny poziom (ok. 65% wszystkich transkryptów) przy stężeniu 1000 nM. Kolejnym opracowanym eksperymentem była technika SHAPE z wykorzystaniem odczynnika NAI (tego samego, którego użyto podczas

przygotowywana biblioteki). Pozwoliła ona na określenie po raz pierwszy struktury drugorzędowej tego ryboprzełącznika oraz prześledzenie zmian strukturalnych, jakie zachodzą pod wpływem ligandu. Ryboprzełącznik SAM *metE* wykazuje strukturę o kształcie trójlistnej koniczyny (trzy struktury spinek z dwuniciowym trzonem odchodzącym od wspólnej pętli centralnej), charakterystyczną dla innych przedstawicieli tej klasy. Unikatową cechą natomiast jest rozbudowana druga spinka, tworząca dodatkową strukturę o kształcie koniczyny. Ostatnią opracowaną metodą było wyznaczanie stałej dysocjacji K_d z wykorzystaniem filtracji membranowej. Efektem tego eksperymentu było wykreślenie krzywej wiązania ryboprzełącznik:ligand oraz wyznaczenie K_d o wartości 700 nM. W kolejnym etapie zastosowałem opracowane metody w celu zweryfikowania sekwencji liderowej *yfmG* wytypowanej podczas sekwencjonowania. Terminacja transkrypcji *in vitro* z wykorzystaniem polimerazy RNA *E. coli* wykazała obecność pełnej długości transkryptu jak i jego skróconej formy, prawdopodobnie będącej efektem przedwczesnej terminacji transkrypcji. Jednak stosunek ilościowy obu form nie zmienił się pod wpływem mieszaniny ligandów, stąd brak pewności, co do natury tej regulatorowej sekwencji. Wykorzystanie techniki SHAPE z użyciem odczynnika NAI pozwoliło na określenie struktury drugorzędowej regionu liderowego *yfmG*. Obecność mieszaniny ligandów nie zmieniła struktury drugorzędowej, co potwierdziło poprzednią obserwację, że żaden ze tych związków chemicznych nie stanowi ligandu dla tego potencjalnego ryboprzełącznika. Na tym etapie nie jest możliwe jednoznaczne ustalenie czy lider genu *yfmG* jest w istocie ryboprzełącznikiem. Jednak nawet w razie negatywnej weryfikacji tej hipotezy, lider *yfmG* najprawdopodobniej zawiera inny, jak dotąd nieznan element regulatorowy kontrolujący terminację transkrypcji, co już stanowi wartościowe odkrycie.

Dane uzyskane techniką RT-qPCR podczas wyznaczania współczynnika indukcji dla biblioteki cDNA zostały poddane bardziej wnikliwej analizie, z uwzględnieniem fizjologicznej roli, jaką pełnią poszczególne geny. Bo choć ryboprzełączniki SAM występujące w genomie *B. subtilis*, należą do tej samej, ewolucyjnie zakonserwowanej klasy SAM-I, to każdy gen/operon jest kontrolowany w indywidualny sposób, co tyczy się momentu najsilniejszej odpowiedzi na brak metioniny jak i siły tej odpowiedzi. Okazało się, że współczynnik indukcji ryboprzełącznika, w zależności od metabolicznej roli genu, może wzrastać bardzo szybko (*samT*, *metIC*), później, ale za to bardzo intensywnie (*metE*), bądź prawie w ogóle nie reagować na zmiany stężenia metioniny w środowisku (*mtnKA*, operon *cysH*, *metK*, *yxjG*).

Dysponując już sprawdzonymi metodami identyfikacji i weryfikacji ryboprzełączników postanowiłem opracować nową metodę analizy ich aktywności transkrypcyjnej. Zastosowanie hydrolitycznego cięcia transkryptów z udziałem RNazy H oraz nacelowanych Oligomerów DNA pozwoliła na wyeliminowanie wpływu odległości analizowanego fragmentu od końca 3' na oznaczanie stężeń, co ma istotne znaczenie zwłaszcza przy analizie krótkich transkryptów powstałych w wyniku działania ryboprzełączników. Natomiast do samego oznaczania stężeń transkryptów zastosowano technikę ddPCR, która umożliwia ich określenie w jednostkach absolutnych. Eksperymenty wykazały, że zaprojektowane Oligomery DNA skutecznie wiążą docelową cząsteczkę mRNA i indukują cięcie RNazą H. Reakcję tę udało się zoptymalizować zarówno dla cząsteczek stworzonych w reakcji transkrypcji *in vitro* jak i tych naturalnych, wyizolowanych z komórki. Cięcie to ponadto charakteryzowało się niemal pełną wydajnością oraz specyficznością. Analiza ilościowa z użyciem ddPCR pozwoliła na określenie wydajności cięcia na poziomie ~95%. Tak opracowana metoda została wykorzystana do określenia poprawionego współczynnika indukcji i porównania go z uzyskanym bez zastosowania hydrolitycznego cięcia (kontrola). Okazał się on wyższy średnio o 23% niż w przypadku kontroli, przy czym im wyższy współczynnik indukcji tym większa różnica między nimi, sięgająca nawet 60%. Ostatecznie, uzyskane rezultaty skonfrontowano z tymi uzyskanymi techniką RT-qPCR. Wyniki te, choć różnią się w szczegółach, pozostają zgodne w najistotniejszych kwestiach takich jak najwyższa wartość współczynnika indukcji (*metE*, *metIC*) oraz moment, kiedy ona następuje (2 h) czy też w ogóle brak indukcji (*mtnKA*).

Generalnie, opracowane i zoptymalizowane przeze mnie metody pozwalają na pokonanie dotychczasowych ograniczeń, z jakimi muszą się borykać wszyscy badacze ryboprzełączników transkrypcyjnych. Jednak jest to istotna kwestia także dla tych, którzy badają zjawisko terminacji transkrypcji w najróżniejszych jej aspektach. Mam nadzieję wykorzystać atuty tych metod w dalszych badaniach nad ryboprzełącznikami, tym razem w bardzo istotnej z klinicznego punktu widzenia bakterii, jaką jest *Staphylococcus aureus* oporny na metycylinę (MRSA). Pozwoli to głębsze zrozumienie mechanizmów regulatorowych sterujących życiem tej bakterii jak i chorobami przez nią wywoływanymi, co przyczyni się do postępu medycyny.

6 *Materiały i Metody*

6.1 Aparatura

- Zestaw do elektroforezy płytowej – S2 – Life Technologies
- Zestaw do elektroforezy pionowej – Vertical electrophoresis unit – Sigma-Aldrich
- Zestaw do elektroforezy poziomej – Mini-Sub Cell GT Cell – Biorad
- Zestaw do elektroforezy poziomej – Wide Mini-Sub Cell GT Cell – Biorad
- Zasilacz – PowerPac HC 300W – Biorad
- Zasilacz – E833 – Consort
- Zasilacz – EV233 – Consort
- Kuchenka mikrofalowa – Amica
- Zestaw do wizualizacji żeli – GelDoc-It Imaging System – UVP
- Zestaw do wizualizacji żeli – G:Box Chemi XR5 - Syngene
- Waga analityczna – AS 220.R2 – RADWAG
- Waga analityczna – RADWAG PS 1000.R1 – RADWAG
- Mieszadło magnetyczne – heat-stir UC152 – Stuart
- Wirówka – Centrifuge 5810 R – Eppendorf
- Wirówka – Centrifuge 5424 R – Eppendorf
- Wirówka – MFuge C1012 – Benchmak Scientific
- Wytrząsarka o ruchu drgającym – Vortex PV-1 – Grant-bio Instruments
- Wytrząsarka o ruchu drgającym – MS 3 Vortexer for Agilent 2100 Bioanalyzer- IKA
- Licznik scyntylacyjny – Microplate Counter 2450 – Perkin Elmer
- Skaner radioaktywności – FLA-5100 – Fuji Film
- Suszarka do żeli – Gel Dryer 583 – Bio-Rad
- Cieplarka do hodowli bakterii – Mini Incubator – Labnet
- Wytrząsarka do hodowli bakterii – Excella E24 Incubator Shaker – New Brunswick Scientific
- Komora laminarna Steril-Bio BAN Compact – Angelantoni Lifescience
- Komora laminarna – Bio Ban 48 – Steril
- Autoklaw stołowy – Classic 2100 – LaboBaza
- Inkubator do hodowli komórkowych – Memmert

- Analizator kapilarny Bioanalyzer 2100 – Agilent
- Spektrofotometr UV/VIS – NanoDrop One – Thermo Fisher Scientific
- Pompa próżniowa – KNF Neuberger type N035.3 AN.19
- Miernik pH – pH 1100 L phenomenal – VWR
- Termomikser – Thermo Mixer-Heat/Cool – Novazym Polska
- Aparat filtracyjny – Merck
- Termocykler – Tprofessional Basic Gradient – Biometra
- Termocykler – T-professional – Biometra
- Termocykler – T100 Thermal Cycler – Biorad
- Czytnik kropeł – QX200 Droplet Reader – Bio-Rad
- Generator kropeł – QX200 Droplet Generator – Bio-Rad
- Zgrzewarka do płytek 96-dołkowych – PX1 PCR Plate Seale – Bio-Rad
- Termocykler do RT-qPCR – Agilent Mx3000P – Agilent

6.2 Materiały

- Uszczelki – DG8 Gaskets for QX200/QX100 Droplet Generator – Bio-Rad
- Kartridże – DG8 Cartridges for QX200/QX10 Droplet Generator – Bio-Rad
- Olej do czytnika – ddPCR Droplet Reader Oil – Bio-Rad Laboratories
- Olej do generowania kropeł – QX200 Droplet Generation Oil for EvaGreen – Bio-Rad
- Płytki 96-dołkowe – ddPCR 96-Well Plates – Bio-Rad
- Folia do płytek – PCR Plate Heat Seal, foil, pierceable – Bio-Rad
- Wieczka do probówek – Optical Cap 8x – Agilent Technologies
- Próbowki – Tube Strip 8x – Agilent Technologies
- Stacja ze strzykawką – Chip Priming Station – Agilent Technologies
- Membrana Amersham Hybond-N+ firmy – GE Healthcare Life Sciences
- Ekrany do radioaktywności – GE Healthcare Life Sciences

6.3 Odczynniki

6.3.1 Enzymy

- RNaza H – Ribonuclease H [5 U/ μ l] – Thermo Fisher Scientific
- DNaza – TURBO DNase [2 U/ μ l] – Thermo Fisher Scientific
- Odczynnik do PCR – DreamTaq PCR Master Mix (2X) – Thermo Fisher Scientific
- Polimeraza RNA – *E. coli* RNA Polymerase, Holoenzyme [1 U/ μ l] – New England Biolabs
- Inhibitor RNaz – RiboLock RNase Inhibitor [40 U/ μ l] – A&A Biotechnology
- Kinaza polinukleotydowa – T4 Polynucleotide Kinase [10 U/ μ l] – Thermo Fisher Scientific
- Lizozym – 15000 U/mg – Merck
- RNaza A - RNase A, DNase and protease-free (10 mg/mL) – Thermo Fisher Scientific
- T4 RNA Ligaza – T4 RNA Ligase 2, truncated K227Q – New England Biolabs
- Cyrkularna ligaza – CircLigase ssDNA Ligase – Illumina
- Odczynnik do ddPCR – QX200 ddPCR™ EvaGreen Supermix – Bio-Rad

6.3.2 Zestawy

- Transkrypcja *in vitro* T7 – MEGAscript T7 Transcription Kit – Thermo Fisher Scientific
- Odwrotna transkrypcja – SuperScript IV Reverse Transcriptase – Thermo Fisher Scientific
- Odwrotna transkrypcja – SuperScript II Reverse Transcriptase – Thermo Fisher Scientific
- Oczyszczanie DNA – GeneJET PCR Purification Kit – Thermo Fisher Scientific
- Izolacji i oczyszczania RNA – GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit – EURx
- Analiza ilości i jakości DNA – Agilent High Sensitivity DNA Kit – Agilent Technologies
- Usuwanie rRNA – Ribo-Zero rRNA Removal Kits (Gram-Positive Bacteria) – Illumina

6.3.3 Bufory i roztwory

- Bufor elektroforetyczny 1x TBE: 100 mM Tris, 100 mM kwas borowy, 1 mM EDTA, pH 8,3
- Roztwór do izolacji genomowego DNA: 50 mM glukoza, 2,5 mM Tris-HCl pH 8,0, 10mM EDTA pH 8,0
- Roztwory obciążające do RNA lub DNA 6x stężone: 10 mM Tris-HCl pH 7,6, 60% glicerol, 0,02% (w/v) błękit bromofenolowy, 0,02% (w/v) ksylencjanol, 60 mM EDTA, 7 M mocznik
- Bufor SHAPE: 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 100 μM spermidyna
- Bufor do ekstrakcji z żelu: 300 mM NaOAc, 1 mM EDTA

6.3.4 Inne odczynniki

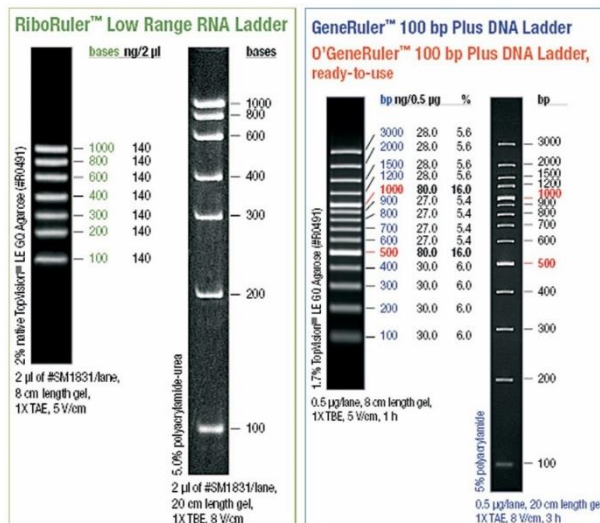
- Woda – Nuclease-Free Water (not DEPC-Treated) – Thermo Fisher Scientific
- Koprecypitant – GlycoBlue Coprecipitant (15 mg/mL) – Thermo Fisher Scientific
- Barwnik fluorescencyjny – 1x SYBR Safe DNA Gel Stain – Thermo Fisher Scientific
- Zestaw rybonukleotydów – NTP Set, 100 mM – Thermo Fisher Scientific
- Zestaw deoksyrybonukleotydów – dNTP Set, 100 mM – Thermo Fisher Scientific
- Zestaw dideoksyrybonukleotydów – ddNTP Set, 5 mM – Sigma-Aldrich
- Alkohol etylowy 96% – Chempur
- β-merkaptioetanol – Chempur
- Izopropanol – POCH
- Fenol, pH 4,5 – Bioshop
- Fenol, pH 6-7 – Bioshop
- Chloroform – Chempur
- DMSO – Sigma-Aldrich
- Akrylamid:bisakrylamid 29:1, gotowa mieszanka – Bioshop
- Agaroza – Bioshop
- Agar – Bioshop
- Ksylencjanol – Bioshop
- Bromofenol – Bioshop
- Pepton – Bioshop
- Wyciąg mięsny – Bioshop
- Ekstrakt drożdżowy – Bioshop
- Hydrolizat kazeiny – Bioshop

- Dimetylosulfotlenek– Sigma-Aldrich
- Kwas borowy – Bioshop
- TRIS – Bioshop
- Mocznik – Bioshop
- EDTA, 0,5 M, pH 8,0 – Bioshop
- Glukoza – Bioshop
- Wodorofosforan dipotasu – Poch
- Diwodorofosforan potasu – Poch
- Siarczan magnezu VI – Bioshop
- Cytrynian żelaza – Bioshop
- Chlorek cynku– Bioshop
- Chlorek magnezu – Bioshop
- Chlorek żelaza – Bioshop
- Cytrynian sodu – Bioshop
- Chlorek miedzi – Bioshop
- Chlorek kobaltu – Bioshop
- Molibdenian sodu – Bioshop
- Chlorek wapnia – POCH
- Chlorek manganu – Bioshop
- Chlorek potasu – Bioshop
- Chlorek manganu – Bioshop
- Cytrynian żelazowo-amonowy – Sigma-Aldrich
- Octan sodu – Bioshop
- Kwas octowy – Chempur
- Dodecylosiarczan sodu – Bioshop
- Nadsiarczan amonu - Sigma-Aldrich
- Wodorotlenek sodu – Chempur
- N,N,N',N'-Tetrametyloetylenodiamina – Bioshop
- L-Glutamina – Bioshop
- L-Tryptofan – Sigma-Aldrich
- L-Glicyna – Sigma-Aldrich
- L-Lizyna - Sigma-Aldrich
- S-adenozylometionina – Sigma-Aldrich

- [metyl-³H]SAM – Hartmann Analytic
- [γ -³²P]ATP – Hartmann Analytic
- Płyn scyntylicyjny – Perkin Elmer
- Kwas metylonikotynowy – Sigma-Aldrich
- 1,1'-karbonyloimidazol – Sigma-Aldrich

6.3.5 Standardy do oznaczania wielkości kwasów nukleinowych

Do określania wielkości kwasów nukleinowych wykorzystano marker wielkości RNA RiboRuler Low Range RNA Ladder, ready-to-use firmy Thermo Fisher Scientific oraz GeneRuler GeneRuler 100 bp DNA Ladder, ready-to-use (Rysunek 63).



