

Potencjał regulatorowy krótkich RNA oddziałujących z rybosomami (rancRNA) w Saccharomyces cerevisiae w warunkach stresu abiotycznego

mgr Anna Wasilewska-Burczyk

Rozprawa doktorska zrealizowana w Pracowni Modelowych Organizmów Bezkręgowych Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk Promotor: dr hab. Kamilla Grzywacz, prof. ICHB PAN

Poznań 2025

Pragnę złożyć najserdeczniejsze podziękowania

Mojemu promotorowi, dr hab. Kamilli Grzywacz, prof. ICHB PAN za nieocenione wsparcie, cierpliwość, życzliwość oraz za bezcenne wskazówki i przekazaną wiedzę.

Dr.hab. Markowi Żywickiemu, prof. UAM Za merytoryczne wsparcie w realizacji pracy badawczej.

Całej Pracowni Modelowych Organizmów Bezkręgowych Za wspólnie spędzony czas.

Mgr. inż. Kamili Pepłowskiej Za nieocenione wsparcie w powstaniu niniejszej rozprawy.

Mgr. Weronice Pawlik Za wiele wspólnych godzin pracy w miłej atmosferze.

Rodzinie i przyjaciołom Za wsparcie w najtrudniejszych chwilach.

Mojemu mężowi Karolowi Który nieustannie we mnie wierzył oraz wspierał, gdy ja w siebie wątpiłam.

Spis treści

STRESZCZENIE	8
ABSTRACT	10
1. WPROWADZENIE	11
1.1. Historia odkrycia rybosomów oraz rancRNA	11
1.2. Krótkie RNA powstające z tRNA	12
1.2.1. Budowa tRNA	12
1.2.2. Metylacje tRNA	13
1.2.3. Klasyfikacja tRF	15
1.2.4. Biogeneza tRF	17
1.2.4.1. Biogeneza tRF zależna od angiogeniny	17
1.2.4.2. Biogeneza tRF zależna od Dicer	17
1.2.4.3. Biogeneza tKF zalezna od inných endonukleaz KNA	
1.2.5. FUNKCJE TKF	18
1.2.5.1. Interakcje tRF 2 kluczowymi komponentami aparatu transiacyjnego i ich wpływ na	10
ekspresję genow	10 10
	19
1.3. Krótkie RNA powstające ze snoRNA (sdRNA)	19
1.3.1. Budowa snoRNA	19
1.3.2. Klasyfikacja sdRNA	21
1.3.3. Biosynteza sdRNA	21
1.3.3.1. Biogeneza sdRNA zależna od Dicer	21
1.3.3.2. Biogeneza sdRNA zależna od AGO2	21
1.3.4. Funkcje sdRNA	22
1.4. Demetylacja RNA	22
1.4.1. Białka AlkB i AlkB-D135S	22
1.4.2. Mechanizm demetylacji	23
2. CEL I UZASADNIENIE PODJĘTEJ TEMATYKI PRACY	24
3. MATERIAŁY I METODY	25
3.1. Aparatura	25
3.2. Odczynniki oraz gotowe zestawy odczynników	25
3.3. Bufory oraz pożywki wykorzystane w pracy	27
3.3.1. Bufory	27
2.3.2. Pożywki	28
3.4. Hodowle drożdżowe oraz bakteryjne	29
3.4.1. Szczep drożdży	29
3.4.1.1. Typy stresów abiotycznych	29
3.4.2. Hodowla komórek kompetentnych Escherichia coli	30
3.4.2.1. Transformacja metodą szoku cieplnego	30
3.4.2.2. Nadprodukcja białek w bakteriach	32

3.4.2.3. Izolacja białek	32
3.4.2.3.1. Zageszczanie białek	32
3.4.2.3.2. Sprawdzenie czystości białek	32
3.5. Profilowanie polisomowe	33
3.6. Izolacja RNA	34
3.6.1. Elektroforeza kwasów nukleinowych	34
3.6.2. Elucja kwasów nukleinowych z żelu	35
3.6.3. Analiza jakościowa i ilościowa kwasów nukleinowych	35
3.7. Demetylacja RNA	35
3.8. Sekwencjonowanie RNA	35
3.9. Identyfikacja rancRNA w zmiennych warunkach środowiskowych - komputerowe profilowanie	•
asocjacji	35
	~ -
4. WYNIKI I DYSKUSJA	.37
4.1. Profilowanie polisomowe	37
4.2. Izolacja RNA	40
4.2.1. Sprawdzenie jakości RNA po izolacji z frakcji sacharozowej	41
4.2.2. Sprawdzenie jakości RNA po elucji z żelu	44
4.3. Demetylacja RNA	45
4.4. Analiza danych wysokoprzepustowych rancRNA-seq	51
4.4.1. Ilości odczytów	51
4.4.2. Ilości poszczególnych typów krótkich RNA	52
4.4.3. Analiza sdRNA oraz tRF	57
4.4.3.1. Zmiany zawartości tRF oraz sdRNA w bibliotekach rancRNA	57
4.4.3.2. Nazewnictwo rancRNA zastosowane w pracy	66
4.4.4. Analiza sdRNA oraz tRF o istotnych statystycznie zmianach akumulacji w poszczególnych	
frakcjach	67
4.4.4.1. sdRNA wykazujące istotne statystycznie zmiany akumulacji w podjednostkach rybosom	۱ów,
monosomach oraz polisomach	67
4.4.4.2. tRF wykazujące istotne statystycznie zmiany asocjącji w podjednostkach rybosomów,	
monosomach oraz polisomach	68
4.4.4.3. Podjednostki rybosomowe	
4.4.4.3.1. Wybrane przykłady sdRNA o istotnych statystycznie zmianach w oddziaływaniu z	
nodiednostkami rybosomalnymi nod wnływem stresu	70
4 4 4 3 1 1 Wybrane sdRNA wykazujące istotne zmiany asociacji do podjednostek	
rybosomowych tylko w odpowiedzi na stres głodu cukrowego	70
1 4 4 3 1 2 Wybrane sdRNA wykazujące istotne zmiany asociacji do nodjednostek	
rybosomowych tylko w odpowiedzi na stres hinerosmotyczny	74
4.4.4.2.1.2. Wybrano sdPNA wykazujące istotno zmiany acesiacji z podiednostkami	
4.4.4.5.1.5. Wybrane sukina wykazujące istotne ziniany asocjacji z poujeunostkami	
rybosomowymi w odpowiedzi na oba typy stresow	//
4.4.4.3.2. Podsumowanie wyników opisujących sakina oddziałujące z podjednostkami w bosowowyci	~ ~
	81
4.4.4.3.3. tkF o istotnych statystycznie zmianach w oddziaływaniu z podjednostkami	
ryposomalnymi pod wpływem stresu	82
4.4.4.3.3.1. Wybrane tRF wykazujące istotne zmiany akumulacji w podjednostkach	
rybosomowych tylko w odpowiedzi na stres głodu cukrowego	82

4.4.4.3.3.2. Wybrane tRF wykazujące istotne zmiany akumulacji w podjednostkach
rybosomowych tylko w odpowiedzi na stres hiperosmotyczny
4.4.4.3.3.3. Wybrane tRF wykazujące istotne zmiany akumulacji w podjednostkach
rybosomowych w odpowiedzi na oba typy stresów
4.4.4.3.4. Podsumowanie wyników opisujących tRF oddziałujące z podjednostkami
rybosomowymi95
4.4.4.4. Monosomy
4.4.4.4.1. sdRNA o istotnych statystycznie zmianach w oddziaływaniu z monosomami pod
wpływem stresu
4.4.4.4.1.1. Wybrane sdRNA wykazujące istotne zmiany asocjacji z monosomami tylko w
odpowiedzi na stres głodu cukrowego98
4.4.4.4.1.2. Wybrane sdRNA wykazujące istotne zmiany asocjacji z monosomami tylko w
odpowiedzi na stres hiperosmotyczny 101
4.4.4.4.1.3. Wybrane sdRNA wykazujące istotne zmiany asocjacji w monosomach w
odpowiedzi na oba typy stresów103
4.4.4.4.2. Podsumowanie wyników opisujących sdRNA oddziałujące z monosomami 105
4.4.4.3. tRF o istotnych statystycznie zmianach w oddziaływaniu z monosomami pod
wpływem stresu
4.4.4.4.3.1. tRF wykazujące istotne zmiany asocjacji z monosomami tylko w odpowiedzi na
stres głodu cukrowego
4.4.4.3.2. Wybrane tRF wykazujące istotne zmiany asocjącji w monosomach tylko w
odpowiedzi na stres hiperosmotyczny
4.4.4.3.3. Wybrane tRF wykazujące istotne zmiany asociącii w monosomach w odpowiedzi
na oba typy stresów
4.4.4.4. Podsumowanie wyników opisujących tRF oddziałujące z monosomami
4.4.4.5. Polisomy
4.4.4.5.1. sdRNA o istotnych statystycznie zmianach w oddziaływaniu z polisomami pod
wpływem stresu
4.4.4.5.1.1. Wybrane sdRNA wykazujące istotne zmiany asociącii z polisomami tylko w
odpowiedzi na stres głodu cukrowego
4.4.4.5.1.2. Wybrane sdRNA wykazujące istotne zmiany asociącji z polisomami tylko w
odpowiedzi na stres hiperosmotyczny
4.4.4.5.1.3. Wybrane sdRNA wykazujące istotne zmiany asociącji z polisomami w odpowiedzi
na oba typy stresów
4.4.4.5.2. Podsumowanie wyników opisujących sdRNA oddziałujące z polisomami
4 4 4 5 3 tRE o istotnych statystycznie zmianach w oddziaływaniu z polisomami pod wpływem
stresu
444531 Wybrane tRE wykazujące istotne zmiany asociącii w polisomach w odpowiedzi na
stres gladu cukrowego
125
adnowiedzi na stres hinerosmotyczny
4.4.5.3.3 Wybrane tPE wykazujące istotne zmiany asociacji z polisomani w odnowiedzi na
4.4.4.5.5.5. Wybrane thi wykazujące istotne zmiany asocjacji z polisomanii w oupowiedzi na oba typy stresów
142 A Dodsumowanie wyników onisujących tRE oddziałujące z polisomami 142
5. WNIOSKI
5.1. Wnioski ogólne
5.2. Wnioski szczegółowe dla rancRNA asocjujących z podjednostkami rybosomalnymi
5.3. Wnioski szczegółowe dla rancRNA asocjujących z monosomami 148
5.4. Wnioski szczegółowe dla rancRNA asocjujących z polisomami 149
6. FINANSOWANIE BADAŃ W RAMACH ROZPRAWY DOKTORSKIFI 150

7. AKTYWNOŚĆ NAUKOWA I OSIĄGNIĘCIA DOKTORANTA	150
7.1. Udział w realizacji projektów badawczych	150
7.2. Spis publikacji naukowych	150
7.3. Prezentacja wyników na konferencjach naukowych	151
7.4. Opieka nad stażystami	151
7.5.Udział w działalności upowszechniającej i promującej naukę	151
7.6. Nagrody i wyróżnienia	151
8. WYKAZ SKRÓTÓW	152
9. MATERIAŁ DODATKOWY	153
10. REFERENCJE	163

STRESZCZENIE

Niekodujące RNA odgrywają kluczową rolę w regulacji ekspresji genów na wielu etapach życia komórki. W 2012 roku odkryto nowy mechanizm regulacji biosyntezy białka polegający na bezpośrednim wiązaniu krótkich RNA z rybosomami u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Te krótkie RNA, nazwane rancRNA (ang. *ribosome-associated noncodig RNAs*), powstają w warunkach stresowych poprzez cięcie znanych niekodujących RNA, takich jak snoRNA, rRNA czy tRNA.

Celem badań podjętych w niniejszej pracy było pogłębienie wiedzy na temat rancRNA, ze szczególnym uwzględnieniem dwóch klas rancRNA: tRF – krótkie RNA powstające z tRNA (ang. *tRNA-derived fragments*) oraz sdRNA – krótkie RNA powstające ze snoRNA (ang. *snoRNA-derived RNAs*). W rozprawie analizowano interakcje tRF oraz sdRNA z frakcjami rybosomalnymi u drożdży *S. cerevisiae*. W celu zbadania wpływu modyfikacji obecnych w rancRNA na ich poziom akumulacji wykorzystano białka AlkB/AlkB-D135S.

W pierwszym etapie pracy skupiono się na identyfikacji jak najszerszego spektrum rancRNA oddziałujących z rybosomami S. cerevisiae w warunkach umiarkowanego stresu abiotycznego z użyciem wysokoprzepustowego sekwencjonowania. W pierwszej kolejności wykonano hodowlę drożdży w trzech warunkach: optymalnych (kontrola) oraz 2 warunkach stresowych, w których obserwowano najwyższą heterogeniczność rybosomów, tj. wstrząs hiperosmotyczny i głód cukrowy. W celu "zamrożenia" maszynerii translacyjnej, komórki poddawano inkubacji z cykloheksimidem, inhibitorem biosyntezy białka w organizmach eukariotycznych, a następnie lizie w ochronnych warunkach niskiej temperatury. Lizaty poddawano ultrawirowaniu w gradiencie sacharozy (profilowanie polisomowe), podczas którego uzyskano 3 frakcje rybosomowe: polisomy, monosomy, podjednostki oraz 1 frakcję nierybosomowa (wolne RNA). Z każdej frakcji wyizolowano RNA, a następnie przeprowadzono selekcję względem wielkości z wykorzystaniem rozdziału w żelu poliakrylamidowym i następującej po nim elucji, w celu uzyskania krótkich RNA o długości ~20-50 nt. Krótkie RNA rozdzielano na dwie frakcje, z których jedną poddano demetylacji z udziałem demetylaz tRNA AlkB (enzym AlkB produkowano w bakteryjnym systemie ekspresyjnym). Tak przygotowane RNA poddano ocenie jakościowej i ilościowej z wykorzystaniem elektroforezy kapilarnej, a następnie wysokoprzepustowemu na platformie Illumina. Przygotowano 48 bibliotek sekwencjonowaniu do sekwencjonowania rancRNA (rancRNA-seq): 2 powtórzenia biologiczne x 4 frakcje z profilu polisomowego x 3 warunki hodowli drożdży x 2 warunki demetylacji = 48 bibliotek cDNA. Nastepnie przeprowadzono standardowa analize bioinformatyczna wyników sekwencjonowania. To pozwoliło na zidentyfikowanie 2028 różnych tRF oraz różnych sdRNA. Zastosowanie sekwencjonowania wysokoprzepustowego 961 umożliwia kompleksową analizę asocjacji rancRNA z podjednostkami rybosomowymi, monosomami oraz polisomami.

W kolejnym etapie zbadano czy stres wpływa na asocjację tRF i sdRNA z frakcjami rybosomalnymi: podjednostki rybosomowe, monosomy, polisomy. Szczegółowa analiza frakcji rybosomalnych w stresach abiotycznych względem warunków optymalnych umożliwiła wykazanie zmian akumulacji tRF oraz sdRNA w poszczególnych frakcjach.

Następnym krokiem było zbadanie wpływu modyfikacji m³C, m¹A, m¹G oraz m³T na wykrywany poziom tRF i sdRNA w bibliotekach rancRNA. To umożliwiło wyróżnienie 1231 tRF i 456 sdRNA w bibliotekach AlkB+ oraz 954 tRF i 493 sdRNA w bibliotekach AlkB-. Wykazano niejednorodny wpływ białek AlkB/AlkB-D135S na

poszczególne rancRNA. Porównanie wyników sekwencjonowania standardowego z wynikami uzyskanymi po zastosowaniu białek AlkB/AlkB-D135S, umożliwia rzetelną ocenę efektywności zastosowania demetylacji RNA w wykrywaniu rancRNA asocjujących z rybosomami.

Wyniki prezentowane w niniejszej rozprawie doktorskiej zostały opublikowane w jednym recenzowanym artykule naukowym.

ABSTRACT

Non-coding RNAs play a crucial role in the regulation of gene expression at multiple stages of cell life. In 2012, a novel mechanism of protein biosynthesis regulation was discovered, involving direct binding of small RNAs to ribosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. These small RNAs, termed rancRNAs (ribosome-associated noncoding RNAs), are generated under stress conditions through the cleavage of known noncoding RNAs such as snoRNA, rRNA, and tRNA.

The aim of the studies undertaken in this dissertation was to deepen the understanding of rancRNAs, with a particular focus on two classes of rancRNAs: tRFs (tRNA-derived fragments) and sdRNAs (snoRNA-derived RNAs). The dissertation analyzed the interactions of tRFs and sdRNAs with ribosomal fractions in *S. cerevisiae*. To investigate the impact of modifications, present in rancRNAs on their accumulation levels, AlkB/AlkB-D135S proteins were utilized.

In the first stage of the study, we focused on identifying the broadest possible spectrum of rancRNAs interacting with S. cerevisiae ribosomes under moderate abiotic stress conditions using high-throughput sequencing. Inilially, yeast was cultured in three conditions: optimal (control) and two stress conditions where the highest ribosome heterogeneity was observed, i.e., hyperosmotic shock and sugar starvation. To "freeze" the translation machinery, cells were incubated with cycloheximide, an inhibitor of protein biosynthesis in eukaryotic organisms, and then lysed under low temperature protective conditions. Lysates were subjected to ultracentrifugation in a sucrose gradient (polysome profiling), during which three ribosomal fractions were obtained: polysomes, monosomes, subunits, and one non-ribosomal fraction (free RNA). RNA was isolated from each fraction, and then size selection was performed using polyacrylamide gel electrophoresis and subsequent elution to obtain short RNAs of approximately 20-50 nt in length. Short RNAs were divided into two fractions, one of which was subjected to demethylation using tRNA demethylases AlkB (the AlkB enzyme was produced in a bacterial expression system). The prepared RNA was qualitatively and quantitatively assessed using capillary electrophoresis and then subjected to high-throughput sequencing on the Illumina platform. A total of 48 rancRNA sequencing libraries were prepared (rancRNA-seq): 2 biological replicates x 4 fractions from the polysome profile x 3 yeast culture conditions x 2 demethylation conditions = 48 cDNA libraries. Subsequently, a standard bioinformatic analysis of the sequencing results was performed. This allowed us to identify 2028 different tRFs and 961 different sdRNAs. In the next stage, we investigated whether stress affects the association of tRFs and sdRNAs with ribosomal fractions: ribosomal subunits, monosomes, and polysomes. A detailed analysis of ribosomal fractions under abiotic stress compared to optimal conditions enabled us to demonstrate changes in the accumulation of tRFs and sdRNAs in individual fractions.

The next step involved investigating the impact of m^3C , m^1A , m^1G , and m^3T modifications on the detected levels of tRFs and sdRNAs in RNA libraries. This allowed for the identification of 1231 tRFs and 456 sdRNAs in AlkB+ libraries and 954 tRFs and 493 sdRNAs in AlkB- libraries. A heterogeneous effect of AlkB/AlkB-D135S proteins on individual rancRNAs was demonstrated.

The results presented in this doctoral dissertation have been published in one peerreviewed scientific article.

1. Wprowadzenie

1.1. Historia odkrycia rybosomów oraz rancRNA

W 1955 roku George Palade, wykorzystując mikroskopię elektronową, odkrył w cytoplazmie nieznane wcześniej struktury [1]. Zaobserwował zarówno wolne cząstki w cytoplazmie, jak i te związane z retikulum endoplazmatycznym. Za swoje odkrycie badacz otrzymał w 1974 roku Nagrodę Nobla. Początkowo odkryte struktury określano mianem "cząsteczek mikrosomalnych". Badania wykazały, że są one zbudowane z RNA i białek oraz znajdują się w miejscach komórki, gdzie zachodzi biosynteza białek [2]. W 1958 roku zaproponowano dla nich nową nazwę: rybosomy. Przełomowym odkryciem było zaobserwowanie w 1958 roku przez Paula Zamecnika i Mahlona Hoaglanda transportujących RNA (tRNA), czyli pierwszych RNA nie kodujących białek [3]. Kolejne niekodujące RNA, małe jąderkowe RNA (snoRNA), odkryto dopiero w 1968 roku [4]. Termin "snoRNA" został wprowadzony w 1982 roku [5].

Pomimo, że proces hydrolizy tRNA i snoRNA obserwowano już w latach 70. ubiegłego wieku [6]–[8], dopiero w XXI w. odkryto możliwe funkcje krótkich RNA pochodzących tRNA (tRF) i snoRNA (sdRNA). Odkrycie to ujawniło niezwykle złożony charakter procesu biosyntezy białka. W 2008 roku wykazano, że ludzki snoRNA ACA45 może być cięty przez enzym Dicer podobnie jak mikroRNA, wiązać się z białkami Ago i uczestniczyć w post-transkrypcyjnym wyciszaniu genów [9]. Rok później odkryto, że fragmenty tRNA, takie jak tRF-1001, ulegają nadekspresji w wielu liniach komórkowych i odgrywają istotną rolę w regulacji proliferacji komórkowej [10].

U drożdży Saccharomyces cerevisiale wykryto krótkie RNA asocjujące z rybosomami (rancRNA) [5] oraz powiązano ich obecność z koniecznością istnienia nowego mechanizmu kontroli translacji poprzez asocjację RNA z rybosomami. Do rancRNA należą krótkie RNA będące produktami przetwarzania: tRNA, rRNA, mRNA i Jako pierwszy rancRNA opisany został krótki, snoRNA. 18-nukleotydowy rancRNA 18, powstający z mRNA genu TRM10, który oddziałuje z rybosomami 80S drożdży S. cerevisiae hodowanych w optymalnych warunkach wzrostu [11]. Pod wpływem stresu hiperosmotycznego asocjojuje z aktywnymi translacyjnie polisomami oraz obniża poziom translacji. Kolejne istotne odkrycie dotyczące rancRNA powstało w badaniach nad Escherichia coli, wykryto tam przetwarzanie dojrzałego 16S rRNA do fragmentu ok. 80 nt długości [12]. Wspomniany fragment 16S powstaje wyłącznie podczas fazy stacjonarnej i łączy się z małą podjednostką rybosomową 30S. Przyłączenie tego rancRNA do rybosomów skutkuje wyraźnym zmniejszeniem aktywności translacyjnej. 5'tRF pochodzący z tRNA^{Wal} u Haloferax volcanii jest przetwarzany podczas stresu wysokiego pH, a jego miejscem wiązania jest mała podjednostka rybosomu [13]. Skutkuje to wyparciem mRNA z kompleksu inicjacyjnego oraz globalnym zmniejszeniem translacji in vivo oraz in vitro. Inne badania wykazały, że fragmenty tRNA moga mieć stymulujący wpływ na synteze białka [14]. Podczas regeneracji po stresie głodu u Trypanosoma brucei, 3' połówki tRNA^{Thr} wiążą się z rybosomami i polisomami stymulując tym samym translację poprzez ułatwienie ładowania mRNA do rybosomu. Bakteryjny tmRNA (ang. transfer messenger RNA), przypominający tRNA oraz mRNA, jest cięty na końcu 5' przez RNazę P. Posiada on również modyfikacje charakterystyczne dla tRNA, poprzez co ulega amonoacylacji alaniną oraz jest wiązany do czynnka translacyjego EF-Tu, z którym to łączy się z rybosomem [15]–[17]. Środkowa część tmRNA koduje krótki peptyd co umożliwia działanie jako mRNA [18]. Cechy tRNA umożliwiają mu dostęp do rybosomu i wiązanie w miejscu A, co skutkuje syntezą krótkiego peptydu kodowanego w

środkowej cześci tmRNA. Dzieki tym właściwościom następuje recykling zatrzymanych na mRNA rybosomów oraz znakowanie do degradacji nieprawidłowego białka [19]. W pracach wykorzystujących S. cerevisiae grupa prof. Kamilli Grzywacz wykazała, że oddziałujące z rybosomami tRF regulują proces translacji na jego przygotowawczym etapie, tworząc trójskładnikowy wczesnym, kompleks tDR/rybosom/aminoacylaza tRNA [20]. Wykazano również, że asocjacja tRF/rybosom w S. cerevisiae jest ściśle regulowana przez zróżnicowane warunki stresowe [21]. W pracy, której jestem współautorem, wykazano, oddziaływania pomiędzy rybosomami a sdRNA inhibują aktywność translacyjną w warunkach optymalnych nie tylko u drożdży, ale również u zarodków pszenicy, co sugeruje istnienie zachowanego ewolucyjnie mechanizmu regulacji tranlacji przez sdRNA [22].

1.2. Krótkie RNA powstające z tRNA

1.2.1. Budowa tRNA

tRNA to niezwykle ważna cząsteczka, która odgrywa kluczową rolę w produkcji białek. Jest jak tłumacz, który przekłada informacje zawarte w genach na sekwencję aminokwasów tworzących białka. Cząsteczki tRNA mają charakterystyczny kształt przypominający liść koniczyny [23]. Ten kształt powstaje dzięki specyficznemu ułożeniu krótkich odcinków RNA. W tej strukturze znajdują się ważne regiony:

- **Pętla D (DHU):** To miejsce rozpoznawane przez enzymy, które dołączają do tRNA odpowiedni aminokwas [24].
- **Pętla antykodonowa:** Zawiera sekwencję, która dokładnie pasuje do odpowiedniego fragmentu informacji genetycznej (kodonu) na mRNA. Dzięki temu tRNA może dostarczyć właściwy aminokwas w odpowiednie miejsce podczas syntezy białka [24].
- **Pętla zmienna:** Ta część tRNA może się różnić między różnymi organizmami.
- Pętla TΨC: To miejsce rozpoznawane przez inne cząsteczki biorące udział w produkcji białka. Pomaga ona tRNA przyłączyć się do rybosomu – komórkowej fabryki białek.
- **Ramię akceptorowe:** Na końcu 3' tRNA znajduje się sekwencja CCA, do której przyłączany jest konkretny aminokwas, który następnie zostanie wbudowany w powstające białko [25].

tRNA pełni rolę adaptera molekularnego, umożliwiając proces translacji, czyli przekształcenie informacji genetycznej zakodowanej w mRNA na sekwencję aminokwasów w białku. Już pierwsze badania nad strukturą tRNA wykazały obecność licznych modyfikacji nukleozydów [26]. Obecnie znanych jest ponad 90 różnych typów tych modyfikacji [27], które są niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania tRNA. Brak lub nieprawidłowy przebieg modyfikacji może prowadzić do błędnego załadowania tRNA niewłaściwym aminokwasem, co z kolei skutkuje błędną translacją kodonów mRNA i potencjalnie poważnymi konsekwencjami dla komórki.

Modyfikacje nukleotydów w tRNA poszerzają zakres sekwencji zdolnych do przyjęcia tej charakterystycznej konformacji [28]. Co więcej, profil modyfikacji tRNA jest dynamiczny i często podlega regulacji w odpowiedzi na różne bodźce środowiskowe [29], [30]. Modyfikacje nukleotydów odgrywają kluczową rolę w prawidłowym

funkcjonowaniu tRNA [31]. Szczególnie istotne są modyfikacje w obrębie i w pobliżu pętli antykodonowej, które wpływają zarówno na dokładność procesu translacji, jak i na tempo wzrostu komórki [32]. Z kolei modyfikacje w innych regionach cząsteczki tRNA są związane z jej stabilnością i prawidłowym formowaniem [33].

1.2.2. Metylacje tRNA

W cząsteczkach tRNA występuje ponad 50 różnych metylacji nukleozydów [34], z których poniżej przedstawię te, które mają wpływ na powstawanie i/lub funkcjonowanie tRF (Rys.1).

m^1G

Metylacja pozycji N1 guaniny (m¹G) jest modyfikacją posttranskrypcyjną wysoce konserwowaną ewolucyjnie, obecną we wszystkich domenach życia. U eukariontów bezpośrednim donorem grupy metylowej jest S-adenozylometionina (SAM), której przekształcenie w S-adenozylo-L-homocysteinę (SAH) towarzyszy metylacji nukleotydu [35]. Mutacje prowadzące do utraty m¹G37 powodują obniżenie tempa zużycia tlenu, co sugeruje zaburzenia w syntezie białek mitochondrialnych, potencjalnie związane ze zmianą ramki odczytu [36]. Wyniki badań wskazują, że wspomniana metylacja jest niezbędna zarówno dla bakterii, jak i drożdży, gdzie odgrywa kluczową rolę w prawidłowym wzroście komórkowym [32]. Homolog ludzkiej metylotransferazy tRNA 10 A (TRMT10A) wytwarza N1-metyloguanozynę (m¹G) w pozycji 9 u 17 różnych izoakceptorów tRNA, w tym tRNA^{GIn}, tRNA^{Arg} i tRNA^{iMet} [37], a niedobór m¹G9 promuje gromadzenie się tRF-5 z tRNA^{GIn} w komórkach β wysp trzustkowych [38].

mpG

Metylacja 5'monofosforanu (mpG) tRNA^{His} przez fosfometylotransferazę BCDIN3D hamuje jego fragmentację do tRF-3s [39], [40].

m¹A

Metylacja m¹A58 jest niezbędna do utrzymania odpowiedniej ilości inicjatorowego tRNA^{Met} w komórkach *S. cerevisiae*. Mutacje w tym rejonie uniemożliwiają przyłączenie SAM do tRNA^{Met}, co prowadzi do zaburzenia metylacji i w konsekwencji do zahamowania syntezy białek oraz śmierci komórki [41]. U ludzi mutacja w pozycji m¹A58 została wykorzystana jako narzędzie do precyzyjnej manipulacji replikacją poprzez wirusa HIV-1. Zmiana ta wpływa na interakcje między wirusowym RNA a komórkowymi czynnikami translacji, umożliwiając efektywne wytwarzanie nowych cząstek wirusowych [42]. Dioksygenazy ALKBH1 i ALKBH3 mogą demetylować tRNA w pozycji m¹A58, zwiększając w ten sposób hydrolizę tRNA przez angiogeninę i promując akumulację połówek tRNA [43], [44]. m¹A58, który jest wprowadzany przez kompleks metylotransferazy tRNA TRMT6–TRMT61A m¹A, jest szeroko spotykany w niemal wszystkich tRNA u eukariotów [45], [46].

Nm

2'-O-metylacja ludzkiego elongatora tRNA^{Met}CAU w trzeciej pozycji antykodonu C34 kierowana przez specyficzne dla ciała Cajala małe jądrowe RNA C/D 97 (SNORD97) zapobiega cięciu specyficznemu dla miejsca przez angiogeninę [47]. Podobnie, linie komórkowe raka piersi pozbawione katalizowanego przez TRMT13 Nm w pozycji 4 gromadzą połówki 5' tRNA^{Gly}CCC [48].

hm⁵C

Utlenianie m⁵C do 5-hydroksymetylocytozyny (hm⁵C) przez dioksygenazę metylocytozyny TET2 zwiększa poziomy 3' tRF i zmniejsza poziomy tRF-5 [49], co jest zgodne z aktywnością enzymatyczną TET2 i NSUN2.

m⁵C

Metylotransferazy DNMT2 (białko podobne do DNA (cytozyny-5)-metylotransferazy 2; znane również jako TRDMT1) i NSUN2 (metylotransferaza RNA wprowadzająca 5metylocytozynę do tRNA) katalizują metylację cytozyny do m⁵C, co silnie wpływa na biogenezę tRF [50], [51]. DNMT2 specyficznie metyluje C38 tRNA^{Asp}, tRNA^{Gly} i tRNA^{Wal} [51]–[53], podczas gdy NSUN2 metyluje C48, C49 i C50 w wielu tRNA [9], [50]. Modyfikacja m⁵C38 za pośrednictwem DNMT2 w tRNA^{Asp}, tRNA^{Gly} i tRNA^{Wal} chroni je przed hydrolizą i ogranicza powstawanie 5' tRF po szoku cieplnym u muszek owocowych [51], [54] oraz w komórkach hematopoetycznych i plemnikowych myszy [55], [56]. Utrata NSUN2 zwiększa przecinanie tRNA za pośrednictwem angiogeniny, co powoduje gromadzenie się tRF-5 w neuronach [9]. Co godne uwagi, wyczerpanie NSUN2 zmienia poziomy tRF w odpowiedzi na stres, co prowadzi do upośledzenia regulacji syntezy białek [57].

mcm⁵S²U

W *S. cerevisiae* 5-metoksykarbonylometylo-2-tiourydyna (mcm5s²U) katalizowana przez Trm9 w pozycji trzeciej pozycji antykodonu urydyny 34 (U34) chroni przed cięciem tRNA przez zymocynę [58].

Podsumowując, specyficzne modyfikacje kierują powstawaniem i funkcjonowaniem różnych tRF podczas regulacji ekspresji genów, odpowiedzi na stres oraz innych procesów komórkowych [59]. Niestety, dotychczasowe metody badawcze pozwoliły na analizę tylko niewielkiej części tych modyfikacji. Chociaż pojawiły się nowe techniki badawcze takie jak sekwencjonowanie nowej generacji czy też sekwencjonowanie nanoporowe [60], [61] dokładne zbadanie dynamiki modyfikacji tRNA u bardziej złożonych organizmów wciąż stanowi duże wyzwanie [62].

Co istotne dla tej pracy doktorskiej, wykazano, że kombinacje modyfikacji potranskrypcyjnych stanowią wyzwanie dla wykrywania i oceny tRF, natomiast usunięcie tych modyfikacji jest wymagane do dokładnej oceny ilości tRF [33], [63].



Rys. 1 Modyfikacje tRNA zaangażowane w biogenezę tRF. Na strukturze tRNA oznaczono pozycje w których mają miejsce modyfikacje.

1.2.3. Klasyfikacja tRF

Krótkie RNA powstające z tRNA (tdR - ang. *tRNA-derived RNAs*, tRF - ang. *tRNA-derived fragments*, tsRNAs - ang. *tRNA-derived small RNAs*) stanowią heterogenną grupę cząsteczek, powstających w wyniku przetwarzania lub degradacji prekursorów lub dojrzałych tRNA (Rys. 2).

W zależności od miejsca cięcia i długości, tRF według obecnych standardów dzieli się na kilka kategorii, takich jak tRF-5, tRF-3, 5' oraz 3' połówki, tRF-1, wewnętrzne tRF oraz inne tRF [64], [65]. Podział ten pozwala na lepsze zrozumienie różnorodnych funkcji biologicznych tych cząsteczek. Chociaż pierwotnie klasyfikację opierano głównie na długości cząsteczek, to obecnie wiadomo, że pozycja cięcia w prekursorze lub dojrzałym tRNA jest kluczowym czynnikiem determinującym właściwości funkcjonalne poszczególnych tRF.



Rys.2 Klasyfikacja typów tRF. tRF-5 cząsteczki wytwarzane przez angiogeninę, Dicer i inne nieznane RNazy. Pochodzą z końca 5' dojrzałego tRNA, mogą być rozciągnięte do pętli D lub trzonu antykodonu. **tRF-3** cząsteczki pochodzące z końca 3'CCA dojrzałego tRNA. **tRNA połówki** połówki 5' i 3' są generowane przez cięte przez angiogeninę i inne nieznane RNazy w pętli antykodonowej dojrzałych tRNA. **tRF-1** są wytwarzane przez RNazę Z i pochodzą z odcinka 3' końca prekursorowych tRNA zawierających sygnał terminacji poli(U) dla polimerazy RNA III. **Wewnętrzne tRF** wytwarzane przez angiogeninę i Dicer. Obejmują region pętli antykodonu tRNA bez typowych sekwencji 5' i 3' końców. **Inne tRF** grupa zawierająca tRF z niezidentyfikowanymi annotacjami. Niebieskim kolorem oznaczono rejon od początku 5' do pętli antykodonu. Żółtym kolorem oznaczono antykodon. Szarym kolorem oznaczono intron. Czerwonym kolorem oznaczono rejon od pętli antykodonu do końca 3'.

tRF-5 powstają z 5' końca dojrzałego tRNA i mogą kończyć się aż w pętli antykodonowej. W zależności od długości, wyróżniamy: tRF-5a i tRF-5b, które powstają przez cięcie tRNA w ramieniu dihydrourydynowym (D) oraz tRF-5c obejmujące również ramię antykodonowe, bez pętli (Rys.2). Z kolei tRF-3 powstają z 3' końca dojrzałego tRNA, charakteryzującego się sekwencją CCA i dzielą się na tRF-3a (18nt) oraz tRF-3b (22nt) [66] (Rys.2). 5' oraz 3' połówki tRNA zawierają grupy krótkich RNA powstałych na skutek cięcia w pętli antykodonu dojrzałych tRNA w warunkach fizjologicznych oraz stresowych (Rys.2). Jeśli połówki tRNA powstają w warunkach stresowych są również określane jako tiRNAs (ang. termed stress-induced RNAs) [67]. tRF-1 powstają z 3' regionu niekodującego prekursorów tRNA. Ich 5' koniec powstaje w wyniku cięcia RNazy Z podczas dojrzewania tRNA, a 3' koniec zawiera charakterystyczny ogon poli(A) będący sygnałem zakończenia transkrypcji przez polimerazę RNA III [68], [69] (Rys.2). Wewnętrzne tRF to heterogeniczna grupy tRF pochodzących z rejonu pętli antykodonowej dojrzałych tRNA [70] (Rys.2). Istnieje też grupa tRF określanych jako "inne", nie przypisanych do żadnej z wcześniej opisanych kategorii (Rys.2).

1.2.4. Biogeneza tRF

Biogeneza tRF jest procesem złożonym, w którym uczestniczy wiele różnych enzymów. Chociaż pełna charakterystyka szlaków prowadzących do powstania tRF pozostaje przedmiotem badań, wiadomo, że kluczową rolę odgrywają specyficzne endonukleazy oraz enzymy związane z dojrzewaniem tRNA i przetwarzaniem miRNA.

1.2.4.1. Biogeneza tRF zależna od angiogeniny

Angiogenina, czyli rybonukeaza 5 (RNaza 5) to enzym specyficzny dla kręgowców [71]. Zazwyczaj znajduje się w jądrze komórkowym i jest tam unieruchomiona przez jej bezpośredni inhibitor RNH1. Jednak w sytuacjach stresowych komórka uwalnia angiogeninę, prawdopodobnie poprzez fosforylację kinazy C i kinaz zależnych od cykliny (ang. *cyclin-dependent kinases*, CDKs), co prowadzi do jej aktywacji. W sytuacjach stresowych komórki wykorzystują angiogeninę do cięcia tRNA, co skutkuje tworzeniem tiRNA [67], [72], [73]. Chociaż dokładny mechanizm, który pozwala angiogeninie rozpoznać, które tRNA ma przeciąć, nie jest jeszcze w pełni poznany, wiadomo, że obecność niektórych modyfikacji chemicznych w tRNA jak np. metylacji, może hamować działanie tego enzymu, o czym pisałam w rozdziale 1.2.2. [9], [47], [50], [51]. Oprócz pętli antykodonowej, enzym angiogenina potrafi przecinać tRNA w pętli T ψ C. W wyniku tego powstają tRF-3s, należące do kategorii tRF-3a [74].

U drożdży istnieje podobny proces do działania angiogeniny, który jest katalizowany przez drożdżową endonukleazę Rny1, która należy do rodziny T(2) RNaz, został on opisany w warunkach stresu oksydacyjnego [75].

Warto podkreślić, że połówki tRNA mogą powstawać nawet jeśli angiogenina jest nieobecna, co sugeruje, że w komórce istnieją jeszcze inne enzymy zdolne do tego typu cięcia tRNA [76].

1.2.4.2. Biogeneza tRF zależna od Dicer

Dicer, enzym kluczowy dla powstawania mikroRNA, odgrywa również istotną rolę w biogenezie tRF [77]. Badania wskazują, że Dicer uczestniczy zarówno w produkcji tRF-5a, jak i tRF-3a w różnych typach komórek [66], [78], [79]. Te odkrycia sugerują, że szlaki biogenetyczne miRNA i tRF mogą być ze sobą powiązane, co może być istotne dla zrozumienia złożonych mechanizmów translacyjnych u wyższych eukariontów [59].