Rysunek 63. Markery wielkości RNA – RiboRuler Low Range RNA Ladder, ready-to-use Thermo Fisher Scientific oraz DNA – GeneRuler 100 bp DNA Ladder, ready-to-use. Ze strony producenta.

6.4 Hodowla bakterii *Bacillus subtilis*

Bakterie

Jako organizm modelowy posłużyły bakterie należące do szczepu *Bacillus subtilis subspecies subtilis strain 168*, który jest auktotrofem względem tryptofanu. Pełna genomowa sekwencja została pobrana z bazy GeneBank, numer dostępu AL009126.3:

Genom	CG%	Białka	Geny	rRNA	tRNA	Inne RNA	Pseudogeny	Operony	Gen/operon
4,22 Mb	43,5	4237	4,536	30	86	95	88	300	3

Pożywki

Bulion odżywczy (1 l)

- 4 g – pepton
- 0,4 g – wyciąg mięsny
- 5,6 g – hydrolizat kazeiny
- 1,7 g – ekstrakt drożdżowy
- 3,5 g – chlorek sodu

Pożywka sporulacyjna stała – medium SP (ang. *sporulation medium*) (1 l)

- 8 ml – bulion odżywczy
- 1 mM – siarczan magnezu
- 13,4 mM – chlorek potasu
- 20 g/l – agar

Wysterylizować, po czym dodać bezpośrednio przed wylaniem:

- 0,5 mM – chlorek wapnia
- 10 μ M – chlorek manganu
- 13,4 μ M – cytrynian żelazowo-amonowy

Pożywka zdefiniowana do hodowli bakterii *B. subtilis* (1 I)

- 8 mM – wodorofosforan dipotasu
- 4,4 mM – diwodorofosforan potasu
- 27 mM – glukoza
- 0,3 mM – cytrynian sodu
- 15 mM – L-glutamina
- 0,244 mM – L-tryptofan
- 33,9 μ M – cytrynian żelaza
- 2 mM – siarczan magnezu
- 0,61 mM – chlorek magnezu
- 49,5 μ M – chlorek wapnia
- 49,9 μ M – chlorek żelaza
- 5,05 μ M – chlorek manganu
- 12,4 μ M – chlorek cynku
- 2,52 μ M – chlorek miedzi
- 2,5 μ M – chlorek kobaltu
- 2,28 μ M – molibdenian sodu

6.5 Startery i Oligomery DNA

Wszystkie startery zostały zaprojektowane przy użyciu programu Primer-BLAST, dostępnego na stronie NCBI. Temperatura topnienia wszystkich starterów była zbliżona i wynosiła ~60°C. Startery do reakcji PCR charakteryzowały się długością od 19 nt do 26 nt, większość o długość 20-21 nt. Oligomery DNA użyte podczas eksperymentów zostały zsyntetyzowane w firmie Sigma-Aldrich lub w firmie Genomed.

Tabela 9. Startery do reakcji RT-qPCR

<i>Gen</i>	Starter	Sekwencja 5'-3'
<i>samT</i>	samT qPCR F	CAGCCATGACCAAGGTGCTA
	samT qPCR R1	AGACTTTGTCAGTGATTTTGTCTCTTC
	samT qPCR R2	ATAATGTTGGCTCCCGCTTCA
<i>metIC</i>	metIC qPCR F	TCAGCAACCGGCTTGTTTTG
	metIC qPCR R1	GAAGGGGTTTAACGCTTCTTCTT
	metIC qPCR R2	TAGCGATCGCGTCCTCAAC
<i>metE</i>	metE qPCR F	TTGGCCTTTTGACCCCAACA
	metE qPCR R1	ATGGAATTAGCACCGTGCCTT
	metE qPCR R2	GCACAACATCAATCTGCTGGTC
<i>mtnKA</i>	mtnKA qPCR F	GAGAGTTGGGCGAGGGATT
	mtnKA qPCR R1	CACCGTGCCTTAAGAGACCA
	mtnKA qPCR R2	TTTGCATACGGAACCGCCT
<i>mtnWXBD</i>	mtnWXBD qPCR F	CAAGAGCAGGCAGAGGGAC
	mtnWXBD qPCR R1	AGGTTTCGTTTCTCGTCCGAA
	mtnWXBD qPCR R2	GCAGCAGTTCCTCTCTCTC
<i>cysH operon</i>	cysH qPCR F	TATACAAGAGCGGCTGAGGGA
	cysH qPCR R1	TCCGGCGGAAAGAAAGACAG
	cysH qPCR R2	CTCAATTCCGAAACTGCAGGC
<i>metK</i>	metK qPCR F	CCCTATGAAGCCCAGCAACC
	metK qPCR R1	TGGTCTTTGTCCTTTCACTCT
	metK qPCR R2	GAACCAAACCTGTTGTACAGATG
<i>metNPQ</i>	metNPQ qPCR F	TGGAGGGAAGTGCCCTATGA
	metNPQ qPCR R1	GCACACTTGAGCAGAAAGGC
	metNPQ qPCR R2	TCTCAAGGCCGTTTACAGCAG
<i>yxjH</i>	yxjH qPCR F	AAGAGAGGTGGAGGGACTGG
	yxjH qPCR R1	AACGATCAAATCTCCGCCTCA
	yxjH qPCR R2	GTTCCGCTGTATCTCACCA
<i>yxjG</i>	yxjG qPCR F	AAGAGAGGTGGAGGGACTGG
	yxjG qPCR R1	AGGAAGAGCTTGCGTGACAA
	yxjG qPCR R2	AAGCTGCTCAGCGGTCATT

Tabela 10. Startery do reakcji ddPCR.

Gen	Starter	Sekwencja 5'-3'
<i>gyrA</i>	gyrA ddPCR F1	ATGAGTGAACAAAACACACCAC
	gyrA ddPCR R1	GCTTGTCACCTGTCATGCCT
	gyrA ddPCR F2	GCATGACAAGTGACAAGCCT
	gyrA ddPCR R2	TCTGTATAACGCATGGCCGC
	gyrA ddPCR F3	CCGAGAACAACGGCCAATA
	gyrA ddPCR R3	GCAACATGCTCTTCTTCTGCC
<i>samT</i>	samT ddPCR F1	ACACGAAAATTTTCATATCCGTTCT
	samT ddPCR R1	TGTCTCTTCTTATCTTCCAAGCTGT
	samT ddPCR F2	AAGCTCGAACAGCTTGGAGA
	samT ddPCR R2	TAGGAGTAGAGGAGCGTCCC
	samT ddPCR F3	GCCCATGCCGGTGAAGATAA
	samT ddPCR R3	ATGATGTGAGCTCAGCGGTT
<i>metIC</i>	metIC ddPCR F1	CGATATTTCTTATCGTGAGAGGTGG
	metIC ddPCR R1	CGTTCTTCTTATCTTCCAAGCA
	metIC ddPCR F2	TCAGCAACCGGCTTGTTTTG
	metIC ddPCR R2	CTTCATCGCTACGGTCCCA
	metIC ddPCR F3	GGATATTCCTGAAGAGATCCGCA
	metIC ddPCR R3	GCTCCCTCTTTGACCTGACA
<i>metE</i>	metE ddPCR F1	CTCTTATCGAGAGTTGGGCGAG
	metE ddPCR R1	ACGTAAAACACTGCCTCTCTCA
	metE ddPCR F2	AGGGATTGGCCTTTTGACCC
	metE ddPCR R2	CATCCCGGTTACAGTCCGAT
	metE ddPCR R2*	AAACACTCTCTTTCACCCGC
	metE ddPCR F3	AATCGGACTGAACCGGGAAT
	metE ddPCR R3	TCAACTGGATCCCGAAACGG
<i>mtnKA</i>	mtnKA ddPCR F1	TTATCGAGAGTTGGGCGAGG
	mtnKA ddPCR R1	ACATCTATGTCCGCTCTCTT
	mtnKA ddPCR F2	TTCCATTGTGAAATGGGGCG
	mtnKA ddPCR R2	CCACAGCGGAGCTTTCATTT
	mtnKA ddPCR F3	AGAAGCAATCGGATTTGCGG
	mtnKA ddPCR R3	GTTTTGAATTCCGAACGTTTTTCG
<i>mtnWXBD</i>	mtnWXBD ddPCR F2	CAGCTAGCGGCTGAGAGATAA
	mtnWXBD ddPCR R2	AGTCCAGGAGCCTACTGTCA
operon <i>cysH</i>	cysH ddPCR F2	TGTAAGGTGCTACTTCCAGCA
	cysH ddPCR R2	TGTAATCGTTGGTTCTTCCCA
<i>yoaDBC</i>	yoaDBC ddPCR F2	AGGTTTATACCGGCGTCTGC
	yoaDBC ddPCR R2	TCCCTCCGATATGCCCTACC
<i>metK</i>	metK ddPCR F2	AGCGATAAGAGTGAAAGGCACA
	metK ddPCR R2	TGCCCCCTCCGTAACAGATTC
<i>metNPQ</i>	metNPQ ddPCR F2	CACGAAGCGTTCAGCTTTGA

	metNPQ ddPCR R2	CGAGACGTTTTGGACAGCAT
<i>yxjH</i>	yxjH ddPCR F2	CTTGCAGATGAGGCGGAGAT
	yxjH ddPCR R2	AAGGTTGAGATTGTCACGCAAG
<i>yxjG</i>	yxjG ddPCR F2	AGTGATTTTTGTCTGCGGGTG
	yxjG ddPCR R2	CGTTCCGTTCCGGTAAAGGA

Tabela 11. Startery do transkrypcji *in vitro*. Niebieski kolor –sekwencja promotora, podkreślony i pogrubiony nukleotyd – pierwszy transkrybowany nukleotyd .

Gen	Starter	Sekwencja 5'-3'
<i>samT</i>	samT T7 F	TAATACGACTCACTATAGGGAG <u>A</u> ACACGAAAATTCATATCCGTTCT
<i>metIC</i>	metIC T7 F	TAATACGACTCACTATAGGGAG <u>A</u> CGATATTTCTTATCGTGAGAGGTGG
<i>metE</i>	metE T7 F	TAATACGACTCACTATAGGGAG <u>A</u> CTCTTATCGAGAGTTGGGCGAG
<i>metE</i>	metE E.coli F	TCGCAATGATTGACACGATTCCGCTTGACGCTGCGTAAGGTTTTTGTAATTTT ACAGGC <u>A</u> CTCTTATCGAGAGTTGGGCG
<i>mtnK</i>	mtnKA T7 F	TAATACGACTCACTATAGGGAG <u>A</u> TTATCGAGAGTTGGGCGAGG
<i>mtnWXBD</i>	mtnWXBD T7 F	TAATACGACTCACTATAGGGAG <u>A</u> TCTATATTTTCTTATCAAGAGCAGGCA
<i>yfmG</i>	yfmG T7 F	TAATACGACTCACTATAGGGAG <u>A</u> GACTATTCTATCAATATTCAGGGAACC
<i>yfmG</i>	yfmG E.coli F	TCGCAATGATTGACACGATTCCGCTTGACGCTGCGTAAGGTTTTTGTAATTTT ACAGGC <u>A</u> GTTTATTTAAGTTCTCTGAC
<i>yfgmG</i>	YfmG R1	TGTTAGCCCGTTCTTTATACT
<i>yfgmG</i>	yfmG R2	TCGTAATTTGACTCTATTAATGCAA

Tabela 12. Oligomery DNA do reakcji cięcia RNazą H

Gen	Starter	Sekwencja 5'-3'
<i>gyrA</i>	gyrA Oligomer DNA 15 nt	GCTGAATCACCGTGC
	gyrA Oligomer DNA 20 nt	ATACCGCTGAATCACCGTGC
	gyrA Oligomer DNA 25 nt	TTCATATACCGCTGAATCACCGTGC
<i>samT</i>	samT Oligomer DNA	GCCTCCTTTATTCACATCAGCAAG
<i>metIC</i>	metIC Oligomer DNA	TTATTTTGAAAAGGGAAGGT
<i>metE</i>	metE Oligomer DNA	GGCTGCTAAGAGGTTTTCTCAC
<i>mtnKA</i>	mtnKA Oligomer DNA	TTATGTAATTAATTAATATGTGGCCG
<i>mtnWXBD</i>	mtnWXBD Oligomer DNA	GAGCTCCTTTCATTTTCATCCATATC
<i>operon cysH</i>	cysH Oligomer DNA	CGCGGCTGCTGATATACAGATAG
<i>yoaDBC</i>	yoaDBC Oligomer DNA	GCAAAACATCCTTTTCATCGTATTTTTC
<i>metK</i>	metK Oligomer DNA	GAACCTCGCTCCCTCTTATACAATGTAC
<i>metNPQ</i>	metNPQ Oligomer DNA	GAACCTCGCTCCCTCTTATACAATGTAC
<i>yxjH</i>	yxjH Oligomer DNA	CGCTCTTTTCTGAAATATTAAGC
<i>yxjG</i>	yxjG Oligomer DNA	GTCCATTCTTCTTCCATTCAAATAT

Tabela 13. Startery i oligomery do sekwencjonowania Term-SHAPE-seq

Nazwa	Sekwencja 5'-3'
3' Linker	5'rApp/CTGTAGGCACCATCAAT/3'ddC
Starter RT	5'Ap/GATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGTAGATCTCGGTGGTTCGC/iSp18/TTCGAACG TGTGCTCTTCCGATCTATTGATGGTGCCTACAG
F seq	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC
R1 seq	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGCTGCGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCG
R2 seq	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATATCGTAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCG
R3 seq	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTGACGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCG
R4 seq	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCTACGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCG

6.6 Protokoły

6.6.1 Izolacja genomowego DNA (gDNA)

Do izolacji gDNA pobrano 2 ml hodowli bakterii *B. subtilis* o OD₆₀₀ od 0,8 do 1 do próbek Eppendorfa. Bakterie zwirowano w temperaturze pokojowej przez 5 min z prędkością 5 000 rcf, po czym zdekantowano supernatant. Bezpośrednio przed izolacją do zimnego roztworu do izolacji DNA dodano lizozym w stężeniu końcowym 2 mg/ml oraz RNazę A 100 mg/ml, po czym do osadu bakterii dodano 500 µl tak przygotowanego roztworu. Zawieszane bakterie inkubowano 10 min na lodzie. Następnie dodano 50 µl 10% SDS i inkubowano w temperaturze 37°C przez 5-10 min, aż zawiesina była klarowna. Do każdej próbki dodano 550 µl fenolu (pH 6,0) (proporcja 1:1), po czym wymieszano przez obracanie. Następnie każdą próbkę zwirowano w temperaturze 4°C z prędkością 12 000 rcf przez 15 min, po czym przeniesiono fazę wodną (górną) do nowej próbki. Do roztworu dodano 550 µl chloroformu, próbki ponownie zwirowano, a oczyszczoną fazę wodną przeniesiono do nowej próbki. DNA strącano przez dodanie 0,1 objętości 3M NaOAc, 2,5 objętości EtOH oraz 1 µl GlycoBlue Coprecipitant [15 mg/ml]. Po dodaniu powyższych odczynników DNA umieszczano na 15 min w temperaturze -80°C, następnie próbki zwirowano przez 5 min w temperaturze w 4°C z maksymalną prędkością. Po wirowaniu usunięto supernatant osad osuszono w temperaturze pokojowej przez 15 min i zawieszono w 50 µl sterylnej wody.

6.6.2 Izolacja całkowitego RNA

Do izolacji całkowitego RNA wykorzystano zestaw GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit firmy EURx. Procedurę przeprowadzono zgodnie z protokołem załączonym przez producenta. Do izolacji RNA użyto osadu bakterii uzyskanego po zwirowaniu 2 ml hodowli o $OD_{600}=0,8-1$ w temperaturze pokojowej, przez 5 min. z prędkością 5 000 rcf. Oczyszczony RNA zawieszono w 40 μ l buforu do elucji dołączonym przez producenta.

6.6.3 Ekstrakcja kwasów nukleinowych z żelu poliakryloamidowego

Po elektroforezie, żel poliakryloamidowy umieszczono na transiluminatorze, po czym przy użyciu skalpela wycięto prążki odpowiadające pożądanym fragmentom RNA. Wycięte pasma żelu rozdrobniono, umieszczono w probówce Eppendrofa i inkubowano w buforze do ekstrakcji z żelu przez noc w temperaturze pokojowej z wytrząsaniem 1000 rpm.

6.6.4 Strącanie kwasów nukleinowych

RNA strącano dodając do próbki: 0,1 objętości 3M octanu sodu, 1 μ l GlycoBlue Coprecipitant oraz 2,5 objętości 96% etanolu. Próbkę strącano przez 30 min w temperaturze -80°C lub przez noc w temperaturze -20°C . Po strącaniu próbki wirowano w temperaturze 4°C przy 14 000 rcf przez 30 min. Supernatant usunięto, a osad suszono i rozpuszczano w sterylnej wodzie wolnej od RNaz.

6.6.5 Elektroforeza kwasów nukleinowych

Żel poliakryloamidowy (PAA) w warunkach denaturujących

Metodę tę wykorzystywano do analizy całkowitego RNA, transkryptów oraz fragmentów cDNA otrzymanych w reakcji odwrotnej transkrypcji z radioaktywnie znakowanymi starterami. Do rozdzielania cząsteczek RNA stosowano żel poliakryloamidowy o usieciowaniu 29:1 (stosunek wagowy akryloamidu do bisakryloamidu) z 7 M mocznikiem oraz bufor elektroforetyczny 1x TBE. Procentowość żelu wynosiła 8 - 12% w zależności od długości rozdzielanych fragmentów. Próbkę RNA obciążano buforem obciążającym 6x stężonym, a jako marker wielkości użyto RiboRuler Low Range RNA Ladder, ready-to-use. Elektroforezę poprzedzała preelektroforeza prowadzona przy natężeniu prądu 30 mA, przez 20 min. Podczas właściwego rozdzielania elektroforetycznego stosowano natężenie prądu 30 mA.

Wielkość szyb do elektroforezy to 16,5 x 14,5 cm lub 16,5 x 22 cm, w zależności od pożądanego rozdziału RNA. Do wizualizacji żelu wykorzystywano systemy do dokumentacji żeli G:Box, bądź (w przypadku cDNA) wykorzystywano: autoradiografię po znakowaniu radioizotopowym, ekrany odwzorowujące po rozdziale elektroforetycznym produktów reakcji odwrotnej transkrypcji z radioaktywnie znakowanym starterem DNA.

Żel agarozowy

Elektroforezę DNA i RNA na żelu agarozowym stosowano do analizy fragmentów otrzymanych metodą PCR, gDNA lub całkowitego rRNA. W zależności od długości rozdzielanych fragmentów stosowano 0,5 - 2% (w/v) żel agarozowy z barwnikiem fluorescencyjnym 1x SYBR Safe DNA Gel Stain, a jako bufor elektroforetyczny stosowano 1x TBE. Próbki DNA obciążano roztworem do obciążania próbek DNA, w stosunku 5:1. Elektroforezę prowadzono w temperaturze pokojowej przy stałym napięciu 80–120 V w zależności od długości żelu. Do wizualizacji żelu wykorzystano DNA systemy do dokumentacji żeli G:Box firmy SynGene.

6.6.6 Analiza jakościowa i ilościowa kwasów nukleinowych

Pomiar z wykorzystaniem spektrofotometru NanoDrop One

Stężenie kwasów nukleinowych w próbce oznaczono na podstawie pomiarów absorbancji przy długości fali 260 nm z wykorzystaniem spektrofotometru NanoDrop One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer. Czystość kwasów nukleinowych określono na podstawie stosunku absorbancji mierzonej przy długości fali 260 nm do absorbancji mierzonej przy długości fali 280 nm (A_{260}/A_{280}) i stosunku absorbancji mierzonej przy długości fali 260 nm do absorbancji mierzonej przy długości fali 230 nm (A_{260}/A_{230}). Za odpowiednio czyste były uważane próbki, których A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230} wynosiły ok. 2,0-2,2.

Pomiar z wykorzystaniem analizatora kapilarnego Agilent 2100 Bioanalyzer

Podczas przygotowywania biblioteki do sekwencjonowania analizę jakościową i ilościową kwasów nukleinowych wykonano przy użyciu analizatora kapilarnego Agilent 2100 Bioanalyzer z wykorzystaniem zestawu Agilent High Sensitivity DNA Kit. Procedurę przeprowadzono zgodnie z protokołem załączonym przez producenta.

6.6.7 Transkrypcja *in vitro* w wykorzystaniem polimerazy T7

Pierwszym etapem było przygotowanie matrycy DNA, zawierającej sekwencję promotora dla polimerazy T7, cały ryboprzełącznik oraz fragment początkowej sekwencji ORF. W tym celu przeprowadzono reakcję PCR z odpowiednio zaprojektowanymi starterami. Starter *forward* zawierał dodatkową sekwencję promotora dla wirusowej polimerazy T7 (Tabela 11). Komponenty reakcji PCR: 10,5 μl H₂O, 1 μl mieszaniny starterów *forward* i *reverse* (Tabela 10, Tabela 11) [4 μM każdy], 1 μl gDNA [100 ng/ μl], 12,5 μl DreamTaq PCR Master Mix (2x). Program reakcji: 95°C – 3 min, (95°C – 30 sek, 60°C – 30 sek, 72°C – 1 min) x 25, 72°C – 5 min, 10°C – ∞ . Produkty zostały następnie oczyszczone przy użyciu zestawu GeneJET PCR Purification Kit. Oczyszczona matryca DNA została zawieszona w 50 μl buforu do elucji. Tak przygotowany DNA został wykorzystany jako matryca do transkrypcji *in vitro* z wykorzystaniem zestawu MEGAscript T7 Transcription Kit. Do reakcji użyto 8 μl matrycy DNA z sekwencją promotora dla polimerazy T7. Reakcję przeprowadzono zgodnie z protokołem załączonym przez producenta. Inkubację prowadzono w temperaturze 37°C przez 4 h. Po reakcji transkrypcji *in vitro* z każdej próbki usunięto pozostałości DNA dodając 1 μl DNazy I [2 U/ μl]. Tak uzyskane transkrypty oczyszczono przy użyciu zestawu GeneMATRIX Universal RNA Purification zgodnie z protokołem załączonym przez producenta. Oczyszczony RNA zawieszono w 40 μl buforu do elucji.

6.6.8 Transkrypcja *in vitro* z wykorzystaniem polimerazy *E. coli*

Pierwszym etapem było przygotowanie matrycy DNA, zawierającej sekwencję promotora *E. coli*, cały ryboprzełącznik oraz fragment początkowej sekwencji ORF. W tym celu przeprowadzono reakcję PCR z odpowiednio zaprojektowanymi starterami. Starter *forward* został zawierał dodatkową sekwencję promotora dla bakteryjnej polimerazy *E. coli* z genu *gapAPI* (Tabela 11). Komponenty reakcji PCR (25 μl): 10,5 μl H₂O, 1 μl mieszanina starterów *forward* i *reverse* [4 μM każdy] (Tabela 10, Tabela 11), 1 μl gDNA [1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$], 12,5 μl DreamTaq PCR Master Mix (2x). Program reakcji: 95°C – 3 min, (95°C – 30 sek, 60°C – 30 sek, 72°C – 1 min) x 40, 72°C – 5 min, 10°C – ∞ . Produkty zostały następnie oczyszczone przy użyciu zestawu GeneJET PCR Purification Kit. Oczyszczona matryca DNA została zawieszona w 50 μl buforu do elucji dołączonym przez producenta. Tak przygotowany DNA został wykorzystany, jako matryca do transkrypcji *in vitro* z wykorzystaniem polimerazy RNA z bakterii *E. coli* – *E. coli* RNA Polymerase, Holoenzym. Komponenty reakcji transkrypcji *in vitro*: 5 μl matrycy DNA, 2 μl bufor reakcyjny (5x), 1 μl SAM

[różne stężenia], 0,5 μ l NTPs [10 mM], 0,5 μ l Inhibitor RNaz [40 U/ μ l], 1 μ l polimeraza RNA *E. coli*. Próbkę inkubowano w 37°C przez noc. Po reakcji transkrypcji *in vitro* z każdej próbki usunięto pozostałości DNA dodając 1 μ l DNazy I [2 U/ μ l] oraz inkubując w 37°C przez 15 min. Na końcu dodano 1 μ l EDTA [50 mM].

6.6.9 Odwrotna transkrypcja (RT)

Odwrotna transkrypcja była przeprowadzona z wykorzystaniem zestawu do transkrypcji SuperScript IV Reverse Transcriptase. Reakcję prowadzono zgodnie z protokołem załączonym przez producenta. Do przepisania cząsteczki RNA na cDNA wykorzystano heksamery o losowej sekwencji. W zależności od eksperymentu użyto od 100 ng do 1 μ g RNA jako matrycy. Mieszaninę inkubowano 23°C przez 10 min, 55°C przez 10 min oraz 80°C przez 10 min.

6.6.10 Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR)

Reakcja PCR była przeprowadzona z użyciem odczynnika DreamTaq PCR Master Mix (2x). W pierwszym etapie przygotowano mieszaninę reakcyjną: 10,5 μ l H₂O, startery *forward* i *reverse* (Tabela 9, Tabela 10) [4 μ M każdy], gDNA lub cDNA [100 ng lub 1 μ g], 12,5 μ l DreamTaq PCR Master Mix (2x). Program reakcji: 95°C – 3 min, (95°C – 30 sek, 60°C – 30 sek, 72°C – 1 min) x 35, 72°C – 5 min, 10°C – ∞ . Produkty zostały następnie oczyszczone przy użyciu zestawu GeneJET PCR Purification Kit. Oczyszczony produkt amplifikacji został zawieszony w 50 μ l buforu do elucji.

6.6.11 Emulsyjny PCR w czasie rzeczywistym (ddPCR)

Do przeprowadzenia reakcji emulsyjnego PCR w czasie rzeczywistym użyto systemu QX200 Droplet Digital PCR (ddPCR) System oraz wszystkich akcesoriów i odczynników firmy Bio-Rad Laboratories. Pierwszym etapem było przygotowanie mieszaniny reakcyjnej: 4 μ l H₂O, 1 μ l mieszaniny starterów *forward* i *reverse* (Tabela 10) [4 μ M każdy], 5 μ l cDNA [20 ng/ μ l], 10 μ l 2x QX200 ddPCR EvaGreen Supermix. Tak przygotowaną mieszaninę przeniesiono na kartridż, wraz z olejem do generowania kropeł, po czym przykryto uszczelką. Gotowy kartridż umieszczono w generatorze kropeł. Następnie przygotowaną emulsję kropeł zawierających składniki mieszaniny PCR przeniesiono na płytkę 96-dołkową, którą w dalszej kolejności zasklepiono specjalną folią aluminiową. Płytkę została umieszczona w termocyklerze a reakcja PCR została przeprowadzona

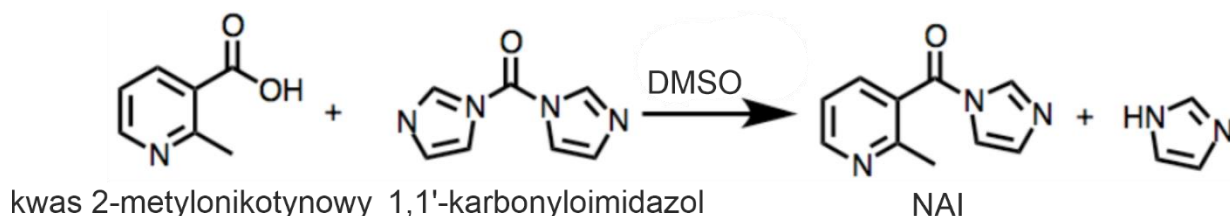
zgodnie z programem: 95°C – 5 min, (95°C – 30 sek, 55°C – 30 sek, 72°C – 45 sek) x 40, 72°C – 2 min, 4°C – 5 min, 90°C – 5 min, 10°C – ∞. Dla każdego etapu dodatkowo został ustawiony skok temperatury 2°C/sek. Po reakcji PCR płytkę przeniesiono do czytnika kropeł w celu pomiaru stężenia RNA w badanych próbkach.

6.6.12 Ilościowy PCR w czasie rzeczywistym – RT-qPCR

Do przeprowadzenia PCR w czasie rzeczywistym użyto systemu Agilent Mx3000P. Pierwszym etapem było przygotowanie mieszaniny reakcyjnej: 14 µl H₂O, 1 µl mieszanina starterów *forward* i *reverse* (Tabela 9) [4 µM każdy], 1 µl cDNA [100 ng/µl], 4 µl HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix (5x). Reakcja RT-qPCR została przeprowadzona zgodnie z programem: 95°C-12 min., (95°C-15 sek., 60°C-20 sek., 72°C-20 sek) x 40. Pomiar fluorescencji był dokonywany w fazie 72°C każdego cyklu. Swoistość amplifikowanych celów oceniano za pomocą analizy krzywej topnienia od 55°C do 95°C w przyrostach co 0,5°C, mierząc fluorescencję w każdej temperaturze po ostatnim cyklu. Wszystkie pary starterów badano pod względem wydajności amplifikacji z seryjnym rozcieńczeniem 4x log₁₀ losowej próbki cDNA w trzech powtórzeniach. Wszystkie badane startery spełniają kryteria wydajności 90–110 % i R²>0,985. Wyniki wyrażono, jako względną ilość zgodnie z równaniem $RQ=2^{\Delta\Delta C_t \pm SE}$. Poziom transkryptów FL (Startery 2) został znormalizowany względem sumy transkryptów FL i TT (Startery 1) (Tabela 9).

6.6.13 Synteza imidazolidu kwasu 2-metylonikotynowego (NAI)

137 mg [1 mmol] kwas metylonikotyniowego rozpuszczono w 0,5 ml bezwodnego DMSO. Następnie w 0,5 ml DMSO rozpuszczono 162 mg [1 mmol] 1,1'-karbonyloimidazolu. Do roztworu kwasu metylonikotynowego kropelkami dodawano 1,1'-karbonyloimidazol przez 5 min. Tak otrzymany roztwór mieszano przez 15 min w otwartym naczyniu, w temperaturze pokojowej przez godzinę. W ten sposób uzyskano NAI [1 M], używany do późniejszych analiz. Reakcja przebiegła zgodnie z równaniem:



6.6.14 Mapowanie struktury drugorzędowej metodą SHAPE

Znakowanie starterów na końcu 5' izotopem ^{32}P

Mieszanina reakcyjna zawierała: 100 pmoli startera *reverse* ddPCR R1 lub R2 (Tabela 10), 2 μl [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$]ATP o aktywności 4 000 – 5 000 Ci/mmol, 1 μl T4 PNK (10x) oraz 1 μl T4 kinazy polinukleotydowej [10 U/ μl]. Przed reakcją przeprowadzono denaturację RNA w temperaturze 100°C przez 2 min, a następnie próbkę schładzano w lodzie przez 10 min. Po dodaniu enzymu reakcję prowadzono przez 30 min w temperaturze 37°C. Znakowane startery oczyszczano w 8% żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących, wizualizowano przez autoradiografię, wycinano z żelu, eluowano, strącano, wirowano i suszono. Poziom radioaktywności starterów zmierzono za pomocą licznika scyntylicyjnego.