1.2.4.3. Biogeneza tRF zależna od innych endonukleaz RNA

Powstawanie tRF jest bardziej złożonym procesem niż początkowo sądzono. Nawet w przypadku braku niektórych kluczowych enzymów, takich jak angiogenina i Dicer, tRF nadal powstają [66], [76]. Sugeruje to udział dodatkowych RNaz w przetwarzaniu tRNA do tRF. Na przykład, tRF-1 są wytwarzane przez enzymy ELAC2 lub RNazę Z poprzez wycięcie fragmentów RNA z prekursorów tRNA, co jest niezbędne do prawidłowego funkcjonowania tRF [68]. W odpowiedzi na stresy takie jak infekcja fagowa czy działanie rybotoksyn, bakterie i drożdże wykorzystują dodatkowe mechanizmy regulacyjne, w tym cięcie tRNA w pętli antykodonu, co wpływa na ekspresję genów [80], [81]. W ludzkich komórkach dwuniciowe RNA powoduje cięcie tRNA^{His}, tRNA^{Pro} oraz tRNA^{Gln} poprzez aktywację inhibicji translacji przez endonukleazę RNazę L. Rnaza 1 tnie uwolnione pre-tRNA w przestrzeni

zewnątrzkomórkowej [82]. W podobny sposób połówki tRNA akumulują się w płynach ustrojowych po przecięciu przez RNazy jak np. RNaza 1. To tworzy rezerwuary ciętych tRNA (ang. *nicked tRNAs*), które mogą ponownie wejść do komórki [83]–[85]. U kręgowców występują białka z rodziny Schlafen (SLFN), ich N-terminalna domena endorybonukleazy jest zaangażowana w przetwarzanie tRNA [86].

1.2.5. Funkcje tRF

1.2.5.1. Interakcje tRF z kluczowymi komponentami aparatu translacyjnego i ich wpływ na ekspresję genów

Najbardziej zachowaną ewolucyjnie funkcją tRF jest regulacja translacji. Wiele badań wskazuje na inhibicję biosyntezy białka przez tRF w odpowiedzi na różne bodźce i stymulanty [39], [87]–[89].

• Inhibicja translacji

Fragmenty pochodzące z tRNA^{Ala} i tRNA^{Cys} mogą wiązać się z kluczowymi białkami odpowiedzialnymi za rozpoczęcie procesu tworzenia białka (eIF4G i eIF4A) [67], [72], [88]. Wspomniana grupa tRF oddziela kluczowy współczynnik inicjacji translacji eukariotycznej 4 γ (EIF4G) i EIF4A z kompleksu eIF4F wiążącego czapeczkę m⁷G mRNA, co zaburza inicjację translacji zależną od czapeczki [88]. Ponadto, 5'-połówki tRNA mogą powodować tworzenie się w komórce tzw. granulek stresowych. Są to skupiska różnych cząsteczek, w tym białek i niedokończonych łańcuchów białkowych, które powstają w odpowiedzi na stres. Granulki stresowe hamują ogólną produkcję białek w komórce [90].

tRF mogą bezpośrednio oddziaływać na rybosomy i spowalniać ich prawidłowe funkcjonowanie. Sobala i współautorzy wykazali, że fragmenty pochodzące z tRNA^{Gln}, hamowały produkcję białek niezależnie od cyrkularyzacji mRNA [30].

tRF mogą również zakłócać proces recyklingu cząsteczek tRNA na różne sposoby, w tym poprzez bezpośrednie oddziaływanie z kluczowymi enzymami i czynnikami zaangażowanymi w ten proces. Na przykład, 5'tRF^{GIn} w komórkach HeLa, może wpływać na dostępność tRNA poprzez inaktywację lub supresję ich prekursorów transkrypcyjnych, co prowadzi do zmniejszenia puli dojrzałych cząsteczek tRNA gotowych go uczestnictwa w translacji. To prowadzi do zmniejszenia dostępności tRNA i spowolnienia produkcji białek [91]. Badania naszego zespołu z 2016 roku wykazały możliwy potencjał regulatorowy podczas procesu biosyntezy białka nie tylko 5'tRF ale również 3'tRF w *S. cerevisiae* [21]. Przedstawione dane wskazują na specyficzne interacje między rybosomami a 5' i 3' tRF^{His} regulujące aktywność translacyjną podczas warunków stresowych wzrostu *S. cerevisiae*. Natomiast w 2018 roku udowodniliśmy, że drożdżowe tRF wpływają na aminoacylację odpowiednich rodzicielskich tRNA oraz globalną aminoacylację, najprawdopodobniej poprzez interakcje z aminoacylo-tRNA syntetazami [20].

• Pobudzanie translacji

Fragmenty pochodzące z tRNA^{Leu}CAG, mogą wiązać się z mRNA kodującym białka budujące rybosomy (np. RPS28 i RPS15). To z kolei prowadzi do zwiększenia produkcji tych białek i w efekcie do wzrostu liczby rybosomów w komórce. Więcej rybosomów oznacza szybszą produkcję wszystkich białek w komórce [92]. Wykazano również, że tRF mogą pobudzać produkcję białek w komórkach będących prekursorami granulocytów i monocytów (GMP) [74].

• Funkcje podobne do miRNA

Odkryto, że niektóre tRF mogą pełnić funkcje podobne do dobrze znanych mikroRNA (miRNA). Obserwacja ta jest niezwykle interesująca, ponieważ otwiera nowe możliwości zrozumienia regulacji procesów komórkowych. Kumar i współautorzy opisali pulę tRF związanych z białkami Ago, które są kluczowymi elementami mechanizmu działania mikroRNA [66]. tRF mogą również modyfikować interakcje między komórką a bakteriami, wykorzystując mechanizmy przypominające działanie mikroRNA [93].

• Oddziaływania z białkami PIWI

Ograniczona liczba badań sugeruje, że tRF mogą uczestniczyć w regulacji ekspresji genów poprzez interakcje z białkami PIWI. Niektóre badania wykazały, że takie oddziaływania prowadzą do wyciszania ekspresji wybranych genów [2], [94], podczas gdy inne wskazują na możliwość wpływania na transkrypcję poprzez zwiększanie lub zmniejszanie intensywności tego procesu [61]. Co ważne, podobny mechanizm zaobserwowano również w liniach komórkowych raka piersi, co sugeruje, że tRF i białka PIWI mogą odgrywać istotną rolę w regulacji ekspresji genów w różnych typach komórek [94].

• Regulacja transkrypcji

U danio rerio wykazano ich udział w regulacji wczesnych etapów rozwoju embrionalnego [95]. W przypadku ludzkiego wirusa białaczki T (HTLV-1) odkryto, że tRF-3 pochodzący z tRNA-Pro, poprzez komplementarność z miejscem wiązania primera, zwiększa aktywność wirusa [61]. Z kolei w komórkach rozrodczych myszy zaobserwowano, że tRF przyczyniają się do represji retrowirusa endogennego myszy typu L (MERVL) [61], [90].

1.2.5.2. Wiązanie tRF do białek moduluje ich funkcje

Oddziaływania tRF z białkami wiążącymi RNA (RBPs) mają istotny wpływ na wiele kluczowych procesów komórkowych. Badania wykazały, że takie interakcje:

- Tłumią stabilność wielu onkogennych transkryptów w komórkach raka piersi w warunkach niedotlenienia, co może hamować rozwój nowotworu [96].
- Indukują oligomeryzację nukleoliny, sprzyjając tworzeniu przerzutów w raku piersi [93].
- Zmniejszają apoptozę w warunkach stresu osmotycznego w komórkach fibroblastów myszy [61]. Ponadto, akumulacja tRF w komórkach ludzkich i zebrafish pozbawionych kinazy CLP1 prowadzi do zwiększonej śmierci komórkowej wywołanej przez białko p53 [90].

1.3. Krótkie RNA powstające ze snoRNA (sdRNA)

1.3.1. Budowa snoRNA

Małe jąderkowe RNA (snoRNA) to małe niekodujące RNA szeroko występujące w jąderkach komórek eukariotycznych, mające długość 60-300 nt [97]. snoRNA są głównie kodowane przez regiony intronowe genów kodujących i niekodujących białek [98]. Dzielimy je na trzy grupy:

• snoRNA typu C/D (Rys. 3A)

Zawierają dwie sekwencje konserwatywne: motyw C oraz motyw D, a ich długość wynosi od 70 do 120nt. Motyw C składa się z nukleotydów: RUGAUGA, natomiast motyw D składa się z nukleotydów: CUGA [99].

• snoRNA typu H/ACA (Rys. 3B)

Ta klasa snoRNA o długości 60-75 nt posiada region nazywany kieszeniami pseudourydylacyjnymi, gdzie reszty urydyny w RNA substratowym ulegają izomeryzacji [100]. snoRNA należące do tej grupy zawierają dwie sekwencje konserwatywne: motyw H oraz ACA zlokalizowane odpowiednio poniżej pierwszej i drugiej struktury spinki [101]. Motyw H składa się z nukleotydów ANANNA, natomiast motyw ACA składa się z nukleotydów ANANNN [102].

• małe jąderkowe RNA specyficzne dla ciałek Cajala (scaRNAs)

Również podlegają klasyfikacji C/D-H/ACA, ale niektóre scaRNA zawierają zarówno strukturę C/D jak i H/ACA [103].



Rys. 3 Struktura snoRNA. (3A) snoRNA klasy C/D. (3B) snoRNA klasy H/ACA. Niebieskimi ramkami oznaczono sekwencje konserwatywne dla uwzględnionych grup snoRNA.

snoRNA wiążą się z docelowymi rRNA poprzez elementy antysensowe [59], [82], [83], [104], [105]. snoRNP czyli kompleksy krótkich RNA z białkami (ang. small nucleolar RNA-protein complexes), przenoszą grupę metylową SAM do grupy 2'hydroksylowej cząsteczek rybozy w docelowym RNA [106]. Pisząc o snoRNA nie można zapomnieć o pseudourvdvlacii. która jest ważna w kontekście przekształcania kodonów nonsensownych w kodony sensowne [25], [31], [107]. Znamy dwa typy pseudourydylacji: niezależny od RNA i zależny od RNA. Zależna od RNA pseudourydylacja wymaga snoRNP z motywem H/ACA [107], [108]. snoRNA są wykorzystywane przez acetylotransferazę NAT10 snoRNA do katalizowania powstawania ac4C na rRNA [109], [110]. Sharma i współautorzy postawili hipoteze, że snoRNA klasy C/D są zaangażowane w acetylację 18S rRNA [111]. Kolejnym procesem, o którym wspomnę jest regulacja alternatywnego splicingu. Niektóre badania wskazują, że liczne snoRNA nie mają miejsca wiązania z rRNA [112]. Falaleeva i współautorzy zidentyfikowali komplementarność miedzy alternatywnie splicingowanymi eksonami genu E2F7 oraz SNORD27. Dodatkowo powiązano niskie

poziomy SNORD27 oraz zmniejszony poziom alternatywnego pomijania eksonów [113].

1.3.2. Klasyfikacja sdRNA

sdRNA (ang. *sno-derived small RNA*) to krótkie RNA, powstające w wyniku precyzyjnego przetwarzania snoRNA. Długość sdRNA zależy od klasy snoRNA, z której pochodzą. sdRNA pochodzące z klasy H/ACA mają zazwyczaj 20-24 nukleotydy, natomiast te z klasy C/D mogą być zarówno krótsze (17-19 nt), jak i dłuższe (powyżej 27 nt) [114], [115]. Badania z wykorzystaniem sekwencjonowania wykazały, że większość sdRNA pochodzących z klasy C/D lokalizuje się w jądrze komórkowym [93]. Natomiast część sdRNA, szczególnie te zaangażowane w proces interferencji RNA, prawdopodobnie działa w cytoplazmie [44].

1.3.3. Biosynteza sdRNA

Szczegółowe mechanizmy biogenezy sdRNA nie są jeszcze w pełni poznane. Jednakże, biorąc pod uwagę przypuszczenia o wspólnym pochodzeniu niektórych miRNA i sdRNA, a także podobny rozkład ich długości [116], [117], można wysnuć hipotezę, że mechanizmy stojące za powstawaniem tych dwóch klas krótkich RNA mogą być podobne.

1.3.3.1. Biogeneza sdRNA zależna od Dicer

Badania nad biogenezą sdRNA wskazują na istotną rolę Dicer w tym procesie. Eksperymenty z komórkami raka jelita grubego pozbawionymi genu Dicer wykazały zmniejszenie poziomu sdRNA, co sugeruje, że Dicer jest niezbędny do ich biogenezy. Z kolei poziom miRNA w takich komórkach wzrastał [118]. Dodatkowe badania wykazały, że również białko DGCR8, które jest kluczowym składnikiem kompleksu przetwarzającego pri-miRNA, może być zaangażowane w biogenezę sdRNA. Usunięcie genu DGCR8 prowadziło do zmniejszenia poziomu większości sdRNA, szczególnie tych pochodzących z klasy H/ACA. Dodatkowo, zaobserwowanie wzrostu poziomu niektórych sdRNA po delecji DGCR8 sugeruje, że białko to może działać jako inhibitor biogenezy niektórych rodzajów sdRNA [114]. Wyniki tych eksperymentów wskazują na złożoność procesów dojrzewania sdRNA oraz na potencjalne interakcje między szlakiem biogenezy miRNA i sdRNA. Wymagają one jednak dalszych badań, aby w pełni zrozumieć mechanizmy regulujące biogenezę tych ważnych regulatorów ekspresji genów.

1.3.3.2. Biogeneza sdRNA zależna od AGO2

AGO2 to niewielkie białko posiadające regiony odpowiedzialne za wiązanie RNA (domeny PAZ oraz MID) oraz domenę PIWI umożliwiającą mu pełnienie funkcji nukleolitycznej [119]. AGO2 jest niezbędne w procesie powstawania miRNA, współpracuje z innymi białkami (DROSHA/DGCR8), tworząc kompleks, odpowiedzialny na dojrzewanie miRNA [120], [121]. AGO2 może mieć bardziej złożone zadania niż wcześniej sądzono. Hock i współautorzy wskazali na fibrylarynę (białko należące do kompleksu snoRNP), jako potencjalny mediator oddziaływań między AGO2 a snoRNA, sugerując że białko AGO2 może być zaangażowane w przetwarzanie snoRNA do sdRNA [122].

1.3.4. Funkcje sdRNA

Istnieją dowody na to, że niektóre miRNA powstają ze snoRNA i pełnią funkcje w szlaku interferencji RNA, który reguluje ekspresje genów na poziomie potranskrypcyjnym. Nić przewodnia takiego miRNA łaczy się z białkiem AGO2, tworzac kompleks RISC (ang. RNA-induced silencing complex). Ten kompleks rozpoznaje i wiąże się z komplementarną sekwencją w docelowym mRNA, co może prowadzić do degradacji mRNA lub zahamowania jego translacji [123]. Badania wykazały, że miR-605, pochodzący ze snoRNA klasy H/ACA jest zaangażowany w szlak zwiazany z białkiem p53, co sugeruje jego udział w regulacji komórkowej [124]. Ponadto, sno-mir-28, pochodzący z prekursora SNORD28, obniża ekspresję genu TAF9B i posiada podwyższony poziom w raku piersi [125]. Jednakże badania Kishore i współautorów nie wykryły interakcji pomiedzy białkiem AGO i sdRNA z klasy C/D, co sugeruje, że nie wszystkie sdRNA uczestniczą w szlaku interferencji RNA [126]. Mimo to, wiele sdRNA z klasy C/D zawiera motywy funkcjonalne charakterystyczne dla snoRNA i może tworzyć kompleksy z białkami [51], [124]. Kishore i współautorzy wykazali, że niektóre sdRNA z klasy C/D mogą regulować splicing receptora serotoniny 2C [127]. Nasze badania z 2019 roku wykazały, że obecność sdRNA we frakcjach rybosomowych wpływa na biosyntezę białek in vivo oraz in vitro w S. cerevisiae, organizmie pozbawionym szlaku mikroRNA [22]. Obecność sdRNA w RNA powiązanych z rybosomami wskazuje na istnienie nowego, innego niż miRNApodobnego mechanizmu regulacji translacji przez sdRNA. W tej samej pracy zaobserwowaliśmy, że drożdżowe sdRNA hamują biosyntezę białek w zarodkach pszenicy, co sugeruje, że mechanizm regulacji translacji przez sdRNA jest ewolucyjnie konserwowany. Zhong i współautorzy wykryli grupę piRNA pochodzącą ze snoRNA w ludzkich pierwotnych komórkach limfocytów-T posiadających białko CD4. Nowoodkryte piRNA oddziaływały z kompleksami TRAMP (główny składnik systemu jakości RNA [128], [129] i egzosomami, co prowadzi do rozkładu pre-mRNA ukierunkowanego na piRNA [130]. Należy też zwrócić uwagę na swoistą ekspresję snoRNA w tkankach w nowotworach litych oraz krwi [131]-[133]. Może to wskazywać na potencjalna rolę w diagnostyce i/lub prognozie różnych typów raka [131], [134]-[137].

1.4. Demetylacja RNA

1.4.1. Białka AlkB i AlkB-D135S

Białko AlkB należy do rozległej nadrodziny oksygenaz zależnych od α -ketoglutaranu i żelaza (II) (2OG-FeII oksygenazy) [138]. Jego produkcja w *Escherichia coli* jest indukowana w odpowiedzi na uszkodzenia wywołane przez czynniki alkilujące i wiąże się z procesem naprawy tych uszkodzeń [139]. Enzymy z tej rodziny katalizują oksydacyjną demetylację alkilowanych zasad azotowych w jednoniciowym i dwuniciowym DNA oraz RNA, usuwając w ten sposób modyfikacje takie jak 3-metylocytozyna (m³C), 1-metyloadenina (m¹A) [140], 1-metyloguanina (m¹G) i 3-metylotymina (m³T) [141].

Badania strukturalne wykazały, że pozytywnie naładowane substraty są preferencyjnie wiązane w centrum aktywnym enzymu poprzez oddziaływania elektrostatyczne z ujemnie naładowaną grupą karboksylową kwasu asparaginowego w pozycji 135 (D135). Na tej podstawie sformułowano przypuszczenie, że mutacja w pozycji D135 mogłaby zwiększyć powinowactwo enzymu do m¹G i tym samym poprawić wydajność demetylacji. W celu potwierdzenia tej hipotezy przeprowadzono mutację, zastępując

kwas asparaginowy seryną. Otrzymany wariant enzymu, nazwany AlkB-D135S, zachował kluczowe wiązanie wodorowe z substratem, umożliwiając efektywne wiązanie m1G w centrum aktywnym [63].

Opisane mechanizmy naprawy uszkodzeń DNA i RNA za pośrednictwem białka AlkB oraz jego homologów są niezwykle istotne, ponieważ umożliwiają przywrócenie prawidłowej struktury kwasów nukleinowych bez konieczności przecinania nici polinukleotydowej [65].

Białka AlkB, a zwłaszcza mutant AlkB-D135S, wykazują zdolność do demetylacji RNA. Cozen i wsp. jako pierwsi opisali korzystny wpływ tej demetylacji na wydajność sekwencjonowania tRNA, uzyskując ponad trzykrotny wzrost proporcji odczytów tRNA do innych odczytów w bibliotekach [33]. Badania te zainspirowały innych naukowców do dalszych analiz, potwierdzających skuteczność tej metody i sugerujących potencjalne zastosowania w sekwencjonowaniu mRNA [105]. Najnowsze prace koncentrują się na identyfikacji nowych mutantów AlkB o jeszcze większej aktywności demetylacyjnej, otwierając nowe perspektywy w badaniach krótkich RNA [142].

1.4.2. Mechanizm demetylacji

Demetylacja oksydacyjna katalizowana przez białko AlkB, prowadząca do usunięcia modyfikacji m¹A i m³C, przebiega w dwóch głównych etapach:

1. Aktywacja tlenu molekularnego: W pierwszym etapie białko AlkB wiąże kwas α -ketoglutarowy oraz jon żelaza (II). Związany jon żelaza (II) aktywuje cząsteczkę tlenu, co prowadzi do przekształcenia kwasu α -ketoglutarowego w bursztynian oraz powstania wiązania Fe^{IV}==O.