Mapowanie struktury drugorzędowej RNA z wykorzystaniem techniki SHAPE

Przed reakcją modyfikacji, próbki zawierające 30 pmoli mRNA zawieszono w buforze SHAPE inkubowano wraz z ligandem lub mieszaniną ligandów przez 24 h w temperaturze pokojowej. Następnie do każdej mieszaniny reakcyjnej dodawany był NAI, rozpuszczony w bezwodnym DMSO, o stężeniu końcowym 100 mM. Równocześnie przygotowane były także dwie reakcje kontrolne zawierające tę samą ilość mRNA oraz bufor o takim samym składzie, lecz nie zawierające ligandu. Do pierwszej reakcji kontrolnej dodany był NAI o stężeniu końcowym 100 mM, natomiast do drugiej dodany został bezwodny DMSO (NR, ang. *no reaction*). Reakcje modyfikacji prowadzono przez 15 min w temperaturze 37°C, po czym zatrzymano dodając DTT o stężeniu końcowym 10 mM. Następnie mRNA strącano, wirowano, suszono i rozpuszczano w H₂O. W kolejnym etapie, wykonywano reakcje odwrotnej transkrypcji z wykorzystaniem odwrotnej transkryptazy SuperScript IV i radioaktywnie znakowanego startera DNA. Produkty reakcji analizowano w 8% żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących. Żel przeniesiono następnie na bibułę Whatman 3 mm firmy Sigma-Aldrich, po czym wysuszono na suszarce do żeli poliakryloamidowych i umieszczono w kasecie wraz z ekranem do naświetlania. Ekran sczytano w skanerze radioaktywności

6.6.15 Wyznaczanie K_d metodą filtracji membranowej

W celu określenia stałej dysocjacji K_d w pierwszej kolejności wyznaczono krzywą wiązania ryboprzełącznik:ligand wykorzystując technikę filtracji membranowej. Fragmenty RNA

obejmujące sekwencję ryboprzełącznika został zsyntetyzowany z wykorzystaniem transkrypcji *in vitro* T7 przeprowadzonej zgodnie z procedurą opisaną w Rozdziale 6.6.7. Tak przygotowane ryboprzełączniki inkubowano wraz z innymi komponentami w 65 °C przez 5 min, a następnie 45°C przez 30 min. Skład mieszaniny reakcyjnej: 2,5 nM RNA (ryboprzełącznik), 2µl bufor do transkrypcji *in vitro* T7 (5x), od 28 do 1800 nM [metyl-³HSAM, dopełnić H₂O do 10 µl. Następnie próbkę naniesiono na środek membrany Amersham Hybond-N+ po czym przepłukano dwukrotnie 200 µl buforu transkrypcji *in vitro* T7 (1x). Zestaw do sączenia składał się z pompy, kolbki stożkowej oraz sączka. Każdą próbkę umieszczono w probówce Eppendorfa, zalano 1 ml płynu scyntylicyjnego firmy Perki Elmer, po czym zmierzono radioaktywność w liczniku scyntylicyjnym.

6.6.16 Endonukleolityczne cięcie RNazą H

Reakcję tę przeprowadzono z wykorzystaniem RNazy H zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. Dla transkryptów *in vitro* użyte stężenie RNA wynosiło 100 ng/µl oraz od 100 pM do 10 µM. Dla transkryptów *ex vivo* stężenie całkowitego RNA wynosiło 10 ng/µl oraz od 10 nM do 5 µM. Próby inkubowano w 37°C przez 20 min, a następnie w 65°C 10 min.

6.6.17 Przygotowanie biblioteki do sekwencjonowania Term-SHAPE-Seq

Modyfikacja RNA przy użyciu NAI *in vivo*

Do przygotowania RNA użyto po 2 ml z hodowli bakteryjnej Met + i Met – o OD₆₀₀ 0,8 w 2 ml probówce Eppendorfa. Hodowlę zwirowano przez 5 minut przy 6 000 rcf, usunięto supernatant, a pozostały osad zawieszono w 900 µl PBS. Następnie do jednej z probówek dodano 100 µl 1 M NAI rozpuszczonego w DMSO lub tylko 100 µl DMSO, jako kontrola. Tak przygotowane hodowle bakterii inkubowano w temperaturze pokojowej 15 min. W taki sposób uzyskano cztery hodowle, stanowiące wyjściowe RNA dla czterech bibliotek: (i) Met+ NAI+, (ii) Met+ NAI–, (iii) Met– NAI+, (iv) Met– NAI–.

Izolacja RNA

Wszystkie przygotowane hodowle poddano następnie izolacji RNA przy użyciu zestawu GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit zgodnie z protokołem załączonym przez producenta. Oczyszczone RNA zawieszono w 40 µl buforu do elucji.

Eliminacja rRNA

Do przygotowania biblioteki wykorzystano po 5 µg całkowitego RNA z każdej z czterech przygotowanych hodowli. Następnie do usunięcia rRNA z puli całkowitego RNA wykorzystano zestaw Ribo-Zero rRNA Removal Kits. Procedurę przeprowadzono zgodnie z protokołem załączonym przez producenta.

Ligacja 3' linkera

Kolejnym etapem przygotowania bibliotek było przyłączenie 3' Linkera (Tabela 13), zawierającego sekwencję komplementarną do startera używanego do odwrotnej transkrypcji. Ligacja 3' linkera była możliwa dzięki temu, iż pierwszy nukleotyd z końca 5' jest rybonukleotydem, w związku z tym cząsteczki RNA oraz 3' Linker mogą stanowić substrat reakcji ligacji przeprowadzonej przez ligazę RNA. Do każdej próbki dodano: 0,5 µl 3' Linkera, 2 µl T4 RNA ligazy 2, 1 µl 0,1 M DTT, 6 µl 50% PEG 6000 oraz 2 µl buforu do ligazy (10x). Inkubację prowadzono w temperaturze 25°C przez 1,5 h. W celu usunięcia niezligowanych cząsteczek 3' Linkera przeprowadzono selekcję fragmentów. W tym celu otrzymane próbki RNA zostały poddane rozdzielaniu elektroforetycznemu na 12% żelu PAA, zgodnie z procedurą opisaną w Rozdziale 6.6.5, a następnie ekstrakcji zgodnie z procedurą opisaną w Rozdziale 6.6.3.

Odwrotna transkrypcja

Do odwrotnej transkrypcji wykorzystano SuperScript II Reverse Transcriptase. Reakcję przeprowadzono zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. Do reakcji użyto 300 ng RNA. Starter RT (Tabela 13) zawiera sekwencję komplementarną do 3' Linkera, co pozwoliło na wprowadzenie za jego pośrednictwem sekwencji dla starterów *forward* F seq (Tabela 13) oraz sekwencji dla starterów *reverse*: (R1 seq, R2 seq, R3 seq lub R4 seq (Tabela 13) niezbędnych do późniejszej reakcji PCR. W celu usunięcia niewykorzystanych starterów przeprowadzono selekcję fragmentów zgodnie z procedurą opisaną w Rozdziale 6.6.5. Elucję DNA przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną w Rozdziale 6.6.3

Cyrkularyzacja

Otrzymane fragmenty cDNA poddano reakcji cyrkularyzacji z wykorzystaniem cyrkularnej ligazy CircLigase ssDNA Ligase. Zastosowanie takiego niestandardowego podejścia podyktowane było faktem, iż w przypadku linearnych cząsteczek cDNA, w zależności od ostatnich nukleotydów z końca 5' jak i 3', adaptory niezbędne do sekwencjonowania są przyłączane z różną wydajnością [204]. Ma to bezpośrednie przełożenie na wydajność amplifikacji poszczególnych fragmentów DNA, co z kolei skutkuje zafałszowaną ilością odczytów. Procedurę przeprowadzono zgodnie z protokołem załączonym przez producenta. Do reakcji użyto 9 μ l cDNA. W celu przetestowania wydajności reakcji cyrkularyzacji, produkty sprawdzono na 12% żelu PAA zgodnie z procedurą opisaną w Rozdziale 6.6.5.

Dołączanie adapterów

Ostatnim etapem przygotowania biblioteki było przyłączenie sekwencji adapterów do sekwencjonowania z wykorzystaniem sekwenatora genomowego MiSeq Illumina. W tym celu cyrkularne produkty reakcji poddano reakcji PCR używając specjalnie zaprojektowanych starterów: F seq, R1 seq, R2 seq, R3 seq lub R4 seq (Tabela 13), komplementarnych do sekwencji Startera RT, zawierających sekwencje adaptera oraz *tag* indywidualny dla każdej biblioteki (starter *reverse*) (). Komponenty reakcji: 18 μ l H₂O, 25 μ l Fusion buffer (2x), 1 μ l startera *forward* [100 μ M], 1 μ l startera *reverse* [100 μ M], 5 μ l cyrkularnego cDNA. Program reakcji: 98°C – 30 sek, (98°C – 10 sek, 65°C – 30 sek, 72°C – 30 sek) x 10, 72°C – 5 min, 10°C – ∞ . Po reakcji wszystkie biblioteki oczyszczono przy użyciu zestawu MinElute PCR Purification Kit, zgodnie z protokołem załączonym przez producenta.

7 Wykaz Skrótów

[metyl-³H]SAM – SAM znakowany radioizotopem wodoru ³H w grupie metylowej

[γ -³²P]ATP – ATP znakowane radioizotopem fosforu ³²P w pozycji γ

2'-dG – G'-deoksyguanozyna

3'UTR – region nieulegający translacji 3' (ang. *3' untranslated region*)

5'UTR – region nieulegający translacji 5' (ang. *5' untranslated region*)

70S – rybosom bakteryjny

A – adenozylna

A_{260/230} – Stosunek absorbancji mierzonej przy długości fali 260 nm i 230 nm

A_{260/280} – Stosunek absorbancji mierzonej przy długości fali 260 nm i 280 nm

aaRS – aminoacylo-tRNA syntetaza

AdoCbl – adenozylokobalamina

ADP – adenozyndifosforan

AdV – adenowirus

Alac. – allolaktoza

AMP – adenozylnomonofosforan

APS – adenozylno-5-fosfosiarczan

APS – nadsiarczan amonu

AqCbl – akwakobalamina

bp – para zasad (ang. *base pair*)

C – cytydyna

CAF – Amonu żelaza cytrynian

cAMP – cykliczny adenozylnomonofosforan

c-AMP-GMP – 5'-3'-cykliczny AMP-GMP

c-di-AMP – 5'-3'-cykliczny di-AMP

c-di-GMP – 5'-3'-cykliczny di-GMP

cDNA – komplementarny DNA (ang. *complementary DNA*)

CDP – cytydynodifosforan

cpm – zliczenia na minutę (ang. *counts per minutes*)

C_t – cykl progowy (ang. *threshold cycle*)

Da – dalton

ddPCR – emulsyjny PCR w czasie rzeczywistym (ang. *droplet digital PCR*)

DHK-MTPen-1-P – 1,2-dihydroksy-3-keto-5-metylotiopenten-1-fosforan
Dis. – dyskryminator (ang. *discriminator*)
DK-MTP-1-P – 2,3-diketo-5-metylotiopentan-1-fosforan
DMSO – dimetylosulfotlenek
DNA – kwas deoksyrybonukleinowy
dNTP – trifosforan dowolnego deoksyrybonukleotydu
dSAM – dekarboksylowana S-adenozylometionina
DTT – ditiotreitrol
EC₅₀ – połowa maksymalnego efektywnego stężenia (ang. *half-maximal effective concentration*)
Ext. – wydłużony blok -10 (ang. *extended -10*)
F – starter forward
FL – transkrypty pełnej długości (ang. *full-length*)
FMN – mononukleotyd Flawinowy
G – glicyna
G – guanozyna
GDP – guanozynodifosforan
GFP – białko zielonej fluorescencji (ang. *green fluorescence protein*)
GlcN-6-P – glukozamino-6-fosforan GlcN-6-P
Gln – glutamina
Gly – glicyna
GMP - guanozynomonofosforan
GTP – guanozynotrifosforan
HK-MTPentyl-1-P – 2-hydroksy-3-keto-5-metylotiopentyl-1-fosforan
IC₅₀ – połowa maksymalnego stężenia hamującego (ang. *half-maximal inhibitory concentration*)
IF-3 – czynnik inicjacyjny-3 (ang. *initiation factor-3*)
IR – współczynnik indukcji (ang. *induction ratio*)
K – lizyna
k/μl – ilość kopii RNA na 1 μl
k/μl – ilość kopii RNA na 1 μl roztworu
K_d – krzywa dysocjacji
KMTB – 2-keto-4-metylotiomaślan
L – ligand
Lys – lizyna
M – marker wielkości
MeV – wirus odry
MIC – minimalne stężenie hamujące (ang. *minimum inhibitory concentration*)

Min – minuta
miRNA – mikroRNA
Moco – kofaktor molibdenowy
mRNA – RNA matrycowy (ang. *messenger RNA*)
MRSA – gronkowiec złocisty oporny na metycylinę (ang. *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*)
MTA – 5-metyloadenozyna
MTHF – metylotetrahydrofolian
MTR – 5-metylotioryboza
MTR-1-P – metylotiorybozo-1-fosforan
MTRu-1-P – 5-metylotiorybulozo-1-fosforan
N₆ – heksamery o losowej sekwencji (ang. *random hexamers*)
NA – nie dotyczy (ang. *not applicable*)
NAI – imidazolid kwasu 2-metylonikotynowego
ND – nie oznaczono (ang. *not determined*)
Neg. – krople negatywne
NGS – sekwencjonowanie nowej generacji (ang. *new generation sequencing*)
NP – niespecyficzny produkt reakcji
NR – próbka bez reakcji (ang. *no reaction*)
nt – nukleotyd
OD₆₀₀ – gęstość optyczna mierzona przy długości fali 600 nm (ang. *optical density*)
OH – grupa hydroksylowa
Oper. – operator
ORF – otwarta ramka odczytu (ang. *open reading frame*)
P – pseudowęzeł
PAA – żel poliakryloamidowy
PAPS – 3-fosfoadenozyno-5-fosfosiarozan
PBS – domenę wiążącą RNA (ang. *primary binding site*)
PCR – łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*)
PEG – glikol polietylenowy
Poz. – krople pozytywne
ppGpp – tetrafosforan guanozyny
PRE – pH-metr (ang. *pH-responsive RNA element*)
PreQ₁ – prekweozyna₁
Prom. – promotor
PRPP – pirofosforan fosforybozylu

- Q – glutamina
- R – starter reverse
- R^2 – współczynnika determinacji R^2
- RBS – miejsce wiązania rybosomu (ang. *ribosome-binding site*)
- rcf – względna siła odśrodkowa (ang. *relative centrifugal force*)
- Reg. – gen regulatorowy
- Rep. – repressor
- RNA – kwas rybonukleinowy
- RNAP – polimeraza RNA
- RNAT – termometr RNA (ang. *RNA thermometers*)
- Rof – rozeoflawina
- rpm – obroty na minutę (ang. *rotations per minute*)
- RQ – względny poziom ekspresji (ang. *relative quantity*)
- rRNA – rybosomalny RNA (ang. *ribosomal RNA*)
- RT – odwrotna transkrypcja (ang. *reverse transcription*)
- RT-qPCR – ilościowy PCR w czasie rzeczywistym poprzedzony reakcją odwrotnej transkrypcji (ang. *reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*)
- S – startery
- SAH – S-adenozylhomocysteina
- SAM – S-adenozylometionina
- SD – odchylenie standardowe (ang. *standard deviation*)
- SD – sekwencja Shine-Dalgarno
- SDS – dodecylotiosiarzan sodu
- SELEX – systematyczna ewolucja ligandów w technologii wzbogacenia wykładniczego (ang. *systematic evolution of ligands by exponential enrichment*)
- SHAPE – acylacja grup 2'-hydroksylowych analizowana za pomocą reakcji odwrotnej transkrypcji (ang. *selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension*)
- snoRNA – małe jąderkowe RNA (ang. *small nucleolar RNA*)
- snRNA – małe niekodujące RNA, ang. *small noncoding RNA*)
- SRH – S-rybulozohomocysteina
- sRNA – małe bakteryjne RNA (ang. *small RNA*)
- T – skrócone transkrypty (ang. *truncated*)
- T – tymidyna
- TBE – Triss, kwas borowy, EDTA.
- TEC – transkrypcyjny kompleks elongacyjny (ang. *transcription elongation complex*)
- TEMED – N,N,N',N'-Tetrametyloetylenodiamina

Term. – terminator

T_g – czas generacji

THF – tetrahydrofolian

TPP – pirofosforan tiaminy

Trans. – transkrypt

tRNA – transferowy RNA (ang. *transfer RNA*)

Trp – tryptofan

TTS – miejsce terminacji transkrypcji (ang. *transcription termination site*)

Tuco – kofaktor wolframowy

U – urydyna

UPG-III – uroporfirynogen-III

VEGF – czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego A (ang. *vascular endothelial growth factor*)

w/v – stosunek wagowo-objętościowy

Wco – kofaktor wolframowy

Y – pirymidyna

ZTP – Rybonukleotyd aminoimidazolokarboksyamidu

8 Spis Rysunków, Tabel, Równań

Rysunki

Rysunek 1. Budowa promotora bakteryjnego wraz z podjednostkami bakteryjnej polimerazy RNA. Ext. – wydłużony blok -10, Dis. – dyskryminator.	13
Rysunek 2. Budowa i mechanizm działania operonów bakteryjnych na przykładzie operonu <i>lacZYA</i> . A) Działanie operonu z nieaktywnym represorem. B) Działanie operonu z aktywnym operonem. RNAP – Polimeraza RNA. Prom. – promotor, Reg. – gen regulatorowy, Oper. – operator, Term. – terminator. Rep. – represor, Alac – allolaktoza (korepresor).	16
Rysunek 3. Mechanizmy działania bakteryjnych sRNA. A) Terminacja transkrypcji. B) Blokowanie translacji. C) Aktywacja translacji. D) Indukcja cięcia przez RNazę E. E) Inhibicja/modulacja funkcji białka. RNAP – polimeraza RNA, SD – sekwencja Shine-Dalgarno.	20
Rysunek 4. Modele terminacji transkrypcji u bakterii. A) Prawidłowo przebiegająca transkrypcja. B) Model ścinający/hipertranslokacji wewnątrz terminacji transkrypcji. C) Model allosteryczny wewnątrz terminacji transkrypcji. C) Model ścinający/hipertranslokacji Rho-zależnej terminacji transkrypcji. D) Model allosteryczny Rho-zależnej terminacji transkrypcji. Granatowe T – Kolejne nukleotydy, różowe ramki – miejsce aktywne.	22
Rysunek 5. Sprzężenia zwrotne ujemne z udziałem ryboprzełączników. M – metabolit (ligand).	37
Rysunek 6. Mechanizm działania ryboprzełączników transkrypcyjnych. L – ligand.	38
Rysunek 7. Mechanizm działania ryboprzełączników translacyjnych. L – ligand, 70S – rybosom bakteryjny, SD – sekwencja Shine-Dalgarno.	39
Rysunek 8. Ryboprzełączniki tandemowe. A) Dwa niezależne ryboprzełączniki poprzedzające wspólny ORF. B) Dwie domeny aptamerowe poprzedzające wspólną platformę ekspresyjną. ORF – otwarta ranka odczytu.	42
Rysunek 9 Budowa ryboprzełączników. A) Ryboprzełączniki z pętlą centralną. B) Ryboprzełączniki pseudowęzłowe. L – ligand.	45
Rysunek 10 . Krzywa wzrostu bakterii <i>B. subtilis</i> . „Met–” - hodowla bez metioniny, „Met+” - hodowla z metioniną. T_g – czas generacji.	63
Rysunek 11. Schemat zaprojektowanych starterów do reakcji RT-qPCR. Czerwony X – miejsce terminacji transkrypcji, RNAP – polimeraza RNA, L – ligand, F – starter <i>forward</i> , R – starter <i>reverse</i> , FL – fragmenty pełnej długości, T – fragmenty skrócone.	65

Rysunek 12. Produkty PCR dla genów <i>metE</i> i <i>metIC</i> . M – marker wielkości, R1 – produkty starterów zaprojektowanych do sekwencji ryboprzełącznika, R1 – produkty starterów zaprojektowanych do sekwencji ORF. „-” – hodowla z metioniną „+” – hodowla bez metioniny.....	66
Rysunek 13. Zmiany współczynnika indukcji IR genów/operonów kontrolowanych ryboprzełącznikiem SAM w ośmiu punktach czasowych (0 h, 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 16 h).....	69
Rysunek 14. Średnie wartości współczynnika indukcji IR genów/operonów kontrolowanych ryboprzełącznikiem SAM w ośmiu punktach czasowych (0 h, 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 16 h)	70
Rysunek 15. Przygotowanie biblioteki cDNA oraz sekwencjonowanie wraz z analizą. Czerwone trójkąty – NAI, zielone strzałki – miejsca modyfikacji, fioletowe strzałki – miejsce terminacji transkrypcji, RT – Starter RT.....	71
Rysunek 16. Rodział elektroforetyczny całkowitego RNA z komórki <i>B. subtilis</i> . „Met-” - hodowla bez metioniny, „Met+” - hodowla z metioniną.....	72
Rysunek 17. Analiza czterech bibliotek cDNA z wykorzystaniem analizatora kapilarnego Agilent 2100 Bioanalyzer.	73
Rysunek 18. Struktura drugorzędowa tRNA ^{Thr} wygenerowana na podstawie danych z Term-SHAPE-seq. Kolory nukleotydów – reaktywność zgodnie ze skalą.	75
Rysunek 19. Struktura drugorzędowa 5S rRNA wygenerowana na podstawie danych z Term-SHAPE-seq. Kolory nukleotydów – reaktywność zgodnie ze skalą.	76
Rysunek 20. Struktura drugorzędowa <i>srlX</i> wygenerowana na podstawie danych z Term-SHAPE-seq.	77
Rysunek 21. Struktura drugorzędowa sekwencji liderowej <i>yfmG</i> wygenerowana na podstawie danych z Term-SHAPE-seq. Kolory nukleotydów – reaktywność zgodnie ze skalą.....	78
Rysunek 22. Terminacji transkrypcji <i>in vitro</i> . Pomarańczowy X – miejsce terminacji transkrypcji, RNAP – polimeraza RNA, L – ligand. FL – transkrypty pełnej długości, T – transkrypty skrócone.	83
Rysunek 23. A) Genomowy DNA. B) Matryca PCR <i>metE</i> do transkrypcji <i>in vitro</i> z wykorzystaniem wirusowej polimerazy T7. M – marker wielkości.....	84
Rysunek 24. Terminacja transkrypcji <i>in vitro metE</i> z użyciem wirusowej polimerazy T7. Elektroforeza przedstawiająca produkty terminacji transkrypcji w gradiencie stężeń SAM. M – marker wielkości, FL – transkrypty pełnej długości, T – transkrypty skrócone.	85
Rysunek 25. Matryca PCR <i>metE</i> do transkrypcji <i>in vitro</i> z wykorzystaniem bakteryjnej polimerazy <i>E. coli</i> . M – marker wielkości.....	85
Rysunek 26. Terminacja transkrypcji <i>in vitro metE</i> z wykorzystaniem bakteryjnej polimerazy <i>E. coli</i> . (A) Elektroforeza przedstawiająca produkty terminacji transkrypcji w gradiencie stężeń SAM. M – marker wielkości, FL – transkrypty pełnej długość, T – transkrypty skrócone. (B) Udział procentowy poszczególnych transkryptów w gradiencie stężenia SAM.....	86
Rysunek 27. Mapowanie struktury drugorzędowej metodą SHAPE <i>in vitro</i> z wykorzystaniem odczynnika NAI. Czerwone trójkąty – NAI, [³² P] – radioaktywny izotop fosforu.	87

Rysunek 28. A) Matryca PCR <i>metE</i> do transkrypcji <i>in vitro</i> z wykorzystaniem wirusowej polimerazy T7.	
B) Produkt transkrypcji <i>in vitro</i> z wykorzystaniem wirusowej polimerazy T7. M – marker wielkości, tran. – transkrypt.....	88
Rysunek 29. A) Mapowanie struktury drugorzędowej metodą SHAPE dla ryboprzełącznika SAM-I <i>metE</i> .	
B) Struktura drugorzędowa ryboprzełącznika SAM-I <i>metE</i> wygenerowana na podstawie danych z mapowania metodą SHAPE. P – pseudowęzeł, niebieskie regiony 3, 4 – spadek reaktywności ze wzrostem siężenia SAM, czerwone regiony 1, 2, 5 – spadek reaktywności ze wzrostem siężenia SAM, kolory nukleotydów – reaktywność zgodnie ze skalą.	90
Rysunek 30. Procedura wyznaczania K_d metodą filtracji membranowej. RNAP – polimeraza RNA, L* – radioaktywnie wyznakowany ligand, niebieska kropla – bufor przepływający membranę. „-” i „+” – ładunki elektrostatyczne.....	92
Rysunek 31. Krzywa wiązania ryboprzełącznik:ligand <i>metE</i> . B_{max} – maksymalne wiązanie, K_d – stała dysocjacji.....	93
Rysunek 32. A) Matryca PCR <i>yfmG</i> do transkrypcji <i>in vitro</i> z wykorzystaniem bakteryjnej polimerazy <i>E. coli</i> . B) Terminacja transkrypcji <i>in vitro</i> <i>yfmG</i> z wykorzystaniem bakteryjnej polimerazy <i>E. coli</i> . M – marker wielkości, „-” – kontrola bez ligandów, „+” – próba z ligandami.	95
Rysunek 33. A) Matryca PCR <i>yfmG</i> do transkrypcji <i>in vitro</i> z wykorzystaniem wirusowej polimerazy T7.	
B) Produkt transkrypcji <i>in vitro</i> z wykorzystaniem wirusowej polimerazy T7. M – marker wielkości, trans. – transkrypt.....	95
Rysunek 34. A) Mapowanie struktury drugorzędowej metodą SHAPE dla ryboprzełącznika SAM-I <i>yfmG</i> .	
B) Struktura drugorzędowa ryboprzełącznika SAM-I <i>yfmG</i> wygenerowana na podstawie danych z mapowania metodą SHAPE. Kolory nukleotydów – reaktywność zgodnie ze skalą.	96
Rysunek 35. Dynamika zmian współczynnika indukcji genów/operonów kontrolowanych ryboprzełącznikiem SAM w ośmiu punktach czasowych (0 h, 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 16 h).	100
Rysunek 36. Szlak metabolizmu i biosyntezy metioniny. Kolorami zaznaczono geny/operony kontrolowane przez ryboprzełącznik SAM oraz kandydata <i>yfmG</i> . Brązowa, przerywana strzałka – transport przez błony. APS – adenozylo-5-fosfosiarczan, PAPS – 3-fosfoadenozylo-5-fosfosiarczan, THF – tetrahydrofolian, MTHF – metyloTHF, SAM – S-adenozylometionina, dSAM – dekarboksylowany SAM, SAH – S-adenozylhomocysteina, SRH – S-rybulozohomocysteina, MTA – 5-metyloadenozylna, MTR – 5-metylotioryboza, MTR-1-P – MTR-1-fosforan, MTRu-1-P – 5-metylotiorybulozo-1-fosforan, DK-MTP-1-P – 2,3-diketo-5-metylotiopentyl-1-fosforan, HK-MTPentyl-1-P – 2-hydroksy-3-keto-5-metylotiopentyl-1-fosforan. DHK-MTPentyl-1-P – 1,2-dihydroksy-3-keto-5-metylotiopentyl-1-fosforan, KMTB – 2-keto-4-metylotiomaślan, UPG-III – uroporfirynogen-III.	104
Rysunek 37. Rozkład względnej ilości odczytów wzdłuż transkryptu. Na podstawie Agarwal et al. 2015 [200].	106

Rysunek 38. Zależność ilości odczytów od odległości od końca 3' transkryptu. Przerzywane strzałki – kierunek reakcji odwrotnej transkrypcji, N ₆ – heksamer o losowej sekwencji.	107
Rysunek 39. Analizy aktywności transkrypcyjnej ryboprzełączników z wykorzystaniem RNazy H. F – starter <i>forward</i> , R – starter <i>reverse</i> , FL – fragmenty pełnej długości, T – fragmenty skrócone.	108
Rysunek 40. Matryca PCR <i>metE</i> do transkrypcji <i>in vitro</i> z wykorzystaniem wirusowej polimerazy T7. M – marker wielkości.	109
Rysunek 41. Cięcie RNazą H transkryptu <i>in vitro gyrA</i> z wykorzystaniem Oligomerów DNA o długości 15, 20 i 25 nt. M – marker wielkości, FL – transkrypt pełnej długości, T ₁ i T ₂ – produkty cięcia RNazą H. „-” – kontrola.	110
Rysunek 42. Cięcie RNazą H transkryptu <i>in vitro</i> genu <i>metE</i> z dodatkową reakcją bez Oligomeru DNA. M – marker wielkości, NR – bez reakcji (tylko RNA), - kontrola, + reakcja.	110
Rysunek 43. Cięcie RNazą H transkryptu <i>in vitro metE</i> w rosnącym gradiencie stężenia Oligomerów DNA. M – marker wielkości, NR – bez reakcji (RNA), „-” – kontrola, FL – transkrypt pełnej długości, T ₁ i T ₂ – produkty cięcia RNazą H.	111
Rysunek 44. Produkty PCR <i>gyrA</i> po cięciu RNazą H transkryptów <i>ex vivo</i> w rosnącym gradiencie stężenia Oligomerów DNA od 0,1 do 5 μM. M – marker wielkości.	112
Rysunek 45. Produkty PCR <i>gyrA</i> po cięciu RNazą H transkryptów <i>ex vivo</i> w rosnącym gradiencie stężenia Oligomerów DNA. (A) Od 10 do 500 nM. (B) Od 50 do 250 nM. M – marker wielkości.	113
Rysunek 46. Produkty PCR <i>samT</i> po cięciu RNazą H transkryptów <i>ex vivo</i> , w rosnącym gradiencie stężenia Oligomerów DNA od 50 do 250 nM. M – marker wielkości.	114
Rysunek 47. Produkty PCR <i>metIC</i> po cięciu RNazą H transkryptów <i>ex vivo</i> , w rosnącym gradiencie stężenia Oligomerów DNA od 50 do 250 nM. M – marker wielkości.	114
Rysunek 48. Produkty PCR <i>metE</i> po cięciu RNazą H transkryptów <i>ex vivo</i> , dla dwóch stężeń Oligomeru DNA 50 i 100 nM. M – marker wielkości.	114
Rysunek 49. Produkty PCR <i>mtnKA</i> po cięciu RNazą H transkryptów <i>ex vivo</i> , dla dwóch stężeń Oligomeru DNA 50 i 100nM. M – marker wielkości.	114
Rysunek 50. Produkty PCR: <i>mtnWXBD</i> , operonu <i>cysH</i> , <i>yodDCB</i> , <i>metK</i> , <i>metNPQ</i> , <i>yxjH</i> , <i>yxjG</i> po cięciu RNazą H transkryptów <i>ex vivo</i> w rosnącym gradiencie stężenia Oligomerów DNA od 50 do 250 nM. M – marker wielkości, S2 – Startery 2.	115
Rysunek 51. Produkty ddPCR <i>gyrA</i> po cięciu RNazą H transkryptów <i>ex vivo</i> , w rosnącym gradiencie stężenia Oligomerów DNA od 50 do 250 nM. Poz. – krople pozytywne (zielone), Neg. – krople negatywne (szare).	117
Rysunek 52. Produkty ddPCR <i>samT</i> po cięciu RNazą H transkryptów <i>ex vivo</i> , w rosnącym gradiencie stężenia Oligomerów DNA od 50 do 250 nM. Poz. – krople pozytywne (niebieskie), Neg. – krople negatywne (szare).	117

Rysunek 53. Produkty ddPCR <i>metIC</i> po cięciu RNazą H transkryptów <i>ex vivo</i> , w rosnącym gradiencie stężenia Oligomerów DNA od 50 do 250 nM. Poz. – krople pozytywne (niebieskie), Neg. – krople negatywne (szare).....	117
Rysunek 54. Produkty ddPCR <i>metE</i> po cięciu RNazą H transkryptów <i>ex vivo</i> , w rosnącym gradiencie stężenia Oligomerów DNA od 50 do 250 nM. Poz. – krople pozytywne (niebieskie), Neg. – krople negatywne (szare), NP. – niespecyficzny produkt reakcji.	117
Rysunek 55. Produkty ddPCR <i>mtnKA</i> po cięciu RNazą H transkryptów <i>ex vivo</i> , w rosnącym gradiencie stężenia Oligomerów DNA od 50 do 250 nM. Poz. – krople pozytywne (niebieskie), Neg. – krople negatywne (szare).....	118
Rysunek 56. Aktywność transkrypcyjna <i>gyrA</i> w czterech punktach czasowych (0 h, 1 h, 2 h, 3 h). „Met ⁻ ” – hodowla bez metioniny, „Met ⁺ ” – hodowla z metioniną (kontrola).....	121
Rysunek 57. Aktywność transkrypcyjna <i>samT</i> w czterech punktach czasowych (0 h, 1 h, 2 h, 3 h). „Met ⁻ ” – hodowla bez metioniny, „Met ⁺ ” – hodowla z metioniną (kontrola).....	121
Rysunek 58. Aktywność transkrypcyjna <i>metIC</i> w czterech punktach czasowych (0 h, 1 h, 2 h, 3 h). „Met ⁻ ” – hodowla bez metioniny, „Met ⁺ ” – hodowla z metioniną (kontrola).....	121
Rysunek 59. Aktywność transkrypcyjna <i>metE</i> w czterech punktach czasowych (0 h, 1 h, 2 h, 3 h). „Met ⁻ ” – hodowla bez metioniny, „Met ⁺ ” – hodowla z metioniną (kontrola).....	122
Rysunek 60. Aktywność transkrypcyjna <i>mtnKA</i> w czterech punktach czasowych (0 h, 1 h, 2 h, 3 h). „Met ⁻ ” – hodowla bez metioniny, „Met ⁺ ” – hodowla z metioniną (kontrola).	122
Rysunek 61. Porównanie współczynników indukcji IR* dla poszczególnych genów/operonów: (A) <i>gyrA</i> , (B) <i>samT</i> , (C) <i>metIC</i> , (D) <i>metE</i> , oraz (E) <i>mtnKA</i> ; uzyskanych z wykorzystaniem cięcia RNazą H oraz bez (nazwa genu/operonu*) w czterech punktach czasowych (0 h, 1 h, 2 h, 3 h).	125
Rysunek 62. Porównanie współczynników indukcji IR dla poszczególnych genów/operonów: (A) <i>samT</i> , (B) <i>metIC</i> , (C) <i>metE</i> oraz (D) <i>mtnKA</i> . DD wyniki uzyskane techniką ddPCR (DD). RT wyniki uzyskane techniką RT-qPCR w pięciu punktach czasowych (0 h, 1 h, 2 h, 3 h).	129
Rysunek 63. Markery wielkości RNA – RiboRuler Low Range RNA Ladder, ready-to-use Thermo Fisher Scientific oraz DNA – GeneRuler 100 bp DNA Ladder, ready-to-use. Ze strony producenta.	141