2. Oksydacja substratu: Kompleks Fe^{IV}==O odciąga atom wodoru z grupy metylowej substratu (m1A lub m3C), tworząc rodnik węglowy i wiązanie Fe^{III}—OH. Następnie, grupa hydroksylowa (-OH) związana z żelazem atakuje rodnik węglowy, prowadząc do powstania hydroksymetylowego produktu pośredniego. Ten nietrwały związek ulega dalszej przemianie, prowadząc do uwolnienia demetylowanego produktu końcowego. W wyniku reakcji, oprócz demetylowanego produktu, uwalniany jest również dwutlenek węgla, bursztynian i formaldehyd [143].

2. Cel i Uzasadnienie Podjętej Tematyki Pracy

Celem pracy jest identyfikacja i charakterystyka krótkich RNA asocjujących z rybosomami (rancRNA) u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w warunkach optymalnych, łagodnym stresie hiperosmotycznym oraz stresie głodu cukrowego, ze szczególnym uwzględnieniem tRF (ktrótkie RNA pochodzące z tRNA) i sdRNA (krótkie RNA pochodzące ze snoRNA).

Cele szczegółowe obejmują:

- 1) Określenie ilości i typów rancRNA oddziałujących z podjednostkami rybosomalnymi, monosomami i polisomami.
- 2) Zbadanie wpływu metylacji RNA na ilość i typ wykrywanych rancRNA.
- 3) Określenie możliwej funkcji najczęściej wykrywanych tRF oraz sdRNA.

Uzasadnienie podjęcia tematyki badawczej:

Od czasu odkrycia krótkich RNA pochodzących z tRNA (tRF) oraz snoRNA (sdRNA), liczba znanych rancRNA znacząco wzrosła. Choć wiedza na temat roli tych cząsteczek w prawidłowym funkcjonowaniu komórki jest coraz lepiej poznana, związek między rancRNA a poszczególnymi elementami maszynerii translacyjnej pozostaje słabo zbadany. Biorąc pod uwagę kluczową rolę tRF i sdRNA w procesach życiowych, szczegółowa analiza ich asocjacji z podjednostkami rybosomalnymi, monosomami i polisomami jest niezwykle istotna. Zrozumienie tych interakcji może przyczynić się do lepszego poznania mechanizmów molekularnych leżących u podstaw chorób związanych z zaburzeniami funkcji rybosomów.

W naszych wcześniejszych badaniach [22] skupiliśmy się na rancRNA związanych z rybosomami. Jednakże, ze względu na ograniczenia metodologiczne, nie byliśmy w stanie przeprowadzić szczegółowej analizy asocjacji rancRNA z poszczególnymi komponentami rybosomu. Niniejsza praca doktorska ma na celu wypełnienie tej luki badawczej poprzez zastosowanie nowoczesnych technik sekwencjonowania wysokoprzepustowego do kompleksowej analizy asocjacji rancRNA z podjednostkami rybosomalnymi, monosomami i polisomami.

Inspiracją do przeprowadzenia eksperymentów demetylacji RNA były wyniki badań Arm-seq [33], w których wykazano, że zastosowanie białek AlkB i AlkB-D135S prowadzi do znaczącego wzrostu liczby wykrywanych krótkich RNA pochodzących z tRNA. Autorzy tych badań sugerują, że modyfikacje struktury tRNA, takie jak metylacje, mogą utrudniać ich sekwencjonowanie, prowadząc do niedoszacowania rzeczywistej różnorodności krótkich niekodujących RNA (ncRNA). W związku z powyższym, zdecydowaliśmy się porównać wyniki sekwencjonowania standardowego z wynikami uzyskanymi po zastosowaniu białek AlkB/AlkB-D135S, aby ocenić, czy ta metoda pozwoli nam na bardziej kompleksową identyfikację rancRNA związanych z rybosomami.

3. Materiały i metody

3.1. Aparatura

- Cieplarka do hodowli drożdży Excella E24 Incubator Shaker New Brunswick Scientific
- Cieplarka do hodowli bakterii Mini Incubator Labnet
- Spektofotometr JENWAY seria 74 UV/VIS 198-1000nm
- Wirówka Hettich ROTINA 380R
- Wirówka Centrifuge 5810 R Eppendorf
- Wytrząsarka o ruchu drgającym Vortex PV-1 Grant-bio Instruments
- Ultrawirówka Beckman Avanti JXN-26 Refrigerated Centrifuge, rotor: Beckman SW41 Ti
- Autoklaw Prestige Medical, No. 210004
- Komora laminarna BSL1- FASTER S.r.l., FlowFAST V
- Mikroskop OLYMPUS IX73 Inverted Microscope
- Sonikator VCX 130
- Termocykler T-professional Biometra
- Gradienty BioComp Piston Gradient FractionatorTM, program: SW41 LONG SUCR 7-47 wv
- NanoDrop NanoDrop One Microvolume UVVis Spectrophotometer.
- Agilent Agilent 2100 Bioanalyzer
- Wytrząsarka orbitralna Labnet ProBlot Rocker
- Licznik scyntylacyjny *BioTek* Synergy 2
- Wizualizacja żeli G BOX. Chemi XR 5, Syngene
- Transiluminator BLooKTM LED Transilluminator
- Waga analityczna RADWAG PS 1000.R1 RADWAG
- Waga analityczna AS 220.R2 RADWAG
- Aparat do elektroforezy Mini Gel Tank Thermo Fisher Scientific

3.2. Odczynniki oraz gotowe zestawy odczynników

Nazwa odczynnika	Producent, Nr Katalogowy
2-merkaptoetanol	Sigma, MFCD00004890
Agar	BioShop, AGR001
Akrylamid/bis-Akrylamid (37.5:1) Mieszanka wstępna	BioShop, ACR013.200
Aprotynina	BioShop, 9087-70-1
Błękit bromofenolowy	BioShop, BRO777.10
Błękit Coomassie Brilliant	Thermo Scientific Chemicals, 20278
Surowicza albumina wołowa (BSA)	BioShop, 9048-46-8
Chlorek amonu	Sigma, 12125-02-09
Chlorek magnezu	BioShop, MAG510.500
Chlorek potasu	BioShop, POC88.1
Chlorek sodu	BioShop, SOD2.1
Chloroform	Chempur, 67-66-3
Cykloheksymid	BioShop, CYC003
D-(+)-Glukoza	Sigma, 50-99-7
DL-Ditiotreitol	Sigma, 211-627-6
Dimetylosulfotlenek (DMSO)	Invitrogen, D12345
Dodecylosiarczan sodu (SDS)	BioShop, SDS001
Kwas wersenowy (EDTA), sól dwusodowa dwuwodna	BioShop, 6381-92-6
Ekstrakt drożdżowy	BioShop, YEX401

Etanol 70%	Merck, 459836
Etanol 96%	РОСН, 64-17-5
Fosforan trisodowy dwunastowodny	Sigma, 10101-89-0
Glicerol	BioShop, GLY001
Glicyna	BioShop, GLN001.1
Heparyna	BioShop, HPA333
Izopropylo β-D-1-tiogalaktopiranozyd (IPTG)	BioShop, 367-93-1
Koprecypitant GlycoBlue (15 mg/mL)	Thermo Fisher Scientific, AM9516
Kwas L-askorbinowy	BioShop, 0134-03-02
Kwas octowy lodowaty 99,5%	Chempur, 64-19-7
Kwas α-Ketoglutarowy	SIGMA, 328-50-7
Leupeptyna	BioShop, leu001.25
Lizozym z białka jaja kurzego	Sigma, L6876
2-(N-morfolino) kwas etanosulfonowy (MES)	BioShop, 145224-94-8
Metanol	Chempur, 67-56-1
Mocznik	BioShop, 57-13-6
Nadsiarczan amonu	BioShop, AMP001.100
Octan sodu trójwodny	BioShop, 6131-90-4
Octan Trisu	BioShop, TRA222
PageRuler [™] Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific Chemicals, 26619
Pepstatyna A	Bioshop, PEP605.25
Pepton	BioShop, PEP403
Fluorek fenylometylosulfonylowy (PMSF)	BioShop, PMS123.25
Siarczan amonu żelaza (II) sześciowodny	Sigma, 9719
Siarczan kanamycyny	BioShop, 25389-94-0
Siarczan magnezu	BioShop, MAG522.500
Siarczan żelaza (II) siedmiowodny	Merck, 7782-63-0
Sybr™ Safe DNA Gel Stain	Thermo Fisher Scientific, S33102
Czterometyloetylenodiamina (TEMED)	BioShop, TEM001
TriReagent	Molecular Research Center, TR118
2-amino-2-(hydroksymetylo)-1,3-propandiol (TRIS)	BioShop, TRS001
Chlorowodorek tris (Tris-HCl pH7,5)	BioShop, 77-86-1
Tween 20	BioShop, TWN510.500
Woda wolna od nukleaz	Thermo Fisher Scientific, AM9937

Tab.1 Lista najważniejszych odczynników.

Nazwa zestawu	Producent, Nr Katalogowy
1-Methyladenosine (m1A) ELISA Kit	Cell Biolabs, MET-5099
Dynabeads [™] His-Tag Isolation & Pulldown	Invitrogen, 10103D
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent, 5067-1511
Amicon® Ultra-cell 3kkDa MWCO	Milipore, 41104916

Tab.2 Lista najważniejszych gotowych zestawów.

Nazwa	Producent, Nr Katalogowy
RiboLock RNase Inhibitor [40 U/µl]	A&A Biotechnology, 037-25
Lysozyme from chicken egg white	Merck, 12650-88-3
RiboRuler Low Range RNA Ladder, ready-to- use	Thermo Scientific Chemicals, SM1833

Tab. 3 Lista najważniejszych enzymów

3.3. Bufory oraz pożywki wykorzystane w pracy

3.3.1. Bufory

Bufor do przygotowania ekstraktu drożdżowego

- 10mM Tris-HCl pH7,5
- 100mM NaCl
- $\bullet \ 30mM-MgCl_2$
- 200µg/ml heparyna
- 500µg/ml cykloheksimid (CHX) w dimetylosulfotlenku (DMSO)
- 1mM fluorek fenylometylosulfonylu (PMSF)
- $6mM \beta$ -merkaptoetanol
- 1nM pepstatyna A w DMSO
- 10nM leupeptyna
- 10 ng/ml aprotynina

Bufor 2X (50ml)

- 50mM octan trisu pH 7,0
- $12mM MgCl_2$
- $50mM NH_4Cl$
- 1mM DTT

10X TGB (1L)

- 36,28 g Tris
- 144,13 g glicyna
- 10 g laurylosiarczan sodu (SDS)

Bufor do elucji z żelu

- 0,3 M NaOAc
- 1mM EDTA

Bufor użyty do sonikacji bakterii

- 100mM Na₃PO₄ pH 8,0
- 600mM NaCl
- 0,02 % Tween 20
- 1mM PMSF
- 500µg/ml lizozym z białka jaja kurzego

Bufor barwiący (1L)

- 2 g Coomassie Brilliant Blue
- 75 ml kwas octowy 99,5-99,9%
- 500 ml etanol 96%

Bufor odbarwiający (1L)

- 100 ml kwas octowy 99,5-99,9%
- 500 ml metanol

Bufor do demetylacji

- 300mM KCl
- 2mM MgCl2
- $50\mu M (NH_4)_2 Fe(SO_4)_2 * 6H_2O$
- $300\mu M Kwas \alpha$ -ketoglutarowy
- 50mM Bufor MES pH 5
- $50\mu g/ml BSA$
- 2mM kwas L-askorbinowy
- $20ng/\mu L AlkB$
- $\bullet \ 20 ng/\mu L AlkBD135S$

2.3.2. Pożywki

YPD (11) (ang. Yeast extract, Peptone, Dextrose)

- 20 g pepton
- 10 g ekstrakt drożdżowy
- 20 g glukoza
- YPD + Agar (0,4L) 10 g pepton
 - 5 g ekstrakt drożdżowy
 - 15 g agar
 - 10 g glukoza

LB (ang. Luria-Bertrani Medium) (1L) z dodatkiem Kanamycyny

- 10 g pepton
- 5 g ekstrakt drożdżowy
- 5 g NaCl
- 50µg/ml kanamycyna

Pożywka stała LB + Kanamycyna (1L)

- 10 g pepton
- 5 g ekstrakt drożdżowy
- 5 g NaCl
- 12 g agar
- 50µg/ml kanamycyna

Medium SOC (1L) (ang. Super Optimal Medium with catabolic repressor)

- 20 g pepton
- 5 g ekstrakt drożdżowy
- 0,58 g NaCl
- 4,8 g MgSO₄
- $\bullet \ 0,952 \ g-MgCl_2$
- 0,186 g KCl
- 3,603 g Glukoza

3.4. Hodowle drożdżowe oraz bakteryjne

3.4.1. Szczep drożdży

W badaniach wykorzystano drożdże *Saccharomyces cerevisiae*, szczep BY4741 (MAT α ;his3 Δ 1;*leu2\Delta0;ura\Delta0*). Hodowle prowadzono w sterylnych kolbach o objętości 500 ml, zawierających 300 ml pożywki YPD w inkubatorze w 30°C z wytrząsaniem o prędkości 180 rpm, aż do uzyskania fazy logarytmicznego wzrostu (absorbancja przy długości fali 600nm: 0,7 – 0,9).

3.4.1.1. Typy stresów abiotycznych

Kontrola

Odmierzono 300 ml wcześniej przygotowanej hodowli drożdży o docelowej absorpcji. Przelano do sterylnej kolby o objętości 500 ml. Hodowano przez 15 minut w 30°C z wytrząsaniem o prędkości 180 rpm.

Stres głodu cukrowego

Odmierzono 300 ml wcześniej przygotowanej hodowli drożdży o docelowej absorpcji. Przelano do sterylnych falkonów o objętości 50 ml. Wirowano przez 3 min przy prędkości 3260 x g, następnie usunięto supernatant, a osad rozpuszczono w 500 ml pożywki YP - pożywce YPD pozbawionej cukru. Następnie hodowano przez 15 minut w 30°C z wytrząsaniem o prędkości 180 rpm.

Stres hiperosmotyczny

Odmierzono 300 ml wcześniej przygotowanej hodowli drożdży o docelowej absorpcji. Przelano do sterylnej kolby o objętości 500 ml. Dodano 60 ml 5 M roztworu sorbitolu (do stężenia końcowego 1M). Następnie hodowano przez 15 minut w 30°C z wytrząsaniem o prędkości 180 rpm.

Szok ciepła

Odmierzono 300 ml wcześniej przygotowanej hodowli drożdży o docelowej absorpcji. Przelano do sterylnej kolby o objętości 500 ml. Następnie hodowano przez 15 minut w 37°C z wytrząsaniem o prędkości 180 rpm.

Szok zimna

Odmierzono 300 ml wcześniej przygotowanej hodowli drożdży o docelowej absorpcji. Przelano do sterylnej kolby o objętości 500 ml. Następnie hodowano przez 15 minut w 15°C z wytrząsaniem o prędkości 180 rpm.

Wysokie zasolenie

Odmierzono 300 ml wcześniej przygotowanej hodowli drożdży o docelowej absorpcji. Przelano do sterylnej kolby o objętości 500 ml. Dodano roztworu chlorek sodu do stężenia końcowego 1M. Następnie hodowano przez 15 minut w 30°C z wytrząsaniem o prędkości 180 rpm.

Światło UV

Odmierzono 300 ml wcześniej przygotowanej hodowli drożdży o docelowej absorpcji. Przelano do sterylnej kolby o objętości 500 ml. Wystawiano hodowlę na promieniowanie UV (120 J/m²). Następnie hodowano przez 15 minut w 30°C z wytrząsaniem o prędkości 180 rpm.

Warunki anaerobowe

Odmierzono 300 ml wcześniej przygotowanej hodowli drożdży o docelowej absorpcji. Przelano do sterylnej kolby o objętości 300 ml. Kolba została szczelnie owinięta parafilmem. Następnie hodowano przez 15 minut w 30°C bez wytrząsania.

Wysokie pH

Odmierzono 300 ml wcześniej przygotowanej hodowli drożdży o docelowej absorpcji. Przelano do sterylnej kolby o objętości 500 ml. Dodano kwas solny, aby zmienić pH do wartości 7,9. Następnie hodowano przez 15 minut w 30°C z wytrząsaniem o prędkości 180 rpm.

Stres głodu aminokwasowego

Odmierzono 300 ml wcześniej przygotowanej hodowli drożdży o docelowej absorpcji. Przelano do sterylnych falkonów o objętości 50 ml. Wirowano przez 3 min przy prędkości 3260 x g, następnie usunięto supernatant, a osad rozpuszczono w 300 ml pożywki pozbawionej aminokwasów. Następnie hodowano przez 15 minut w 30°C z wytrząsaniem o prędkości 180 rpm.

Stres hipoosmotyczny

Komórki hodowano do fazy środkowej logarytmicznej w YPD uzupełnionym 1M sorbitolu zostały przeniesione do YPD bez sorbitolu. Następnie hodowano przez 15 minut w 30°C z wytrząsaniem o prędkości 180 rpm.

Po 15 minutowej hodowli, próby chłodzono na lodzie, wirowano z prędkością 3260 x g przez 3 min w 4°C, usunięto supernatant, a osad zamrożono w -80°C.

3.4.2. Hodowla komórek kompetentnych Escherichia coli

W badaniach wykorzystano bakterie Escherichia coli szczep K12 JM109.

3.4.2.1. Transformacja metodą szoku cieplnego

Bakterie kompetentne rozmrożono na lodzie i dodano do nich 5-10 ng plazmidu zawierającego DNA kodujące białko AlkB (Rys.3) oraz D135S (Rys.4). Próby inkubowano na lodzie przez 30 min, a następnie umieszczono w termobloku na 30s w 42°C. Po tym czasie schłodzono je na lodzie oraz dodano 250 µl SOC rozgrzanego do temperatury 30°C. Próby inkubowano w 37°C przez 60min z wytrząsaniem 225 rpm. Po zakończonej inkubacji, bakterie posiano na szalkach z pożywką stałą LB z dodatkiem antybiotyku kanamycyny (50 µg/ml). Hodowla była prowadzona przez noc w 37°C, następnie bakterie przechowywano w 4°C.

Created with SnapGene®



Rys. 3 Plazmid wykorzystany do transformacji bakterii *E.coli* zawierający sekwencję kodującą białko AlkB. Źródło: https://www.addgene.org/79050/



Rys.4 Plazmid wykorzystany do transformacji bakterii *E.coli* zawierający sekwencję kodującą białko AlkB-D135S. Żródło: https://www.addgene.org/79051/

3.4.2.2. Nadprodukcja białek w bakteriach

Selekcję komórek bakteryjnych zawierających plazmidy przeprowadzono na podstawie obecności genu markerowego – kodującego enzym inaktywujący kanamycynę. W tym celu za pomocą ezy pobrano pojedynczą kolonię bakteryjną z płytki agarowej i przeniesiono ją do 600 ml płynnej pożywki LB zawierającej antybiotyk kanamycynę. Hodowlę inkubowano w temperaturze 37°C z wytrząsaniem o prędkości 250 rpm do momentu osiągnięcia fazy logarytmicznego wzrostu (OD₆₀₀ 0,6-0,8). Następnie w celu indukcji ekspresji genu docelowego, dodano do hodowli 1mM izopropylo-β-D-tiogalaktozydu (IPTG) i 5 μM siarczanu żelaza (II). Hodowlę inkubowano przez 4h w temperaturze 30°C. Komórki bakteryjne zostały zebrane przez odwirowanie w 4°C przy prędkości 5000 rcf przez 5 min. Po usunięciu supernatantu, komórki zamrożono w temperaturze -20°C.

3.4.2.3. Izolacja białek

Izolację białek AlkB/AlkB-D135S rozpoczęto od rozbicia komórek bakteryjnych metodą sonikacji. Suspensję komórkową poddano 15 cyklom sonikacji po 5 sekund każdy, z przerwami 1 minutowego odpoczynku na lodzie, w celu zapobiegnięcia przegrzaniu próbki. Sonikację prowadzono w buforze do sonikacji. Uzyskany lizat komórkowy odwirowano, aby usunąć nierozpuszczone pozostałości. Następnie do oczyszczania białka wykorzystano chromatografię powinowactwa na nośniku magnetycznym Dynabeads[™] His-Tag. Białka zostały wyizolowane zgodnie z protokołem dołączonym do zestawu Dynabeads[™] His-Tag Isolation & Pulldown – Invitrogen.