Tabele

Tabela 1. Podjednostki σ i anty- σ występujących u bakterii <i>E. coli</i>	14
Tabela 2. Lista znanych klas ryboprzelączników.....	36
Tabela 3. Wartości C_t poszczególnych rodzajów transkryptów dla poszczególnych genów/operonów w ośmiu punktach czasowych (0 h, 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 16 h). FL – transkrypty pełnej długości, T – skrócone transkrypty, ND – nie oznaczono, SD – odchylenie standardowe, „Met ⁻ ” – hodowla bez metioniny, „Met ⁺ ” – hodowla z metioniną.	67
Tabela 4. Współczynnik indukcji genów/operonów kontrolowanych przez ryboprzelącznik SAM. IR – współczynnik indukcji, SE – błąd standardowy.....	102
Tabela 5. Stężenia transkryptów poszczególnych genów/operonów oraz efektywność cięcia RNazą H w rosnącym gradiencie stężenia Oligomerów DNA od 50 do 250 nM. NA – nie dotyczy.	119
Tabela 6. Porównanie współczynników indukcji IR* poszczególnych genów/operonów w czterech punktach czasowych (0 h, 1 h, 2 h, 3 h) w próbach Oligomer DNA ⁻ i Oligomer DNA ⁺	124
Tabela 7. Stężenia transkryptów poszczególnych genów/operonów w czterech punktach czasowych (0 h, 1 h, 2 h, 3 h). Stężenia wyrażone w kopiach RNA na μ l [k/ μ l].	127
Tabela 8. Porównanie współczynników indukcji IR poszczególnych genów/operonów w pięciu punktach czasowych (0 h, 0,5 h, 1 h, 2 h, 3 h) uzyskanych technikami ddPCR i RT-qPCR.....	128
Tabela 9. Startery do reakcji RT-qPCR	144
Tabela 10. Startery do reakcji ddPCR.....	145
Tabela 11. Startery do transkrypcji <i>in vitro</i> . Niebieski kolor –sekwencja promotora, podkreślony i pogrubiony nukleotyd – pierwszy transkrybowany nukleotyd	146
Tabela 12. Oligomery DNA do reakcji cięcia RNazą H	146
Tabela 13. Startery i oligomery do sekwencjonowania Term-SHAPE-seq	147

Równania

Równanie 1. Współczynnik Indukcji IR.	69
Równanie 2. Współczynnik Indukcji IR*.	123

9 Referencje

1. Rocha DJ, Santos CS, Pacheco LG (2015) Bacterial reference genes for gene expression studies by RT-qPCR: survey and analysis. *Antonie Van Leeuwenhoek* 108: 685-693.
2. Herr AJ, Jensen MB, Dalmay T, Baulcombe DC (2005) RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. *Science* 308: 118-120.
3. Wierzbicki AT, Ream TS, Haag JR, Pikaard CS (2009) RNA polymerase V transcription guides ARGONAUTE4 to chromatin. *Nat Genet* 41: 630-634.
4. Ebright RH (2000) RNA polymerase: structural similarities between bacterial RNA polymerase and eukaryotic RNA polymerase II. *J Mol Biol* 304: 687-698.
5. Gruber TM, Gross CA (2003) Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu Rev Microbiol* 57: 441-466.
6. Kornberg RD (1999) Eukaryotic transcriptional control. *Trends Cell Biol* 9: M46-49.
7. Sims RJ, 3rd, Mandal SS, Reinberg D (2004) Recent highlights of RNA-polymerase-II-mediated transcription. *Curr Opin Cell Biol* 16: 263-271.
8. Jacob F, Monod J (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol* 3: 318-356.
9. Ross W, Gosink KK, Salomon J, Igarashi K, Zou C, et al. (1993) A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the alpha subunit of RNA polymerase. *Science* 262: 1407-1413.
10. Hawley DK, McClure WR (1983) Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 11: 2237-2255.
11. Barne KA, Bown JA, Busby SJ, Minchin SD (1997) Region 2.5 of the *Escherichia coli* RNA polymerase sigma70 subunit is responsible for the recognition of the 'extended-10' motif at promoters. *EMBO J* 16: 4034-4040.
12. Camacho A, Salas M (1999) Effect of mutations in the "extended -10" motif of three *Bacillus subtilis* sigmaA-RNA polymerase-dependent promoters. *J Mol Biol* 286: 683-693.
13. Travers AA (1980) Promoter sequence for stringent control of bacterial ribonucleic acid synthesis. *J Bacteriol* 141: 973-976.
14. Jeong W, Kang C (1994) Start site selection at lacUV5 promoter affected by the sequence context around the initiation sites. *Nucleic Acids Res* 22: 4667-4672.
15. Trevino-Quintanilla LG, Freyre-Gonzalez JA, Martinez-Flores I (2013) Anti-Sigma Factors in *E. coli*: Common Regulatory Mechanisms Controlling Sigma Factors Availability. *Curr Genomics* 14: 378-387.
16. Hiratsu K, Amemura M, Nashimoto H, Shinagawa H, Makino K (1995) The rpoE gene of *Escherichia coli*, which encodes sigma E, is essential for bacterial growth at high temperature. *J Bacteriol* 177: 2918-2922.
17. Hughes KT, Mathee K (1998) The anti-sigma factors. *Annu Rev Microbiol* 52: 231-286.
18. Jacob F, Perrin D, Sanchez C, Monod J (1960) [Operon: a group of genes with the expression coordinated by an operator]. *C R Hebd Seances Acad Sci* 250: 1727-1729.
19. Monod J, Cohen-Bazire G (1953) [The effect of specific inhibition in biosynthesis of tryptophan-desmase by *Aerobacter aerogenes*]. *C R Hebd Seances Acad Sci* 236: 530-532.
20. Zubay G, Schwartz D, Beckwith J (1970) Mechanism of activation of catabolite-sensitive genes: a positive control system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 66: 104-110.
21. Orth P, Schnappinger D, Hillen W, Saenger W, Hinrichs W (2000) Structural basis of gene regulation by the tetracycline inducible Tet repressor-operator system. *Nat Struct Biol* 7: 215-219.
22. Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Muller G, Hillen W, et al. (1995) Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268: 1766-1769.
23. Reitzer LJ, Magasanik B (1986) Transcription of glnA in *E. coli* is stimulated by activator bound to sites far from the promoter. *Cell* 45: 785-792.

24. Dutta T, Srivastava S (2018) Small RNA-mediated regulation in bacteria: A growing palette of diverse mechanisms. *Gene* 656: 60-72.
25. Wagner EGH, Romby P (2015) Small RNAs in bacteria and archaea: who they are, what they do, and how they do it. *Adv Genet* 90: 133-208.
26. Peer A, Margalit H (2011) Accessibility and evolutionary conservation mark bacterial small-rna target-binding regions. *J Bacteriol* 193: 1690-1701.
27. Storz G, Vogel J, Wassarman KM (2011) Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers. *Mol Cell* 43: 880-891.
28. Giangrossi M, Prosseda G, Tran CN, Brandi A, Colonna B, et al. (2010) A novel antisense RNA regulates at transcriptional level the virulence gene *icsA* of *Shigella flexneri*. *Nucleic Acids Res* 38: 3362-3375.
29. Kawamoto H, Koide Y, Morita T, Aiba H (2006) Base-pairing requirement for RNA silencing by a bacterial small RNA and acceleration of duplex formation by Hfq. *Mol Microbiol* 61: 1013-1022.
30. Morfeldt E, Taylor D, von Gabain A, Arvidson S (1995) Activation of alpha-toxin translation in *Staphylococcus aureus* by the trans-encoded antisense RNA, RNAlII. *EMBO J* 14: 4569-4577.
31. Garrey SM, Blech M, Riffell JL, Hankins JS, Stickney LM, et al. (2009) Substrate binding and active site residues in RNases E and G: role of the 5'-sensor. *J Biol Chem* 284: 31843-31850.
32. Frohlich KS, Papenfort K, Berger AA, Vogel J (2012) A conserved RpoS-dependent small RNA controls the synthesis of major porin OmpD. *Nucleic Acids Res* 40: 3623-3640.
33. Bossi L, Schwartz A, Guillemardet B, Boudvillain M, Figueroa-Bossi N (2012) A role for Rho-dependent polarity in gene regulation by a noncoding small RNA. *Genes Dev* 26: 1864-1873.
34. Liu MY, Gui G, Wei B, Preston JF, 3rd, Oakford L, et al. (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.
35. Cavanagh AT, Klocko AD, Liu X, Wassarman KM (2008) Promoter specificity for 6S RNA regulation of transcription is determined by core promoter sequences and competition for region 4.2 of sigma70. *Mol Microbiol* 67: 1242-1256.
36. Wilson KS, von Hippel PH (1995) Transcription termination at intrinsic terminators: the role of the RNA hairpin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 8793-8797.
37. Korzheva N, Mustaev A, Kozlov M, Malhotra A, Nikiforov V, et al. (2000) A structural model of transcription elongation. *Science* 289: 619-625.
38. Gusarov I, Nudler E (1999) The mechanism of intrinsic transcription termination. *Mol Cell* 3: 495-504.
39. Komissarova N, Becker J, Solter S, Kireeva M, Kashlev M (2002) Shortening of RNA:DNA hybrid in the elongation complex of RNA polymerase is a prerequisite for transcription termination. *Mol Cell* 10: 1151-1162.
40. Santangelo TJ, Roberts JW (2004) Forward translocation is the natural pathway of RNA release at an intrinsic terminator. *Mol Cell* 14: 117-126.
41. Epshtein V, Cardinale CJ, Ruckenstein AE, Borukhov S, Nudler E (2007) An allosteric path to transcription termination. *Mol Cell* 28: 991-1001.
42. Wang D, Severinov K, Landick R (1997) Preferential interaction of the his pause RNA hairpin with RNA polymerase beta subunit residues 904-950 correlates with strong transcriptional pausing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 8433-8438.
43. Greenblatt J, McLimont M, Hanly S (1981) Termination of transcription by nusA gene protein of *Escherichia coli*. *Nature* 292: 215-220.
44. Farnham PJ, Greenblatt J, Platt T (1982) Effects of NusA protein on transcription termination in the tryptophan operon of *Escherichia coli*. *Cell* 29: 945-951.
45. Friedman DI, Baron LS (1974) Genetic characterization of a bacterial locus involved in the activity of the N function of phage lambda. *Virology* 58: 141-148.
46. Roberts JW (1969) Termination factor for RNA synthesis. *Nature* 224: 1168-1174.
47. Peters JM, Mooney RA, Kuan PF, Rowland JL, Keles S, et al. (2009) Rho directs widespread termination of intragenic and stable RNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 15406-15411.
48. Dombroski AJ, Platt T (1988) Structure of rho factor: an RNA-binding domain and a separate region with strong similarity to proven ATP-binding domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 2538-2542.

49. Bogden CE, Fass D, Bergman N, Nichols MD, Berger JM (1999) The structural basis for terminator recognition by the Rho transcription termination factor. *Mol Cell* 3: 487-493.
50. McSwiggen JA, Bear DG, von Hippel PH (1988) Interactions of *Escherichia coli* transcription termination factor rho with RNA. I. Binding stoichiometries and free energies. *J Mol Biol* 199: 609-622.
51. Bear DG, Hicks PS, Escudero KW, Andrews CL, McSwiggen JA, et al. (1988) Interactions of *Escherichia coli* transcription termination factor rho with RNA. II. Electron microscopy and nuclease protection experiments. *J Mol Biol* 199: 623-635.
52. Schwartz A, Walmacq C, Rahmouni AR, Boudvillain M (2007) Noncanonical interactions in the management of RNA structural blocks by the transcription termination rho helicase. *Biochemistry* 46: 9366-9379.
53. Peters JM, Vangeloff AD, Landick R (2011) Bacterial transcription terminators: the RNA 3'-end chronicles. *J Mol Biol* 412: 793-813.
54. Epshtein V, Dutta D, Wade J, Nudler E (2010) An allosteric mechanism of Rho-dependent transcription termination. *Nature* 463: 245-249.
55. Park JS, Roberts JW (2006) Role of DNA bubble rewinding in enzymatic transcription termination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 4870-4875.
56. Washburn RS, Gottesman ME (2011) Transcription termination maintains chromosome integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 792-797.
57. Richardson JP (1991) Preventing the synthesis of unused transcripts by Rho factor. *Cell* 64: 1047-1049.
58. Peters JM, Mooney RA, Grass JA, Jessen ED, Tran F, et al. (2012) Rho and NusG suppress pervasive antisense transcription in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 26: 2621-2633.
59. Sevostyanova A, Artsimovitch I (2010) Functional analysis of *Thermus thermophilus* transcription factor NusG. *Nucleic Acids Res* 38: 7432-7445.
60. Mooney RA, Davis SE, Peters JM, Rowland JL, Ansari AZ, et al. (2009) Regulator trafficking on bacterial transcription units in vivo. *Mol Cell* 33: 97-108.
61. Burmann BM, Schweimer K, Luo X, Wahl MC, Stitt BL, et al. (2010) A NusE:NusG complex links transcription and translation. *Science* 328: 501-504.
62. Naville M, Gautheret D (2010) Transcription attenuation in bacteria: theme and variations. *Brief Funct Genomics* 9: 178-189.
63. Yanofsky C (1981) Attenuation in the control of expression of bacterial operons. *Nature* 289: 751-758.
64. Kortmann J, Narberhaus F (2012) Bacterial RNA thermometers: molecular zippers and switches. *Nat Rev Microbiol* 10: 255-265.
65. Klinkert B, Narberhaus F (2009) Microbial thermosensors. *Cell Mol Life Sci* 66: 2661-2676.
66. Rinnenthal J, Klinkert B, Narberhaus F, Schwalbe H (2011) Modulation of the stability of the *Salmonella* fourU-type RNA thermometer. *Nucleic Acids Res* 39: 8258-8270.
67. Waldminghaus T, Gaubig LC, Klinkert B, Narberhaus F (2009) The *Escherichia coli* *ibpA* thermometer is comprised of stable and unstable structural elements. *RNA Biol* 6: 455-463.
68. Chowdhury S, Maris C, Allain FH, Narberhaus F (2006) Molecular basis for temperature sensing by an RNA thermometer. *EMBO J* 25: 2487-2497.
69. Hoe NP, Goguen JD (1993) Temperature sensing in *Yersinia pestis*: translation of the LcrF activator protein is thermally regulated. *J Bacteriol* 175: 7901-7909.
70. Yamanaka K, Mitta M, Inouye M (1999) Mutation analysis of the 5' untranslated region of the cold shock *cspA* mRNA of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 181: 6284-6291.
71. Nechooshtan G, Elgrably-Weiss M, Sheaffer A, Westhof E, Altuvia S (2009) A pH-responsive riboregulator. *Genes Dev* 23: 2650-2662.
72. Kreuzer KD, Henkin TM (2018) The T-Box Riboswitch: tRNA as an Effector to Modulate Gene Regulation. *Microbiol Spectr* 6.
73. Grundy FJ, Henkin TM (1993) tRNA as a positive regulator of transcription antitermination in *B. subtilis*. *Cell* 74: 475-482.
74. Zhang J, Ferre-D'Amare AR (2013) Co-crystal structure of a T-box riboswitch stem I domain in complex with its cognate tRNA. *Nature* 500: 363-366.