3.4.2.3.1. Zagęszczanie białek

Do zagęszczenia białek wykorzystano kolumny Amicon® Ultra Centrifugal Filter, 3 kDa MWCO. Umożliwiło to zatrzymanie na filtrze docelowych białek i jednoczesne usunięcie mniejszych cząsteczek, takich jak sole. Zagęszczenie przeprowadzono zgodnie z protokołem producenta.

3.4.2.3.2. Sprawdzenie czystości białek

Aby sprawdzić czystość białek przygotowano żel poliakrylamidowy z SDS.

Żel rozdzielający:

- 1625 µl 40% 37,5:1 acr/bis
- \bullet 2438 $\mu l-1M$ Tris/HCl pH 8,8
- 65 μ l 10% SDS
- 65 μ l 10% APS
- 4 μ l TEMED
- $\bullet \ 2300 \ \mu l H_2O$

Żel zagęszczający:

- 200 μ l 40% 37,5:1 acr/bis
- 268 µl 1M Tris/HCl pH 6,8
- 22 μ l 10% SDS
- 22 μ l 10% APS
- 4 μ l TEMED
- $1483 \ \mu l H_2O$

Przygotowno żel rozdzielający i wylano go do gotowej kasetki - BoltTM Empty Mini Gel Cassettes (Invitrogen). Na wierzchu wylanego żelu umieszczono 1 ml wody, aby wyrównać poziom żelu. Gdy żel spolimeryzował usunięto wodę i przygotowano żel zagęszczający. Następnie wylano żel do kasetki i poczekano na polimeryzację. Kasetkę umieszczono w aparacie do elektroforezy – Mini Gel Tank, wolne przestrzenie uzupełniono buforem 1XTGB. Do 5 µg białka dodano 1,2 µl 4X obciążacza. Jako markera użyto PageRulerTM Plus Prestained Protein Ladder (ThermoFisher). Przeprowadzono elektroforezę przez 30 min przy stałym natężeniu 200V. Następnie żel wybarwiono w buforze barwiącym przez 1 h. Kolejnym etapem było odbarwianie w buforze odbarwiającym przez około 1,5 h.

Obciążacz 4X

- 40% glicerol
- 0,4% błękit bromofenolowy
- 200 mM Tris-HCL
- 8% SDS
- 400 mM DTT

3.5. Profilowanie polisomowe

Przygotowania rozpoczęto od hodowli drożdży *Saccharomyces cerevisiae* o objętości 300 ml, aż do uzyskania fazy logarytmicznego wzrostu. W tym momencie drożdże w warunkach optymalnych wirowano, usuwano supernatant i osad mrożono, natomiast w przypadku dwóch warunków stresowych aplikowano opisane w rozdziale 3.4.1.1. stresy abiotyczne a następnie wirowano, usuwano supernatant i osad mrożono tak, jak komórki z warunków optymalnych. Drugim istotnym etapem było przygotowanie lizatu komórkowego.

Przygotowanie lizatu komórkowego

Zamrożony osad zawieszono w 1 ml buforu do przygotowania ekstraktu drożdżowego i umieszczono w probówce typu Eppendorf. Wirowano 3 min w 4°C z prędkością 6000 rcf. Następnie usuwano supernatant i ponownie dodawano 500 µl buforu do ekstraktu, 40U inhibitora RNAz oraz 1 ml szklanych kulek o średnicy 400µm. Próbkę poddano homogenizacji przez 8 cykli po 30s z odstępami chłodzenia 30s w lodzie. Do homogenizacji wykorzystano worteks. Kolejnym etapem było przeniesienie ekstraktu do nowych probówek. Probówki zawierające szklane kulki płukano 500 µl buforu do przygotowania ekstraktu, a następnie płyn dodawano do uzyskanego już ekstraktu. Uzyskane próby wirowano przez 10 min w 4°C z prędkością 10000 rcf. Supernatant przeniesiono do nowej probówki i mierzono OD_{600} za pomocą NanoDrop. Tak przygotowany lizat przechowywano przez noc w temperaturze -80°C.

Przygotowanie gradientu sacharozy:

Tego samego dnia co lizat komórkowy wykonano gradienty sacharozy. Przygotowano wagowo-objętościowy gradient sacharozy o stężeniu od 7% do 47%. Gradient przygotowano metodą mieszania stopniowego dwóch roztworów sacharozy o różnym stężeniu wykorzystano do tego celu BioComp Piston Gradient FractionatorTM, program: SW41 LONG SUCR 7-47 wv. Program do uzyskania gradientu charakteryzował się następującymi parametrami: 4:24 min, kąt nachylenia 60°, szybkość 30km/h; 0:53 min, kąt nachylenia 80°, szybkość 0 km/h, całość uzyskano w 2 krokach. Gradient wraz z rotorem przechowywano w chłodni w temperaturze 4°C przez noc.

Wirowanie w gradiencie sacharozy:

Ten etap wykonywano w kolejnym dniu. Na gradient sacharozy nałożono objętość lizatu odpowiadającą 10 jednostkom A260. Wszystkie próby zostały poddane ultrawirowaniu przez 2,5 h przy 39 000 rpm w temperaturze 4°C w rotorze SW41 Ti. Po zakończeniu wirowania, gradient frakcjonowano za pomocą urządzenia Piston Gradient Fractionator firmy Biocomp, który dzieli próbę na podstawie zdefiniowanych parametrów i generuje wykres profilowania polisomowego. Nasze ustawienia uwzględniały zbieranie 24 frakcji przy prędkości 0,3 mm/s przy długości fali 254 nm. Uzyskane frakcje przechowywano w temperaturze -80°C do dalszej analizy. Każdą frakcję zamrażano osobno.

Skład gradientów:

7% sacharoza – 3,5 g sacharoza, 25 ml bufor 2x, 1mM DTT, 0,25 mg/ml Cykloheksimid (CHX) w dimetylosulfotlenku (DMSO)

47% sacharoza – 23,5 g sacharoza, 25 ml – bufor 2x, 1mM DTT, 0,25 mg/ml CHX w DMSO

3.6. Izolacja RNA

Przed izolacją RNA wykonano analizę profili A254 (Rys.7), na tej podstawie wyodrębniono frakcje: wolne RNA, małe podjednostki 40S, duże podjednostki 60S, monosomy 80S, polisomy. W obrebie wyznaczonych frakcji rybosomowych połaczono odpowiadające im próbówki z rozdziału 3.5. W związku z dużą objętością prób, każdą frakcję rybosomową podzielono na kilka próbówek typu Eppendorf po 400 µl każda. Do każdej próbówki dodano 1 ml TriReagent i wymieszano. Próby mrożono w -80°C przez 10 min. Po rozmrożeniu w temperaturze pokojowej, do każdej próbówki dodano 200 µl chloroformu. Próby intensywnie mieszano przez 3 min za pomocą worteksu, następnie wirowano przez 15 min w 4°C 12 000 x g. Górną wodną fazę przeniesiono do nowych próbówek. Do każdej próbki dodano: 2,5 objętości etanolu, 1/10 obj. 3M octanu sodu i 0,5 µl ko-precypitantu Glyco Blue. RNA stracano przez noc w temperaturze -20°C. Kolejnym etapem było wirowanie prób przez 30 minut przy 16 000 x g w temperaturze 4°C. Supernatant ostrożnie usunięto, a osad zawierający RNA wysuszono w temperaturze pokojowej. Wysuszony osad rozpuszczono w odpowiedniej ilości wody wolnej od RNAz. Steżenie i czystość RNA określono za pomoca urządzenia Agilent.

3.6.1. Elektroforeza kwasów nukleinowych

Żel poliakryloamidowy (PAA) w warunkach denaturujących

Do rozdziału całkowitego RNA wykorzystano żel poliakrylamidowy o 8% stężeniu akrylamidu, usieciowany w stosunku 37,5:1 (akryloamid:bisakrylamid) z 7 M mocznikiem oraz bufor elektroforetyczny 1x TBE. Do próbek RNA dodano 6x stężony bufor obciążający, 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. Następnie właściwy rozdział elektroforetyczny prowadzono przy natężeniu prądu 30 mA. Wielkość szyb do elektroforezy to 16,5 x 22 cm. RNA wybarwiono SYBR Safe. Do wizualizacji RNA wykorzystywano systemy do dokumentacji żeli G:Box oraz transiluminator.

3.6.2. Elucja kwasów nukleinowych z żelu poliakrylamidowego

Po elektroforezie, żel poliakryloamidowy umieszczono na transiluminatorze. Przy użyciu skalpela wycięto prążki odpowiadające pożądanym fragmentom RNA. Wycięte fragmenty żelu rozdrobniono i umieszczono w probówce typu Eppendrof. Następnie próby inkubowano w buforze do elucji z żelu przez noc w temperaturze pokojowej z wytrząsaniem 1000 rpm. RNA strącano dodając do próbki: 0,1 objętości 3 M octanu sodu, 1 µl GlycoBlue Coprecipitant oraz 2,5 objętości 96 % etanolu. Próbki strącano przez 30 min w temperaturze -80°C. Po strącaniu próbki wirowano w temperaturze 4°C przy 14 000 x g przez 30 min. Supernatant usunięto, a osad suszono i rozpuszczano w sterylnej wodzie wolnej od RNaz.

3.6.3. Analiza jakościowa i ilościowa kwasów nukleinowych

Podczas przygotowywania materiału RNA do sekwencjonowania, analizę jakościową i ilościową kwasów nukleinowych wykonano przy użyciu analizatora kapilarnego Agilent 2100 Bioanalyzer z wykorzystaniem zestawu Agilent RNA 6000 Nano Kit. Procedurę przeprowadzono zgodnie z protokołem załączonym przez producenta. Po kontroli jakości i ilości RNA, zabezpieczono 200-500 ng i przesłano do firmy Fasteris do sekwencjonowania.

3.7. Demetylacja RNA

RNA było traktowane 2 µg każdego z białek w objętości 100 µl mieszaniny demetylującej.

- 1. Do 5 µg RNA dodano odpowiednią ilość buforu do demetylacji.
- 2. Inkubowano w temp. pokojowej przez 2h.
- 3. Zatrzymano inkubację poprzez dodanie 5mM kwasu wersenowego (EDTA). Przeprowadzono wytrącanie RNA przez noc w -20°C, dodając 2,5 objętości etanolu (rozdział 3.6.)

3.8. Sekwencjonowanie RNA

Przygotowanie bibliotek rancRNA oraz sekwencjonowanie przeprowadziła frima Fasteris. Łącznie zsekwencjonowano 48 bibliotek na instrumencie NextSeq, w technologii sekwencjonowania z jednego końca (ang. single end) insertów o długości maksymalnej 75 bp, z docelową ilością odczytów równą 6,5 mln z każdej biblioteki. Wszystkie próbki sekwencjonowano razem w jednej linii sekwenatora, stosując indeksowanie.

3.9. Identyfikacja rancRNA w zmiennych warunkach środowiskowych - komputerowe profilowanie asocjacji

Zadanie realizowano dwuetapowo. Pierwszy etap obejmował profilowanie poziomów rancRNA i polegał na mapowaniu odczytów sekwencji cDNA do genomu referencyjnego drożdży za pomocą programu RNA STAR. Podczas mapowania odczytów z bibliotek RNA nie poddawanych demetylacji zezwolono na niewielką liczbę niedopasowań, ze względu na obecność modyfikacji zasad w fragmentach pochodzących z tRNA i rRNA, które mogą prowadzić do błędnego odczytu podczas odwrotnej transkrypcji. Następnie, w obrębie grup odczytów zmapowanych do tych samych loci zweryfikowano stabilność końców 5' i 3', aby odróżnić produkty przetwarzania RNA od degradantów. Dla zidentyfikowanych w ten sposób stabilnych RNA obliczono ich poziom akumulacji poprzez zliczanie liczby odczytów na nie

przypadających. Zadanie zrealizowano we współpracy z dr hab. Markiem Żywickim z Zakładu Biologii Obliczeniowej Wydziału Biologii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu.
4. Wyniki i dyskusja

4.1. Profilowanie polisomowe

Biosynteza białek stanowi proces metabolicznie kosztowny dla komórki. W odpowiedzi na stres środowiskowy, organizmy żywe często regulują tempo translacji, co jest mechanizmem adaptacyjnym minimalizującym zużycie energii [144]. Rybosomy eukariotyczne, złożone z podjednostki małej (40S) i dużej (60S), mogą tworzyć zarówno monosomy (jeden rybosom na cząsteczce mRNA) jak i polisomy (wiele rybosomów na jednej cząsteczce mRNA). Frakcjonowanie polisomów w gradiencie gęstości sacharozy jest powszechnie stosowaną metodą analizy translacji, umożliwiającą nie tylko tworzenie profili polisomowych ale również identyfikację niekodujących RNA związanych z rybosomami (rancRNA) oraz określenie profilu translacji mRNA [145]–[156]

Stąd, aby określić poziom translacji w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae* poddawanych zróżnicowanym warunkom łagodnego stresu abiotycznego, wykonano profilowanie polisomowe (Rozdział 3.5.). Polegało ono na przygotowaniu lizatu komórkowego drożdży *S. cerevisiae* hodowanych w 10 warunkach stresowych oraz w warunkach optymalnych (kontrolnych), zwirowaniu go w gradiencie sacharozowym i rozdzieleniu komponentów rybosomowych ze względu na ich stałą sedymentacji. Frakcje były monitorowane z użyciem spektrofotometru emitującego wiązkę światła o długości 254 nm oraz rejestrację absorbancji w sposób liniowy. Do frakcjonatora podłączony jest automatyczny kolektor frakcji, który dzieli próbę na podstawie zdefiniowanych parametrów i generuje wykres profilowania polisomowego.

Na podstawie wcześniejszych badań prowadzonych w Pracowni Modelowych Organizmów Bezkręgowych [157] dotyczących przetwarzania tRF w *S. cerevisiae* wytypowane zostały warunki hodowli drożdży, w których obserwowano znaczące zmiany w krótkich RNA związanych z rybosomami po 15-minutowym stresie [22], [157]–[159], a także w składzie rybosomów [160]. Na tej podstawie, do moich badań zastosowałam następujące warunki stresu abiotycznego: szok ciepła, szok zimna, wysokie zasolenie, światło UV, warunki beztlenowe, wysokie pH, głód aminokwasowy, głód cukrowy, warunki hipoosmotyczne i hiperosmotyczne. Uzyskane wyniki zostały przedstawione na Rys. 5.



Rys. 5. Wykresy profilowań polisomowych *Saccharomyces cerevisiae* hodowanych w różnych warunkach stresowych. 40S oznacza małe podjednostki rybosomu, 60S duże podjednostki rybosomów, 80S - monosomy, P - polisomy. Oś y oznacza wysokość absorbancji przy fali A254, natomiast na osi X oznaczono gradient sacharozy od 4,5% do 45%.

W warunkach optymalnych otrzymany profil polisomowy wskazuje znaczne nagromadzenie wielu rybosomów związanych z mRNA (polisomy) w dolnej części gradientu. Jest to potwierdzone wysokim sygnałem absorbancji na tym obszarze i świadczy o wysokiej aktywności translacyjnej komórek. Poddanie drożdży warunkom stresowym skutkowało zmniejszeniem liczby polisomów oraz wzrostem ilości monosomów (80S) w porównaniu z warunkami optymalnymi (Rys.5). Najbardziej wyraźną zmianę w proporcjach polisomów i monosomów zaobserwowano w warunkach głodu cukrowego oraz stresu promieniowania UV. W tych warunkach sygnał polisomów znajdował się na poziomie 0,025-0,05 A₂₅₄, natomiast sygnały odpowiadające monosomom znajdowały się w przedziale 0,25-0,30 w warunkach głodu cukrowego oraz w warunkach stresu UV 0,45-0,5. Mniejszy spadek ilości polisomów był widoczny w stresach: szoku zimna, wysokiego stężenia soli, warunków anerobicznych i głodu aminokwasowego. Stresy wysokiego pH, hipo- i hiperosmotyczny nie zmieniły istotnie profili polisomowych w stosunku do warunków optymalnych. Jedynie stres ciepła skutkował zwiększeniem wielkości sygnału polisomów.

Te obserwacje postanowiono potwierdzić analizą aktywności translacyjnej mierzonej jako stosunku polisomów do monosomów (P/M) (Rys.6). Ustalono względny stosunek P/M w warunkach optymalnych jako wartość 1. Natomiast w stresach UV oraz głodu cukrowego ten stosunek był 10-krotnie niższy (odpowiednio P/M= 0.1 p=0,0000 oraz P/M=0,1 p=0,0000). Istotnie niższe P/M niż w warunkach optymalnych zaobserwowaliśmy w stresie szoku zimna (P/M=0,7, p=0,0000), wysokiego stężenia

soli (P/M=0,7, p=0,0002), głodu aminokwasowego (P/M=0,5, p=0,0000) oraz w warunkach beztlenowych (P/M=0,4, p=0,0000). Stosunek polisomów do monosomów nie zmienił się istotnie w warunkach wysokiego pH (P/M=1,0, p=0,2263), hipoosmotycznych (P/M=0,9, p=0,0640), hiperosmotycznych (P/M=0,9, p=0,0679). Zastosowanie stresu ciepła skutkowało istotnym statystycznie podwyższeniem stosunku polisomów do monosomów (P/M=1,4, p=0,0000).



Rys.6 Aktywność translacyjna *S. cerevisie* mierzona jako stosunek polisomów do monosomów. *p<0,05.

W naszych wcześniejszych badaniach [22] stosowaliśmy translację poli(U) w systemie *in vitro* jako miarę aktywności rybosomów w różnych warunkach środowiskowych. Jednak szczegółowa analiza profili polisomowych oraz pomiar stosunku polisomów do monosomów pozwala na określenie poziomu translacji w komórkach oraz pokazuje wpływ warunków środowiskowych na różne etapy translacji. Nasze badania umożliwiają poszerzenie wiedzy na temat przebiegu translacji w *S. cerevisiae* w odpowiedzi na różne stresy abiotyczne.

Na podstawie analizy profili polisomowych oraz stosunku P/M zdecydowano na pogłębienie analizy dla stresu głodu cukrowego oraz stresu hiperosmotycznego. Do dalszej analizy wybrano te dwa stresy ze względu na znaczną różnicę w stosunku P/M oraz w drugim przypadku w związku z niewielką różnicą stosunku P/M.

Kolejnym etapem eksperymentu było ponowne wykonanie profilowania polisomowego, tym razem celem otrzymania odpowiedniej ilości materiału RNA do przygotowania bibliotek rancRNA. Przy prędkości zbierania frakcji 0,3 mm/s otrzymywaliśmy 26 frakcji z jednego profilu polisomowego. Do sekwencjonowania przygotowano dwa powtórzenia biologiczne dla każdego analizowanego warunku hodowlanego. Analizując wykresy (Rys.7) wyselekcjonowaliśmy frakcje: wolne RNA (niezwiązane z rybosomami) oraz związane z rybosomami (rancRNA): RNA pochodzące z 40S, 60S, 80s oraz z polisomów. Na rysunku 6 oznaczono kolorem pomarańczowym frakcje, które zostały zebrane do dalszych etapów badań. Celem eksperymentu była analiza krótkich RNA asocjujących z poszczególnymi frakcjami rybosomalnymi. Dlatego w celu uniknięcia przypadkowego połączenia frakcji np. małych i dużych podjednostek nie izolowano materiału RNA z frakcji znajdującej się między sygnałami 40S i 60S na wykresie polisomowym. Aby uzyskać odpowiednio dużą ilość materiału konieczne było na wykonie trzech równoległych eksperymentów profilowania polisomowego dla

każdego stresu. Uwzględniając powtórzenia biologicznie, łącznie dało to ilość osiemnastu profilowań polisomowych



Rys.7 Wykresy przedstawiające profilowanie polisomowe lizatów *S. cerevisie* **z hodowli w warunkach optymalnych, stresu głodu cukrowego oraz stresu hiperosmotycznego.** Powyższe wykresy są reprezentatywne. Kolorem pomarańczowym zaznaczono frakcje, które wybrano do dalszych eksperymentów.

4.2. Izolacja RNA

RNA zostało wyizolowane zgodnie z protokołem z rozdziału 3.6. Uzyskane ilości RNA umieszczono w Tabeli 4. W związku z tym, że w późniejszej części eksperymentu okazało się, że aby otrzymać wystarczającą ilość materiału do przygotowania bibliotek zdecydowałam połączyć frakcje małych i dużych podjednostek w jedną zbiorczą frakcję pod wspólną nazwą podjednostki (SU).

		Całkowita ilość RNA [µg]
Kontrola – 1 replikat	Wolne RNA	54,3
	Podjednostki (SU)	19,9
	Monosomy (80S)	53,1
	Polisomy	42
Kontrola – 2 replikat	Wolne RNA	39,6
	Podjednostki (SU)	27,1
	Monosomy (80S)	60,7
	Polisomy	125
Stres głodu cukrowego – 1 replikat	Wolne RNA	74
	Podjednostki (SU)	51
	Monosomy (80S)	111,4
	Polisomy	26,3
Stres głodu cukrowego – 2 replikat	Wolne RNA	27,8
	Podjednostki (SU)	20,1
	Monosomy (80S)	32,7
	Polisomy	32,6
Stres Hiperosmotyczny – 1 replikat	Wolne RNA	16,5
	Podjednostki (SU)	19,4
	Monosomy (80S)	89,4
	Polisomy	28,4
Stres Hiperosmotyczny – 2 replikat	Wolne RNA	67,2
	Podjednostki (SU)	60,9
	Monosomy (80S)	76,9
	Polisomy	52,5

Tab.4 Ilości wyizolowanego materiału RNA.

4.2.1. Sprawdzenie jakości RNA po izolacji z frakcji sacharozowej

W celu oceny jakości i ilości RNA, które zostało wyizolowane z frakcji rybosomowych wykonano elektroforezę kapilarną z wykorzystaniem Agilent Bioanalyzer (Rys. 8-10).

Materiał z frakcji wolnych RNA we wszystkich warunkach hodowlanych charakteryzował się zawartością RNA w przedziale długości ok 20 nt do 200 nt, z wysokim sygnałem pochodzącym od RNA o długości ok. 100 nt.

Małe podjednostki rybosomalne składają się z jednego rodzaju RNA – 18S rRNA. Jego długość to ok. 1800 nt. Wyniki elektroforezy kapilarnej potwierdziły przewidywaną długość tego RNA. Obserwowano też silne sygnały krótkich RNA (< 200nt).

We wszystkich frakcjach zawierających duże podjednostki rybosomów również obserwowano przedział RNA od 25 do ponad 4000 nt. Silne sygnały RNA odpowiadały 25S rRNA (ok. 3400nt), 5,8S (ok. 160 nt) oraz 5S (ok. 120 nt). Zaobserwowano również sygnał 18S, co oznaczało zanieczyszczenie frakcji RNA pochodzącym z małych podjednostek rybosomów. Nawet odrzucenie pojedynczej frakcji znajdującej się pomiędzy 40S a 60S (Rys. 7) nie umożliwiło nam pełnego rozdzielenia tych frakcji. Przy kolejnym eksperymencie tego typu, należałoby rozważyć przy profilowaniu polisomowym zmienienie ustawień Piston Gradient Fractionator tak aby zbierane frakcje były jeszcze mniejsze co prawdopodobnie umożliwiłoby dokładniejsze rozdzielenie małych i dużych podjednostek. Innym sposobem na poprawienie rozdziału frakcji jest rozszerzenie gradientu, co sprawiłoby, że podjednostki byłby bardziej od siebie oddalone.

Monosomy oraz polisomy składają się z dużych oraz małych podjednostek. W związku z tym powinniśmy w tych frakcjach zaobserwować zarówno 18S rRNA jak i 5S rRNA,

5,8S rRNA oraz 25S rRNA. We wszystkich frakcjach podobnie jak w podjednostkach obserwowano szeroki przedział sygnału RNA.

Oceniono, że jakość materialu jest odpowiednia. Dlatego postanowiono przejść do kolejnego etapu – selekcji krótkich RNA z całkowitego RNA z poszczególnych frakcji rybosomowych.



Rys. 8. Obraz rozdziału elektroforetycznego. K- oznacza próby pochodzące z hodowli kontrolnej, S – oznacza próby z hodowli w stresie hiperosmotycznym; 1 – frakcja wolnych RNA, 2 – frakcja małych podjednostek, 3- frakcja dużych podjednostek, 4- frakcja monosomów, 5 – frakcja polisomów.



Rys. 9. Obraz rozdziału elektroforetycznego. K- oznacza próby pochodzące z hodowli kontrolnej, BCoznacza próby pochodzące z hodowli w stresie głodu cukrowego; 1 – frakcja wolnych RNA, 2 – frakcja małych podjednostek, 3- frakcja dużych podjednostek, 4- frakcja monosomów, 5 – frakcja polisomów.



Rys. 10 Obraz rozdziału elektroforetycznego. BC- oznacza próby pochodzące z hodowli w stresie głodu cukrowego, S – oznacza próby z hodowli w stresie hiperosmotycznym; 1 – frakcja wolnych RNA, 2 – frakcja małych podjednostek, 3- frakcja dużych podjednostek, 4- frakcja monosomów, 5 – frakcja polisomów.

4.2.2. Sprawdzenie jakości RNA po elucji z żelu

Po wyizolowaniu oraz sprawdzeniu jakości, RNA nałożono na 8% denaturujący żel PAA, przeprowadzono rozdział elektroforetyczny w warunkach denaturujących, a następnie wycięto z żelu fragmenty zawierające kwasy nukleinowe o długości mniejszej niż ~70 bp, tuż poniżej sygnału odpowiadającemu tRNA (Rys.11).



Rys. 11 Reprezentatywny obraz rozdziału elektroforetycznego przedstawiający rozdział RNA w żelu PAA 8%. M- marker mas, X - puste kieszonki, 1-4 RNA całkowite z frakcji wolnych RNA, hodowla kontrolna, strzałkami oznaczono tRNA, natomiast miejsce odcięcia zaznaczono białymi prostokątami.

Aby ocenić jakość krótkich RNA ponownie wykonano elektroforezę kapilarną z wykorzystaniem Agilent Bioanalyzer. Ilości otrzymanych krótkich RNA znajdują się w Tabeli 5.

		Całkowita ilość krótkich RNA [µg]
Kontrola – 1 replikat	Wolne RNA	6,7
	Podjednostki (SU)	1,5
	Monosomy (80S)	1
	Polisomy	6,1
Kontrola – 2 replikat	Wolne RNA	10,4
	Podjednostki (SU)	0,5
	Monosomy (80S)	0,7
	Polisomy	5,54
Stres głodu cukrowego – 1 replikat	Wolne RNA	3,9
	Podjednostki (SU)	0,4
	Monosomy (80S)	0,6
	Polisomy	1,4
Stres głodu cukrowego – 2 replikat	Wolne RNA	3,2
	Podjednostki (SU)	0,7
	Monosomy (80S)	0,6
	Polisomy	0,5
Stres Hiperosmotyczny – 1 replikat	Wolne RNA	1,8
	Podjednostki (SU)	0,3
	Monosomy (80S)	1,8
	Polisomy	1,8
Stres Hiperosmotyczny – 2 replikat	Wolne RNA	7,5
	Podjednostki (SU)	0,6
	Monosomy (80S)	0,9
	Polisomy	5,5

Tab. 5 Ilości wyizolowanych krótkich RNA.

Przedstawione wyniki dotyczą prób, które zostały wysłane do sekwencjonowania i opisane jako niedemetylowane (AlkB-). Z każdego stresu powstały 4 biblioteki, w dwóch powtórzeniach biologicznych co łącznie dało sumę 24 bibliotek.

4.3. Demetylacja RNA

Ze względu na liczne modyfikacje obecne w tRNA, które wpływają na jego stabilność i strukturę, a także mogą modulować proces odwrotnej transkrypcji [105], szczególną uwagę zwrócono na modyfikacje typu "hard-stop". Tego typu modyfikacje, takie jak 1-

metydyloadenozyna (m¹A), 2.2-dimetyloguanozyna (m2,2G) oraz 3-metylocytydyna (m³C), prawdopodobnie odgrywają kluczową rolę w biogenezie, stabilności i funkcjonalności krótkich RNA pochodzących z tRNA [117]. Badania wykazały, że specyficzne modyfikacje mogą zarówno kierować fragmentacja tRNA [58], jak i chronić je przed przecięciem lub wpływać na interakcje z białkami takimi jak Dicer czy Piwi [9], [51], [69], [161]. Mając na uwadze powyższe doniesienia, postanowiłam zbadać wpływ modyfikacji metylowych na efektywność sekwencjonowania krótkich RNA. W tym celu przeprowadziłam demetylację krótkich RNA z wykorzystaniem białek AlkB i AlkB-D135S. Transformowałam kompetentne komórki E. coli szczepu K12 JM109, plazmidami pET30a-AlkB oraz pET30a-AlkB-D135S metodą szoku termicznego. Następnie przeprowadzono nadekspresje białek w bakteriach w hodowli po indukcji IPTG (izopropylo- β -D-1-tiogalaktopiranozyd), płvnnei. Bakterie. nadprodukowały białko z przyłączonym ogonem histydynowym. W dalszym ciągu eksperymentu izolowano białka zgodnie z protokołem 3.4.2.3. Kolejnym etapem było poddanie zawiesiny bakteryjnej sonikacji i oczyszczono białko z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa na kulkach z immobilizowanymi jonami nikielu, które wiązały się z histydynowym ogonem białka. Uzyskano 2,175 mg białka AlkB oraz 0,134 mg białka D135S.

Wyizolowane białka zwizuwalizowano podczas rozdziału elektroforetycznego w 10% żelu zawierającym SDS. Następnie żel wybarwiono błękitem Brillanta Coomassie.



Rys.12 Wizualizacja białek AlkB i AlkB-D135S w żelu. Długość 216 aa, Masa: 24,086 Da. Strzałkami wskazano prążki odpowiadajace białkom AlkB oraz AlkB-D135S.

Aktywność białek demetylujących sprawdziłam za pomocą kitu 1-Methyladenosine ELISA (m¹A). Połowę krótkich RNA uzyskanych w rozdziale 4.2.2. poddałam reakcji demetylacji opisanej w rozdziale 3.7. Skuteczność procesu demetylacji krótkich RNA oceniłam za pomocą zestawu 1-Methyladenosine ELISA (m¹A). W tym celu przygotowałam dwie próbki krótkich RNA poddane demetylacji oraz dwie próbki kontrolne, które zostały przenalizowane pod względem zawartości modyfikacji m¹A. Pomiary wykonano przy użyciu *BioTek* Synergy 2.

Wykonano krzywą standardową zależności absorbancji od stężenia m¹A (Rys. 13).



Rys. 13 Krzywa standardowa zależności absorbancji od stężenia m¹A.

Na podstawie krzywej standardowej (Rys. 13) odczytałam przybliżone stężenia m¹A obecne w próbach krótkich RNA. Zawartość m¹A spadała 60-68 krotnie (z 550-600 ng/ml przed demetylacją do 8-10 ng/ml po demetylacji), w zależności od próby. Obserwowana zawartość m¹A jest dużo niższa w próbach z dodatkiem białek AlkB, co świadczy o wysokiej aktywności użytych białek.

Aby sprawdzić jakość RNA po demetylacji poddano je elektroforezie kapilarnej z użyciem technologii Agilent (Rys. 14-21).

Przedstawione elektroforegramy wskazują, że krótkie RNA po demetylacji posiadają dobrą jakość oraz wyraźne sygnały w przedziale 25nt ~ 70nt. Należy zwrócić uwagę, że we frakcjach polisomów oprócz spodziewanego sygnału widoczne są również RNA o długości ~200nt - ~700nt, a we frakcjach ze stresu hiperosmotycznego zauważalne są również dłuższe fragmenty ~ 2000 nt.

Przygotowany materiał z krótkich RNA bez (AlkB-) oraz po demetylacji (AlkB+) został zabezpieczony w ilości 200-500 ng dla każdej próby. Przygotowanie bibliotek oraz sekwencjonowanie wykonała firma Fasteris.



Rys. 14 Rozkład długości RNA uzyskanych z drożdży *S. cerevisiae* hodowanych w warunkach optymalnych – 1 replikat po demetylacji.



Rys. 15 Rozkład długości RNA uzyskanych z drożdży *S. cerevisiae* hodowanych w warunkach optymalnych – 2 replikat po demetylacji.



Rys. 16 Rozkład długości RNA uzyskanych z drożdży *S. cerevisiae* hodowanych w warunkach stresu glodu cukrowego – 1 replikat po demetylacji.



Rys. 17 Rozkład długości RNA uzyskanych z drożdży *S. cerevisiae* hodowanych w warunkach stresu glodu cukrowego – 2 replikat po demetylacji.



Rys. 18 Rozkład długości RNA uzyskanych z drożdży *S. cerevisiae* hodowanych w warunkach stresu hiperosmotycznego – 1 replikat po demetylacji.



Rys. 19 Rozkład długości RNA uzyskanych z drożdży *S. cerevisiae* hodowanych w warunkach stresu hiperosmotycznego – 2 replikat po demetylacji.



Rys. 20. Obraz rozdziału elektroforetycznego krótkich RNA po demetylacji. d1-d8 oznacza RNA z hodowli w warunkach optymalnych. 1 i 2 - powtórzenie biologiczne, kolejność to odpowiednio: wolne RNA, podjednostki (SU), monosomy (80S) oraz polisomy. d9-d12 oznacza RNA z hodowli w stresie głodu cukrowego.



Rys. 21. Obraz rozdziału elektroforetycznego krótkich RNA po demetylacji. d13-d16 oznacza próby z hodowli w stresie głodu cukrowego; d17-d20 oznacza próby z hodowli w stresie hiperosmotycznym; d21-d24 - powtórzenie biologiczne hodowli w stresie hiperosmotycznym. Kolejność to odpowiednio: wolne RNA, podjednostki (SU), monosomy (80s) oraz polisomy.

4.4. Analiza danych wysokoprzepustowych rancRNA-seq

4.4.1. Ilości odczytów

Przeanalizowaliśmy łącznie 24 biblioteki zawierające krótkie RNA asocjujące z frakcjami rybosomowymi, w tym 2 biologiczne replikaty. Użyto platformy sekwencjonowania Illumina HiSeq, a wyniki sekwencjonowania zostały adnotowane przy użyciu Glimma Plots, co dało łącznie 602 025 230 odczytów mapujących do genomu drożdży.

AlkB-	Stres głodu cukrowego	Warunki optymalne	Stres osmotyczny
80S - 1 replikat	5 525 116	20 086 768	14 961 885
80S - 2 replikat	b.d.	b.d.	6 726 541
Polisomy - 1 replikat	11 356 909	10 733 784	b.d.
Polisomy - 2 replikat	b.d.	33 546 119	17 889 004
Podjednostki - 1 replikat	38 768 794	27 905 778	22 220 216
Podjednostki - 2 replikat	36 833 480	b.d.	14 830 703
Wolne RNA - 1 replikat	61 051 158	50 645 711	56 429 264
Wolne RNA - 2 replikat	71 858 317	60 876 705	39 778 978

Tab.6 Ilości odczytów w bibliotekach nie poddanych demetylacji. b.d. oznacza brak danych ze względu na słabą jakość sekwencjonowania.

AlkB+	Stres głodu cukrowego	Warunki optymalne	Stres osmotyczny
80S - 1 replikat	19 228 160	18 491 544	9 261 271
80S - 2 replikat	12 586 705	14 589 143	12 614 220
Polisomy - 1 replikat	12 460 965	15 119 189	15 237 458
Polisomy - 2 replikat	14 241 956	22 425 920	12 215 888
Podjednostki - 1 replikat	16 480 322	7 835 012	b.d.
Podjednostki - 2 replikat	21 717 786	b.d.	13 504 290
Wolne RNA - 1 replikat	51 055 640	43 049 241	25 801 820
Wolne RNA - 2 replikat	67 243 418	51 743 875	26 306 606

Tab.7 Ilości odczytów w bibliotekach poddanych demetylacji. b.d. oznacza brak danych ze względu na słabą jakość sekwencjonowania.

Analizując ilości odczytów w poszczególnych bibliotekach można zaobserwować, że przeprowadzona demetylacja nie wpłynęła na znaczące zwiększenie liczby odczytów w bibliotekach poddanych temu procesowi, z wyjątekim 1 replikatu 80S w warunkach stresu głodu cukrowego (zmiana z 5 525 116 odczytów w bibliotekach AlkB- na 19 228 160 odczytowów w bibliotekach AlkB+). Natomiast w kliku bibliotekach AlkB+ obserwowano mniejsze ilości odczytów niż w odpowiedających im bibliotekach AlkB-.

Podsumowując, wyciągnęłam wniosek, że demetylacja co prawda nie wpływa na ogólną ilość odczytów w sekwencjonownanych bibliotekach, ale może wpływać na ilości odczytów poszczególnych typów rancRNA. Dlatego kolejnym etapem była analiza składu poszczególnych typów krótkich RNA w bibliotekach bez oraz z dodatkiem białek AlkB/D135S.

4.4.2. Ilości poszczególnych typów krótkich RNA

Analiza biotypów prekursorów krótkich RNA w bibliotekach w różnych frakcjach rybosomowych z hodowli w warunkach optymalnych wykazała, że głównym typem RNA we frakcjach wolnych RNA, podjednostek oraz polisomów jest tRNA, jedynie we frakcjach monosomów obserwowano przewagę rRNA nad tRNA.

We frakcji wolnych RNA dominowały cząsteczki tRNA, stanowiąc około 94% zarówno w bibliotekach kontrolnych, jak i tych poddanych demetylacji. Obserwowano niewielki spadek udziału rRNA (z 4% do 3%) oraz wzrost mRNA (z 1% do 2%) w bibliotekach traktowanych białkami AlkB. Zawartość transpozonów pozostała natomiast niezmieniona.

We frakcji podjednostek rybosomalnych tRNA również stanowiły większość (76% i 71% odpowiednio), a rRNA - około 15%. Demetylacja spowodowała spadek zawartości transpozonów i snoRNA o 2% i 1% oraz wzrost mRNA o 8%.

We frakcji monosomów dominowało rRNA (83% i 72%), którego udział znacząco zmniejszył się po demetylacji (o 11%). Jednocześnie zaobserwowano wzrost zawartości mRNA (o 1%) i tRNA (o 10%).

W polisomach tRNA stanowiło największą frakcję, a jego udział zmniejszył się o 6% po traktowaniu białkami. Spadek zawartości transpozonów (o 1%) towarzyszył wzrostowi mRNA (o 2%) i rRNA (o 5%) (Rys. 22).



Rys.22 Wykresy zawartości poszczególnych biotypów prekursorów rancRNA w bibliotekach pochodzących z hodowli *S. cerevisiae* **w warunkach optymalnych bez oraz z dodatkiem białek AlkB.** Kolorem zielonym oznaczono typy RNA, których zawartość wzrosła w stosunku do bibliotek nie traktowanych białkami AlkB oraz kolorem czerwonym te, których zawartość zmalała.

Analiza biotypów prekursorów krótkich RNA w bibliotekach w różnych frakcjach rybosomalnych pochodzących z hodowli poddanych stresowi głodu cukrowego wykazała, że we frakcjach wolnych RNA oraz podjednostek rybosomowych dominowały cząteczki tRNA. Natomiast we frakcjach monosomów oraz polisomów obserwowano prewagę rRNA.

We frakcji wolnych RNA demetylacja nie wpłynęła znacząco na względną zawartość poszczególnych typów RNA. tRNA stanowiły zdecydowaną większość (97%), podczas gdy mRNA i rRNA stanowiły odpowiednio 2% i 1% (Rys. 23).