75. Sherwood AV, Grundy FJ, Henkin TM (2015) T box riboswitches in Actinobacteria: translational regulation via novel tRNA interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 1113-1118.
76. Nahvi A, Sudarsan N, Ebert MS, Zou X, Brown KL, et al. (2002) Genetic control by a metabolite binding mRNA. *Chem Biol* 9: 1043.
77. Sherwood AV, Henkin TM (2016) Riboswitch-Mediated Gene Regulation: Novel RNA Architectures Dictate Gene Expression Responses. *Annu Rev Microbiol* 70: 361-374.
78. Gralla J, Steitz JA, Crothers DM (1974) Direct physical evidence for secondary structure in an isolated fragment of R17 bacteriophage mRNA. *Nature* 248: 204-208.
79. Lee F, Squires CL, Squires C, Yanofsky C (1976) Termination of transcription in vitro in the *Escherichia coli* tryptophan operon leader region. *J Mol Biol* 103: 383-393.
80. Bronson MJ, Squires C, Yanofsky C (1973) Nucleotide sequences from tryptophan messenger RNA of *Escherichia coli*: the sequence corresponding to the amino-terminal region of the first polypeptide specified by the operon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70: 2335-2339.
81. Kruger K, Grabowski PJ, Zaug AJ, Sands J, Gottschling DE, et al. (1982) Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell* 31: 147-157.
82. Guerrier-Takada C, Gardiner K, Marsh T, Pace N, Altman S (1983) The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* 35: 849-857.
83. Ellington AD, Szostak JW (1990) In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 346: 818-822.
84. Tuerk C, Gold L (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 249: 505-510.
85. Bock LC, Griffin LC, Latham JA, Vermaas EH, Toole JJ (1992) Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature* 355: 564-566.
86. Kadner RJ (1978) Repression of synthesis of the vitamin B12 receptor in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 136: 1050-1057.
87. Webb E, Febres F, Downs DM (1996) Thiamine pyrophosphate (TPP) negatively regulates transcription of some thi genes of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 178: 2533-2538.
88. 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.
89. Kil YV, Mironov VN, Gorishin I, Kreneva RA, Perumov DA (1992) Riboflavin operon of *Bacillus subtilis*: unusual symmetric arrangement of the regulatory region. *Mol Gen Genet* 233: 483-486.
90. Nou X, Kadner RJ (1998) Coupled changes in translation and transcription during cobalamin-dependent regulation of *btuB* expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 180: 6719-6728.
91. Gelfand MS, Mironov AA, Jomantas J, Kozlov YI, Perumov DA (1999) A conserved RNA structure element involved in the regulation of bacterial riboflavin synthesis genes. *Trends Genet* 15: 439-442.
92. Ravnum S, Andersson DI (2001) An adenosyl-cobalamin (coenzyme-B12)-repressed translational enhancer in the *cob* mRNA of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 39: 1585-1594.
93. Nou X, Kadner RJ (2000) Adenosylcobalamin inhibits ribosome binding to *btuB* RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 7190-7195.
94. Mironov AS, Gusarov I, Rafikov R, Lopez LE, Shatalin K, et al. (2002) Sensing small molecules by nascent RNA: a mechanism to control transcription in bacteria. *Cell* 111: 747-756.
95. Winkler W, Nahvi A, Breaker RR (2002) Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature* 419: 952-956.
96. Batey RT, Gilbert SD, Montange RK (2004) Structure of a natural guanine-responsive riboswitch complexed with the metabolite hypoxanthine. *Nature* 432: 411-415.
97. Serganov A, Yuan YR, Pikovskaya O, Polonskaia A, Malinina L, et al. (2004) Structural basis for discriminative regulation of gene expression by adenine- and guanine-sensing mRNAs. *Chem Biol* 11: 1729-1741.
98. McCown PJ, Corbino KA, Stav S, Sherlock ME, Breaker RR (2017) Riboswitch diversity and distribution. *RNA* 23: 995-1011.

99. Breaker RR (2012) Riboswitches and the RNA world. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4.
100. Mirihana Arachchilage G, Sherlock ME, Weinberg Z, Breaker RR (2018) SAM-VI RNAs selectively bind S-adenosylmethionine and exhibit similarities to SAM-III riboswitches. *RNA Biol* 15: 371-378.
101. Weinberg Z, Nelson JW, Lunse CE, Sherlock ME, Breaker RR (2017) Bioinformatic analysis of riboswitch structures uncovers variant classes with altered ligand specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114: E2077-E2085.
102. Kim JN, Roth A, Breaker RR (2007) Guanine riboswitch variants from *Mesoplasma florum* selectively recognize 2'-deoxyguanosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 16092-16097.
103. Sun EI, Leyn SA, Kazanov MD, Saier MH, Jr., Novichkov PS, et al. (2013) Comparative genomics of metabolic capacities of regulons controlled by cis-regulatory RNA motifs in bacteria. *BMC Genomics* 14: 597.
104. Sudarsan N, Lee ER, Weinberg Z, Moy RH, Kim JN, et al. (2008) Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP. *Science* 321: 411-413.
105. Lunse CE, Schmidt MS, Wittmann V, Mayer G (2011) Carba-sugars activate the glmS-riboswitch of *Staphylococcus aureus*. *ACS Chem Biol* 6: 675-678.
106. Ray PS, Jia J, Yao P, Majumder M, Hatzoglou M, et al. (2009) A stress-responsive RNA switch regulates VEGFA expression. *Nature* 457: 915-919.
107. Nahvi A, Barrick JE, Breaker RR (2004) Coenzyme B12 riboswitches are widespread genetic control elements in prokaryotes. *Nucleic Acids Res* 32: 143-150.
108. 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.
109. Weinberg Z, Regulski EE, Hammond MC, Barrick JE, Yao Z, et al. (2008) The aptamer core of SAM-IV riboswitches mimics the ligand-binding site of SAM-I riboswitches. *RNA* 14: 822-828.
110. Weinberg Z, Wang JX, Bogue J, Yang J, Corbino K, et al. (2010) Comparative genomics reveals 104 candidate structured RNAs from bacteria, archaea, and their metagenomes. *Genome Biol* 11: R31.
111. Corbino KA, Barrick JE, Lim J, Welz R, Tucker BJ, et al. (2005) Evidence for a second class of S-adenosylmethionine riboswitches and other regulatory RNA motifs in alpha-proteobacteria. *Genome Biol* 6: R70.
112. Poiata E, Meyer MM, Ames TD, Breaker RR (2009) A variant riboswitch aptamer class for S-adenosylmethionine common in marine bacteria. *RNA* 15: 2046-2056.
113. Fuchs RT, Grundy FJ, Henkin TM (2006) The S(MK) box is a new SAM-binding RNA for translational regulation of SAM synthetase. *Nat Struct Mol Biol* 13: 226-233.
114. Wang JX, Lee ER, Morales DR, Lim J, Breaker RR (2008) Riboswitches that sense S-adenosylhomocysteine and activate genes involved in coenzyme recycling. *Mol Cell* 29: 691-702.
115. 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.
116. Ames TD, Rodionov DA, Weinberg Z, Breaker RR (2010) A eubacterial riboswitch class that senses the coenzyme tetrahydrofolate. *Chem Biol* 17: 681-685.
117. Chen X, Mirihana Arachchilage G, Breaker RR (2019) Biochemical validation of a second class of tetrahydrofolate riboswitches in bacteria. *RNA*.
118. Regulski EE, Moy RH, Weinberg Z, Barrick JE, Yao Z, et al. (2008) A widespread riboswitch candidate that controls bacterial genes involved in molybdenum cofactor and tungsten cofactor metabolism. *Mol Microbiol* 68: 918-932.
119. Kim PB, Nelson JW, Breaker RR (2015) An ancient riboswitch class in bacteria regulates purine biosynthesis and one-carbon metabolism. *Mol Cell* 57: 317-328.
120. Lee ER, Baker JL, Weinberg Z, Sudarsan N, Breaker RR (2010) An allosteric self-splicing ribozyme triggered by a bacterial second messenger. *Science* 329: 845-848.
121. Nelson JW, Sudarsan N, Phillips GE, Stav S, Lunse CE, et al. (2015) Control of bacterial exoelectrogenesis by c-AMP-GMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 5389-5394.
122. Nelson JW, Sudarsan N, Furukawa K, Weinberg Z, Wang JX, et al. (2013) Riboswitches in eubacteria sense the second messenger c-di-AMP. *Nat Chem Biol* 9: 834-839.

123. Sherlock ME, Sudarsan N, Breaker RR (2018) Riboswitches for the alarmone ppGpp expand the collection of RNA-based signaling systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115: 6052-6057.
124. Ames TD, Breaker RR (2011) Bacterial aptamers that selectively bind glutamine. *RNA Biol* 8: 82-89.
125. Mandal M, Lee M, Barrick JE, Weinberg Z, Emilsson GM, et al. (2004) A glycine-dependent riboswitch that uses cooperative binding to control gene expression. *Science* 306: 275-279.
126. 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.
127. 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.
128. Roth A, Winkler WC, Regulski EE, Lee BW, Lim J, et al. (2007) A riboswitch selective for the queuosine precursor preQ1 contains an unusually small aptamer domain. *Nat Struct Mol Biol* 14: 308-317.
129. Meyer MM, Roth A, Chervin SM, Garcia GA, Breaker RR (2008) Confirmation of a second natural preQ1 aptamer class in Streptococcaceae bacteria. *RNA* 14: 685-695.
130. McCown PJ, Liang JJ, Weinberg Z, Breaker RR (2014) Structural, functional, and taxonomic diversity of three preQ1 riboswitch classes. *Chem Biol* 21: 880-889.
131. Sherlock ME, Sudarsan N, Stav S, Breaker RR (2018) Tandem riboswitches form a natural Boolean logic gate to control purine metabolism in bacteria. *Elife* 7.
132. Sherlock ME, Sadeeshkumar H, Breaker RR (2019) Variant Bacterial Riboswitches Associated with Nucleotide Hydrolase Genes Sense Nucleoside Diphosphates. *Biochemistry* 58: 401-410.
133. Barrick JE, Corbino KA, Winkler WC, Nahvi A, Mandal M, et al. (2004) New RNA motifs suggest an expanded scope for riboswitches in bacterial genetic control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 6421-6426.
134. Park SY, Cromie MJ, Lee EJ, Groisman EA (2010) A bacterial mRNA leader that employs different mechanisms to sense disparate intracellular signals. *Cell* 142: 737-748.
135. Furukawa K, Ramesh A, Zhou Z, Weinberg Z, Vallery T, et al. (2015) Bacterial riboswitches cooperatively bind Ni(2+) or Co(2+) ions and control expression of heavy metal transporters. *Mol Cell* 57: 1088-1098.
136. Baker JL, Sudarsan N, Weinberg Z, Roth A, Stockbridge RB, et al. (2012) Widespread genetic switches and toxicity resistance proteins for fluoride. *Science* 335: 233-235.
137. 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.
138. Li S, Hwang XY, Stav S, Breaker RR (2016) The yjdB riboswitch candidate regulates gene expression by binding diverse azaaromatic compounds. *RNA* 22: 530-541.
139. Nelson JW, Atilho RM, Sherlock ME, Stockbridge RB, Breaker RR (2017) Metabolism of Free Guanidine in Bacteria Is Regulated by a Widespread Riboswitch Class. *Mol Cell* 65: 220-230.
140. Sherlock ME, Malkowski SN, Breaker RR (2017) Biochemical Validation of a Second Guanidine Riboswitch Class in Bacteria. *Biochemistry* 56: 352-358.
141. Sherlock ME, Breaker RR (2017) Biochemical Validation of a Third Guanidine Riboswitch Class in Bacteria. *Biochemistry* 56: 359-363.
142. Bastet L, Dube A, Masse E, Lafontaine DA (2011) New insights into riboswitch regulation mechanisms. *Mol Microbiol* 80: 1148-1154.
143. Abduljalil JM (2018) Bacterial riboswitches and RNA thermometers: Nature and contributions to pathogenesis. *Noncoding RNA Res* 3: 54-63.
144. Hollands K, Proshkin S, Sklyarova S, Epshtein V, Mironov A, et al. (2012) Riboswitch control of Rho-dependent transcription termination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 5376-5381.
145. Caron MP, Bastet L, Lussier A, Simoneau-Roy M, Masse E, et al. (2012) Dual-acting riboswitch control of translation initiation and mRNA decay. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: E3444-3453.
146. Loh E, Dussurget O, Gripenland J, Vaitkevicius K, Tiensuu T, et al. (2009) A trans-acting riboswitch controls expression of the virulence regulator PrfA in *Listeria monocytogenes*. *Cell* 139: 770-779.
147. Li S, Breaker RR (2013) Eukaryotic TPP riboswitch regulation of alternative splicing involving long-distance base pairing. *Nucleic Acids Res* 41: 3022-3031.

148. Cheah MT, Wachter A, Sudarsan N, Breaker RR (2007) Control of alternative RNA splicing and gene expression by eukaryotic riboswitches. *Nature* 447: 497-500.
149. Croft MT, Moulin M, Webb ME, Smith AG (2007) Thiamine biosynthesis in algae is regulated by riboswitches. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 20770-20775.
150. Wachter A, Tunc-Ozdemir M, Grove BC, Green PJ, Shintani DK, et al. (2007) Riboswitch control of gene expression in plants by splicing and alternative 3' end processing of mRNAs. *Plant Cell* 19: 3437-3450.
151. Kertesz S, Kerenyi Z, Merai Z, Bartos I, Palfy T, et al. (2006) Both introns and long 3'-UTRs operate as cis-acting elements to trigger nonsense-mediated decay in plants. *Nucleic Acids Res* 34: 6147-6157.
152. Sherman EM, Esquiaqui J, Elsayed G, Ye JD (2012) An energetically beneficial leader-linker interaction abolishes ligand-binding cooperativity in glycine riboswitches. *RNA* 18: 496-507.
153. Sudarsan N, Hammond MC, Block KF, Welz R, Barrick JE, et al. (2006) Tandem riboswitch architectures exhibit complex gene control functions. *Science* 314: 300-304.
154. Mordukhova EA, Pan JG (2013) Evolved cobalamin-independent methionine synthase (MetE) improves the acetate and thermal tolerance of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 79: 7905-7915.
155. Gutierrez-Preciado A, Jensen RA, Yanofsky C, Merino E (2005) New insights into regulation of the tryptophan biosynthetic operon in Gram-positive bacteria. *Trends Genet* 21: 432-436.
156. Serganov A, Huang L, Patel DJ (2009) Coenzyme recognition and gene regulation by a flavin mononucleotide riboswitch. *Nature* 458: 233-237.
157. Trausch JJ, Ceres P, Reyes FE, Batey RT (2011) The structure of a tetrahydrofolate-sensing riboswitch reveals two ligand binding sites in a single aptamer. *Structure* 19: 1413-1423.
158. Gilbert SD, Rambo RP, Van Tyne D, Batey RT (2008) Structure of the SAM-II riboswitch bound to S-adenosylmethionine. *Nat Struct Mol Biol* 15: 177-182.
159. Cheng J, Poduska B, Morton RA, Finan TM (2011) An ABC-type cobalt transport system is essential for growth of *Sinorhizobium meliloti* at trace metal concentrations. *J Bacteriol* 193: 4405-4416.
160. Lim J, Winkler WC, Nakamura S, Scott V, Breaker RR (2006) Molecular-recognition characteristics of SAM-binding riboswitches. *Angew Chem Int Ed Engl* 45: 964-968.
161. Smith KD, Lipchock SV, Ames TD, Wang J, Breaker RR, et al. (2009) Structural basis of ligand binding by a c-di-GMP riboswitch. *Nat Struct Mol Biol* 16: 1218-1223.
162. Serganov A, Huang L, Patel DJ (2008) Structural insights into amino acid binding and gene control by a lysine riboswitch. *Nature* 455: 1263-1267.
163. Serganov A, Polonskaia A, Phan AT, Breaker RR, Patel DJ (2006) Structural basis for gene regulation by a thiamine pyrophosphate-sensing riboswitch. *Nature* 441: 1167-1171.
164. Peselis A, Serganov A (2014) Themes and variations in riboswitch structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1839: 908-918.
165. Ren A, Rajashankar KR, Patel DJ (2012) Fluoride ion encapsulation by Mg²⁺ ions and phosphates in a fluoride riboswitch. *Nature* 486: 85-89.
166. Dann CE, 3rd, Wakeman CA, Sieling CL, Baker SC, Irnov I, et al. (2007) Structure and mechanism of a metal-sensing regulatory RNA. *Cell* 130: 878-892.
167. Huang L, Wang J, Lilley DMJ (2017) The Structure of the Guanidine-II Riboswitch. *Cell Chem Biol* 24: 695-702 e692.
168. Peselis A, Gao A, Serganov A (2015) Cooperativity, allostery and synergism in ligand binding to riboswitches. *Biochimie* 117: 100-109.
169. Mandal M, Breaker RR (2004) Adenine riboswitches and gene activation by disruption of a transcription terminator. *Nat Struct Mol Biol* 11: 29-35.
170. Winkler WC, Breaker RR (2003) Genetic control by metabolite-binding riboswitches. *Chembiochem* 4: 1024-1032.
171. Greenlee EB, Stav S, Atilho RM, Brewer KI, Harris KA, et al. (2018) Challenges of ligand identification for the second wave of orphan riboswitch candidates. *RNA Biol* 15: 377-390.