Stres Głodu Cukrowego

Rys.23 Wykresy procentowej zawartości poszczególnych biotypów prekursorów rancRNA w bibliotekach pochodzących z hodowli *S. cerevisiae* w warunkach stresu glodu cukrowego bez oraz z dodatkiem białek AlkB. Kolorem zielonym oznaczono typy RNA, których zawartość wzrosła w stosunku do bibliotek nie traktowanych białkami AlkB oraz kolorem czerwonym te, których ilość zmalała

W pozostałych analizowanych frakcjach zaobserwowano bardziej wyraźne zmiany. We frakcji podjednostek rybosomalnych tRNA również dominowały (88% i 90% w

bibliotekach AlkB- i AlkB+, odpowiednio), a demetylacja spowodowała niewielki spadek udziału rRNA (o 5%) i transpozonów (o 1%), przy jednoczesnym wzroście zawartości mRNA (o 4%).

Podobny trend zaobserwowano w frakcji monosomów, gdzie rRNA stanowiło większość (82% i 75% w bibliotekach AlkB- i AlkB+, odpowiednio). Demetylacja doprowadziła do zmniejszenia udziału rRNA (o 5%) oraz wzrostu zawartości mRNA (o 1%) i tRNA (o 7%).

W polisomach zaobserwowano wzrost udziału rRNA (o 11%) po demetylacji. Towarzyszył temu spadek zawartości tRNA (o 9%) i transpozonów (o 2%) oraz niewielki wzrost mRNA (o 1%) (Rys. 23).

Analiza biotypów prekursorów krótkich RNA w bibliotekach w różnych frakcjach rybosomowych z hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego wykazała, że głównym typem RNA we frakcjach wolnych RNA oraz podjednostek jest tRNA, natomiast we frakcjach monosomów oraz polisomów obserwowano przewagę rRNA nad tRNA.

We frakcji wolnych RNA dominowały cząsteczki tRNA, stanowiąc 91% zarówno w bibliotekach kontrolnych, jak i tych poddanych demetylacji. Obserwowano niewielki spadek udziału rRNA (z 7% do 5%) oraz wzrost mRNA (z 2% do 4%) w bibliotekach traktowanych białkami.

We frakcji podjednostek rybosomalnych tRNA również stanowiły większość (59% i 79% w bibliotekach AlkB- i AlkB+, odpowiednio).Demetylacja spowodowała spadek zawartości rRNA oraz transpozonów o 25% i 1% oraz wzrost mRNA o 6%.

We frakcji monosomów dominowało rRNA (79% w bibliotekach AlkB), którego udział zmniejszył się po demetylacji o 10%. Jednocześnie zaobserwowano wzrost zawartości mRNA (o 5%) i tRNA (o 6%) oraz spadek zawartości transpozonów o 1%.

W polisomach tRNA stanowiło największą frakcję, a jego udział zmniejszył się o 19% po traktowaniu białkami. Wzrost zawartości rRNA (o 14%) towarzyszył wzrostowi mRNA (o 5%) i rRNA (o 5%). Zawartość transpozonów pozostała natomiast niezmieniona (Rys. 24).





Rys.24 Wykresy procentowej zawartości poszczególnych biotypów prekursorów rancRNA w bibliotekach pochodzących z hodowli *S. cerevisiae* **w warunkach stresu osmotycznego bez oraz z dodatkiem białek AlkB.** Kolorem zielonym oznaczono typy RNA, których zawartość wzrosła w stosunku do bibliotek nie traktowanych białkami AlkB oraz kolorem czerwonym te, których zawartośc zmalała.

Podsumowując, analiza profili akumulacji krótkich RNA w różnych frakcjach rybosomalnych wykazała wyraźne różnice zależne od warunków hodowli i zastosowania demetylacji RNA za pomocą białek AlkB/D135S. W frakcji wolnych RNA zaobserwowano wzrost poziomu zarówno mRNA, jak i rRNA po zastosowaniu demetylacji w warunkach optymalnych oraz stresu hiperosmotycznego. We frakcji

podjednostek rybosomalnych odnotowano wzrost zawartości tRNA w warunkach stresowych, natomiast w warunkach optymalnych demetylacja spowodowała jej zmniejszenie. Jednocześnie zaobserwowano spadek poziomu transpozonów, co korelowało ze wzrostem zawartości mRNA. We frakcjach monosomów stwierdzono uniwersalny wzrost zawartości tRNA i mRNA oraz spadek rRNA, niezależnie od warunków hodowli. Natomiast we frakcjach polisomów zaobserwowano spadek zawartości tRNA i wzrost zawartości mRNA oraz rRNA, co było konsekwentne we wszystkich analizowanych warunkach po zastosowaniu demetylacji.

4.4.3. Analiza sdRNA oraz tRF

Na podstawie analizy profilu akumulacji różnych typów rancRNA w bibliotekach, zidentyfikowałam tRNA jako najobficiej reprezentowane prekursory rancRNA, a snoRNA jako najmniej liczne. Chociaż tRF są przedmiotem intensywnych badań, to sdRNA zajmowano się dotychczas w mniejszym stopniu. Niemniej jednak, niska obfitość sdRNA w komórce nie wyklucza ich potencjalnej roli regulatorowej. Jak wykazano w pracy [11], stosunkowo niewielkie ilości niekodującego RNA ranc_18mer są wystarczające do znaczącego wpływu na globalną aktywność rybosomów i regulację translacji. W dalszej części niniejszej pracy pogłębiłam zatem analizę obu tych typów krótkich RNA oraz zbadałam asocjację wybranych tRF i sdRNA z poszczególnymi frakcjami rybosomalnymi.

4.4.3.1. Zmiany zawartości tRF oraz sdRNA w bibliotekach rancRNA

Widząc rozbieżności w ilości odczytów w bibliotekach demetylowanych oraz niepoddanych temu procesowi, zainteresowało mnie jak wygląda ilość odczytów cząsteczek tRF oraz sdRNA, które przez wzgląd na swoje prekursory, mogą posiadać modyfikacje utrudniające odwrotną transkrypcję.

We frakcji wolnych RNA z hodowli w warunkach optymalnych średni poziom zawartości tRF wynosił 93,89 % (\pm 1,98 %), w podjednostkach rybosomowych 76,02 %, w monosomach jedynie 3,75 %, a w polisomach 56,36 % (\pm 31,33 %, Wykres 1). Porównanie bibliotek poddanych demetylacji RNA z bibliotekami kontrolnymi wykazało podobny poziom tRF w frakcjach RNA niezwiązanych z rybosomami. Natomiast we frakcjach polisomów oraz podjednostek rybosomowych odnotowano średni spadek zawartości tRF o 5,53 % (\pm 0,14 %).

We frakcji wolnych RNA z hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego średni poziom tRF wynosił 96,56 % (\pm 0,21 %). W podjednostkach rybosomowych odnotowano średnią zawartość tRF na poziomie 87,92 % (\pm 2,96 %). Najniższy poziom tRF zaobserwowano ponownie w frakcji monosomów, gdzie jego średnia zawartość wyniosła jedynie 5,10 %. W polisomach średni poziom tRF wynosił 35,82 %. Po przeprowadzeniu demetylacji RNA zaobserwowano ogólny trend wzrostu poziomu tRF w większości analizowanych frakcji. Największy wzrost odnotowano w monosomach (6,76 %), podjednostkach pierwszego replikatu (1,65 %) oraz niewielki wzrost w RNA niezwiązanych z rybosomami (0,29 %). Spadek zawartości tRF zaobserwowano jedynie w polisomach, o 9,01%.

We frakcji wolnych RNA z hodowli w warunkach hiperosmotycznych średni poziom tRF wynosił 90,53 % (\pm 2,53 %). W podjednostkach rybosomowych odnotowano większe zróżnicowanie, ze średnią zawartością tRF na poziomie 59,23 % (\pm 21,79 %). Najniższy poziom tRF zaobserwowano ponownie we frakcji monosomów, gdzie jego

średnia zawartość wyniosła 8,43 % (\pm 2,75 %). W polisomach średni poziom tRF wynosił 48,96 %. Po przeprowadzeniu demetylacji RNA ponownie zaobserwowano ogólny trend wzrostu poziomu tRF w większości analizowanych frakcji. Największy wzrost zawartości tRF zaobserwowano w podjednostkach rybosomowych (o 19,38 %), następnie w monosomach o 5,47% (\pm 7,12%) oraz niewielki w RNA niezwiązanych z rybosomami o 0.34% (\pm 1,61 %). Spadek zawartości tRF zaobserwowano jedynie w polisomach o 19,05% (\pm 12,39 %).

Podumowując, we wszystkich typach bibliotek po dodatkowej demetylacji obserwowano wzrost poziomu tRF we frakcjach monosomów oraz spadek we frakcjach polisomów. Istnieje możliwość, że pula tRF obecna w monosomach była bardziej podatna na wpływ użytych białek demetylujących niż tRF obecne w pozostałych frakcjach rybosomów.

W przeprowadzonych wcześniej badaniach wykazano najwyższą obfitość tRF we frakcji niezwiązanej z rybosomem, a spośród rancRNA największa liczba tRF asocjowała z małą podjednostką 40S rybosomu [20]. W niniejszej pracy zaobserwowano podobny trend - większość tRF zlokalizowano we frakcji RNA niezwiązanej z rybosomami, zarówno w bibliotekach AlkB+ jak i AlkB-. Analiza profilu lokalizacji tRF w warunkach stresowych wykazała, że w warunkach optymalnych i stresu hiperosmotycznego dominującą frakcją dla tRF były polisomy, zarówno w bibliotekach AlkB+ jak i AlkB-. Natomiast w warunkach stresu głodu cukrowego największa liczba tRF została zidentyfikowana we frakcjach podjednostek rybosomalnych (40S+60S) w bibliotekach AlkB-, podczas gdy w odpowiednich bibliotekach AlkB+ dominowały w polisomach.



Wykres.1 Porównanie średniej zawartości procentowej tRF w bibliotekach rancRNA-seq.

W warunkach optymalnych średni poziom sdRNA we frakcjach monosomów wynosił 0,03% wszystkich obecnych rancRNA. W podjednostkach rybosomowych średnia zawartość sdRNA wynosiła 0,57%, w polisomach 0,26% (\pm 0,19%), a we frakcji wolnych RNA 0,06% (\pm 0,01%). Analiza porównawcza bibliotek poddanych demetylacji RNA wykazała, że we wszystkich analizowanych frakcjach z hodowli w warunkach optymalnych procentowa zawartość sdRNA jest większa w bibliotekach AlkB-. Największy spadek zaobserwowano we frakcji podjednostek rybosomowych

(0,29%), następnie w polisomach (0,06%), wolnych RNA (0,01), a najmniejszy w monosomach (0,001%).

Średni udział sdRNA w RNA z hodowli w warunkach głodu cukrowego we frakcjach monosomów oraz podjednostkach rybosomowych (\pm 0,01%) wynosił 0,18%. Najwyższy poziom sdRNA odnotowano w polisomach, gdzie jego średnia zawartość wyniosła 0,67%. Natomiast najniższy poziom sdRNA zaobserwowano we frakcji wolnych RNA 0,05% (\pm 0,00%). Po przeprowadzeniu demetylacji RNA zaobserwowano trend spadku poziomu sdRNA we wszystkich analizowanych frakcjach. Największy spadek odnotowano w polisomach (0,21%), monosomach (0,14%) oraz podjednostkach rybosomowych (0,12%). We frakcji RNA niezwiązanych z rybosomami poziom sdRNA zmniejszył się do 0,03%.

W warunkach hiperosmotycznych zaobserwowano, że średni udział sdRNA w frakcjach monosomów ($\pm 0,01$ %) oraz RNA niezwiązanych z rybosomami ($\pm 0,00$ %) wynosił 0,08 %. W polisomach średnia zawartość sdRNA wyniosła 0,14 %, natomiast w podjednostkach rybosomowych odnotowano nieco wyższy poziom, wynoszący średnio 0,21 % ($\pm 0,08$ %). Po przeprowadzeniu demetylacji RNA ponownie zaobserwowano trend spadku poziomu sdRNA we wszystkich analizowanych frakcjach rybosomowych. Największy spadek odnotowano w podjednostkach rybosomowych (0,12 %), następnie w monosomach (0,04%), w RNA niezwiązanych z rybosomami oraz polisomach najmniejszy (0,03).



Wyk.2 Porównanie średniej zawartości procentowej sdRNA w bibliotekach rancRNA-seq.

Podumowując, ogólna ilość tRF oraz sdRNA w poszczególnych frakcjach rybosomowych w danym warunku hodowli drożdży zmieniła się znacznie w zależności od ilości posiadanych metylacji w cząsteczce, stąd w kolejnym etapie mojej pracy doktorskiej sprawdziłam w jaki sposób metylacje wpływają na akumulację określonych typów tRF oraz sdRNA.

Łącznie we wszystkich bibliotekach wykryto 2 028 różnych tRF, z czego 1 231 tRF w bibliotekach AlkB+ oraz 954 tRF w bibliotekach AlkB-.

W warunkach głodu cukrowego we frakcji monosomów wykryto 121 tRF w bibliotekach AlkB- oraz 484 tRF w bibliotekach AlkB+, przy czym 96 tRF było wspólnych dla obu grup (Diag.1A). We frakcji polisomów zidentyfikowano 673 tRF w bibliotekach AlkB- oraz 787 tRF w bibliotekach AlkB+, z czego 513 tRF było wspólnych (Diag.1B). We frakcji podjednostek rybosomowych wykryto 866 w bibliotekach AlkB- i 754 tRF w bibliotekach AlkB+, przy czym 533 tRF było wspólnych (Diag.1C). W frakcji wolnych RNA wykryto odpowiednio 946 i 953 tRF w bibliotekach AlkB- i AlkB+, ze wspólną pulą 711 cząsteczek (Diag.1D).



Diag.1 Ilości tRF w bibliotekach rancRNA-seq z hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego. 1A biblioteki z frakcji monosomów. 1B biblioteki z frakcji polisomów. 1C biblioteki z frakcji podjednostek rybosomowych. 1D biblioteki z frakcji wolnych RNA.

W warunkach optymalnych w monosomach zidentyfikowano 338 tRF w bibliotekach AlkB- oraz 536 tRF w bibliotekach AlkB+, przy czym 232 tRF było wspólnych dla obu bibliotek (Diag.2A). We frakcji polisomów wykryto 1017 (AlkB-) i 958 (AlkB+) tRF, ze wspólną pulą 802 tRF (Diag.2B). We frakcji podjednostek rybosomowych wykryto 774 tRF w bibliotekach AlkB- oraz 697 tRF w bibliotekach AlkB+, przy czym 461 tRF było wspólnych. We frakcji wolnych RNA w bibliotekach AlkB- i AlkB+ wykryto odpowiednio 1171 i 1230 tRF, ze wspólną pulą 966 cząsteczek (Diag.2D).



Diag.2 Ilości tRF w bibliotekach rancRNA-seq z hodowli w warunkach optymalnych. 2A biblioteki z frakcji monosomów. 2B biblioteki z frakcji polisomów. 2C biblioteki z frakcji podjednostek rybosomowych. 2D biblioteki z frakcji wolnych RNA.

W warunkach stresu hiperosmotycznego w monosomach zidentyfikowano 543 tRF w bibliotekach AlkB- oraz 504 tRF w bibliotekach AlkB+, przy czym 366 tRF było wspólnych (Diag.3A). We frakcji polisomów w bibliotekach AlkB- i AlkB+ odpowiednio wykryto 722 i 747 tRF, ze wspólną pulą 547 tRF (Diag.3B), we frakcji podjednostek rybosomowych - wykryto 805 i 727 tRF, przy czym 549 tRF było wspólnych (Diag.3C). Natomiast we frakcji wolnych RNA zidentyfikowano 1027 tRF (AlkB-) i 917 tRF (AlkB+), ze wspólną pulą, którą stanowiły 702 tRF (Diag.3D).



Diag.3 Ilości tRF w bibliotekach rancRNA-seq z hodowli w stresu hiperosmotycznego. 3A biblioteki z frakcji monosomów. 3B biblioteki z frakcji polisomów. 3C biblioteki z frakcji podjednostek rybosomowych. 3D biblioteki z frakcji wolnych RNA.

Łącznie we wszystkich bibliotekach wykryto 961 różnych sdRNA, z czego 456 sdRNA w bibliotekach AlkB+ oraz 493 sdRNA w bibliotekach AlkB-.

W warunkach stresu głodu cukrowego we frakcji monosomów zidentyfikowano 57 sdRNA w bibliotekach AlkB- i 43 w bibliotekach AlkB+, przy czym 20 sdRNA było wspólnych dla obu tych bibiotek (Diag.4A). We frakcji polisomów odpowiednio zidentyfikowano 385 oraz 449 sdRNA, ze wspólną pulą 302 sdRNA (Diag.4B). W frakcji podjednostek rybosomowych wykryto 384 oraz 71 sdRNA, przy czym 60 sdRNA było wspólnych (Diag.4C). W frakcji RNA niezwiązanych z rybosomami zidentyfikowano 185 i 71 sdRNA, ze wspólną pulą 59 sdRNA (Diag.4D).



Diag.4 Ilości sdRNA w bibliotekach rancRNA-seq z hodowli w stresie głodu cukrowego. 4A biblioteki z frakcji monosomów. 4B biblioteki z frakcji polisomów. 4C biblioteki z frakcji podjednostek rybosomowych. 4D biblioteki z frakcji wolnych RNA.

W warunkach optymalnych w frakcji monosomów zidentyfikowano 53 sdRNA przed oraz 41 tRF w bibliotekach zawierających RNA poddane demetylacji, 13 sdRNA było wspólnych (Diag.5A). W frakcji polisomów w bibliotekach AlkB- i AlkB+ odpowiednio zidentyfikowano 356 i 353 sdRNA, ze wspólną pulą 251 sdRNA (Diag.5B). We frakcji podjednostek rybosomowych wykryto 472 (AlkB-) i 122 (AlkB+) sdRNA, przy czym 98 sdRNA było wspólnych (Diag.5C), a we frakcji RNA niezwiązanych z rybosomami - 199 i 140 sdRNA, ze wspólną pulą 117 sdRNA (Diag.5D).



Diag.5 Ilości sdRNA w bibliotekach rancRNA-seq z hodowli w warunkach optymalnych. 5A biblioteki z frakcji monosomów. 5B biblioteki z frakcji polisomów. 5C biblioteki z frakcji podjednostek rybosomowych. 5D biblioteki z frakcji wolnych RNA.

W warunkach stresu hiperosmotycznego we frakcji monosomów zidentyfikowano 162 sdRNA w bibliotekach AlkB- oraz 31 sdRNA w bibliotekach AlkB+, przy czym 22 sdRNA było wspólnych (Diag.6A). We frakcji polisomów wykryto odpowiednio 194 oraz 183 sdRNA, wspólną pulę stanowiło 119 sdRNA (Diag.6B). We frakcji podjednostek rybosomowych wykryto 377 i 76 sdRNA, przy czym pulę 62 sdRNA było wspólnych (Diag.6C). Natomiast we frakcji RNA niezwiązanych z rybosomami zidentyfikowano 224 i 105 sdRNA, ze wspólną pulą 83 sdRNA (Diag.6D).



Diag.6 Ilości sdRNA w bibliotekach rancRNA-seq z hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego. 6A biblioteki z frakcji monosomów. 6B biblioteki z frakcji polisomów. 6C biblioteki z frakcji podjednostek rybosomowych. 6D biblioteki z frakcji wolnych RNA.

Podsumowując, w niniejszej pracy doktorskiej zidentyfikowałam znaczną liczbę tRF i sdRNA, które występują wyłącznie w bibliotekach AlkB- lub wyłącznie w bibliotekach AlkB+, co wskazuje na istotność metylacji występujących w tRNA i snoRNA w procesie powstawania z nich tRF i sdRNA oraz asocjacji tRF i sdRNA z rybosomami. Wynik ten jest zgodny z doniesieniem z wcześniejszych badań, gdzie zaobserwowano, że enzym AlkB przyczynia się do zwiększonej obecności różnych fragmentów tRNA, zarówno kanonicznych, jak i niekanonicznych [44]. Zatem oba badania mogą wskazywać, że metylacje w tRNA mogą odgrywać istotną rolę w regulacji lub określaniu miejsc cięcia konkretnych tRNA.