172. Antunes D, Jorge NAN, Caffarena ER, Passetti F (2017) Using RNA Sequence and Structure for the Prediction of Riboswitch Aptamer: A Comprehensive Review of Available Software and Tools. *Front Genet* 8: 231.
173. Suess B, Fink B, Berens C, Stentz R, Hillen W (2004) A theophylline responsive riboswitch based on helix slipping controls gene expression in vivo. *Nucleic Acids Res* 32: 1610-1614.
174. Machtel P, Bakowska-Zywicka K, Zywicki M (2016) Emerging applications of riboswitches - from antibacterial targets to molecular tools. *J Appl Genet* 57: 531-541.
175. Hallberg ZF, Su Y, Kitto RZ, Hammond MC (2017) Engineering and In Vivo Applications of Riboswitches. *Annu Rev Biochem* 86: 515-539.
176. Mehdizadeh Aghdam E, Hejazi MS, Barzegar A (2016) Riboswitches: From living biosensors to novel targets of antibiotics. *Gene* 592: 244-259.
177. Blount KF, Breaker RR (2006) Riboswitches as antibacterial drug targets. *Nat Biotechnol* 24: 1558-1564.
178. Lee ER, Blount KF, Breaker RR (2009) Roseoflavin is a natural antibacterial compound that binds to FMN riboswitches and regulates gene expression. *RNA Biol* 6: 187-194.
179. Blount KF, Megyola C, Plummer M, Osterman D, O'Connell T, et al. (2015) Novel riboswitch-binding flavin analog that protects mice against *Clostridium difficile* infection without inhibiting cecal flora. *Antimicrob Agents Chemother* 59: 5736-5746.
180. Johnson S (2009) Recurrent *Clostridium difficile* infection: a review of risk factors, treatments, and outcomes. *J Infect* 58: 403-410.
181. Johnson S (2009) Recurrent *Clostridium difficile* infection: causality and therapeutic approaches. *Int J Antimicrob Agents* 33 Suppl 1: S33-36.
182. Howe JA, Wang H, Fischmann TO, Balibar CJ, Xiao L, et al. (2015) Selective small-molecule inhibition of an RNA structural element. *Nature* 526: 672-677.
183. Wang H, Mann PA, Xiao L, Gill C, Galgoci AM, et al. (2017) Dual-Targeting Small-Molecule Inhibitors of the *Staphylococcus aureus* FMN Riboswitch Disrupt Riboflavin Homeostasis in an Infectious Setting. *Cell Chem Biol* 24: 576-588 e576.
184. Yang J, Seo SW, Jang S, Shin SI, Lim CH, et al. (2013) Synthetic RNA devices to expedite the evolution of metabolite-producing microbes. *Nat Commun* 4: 1413.
185. Jang S, Yang J, Seo SW, Jung GY (2015) Riboselector: riboswitch-based synthetic selection device to expedite evolution of metabolite-producing microorganisms. *Methods Enzymol* 550: 341-362.
186. Han K, Liang Z, Zhou N (2010) Design strategies for aptamer-based biosensors. *Sensors (Basel)* 10: 4541-4557.
187. Su L, Jia W, Hou C, Lei Y (2011) Microbial biosensors: a review. *Biosens Bioelectron* 26: 1788-1799.
188. Jo JJ, Shin JS (2009) Construction of intragenic synthetic riboswitches for detection of a small molecule. *Biotechnol Lett* 31: 1577-1581.
189. You M, Litke JL, Jaffrey SR (2015) Imaging metabolite dynamics in living cells using a Spinach-based riboswitch. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: E2756-2765.
190. Paige JS, Wu KY, Jaffrey SR (2011) RNA mimics of green fluorescent protein. *Science* 333: 642-646.
191. Espah Borujeni A, Mishler DM, Wang J, Huso W, Salis HM (2016) Automated physics-based design of synthetic riboswitches from diverse RNA aptamers. *Nucleic Acids Res* 44: 1-13.
192. Suess B, Hanson S, Berens C, Fink B, Schroeder R, et al. (2003) Conditional gene expression by controlling translation with tetracycline-binding aptamers. *Nucleic Acids Res* 31: 1853-1858.
193. Weigand JE, Sanchez M, Gunnesch EB, Zeiher S, Schroeder R, et al. (2008) Screening for engineered neomycin riboswitches that control translation initiation. *RNA* 14: 89-97.
194. Verhounig A, Karcher D, Bock R (2010) Inducible gene expression from the plastid genome by a synthetic riboswitch. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 6204-6209.
195. Ketzner P, Kaufmann JK, Engelhardt S, Bossow S, von Kalle C, et al. (2014) Artificial riboswitches for gene expression and replication control of DNA and RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: E554-562.
196. Barrick JE (2009) Predicting riboswitch regulation on a genomic scale. *Methods Mol Biol* 540: 1-13.
197. Breaker RR (2011) Prospects for riboswitch discovery and analysis. *Mol Cell* 43: 867-879.

198. Tomsic J, McDaniel BA, Grundy FJ, Henkin TM (2008) Natural variability in S-adenosylmethionine (SAM)-dependent riboswitches: S-box elements in bacillus subtilis exhibit differential sensitivity to SAM In vivo and in vitro. *J Bacteriol* 190: 823-833.
199. Mohanty BK, Kushner SR (2011) Bacterial/archaeal/organelle polyadenylation. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2: 256-276.
200. Agarwal S, Macfarlan TS, Sartor MA, Iwase S (2015) Sequencing of first-strand cDNA library reveals full-length transcriptomes. *Nat Commun* 6: 6002.
201. Burdett ID, Kirkwood TB, Whalley JB (1986) Growth kinetics of individual *Bacillus subtilis* cells and correlation with nucleoid extension. *J Bacteriol* 167: 219-230.
202. Tucker AM, Winkler HH, Driskell LO, Wood DO (2003) S-adenosylmethionine transport in *Rickettsia prowazekii*. *J Bacteriol* 185: 3031-3035.
203. Merali S, Clarkson AB, Jr. (2004) S-adenosylmethionine and *Pneumocystis*. *FEMS Microbiol Lett* 237: 179-186.
204. Seguin-Orlando A, Schubert M, Clary J, Stagegaard J, Alberdi MT, et al. (2013) Ligation bias in illumina next-generation DNA libraries: implications for sequencing ancient genomes. *PLoS One* 8: e78575.
205. Choonee N, Even S, Zig L, Putzer H (2007) Ribosomal protein L20 controls expression of the *Bacillus subtilis* infC operon via a transcription attenuation mechanism. *Nucleic Acids Res* 35: 1578-1588.
206. Dar D, Shamir M, Mellin JR, Koutero M, Stern-Ginossar N, et al. (2016) Term-seq reveals abundant ribo-regulation of antibiotics resistance in bacteria. *Science* 352: aad9822.
207. Morinaga T, Kobayashi K, Ashida H, Fujita Y, Yoshida K (2010) Transcriptional regulation of the *Bacillus subtilis* asnH operon and role of the 5'-proximal long sequence triplication in RNA stabilization. *Microbiology* 156: 1632-1641.
208. Lee B, Flynn RA, Kadina A, Guo JK, Kool ET, et al. (2017) Comparison of SHAPE reagents for mapping RNA structures inside living cells. *RNA* 23: 169-174.
209. Mansilla MC, Albanesi D, de Mendoza D (2000) Transcriptional control of the sulfur-regulated cysH operon, containing genes involved in L-cysteine biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 182: 5885-5892.
210. Even S, Burguiere P, Auger S, Soutourina O, Danchin A, et al. (2006) Global control of cysteine metabolism by CymR in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 188: 2184-2197.
211. Westermann AJ, Gorski SA, Vogel J (2012) Dual RNA-seq of pathogen and host. *Nat Rev Microbiol* 10: 618-630.
212. Taylor SC, Laperriere G, Germain H (2017) Droplet Digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: from variable nonsense to publication quality data. *Sci Rep* 7: 2409.

10Dorobek Naukowy

Publikacje

Mleczek AM*, **Machtel P***, Walkowiak M, Wasilewska A, Bąkowska-Żywicka K (2019) *Levels of sdRNAs in cytoplasm and their association with ribosomes are dependent upon stress conditions but independent from snoRNA expression. Scientific Reports – w recenzji, BioRxiv – preprint, doi 10.1101/584367.* * – pierwsze autorstwo

Machtel P, Bąkowska-Żywicka K, Żywicki M (2016) Emerging applications of riboswitches – from antibacterial targets to molecular tools. *Journal of Applied Genetics* 57(4):531-541.

Bąkowska-Żywicka K, Mleczek AM, Kasprzyk M, **Machtel P**, Żywicki M, Twardowski T (2016). The widespread occurrence of tRNA-derived fragments in *Saccharomyces cerevisiae*”, *FEBS Open Bio* 6(12):1186–1200.

Machtel P, Bąkowska-Żywicka K, Żywicki M (2016) Ryboprzełączniki w medycynie.”, *Postęp medycyny w leczeniu i ochronie zdrowia*, Tom II, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o. o., Lublin, Polska, Red: B. Drop, P. Kiciński, s. 206-219.

Projekty badawcze

NCN PRELUDIUM 12, UMO-2016/23/N/NZ1/02446

Opracowanie nowej metody bezpośredniej identyfikacji i absolutnej oceny ilościowej zdarzeń przedwczesnej terminacji transkrypcji, na przykładzie bakteryjnych ryboprzełączników.

Kierownik projektu: **mgr Piotr Machtel**

Grant dla Młodych Naukowców ICHB PAN 2017

Badanie dynamiki zmian poziomu ekspresji genów zaangażowanych w metabolizm aminokwasów, znajdujących się pod kontrolą ryboprzełączników u bakterii *Bacillus subtilis* poprzez zastosowanie techniki ilościowego PCR w czasie rzeczywistym

Kierownik projektu: **mgr Piotr Machtel**

NCN SONATA 7, UMO-2014/13/D/NZ1/00061

W poszukiwaniu mechanizmów regulacji ekspresji genów niezależnych od RNAi – krótkie, niekodujące RNA powstające ze snoRNA

Kierownik projektu: dr hab. Kamilla Bąkowska-Żywicka, prof. ICHB PAN

NCN OPUS 14, UMO-2017/27/B/NZ1/01416

Zmiany w składzie białek rybosomalnych i w oddziałujących z rybosomami krótkich niekodujących RNA w *Saccharomyces cerevisiae* w odpowiedzi na stres środowiskowy.

Kierownik projektu: dr hab. Kamilla Bąkowska-Żywicka, prof. ICHB PAN

NCN OPUS 13, UMO-2017/25/B/NZ6/00642,

Sieci regulatorowe RNA jako nowe cele terapeutyczne w bakteriach lekoopornych.

Kierownik projektu: dr Marek Żywicki

Udział w konferencjach naukowych

Postery

Aptamers in Bordeaux, 28.06 – 29.06.2019, Bordeaux, Francja

New method for unbiased quantification of riboswitch transcriptional activity.

Machtel P, Wasilewska A, Zacharjasz J, Bąkowska-Żywicka K

11th Bordeaux RNA Club Symposium, 27.06 – 28.06.2019, Bordeaux, Francja

New method for unbiased quantification of riboswitch transcriptional activity.

Machtel P, Wasilewska A, Zacharjasz J, Bąkowska-Żywicka K

The 24th annual Meeting of the RNA Society, 11.06 – 16.06.2019, Kraków, Polska

Regulation of the p53 expression profile by hnRNP K under stress conditions.

Agata Ś, Dutkiewicz M, **Machtel P**, Kubacinska M, Żydowicz-Machtel P, Ciesiołka J

The 24th annual Meeting of the RNA Society, 11.6 – 16.6.2019, Kraków, Polska

New method for unbiased quantification of riboswitch transcriptional activity.

Machtel P, Wasilewska A, Zacharjasz J, Bąkowska-Żywicka K

The 24th annual Meeting of the RNA Society, 11.6 – 16.6.2019, Kraków, Polska

Dealing with pressure: Levels of snoRNA –derived fragments in cytoplasm and their association with ribosomes are dependent upon stress conditions but independent from snoRNA expression.

Mleczo AM, **Machtel P**, Walkowiak M, Wasilewska A, Bąkowska-Żywicka K

I Ogólnopolska Konferencja „Biotechnologia niejedno ma imię”, 24.11 – 25.11.2018, Poznań, Polska

DIY – Zrób to sam! Jak nauczyć RNAzę H nowych sztuczek.

Zacharjasz J, **Machtel P**, Bąkowska-Żywicka K

7th edition of Intercollegiate Biotechnology Symposium Symbioza, 11.6–13.6.2018, Warszawa, Polska

The Hunger Games – kinetics of riboswithces response to amino acid starvation in *Bacillus subtilis*.

Wasilewska A, **Machtel P**, Bąkowska-Żywicka K

7th edition of Intercollegiate Biotechnology Symposium Symbioza, 11.6– 13.6.2018, Warszawa, Polska

RNase H shakes things up! Development of a novel method for sequence-defined transcription cleavage.

Zacharjasz J, **Machtel P**, Bąkowska-Żywicka K

The 23rd annual Meeting of the RNA Society, 29.5 – 3.6.2018, Berkeley, USA

Small nucleolar RNAs are processed to small RNAs and associate with *Saccharomyces cerevisiae* ribosomes in a stress-dependent manner.

Machtel P, Mleczo AM, Walkowiak M, Wasilewska A, Bąkowska-Żywicka K

RNAction 2017, 18.09 – 19.09. 2017, Poznań, Polska

A new method for for a quantitative analysis of premature transcription termination events.

Machtel P, Bąkowska-Żywicka K

The 22nd annual meeting of the RNA society, 23.5 – 3.6.2018, Praga, Czechy

The widespread occurrence of tRNA-derived fragments in *Saccharomyces cerevisiae*.

Bąkowska-Żywicka K, Mleczo A, Kasprzyk M, **Machtel P**, Żywicki M, Twardowski T

EMBO Young Scientists Forum, 2.7 – 3.7.2015, Warszawa, Polska

Metabolite-mediated control of transcription in *Bacillus subtilis*.

Machtel P, Bąkowska-Żywicka K, Twardowski T, Żywicki M

9th Central and Eastern European Proteomic Conference (CEEPC), 15.6 – 18.6.2015, Poznań, Polska
Metabolite-mediated control of transcription in *Bacillus subtilis*.

Machtel P, Bąkowska-Żywicka K, Twardowski T, Żywicki M

25 th Annual Meeting of the German Society of Humangenetics, 19.03 – 21.03.2014, Essen, Niemcy
Influence of lactose intolerance on colorectal cancer incidence in the Polish population

Pławski A, **Machtel P**, Boruń P, Skrzypczak-Zielińska M, Wojciechowska-Łącka A, Godlewski D,
Banasiewicz T

Wystąpienia ustne

VIII Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa TYGIEL 2016 „Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju”
2016, 12.03 – 13.3.2016, Lublin, Polska

Życie Bakterii Pod Kontrolą... Ryboporzędników

Machtel P

Poznańskie Konsorcjum RNA KNOW, 07 – 09.12.2016, Obrzycko, Polska

To transcribe or not to transcribe? – Regulation of gene expression by premature transcription termination
in bacteria

Machtel P

Annual Conference on Hereditary Cancers 2013, 26.9 – 27.9.2013, Szczecin, Polska

Influence of lactose intolerance on colorectal cancer incidence in the Polish population

Pławski A, **Machtel P**, Boruń P, Skrzypczak-Zielińska M, Wojciechowska-Łącka A, Godlewski D,
Banasiewicz T

European Association for Vision and Eye Research Conference 2013, 18.9 – 21.9.2013, Nicea, Francja

Analysis of mitochondrial sequences in patients with keratoconus

Nowak D, Karolak J, **Machtel P**, Polakowski P, Szaflik J, Szaflik J, Gajęcka M.

Stypendia i nagrody

Stypendium Naukowe ICHB PAN dla Najlepszych Doktorantów 2017/2018

Stypendium Naukowe ICHB PAN dla Najlepszych Doktorantów 2018/2019