Mając na uwadze powyższe, w kolejnym etapie pracy przeprowadziłam analizę dla wybranych sdRNA oraz tRF o zwiększonej akumulacji w poszczególnych frakcjach (podjednostki, monosomy, polisomy) w stresie abiotycznym względem tej samej frakcji

w warunkach optymalnych i podjęłam próbę korelacji ich akumulacji z potencjalną rolą podczas poszczególnych etapów translacji.

4.4.3.2. Nazewnictwo rancRNA zastosowane w pracy

Stosowane przeze mnie w niniejszej pracy doktorskiej nazwy cząsteczek sdRNA oraz tRF odnoszą się do prekursorowych cząsteczek snoRNA oraz tRNA, z których powstały. W nawiasach umieszczono numery nukleotydów, od których dana cząsteczka się zaczyna i kończy np. snR47 (61–99) oznacza, że cząsteczka rancRNA powstała ze snoRNA snR47, zaczyna się na nukleotydzie 61 a kończy na 99 cząsteczki snR47. Dla przykładu, na rysunku 25 umieściłam strukturę snR47, a kolorem fioletowym oznaczyłam sdRNA snR47 (61-99). Analogiczną zasadę zastosowałam do zidentyfikowanych w pracy rancRNA tRF, dla przykładuna rysunku 26 umieszczono strukturę tS(AGA) oraz tS(AGA)D1 (49-85). W przypadku cząsteczek tRF przed numerami nukleotydów wskazującymi początek i koniec, znajdują się litery oznaczające region w komórce w którym nastąpiło cięcie danego tRF.



Rys. 25 Struktura drugorzędowa snoRNA 47 oraz lokalizacja powstającego z niego rancRNA snR47 (61— 99). Czerwone strzałki oznaczają miejsce cięcia snoRNA. Struktura snoRNA została wygenerowana z wykorzystaniem RNAfold WebSerwer.



Rys. 26 Struktura drugorzędowa tS(AGA) oraz lokalizacja powstającego z niego rancRNA tS(AGA)D1 (49–85). Czerwone strzałki oznaczają miejsce cięcia tRNA. Źródło struktury tRNA: yeastgenome.org.

4.4.4. Analiza sdRNA oraz tRF o istotnych statystycznie zmianach akumulacji w poszczególnych frakcjach

4.4.4.1. sdRNA wykazujące istotne statystycznie zmiany akumulacji w podjednostkach rybosomów, monosomach oraz polisomach.

Podczas porównania bibliotek z hodowli w warunkach stresu głodu cukrowgo z kontrolnymi zaobserwowano statystycznie istotne zmiany poziomu akumulacji 169 sdRNA: 29 sdRNA w podjednostkach rybosomowych, 10 sdRNA w monosomach oraz 137 sdRNA w polisomach (Tab. 38, 40, 44, 46, 50, 52; Materiał dodatkowy). We frakcji podjednostek zidentyfikowano 26 unikatowych sdRNA tylko dla tej frakcji rybosomowej. Jeden wspólny sdRNA dla podjednostek rybosomowych i monosomów - snR61 (2–44) oraz dwa dla podjednostek i polisomów: snR33 (165–183) oraz snR128 (105–124). We frakcji monosomów zaobserwowano 5 unikatowych sdRNA. Natomiast we frakcji polisomów wyodrębniono 131 unikatowych sdRNA. Wykryto 4 wspólne sdRNA dla monosomów i polisomów: snR68 (101–136), snR72 (78–95), snR63 (232–255) oraz snR60 (86–104) (Diag.7A).



Diagram 7. Ilości sdRNA o istotnych statystycznie zmianach akumulacji we frakcjach podjednostek, monosomów i polisomów w warunkach stresu względem warunków optymalnych. A. Stres głodu cukrowego względem warunków optymalnych. B. Stres hiperosmotyczny względem warunków optymalnych.

Podczas porównania bibliotek z hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego z kontrolnymi zaobserwowano statystycznie istotne zmiany poziomu akumulacji 63 sdRNA: 42 sdRNA w podjednostkach rybosomowych, 2 sdRNA w monosomach oraz 22 sdRNA w polisomach (Tab. 39, 40, 45, 46, 51, 52; Materiał dodatkowy). We frakcji podjednostek zidentyfikowano 39 unikatowych sdRNA tylko dla tej frakcji rybosomowej. Brak wspólnych sdRNA podjednostek rybosomowych i monosomów oraz 3 dla podjednostek i polisomów: snR40 (1–24), snR190 (-1–17) oraz snR77 (39–73). W frakcji monosomów zaobserwowano jedynie 2 unikatowe sdRNA. Natomiast w frakcji polisomów wyodrębniono 19 unikatowych sdRNA (Diag.7B).

4.4.4.2. tRF wykazujące istotne statystycznie zmiany asocjacji w podjednostkach rybosomów, monosomach oraz polisomach.

Podczas porównania bibliotek z hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego z kontrolnymi zaobserwowano statystycznie istotne zmiany poziomu akumulacji 361 tRF: 101 tRF w podjednostkach rybosomowych, 63 tRF w monosomach oraz 229 tRF w polisomach (Tab. 41, 43, 47, 49; 53, 55, Materiał dodatkowy). We frakcji podjednostek zidentyfikowano 76 unikatowych tRF tylko dla tej frakcji rybosomowej. Jedenaście wspólnych tRF podjednostek rybosomowych i monosomów: tS(AGA)L (56-87), tH(GUG)E2 (42-65), tA(UGC)G (45-71), tV(AAC)H (40-76), tC(GCA)G (34-73), tE(CUC)D (55-74), tQ(UUG)L (47-75), tE(UUC)L (55-75), tG(GCC)E (30-70), tV(AAC)L (40-76), tR(CCG)L (42-62); dwanaście dla podjednostek i polisomów: tR(CCU)J (38-71), tE(UUC)I (30-50), tS(AGA)L (44-77), tI(AAU)P2 (75-93), tT(UGU)H (55-75), tV(CAC)H (39-72), tV(AAC)G3 (52-77), tD(GUC)J3 (39-74), tR(ACG)L (31–52), tG(UCC)G (31–51), tA(AGC)L (47–67), tT(UGU)G2 (46–70). We frakcji monosomów zaobserwowano 45 unikatowych tRF. Natomiast we frakcji polisomów wyodrębniono 210 unikatowych tRF. Zidentyfikowano pięć wspólnych tRF dla monosomów i polisomów: tK(CUU)M (43-71), tF(GAA)P1 (38-69), tT(CGU)K (55-75), tL(CAA)N (62-80), tE(UUC)I (35-74). Zaobserwowano również 2 wspólne tRF dla wszystkich trzech analizowanych frakcji: tE(CUC)D (33-74) oraz tV(AAC)L (54-76) (Diag.8A).



Diagram 8. Ilości tRF o istotnych statystycznie zmianach akumulacji we frakcjach podjednostek, monosomów i polisomów w warunkach stresu względem warunków optymalnych. A. Stres głodu cukrowego względem warunków optymalnych. B. Stres hiperosmotyczny względem warunków optymalnych.

Podczas porównania bibliotek rancRNAseq z hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego z kontrolnymi zaobserwowano statystycznie istotne zmiany poziomu akumulacji 313 tRF: 64 tRF w podjednostkach rybosomowych, 37 tRF w monosomach oraz 231 tRF w polisomach (Tab. 42, 43, 48, 49, 54, 55; Materiał dodatkowy). We frakcji podjednostek zidentyfikowano 52 unikatowe tRF tylko dla tej frakcji rybosomowej, dwa wspólne tRF podjednostek rybosomowych i monosomów: tK(CUU)M (43–71) oraz tF(GAA)G (40–76) oraz osiem dla podjednostek i polisomów: tS(AGA)L (30–47), tD(GUC)J3 (3–33), tV(AAC)G3 (52–77), tE(UUC)I (52–70), tS(AGA)L (59–83), tV(AAC)O (32–53), tG(CCC)D (52–69), tT(UGU)G2 (46–70). W frakcji monosomów zaobserwowano 28 unikatowych tRF. Natomiast w frakcji polisomów wyodrębniono aż 216 unikatowych tRF. Zidentyfikowano pięć wspólnych tRF monosomów i polisomów: tT(UGU)G1 (43–70), tP(AGG)N (37–70), tV(CAC)H (1–29), tR(CCG)L (42–62) oraz tQ(UUG)D3 (47–71). Zaobserwowano również 2 wspólne tRF dla wszystkich trzech analizowanych frakcji: tE(UUC)I (1–23) oraz tI(AAU)L1 (40–69) (Diag.8B).

W celu dokładniejszej analizy interakcji między sdRNA i tRF a aparatem translacyjnym, przeanalizowałam mapy cieplne obrazujące zmiany w ich asocjacji z różnymi frakcjami rybosomalnymi w porównaniu do frakcji wolnych RNA. Aby lepiej zrozumieć rolę rancRNA w odpowiedzi na różne rodzaje stresu, podzieliłam je na trzy grupy:

- rancRNA wykazujące istotne statystycznie zmiany asocjacji tylko w odpowiedzi na stres głodu cukrowego,
- rancRNA wykazujące istotne statystycznie zmiany asocjacji tylko w odpowiedzi na stres hiperosmotyczny,
- rancRNA wykazujące istotne statystycznie zmiany asocjacji w obu typach stresu.

Ze względu na dużą liczbę zidentyfikowanych sdRNA i tRF wykazujących istotne statystycznie różnice w poziomie akumulacji, przeprowadziłam wstępną selekcję cząsteczek w celu szczegółowej analizy. Jako kryterium włączenia do dalszych analiz przyjęto minimalną liczbę tysiąca odczytów na milion dla cząsteczek wykazujących istotne różnice w porównaniu kontrolnym (np. stres głodowy vs kontrola w polisomach). W przypadku rancRNA, w których poziom akumulacji był niższy, wybrano pulę cząsteczek o najwyższym poziomie asocjacji w danej grupie.

4.4.4.3. Podjednostki rybosomowe

Biblioteki podjednostek rybosomalnych (SU) zawierają krótkie rancRNA (sdRNA oraz tRF), które asocjowały z małą (40S) i dużą (60S) podjednostką rybosomu przed ich połączeniem w kompletny rybosom. W małej podjednostce zachodzą kluczowe etapy inicjacji translacji, takie jak: wiązanie czynnika inicjacji IF3, mRNA oraz pierwszego tRNA, a także hydroliza GTP katalizowana przez IF2. Z kolei w dużej podjednostce zachodzą procesy zachodzą procesy przygotowaniem jej do translacji, przetwarzanie z 66S prekursora rybosomu tak aby powstała w pełni funkcjonalna podjednostka 60S [162], [163].

4.4.4.3.1. Wybrane przykłady sdRNA o istotnych statystycznie zmianach w oddziaływaniu z podjednostkami rybosomalnymi pod wpływem stresu

4.4.4.3.1.1. Wybrane sdRNA wykazujące istotne zmiany asocjacji do podjednostek rybosomowych tylko w odpowiedzi na stres głodu cukrowego

Zidentyfikowano 13 sdRNA pochodzących z 9 różnych snoRNA, które wykazywały istotne statystycznie zmiany w akumulacji w podjednostkach rybosomowych w stresie głodu cukrowego względem warunków optymalnych. Tabela 38 (Materiał dodatkowy) przedstawia wartości istotności statystycznej zmiany akumulacji dla każdego sdRNA z tej grupy. Na Rys. 27 umieszczono mapę cieplną z porównaniem poziomu akumulacji w/w sdRNA w podjednostkach i poziomu ekspresji we frakcji wolnych RNA. Najwyższe poziomy akumulacji zaobserwowałam w warunkach optymalnych we frakcji podjednostek.



Rys.27 Mapa cieplna sdRNA o istotnych statystycznie zmianach w warunkach stresu głodu cukrowego w porównaniu do warunków optymalnych we frakcji podjednostek rybosomowych. Liczby przy legendzie przedstawiają ilości odczytów na 1 mln w bibliotece.

Założone kryterium ponad tysiąca odczytów na milion spełniły tylko sdRNA z bibliotek rancRNAseq z warunków optymalnych, AlkB-. Dlatego w pozostałych bibliotekach wybrałam po 2 sdRNA o najwyższej ilości odczytów. W Tabeli 8 umieszczono wybrane sdRNA, poziomy ich asocjacji z frakcją podjednostek rybosomowych oraz wartości istotności statystycznej zmiany.

	BC	BC+	Κ	K+	Wartość p
snR128 (105-124)	135,9	86,7	0	0	0,0314
snR190 (-2-21)	248,4	0	1336,8	163,5	0,0133
snR190 (170-192)	54,8	0	377,8	237,8	0,0361
snR40 (1-37)	66,6	10,8	1157,3	138,7	0,0287
snR44 (-1-40)	78,8	0	1313,9	50,4	0,0230
snR73 (76–95)	28,8	88,5	0	0	-

Tab.8 sdRNA wykazujące największą akumulację w bibliotekach rancRNAseq z hodowli w stresie głodu cukrowego w podjednostkach rybosomowych w stosunku do warunków optymalnych. Liczby przedstawiają ilości odczytów na 1 mln w bibliotece. BC – krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego, BC+ – krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego AlkB+, K – krótkie RNA z hodowli w warunkach optymalnych, K+ – krótkie RNA z hodowli w warunkach optymalnych AlkB+.

Najwyższy poziom akumulacji w podjednostkach rybosomalnych w warunkach optymalnych osiągnęły następujące rancRNA: snR190 (-2–21) z 1 336,7 odczytami na milion, snR44 (-1–40) z 1 313,8 odczytów na milion oraz snR40 (1–37) z 1157,2 odczytów na milion (Wyk. 3).

W bibliotekach z RNA podanego demetylacji największą ilość odczytów obserwowano dla snR190 (170–192) i snR40 (1–37), odpowiednio z 237,7 i 138,6 odczytów na milion. Poziom akumulacji snR190 (170–192) był znacznie niższy (140 odczytów na milion) w porównaniu z próbką niedemetylowaną, natomiast dla snR40 (1–37) spadek ten wyniósł 1018,6 odczytów na milion.



Wyk. 3 Porównanie akumulacji wybranych sdRNA w podjednostkach rybosomalnych z bibliotek rancRNAseq z hodowli w warunkach optymalnych oraz stresie glodu cukrowego. Przedstawiono sdRNA wykazujące istotnie statystycznie zmienioną akumulację w porównaniu do frakcji RNA niezwiązanych z rybosomami.

W warunkach głodu cukrowego najwyższy poziom asocjacji rancRNA sdRNA do podjednostek zaobserwowano dla snR190 (-2–21) (Wyk. 3) i snR128 (105–124), odpowiednio z 248,4 i 135,8 odczytami na milion. Poziom akumulacji tych dwóch sdRNA we frakcjach rybosomalnych podczas głodu cukrowego był jednak znacząco niższy ich poziom we frakcji wolnych, nie związanych z rybosomem RNA oraz niż maksymalne poziomy akumulacji zanotowane w warunkach optymalnych.

snR128 (105–124) wykazywał również wysoką akumulację w bibliotece AlkB+ we frakcji podjednostek bibliotek z hodowli w warunkach głodu cukrowego, choć na niższym poziomie – 86,6 odczytów na milion, niż w bibliotece bez dodatku białek demetylujących (135,9 odczytów na milion). W bibliotekach AlkB+ z hodowli w stresie głodu cukrowego, obserwowano również znaczącą akumulację dla snR73 (76–95) z 88,5 odczytami na milion. Poziom asocjacji wspomnianego sdRNA w podjednostkach był 2,75 razy większy niż we frakcji RNA niezwiązanych z rybosomami.

Na Rysunku 28 umieszczono struktury drugorzędowe sdRNA wykazujących najwyższą asocjację do podjednostek rybosomalnych w stresie głodu cukrowego w porównaniu do warunków optymalnych. W bibliotekach AlkB- najwięcej odczytów zaobserwowano dla snR190 (-2–21) pochodzącego z 5'końca snoRNA. Natomiast sdRNA z najwyższą ilością odczytów w bibliotekach AlkB+ pochodziły z końca 3' lub rejonu w pobliżu końca 3': snR128(105–124) oraz snR190 (170–192).


Rys.28 Struktury drugorzędowe snoRNA z zaznaczonymi pozycjami sdRNA wykazującymi najwyższą akumulację w podjednostkach rybosomowych z bibliotek rancRNAseq z hodowli w stresie glodu cukrowego względem warunków optymalnych. Czerwonymi strzałkami oznaczono miejsca cięcia snoRNA. Struktura drugorzędowa snoRNA została wygenerowana z wykorzystaniem RNAfold WebSerwer.

Analiza 13 sdRNA o istotnych statystycznie zmianach akumulacji w stresie głodu cukrowego względem warunków optymalnych we frakcji podjednostek rybosomowych wykazała 3 sdRNA posiadające odczyty powyżej tysiąca na milion.

W warunkach optymalnych najwyższy poziom akumulacji zaobserwowano dla snR190 (-2–21), snR44 (-1–40) oraz snR40 (1–37). Wysoki poziom tych sdRNA w podjednostkach sugeruje, że mogą one odgrywać istotną rolę w procesach zachodzących przy składaniu podjednostek w rybosom w warunkach normalnych wzrostu, a spadek ich akumulacji w warunkach stresowych może być związany z przystosowywaniem komórki do warunków stresowych, np. obniżeniem poziomu translacji, co zaobserwowałam podczas realizacji niniejszej pracy doktorskiej i zaprezentowałam na Rys. 5

Zaskakujące jest, że poziom akumulacji snR190 (-2–21) oraz snR128 (105–124) w bibliotekach traktowanych białkami typu AlkB był znacznie niższy niż w próbach niedemetylowanych. Fakt ten wskazuje na utrudnioną detekcję cząsteczek pozbawionych metylacji. Podobne obserwacje, tj. porównywalne lub zmniejszone ilości odczytów korespondujących do 3'tRF pochodzących z tRNA: Arg-CCG, Gly-CCC i His-GTG w próbkach niepoddanych demetylacji (w porówaniu do próbek poddanych demetylacji) były poczynione w danych pochodzących z sekwencjonowania ARMseq przez twórców tej metody, grupę Todda Lowe [33]. Autorzy takie obserwacje tłumaczyli brakiem modyfikacji m¹A58 w tRF o niższej ilości odczytów w bibliotekach AlkB+.

W warunkach głodu cukrowego we frakcji podjednostek rybosomowych zaobserwowano wysoki poziom akumulacji snR190 (-2–21) i snR128 (105–124). Fakt, że poziom akumulacji obu tych sdRNA był niższy w warunkach stresu, może świadczyć o zmianach w funkcjonowaniu rybosomów podczas warunków głodu cukrowego. Już na wykresach profilowań polisomowych (Rys.5) obserwowałam 10-krotną zmianę stosunku polisomów do monosomów w stresie głodu cukrowego w porównaniu z warunkami optymalnymi.

4.4.4.3.1.2. Wybrane sdRNA wykazujące istotne zmiany asocjacji do podjednostek rybosomowych tylko w odpowiedzi na stres hiperosmotyczny

Zidentyfikowano 26 sdRNA pochodzących z 18 różnych snoRNA w podjednostkach rybosomowych w stresie hiperosmotycznym względem warunków optymalnych. Tabela 39 (Materiał dodatkowy) przedstawia wartości istotności statystycznej zmian akumulacji dla każdego w/w sdRNA. Na Rys. 29 umieszczono mapę cieplną z porównaniem poziomu akumulacji w podjednostkach wspomnianej grupy sdRNA względem frakcji wolnych RNA. Najwyższe poziomy asocjacji ponownie można zaobserwować w bibliotekach z warunków optymalnych AlkB-.



Rys.29 Mapa cieplna sdRNA o istotnych statystycznie zmianach w warunkach stresu hiperosmotycznego w porównaniu do warunków optymalnych we frakcji podjednostek rybosomowych. Liczby przy legendzie przedstawiają ilości odczytów na 1 mln w bibliotece.

Do dalszej analizy zdecydowano się wybrać sdRNA posiadające ponad tysiąc odczytów na milion. W związku z tym, że w bibliotekach z hodowli w stresie hiperosmotycznym (AlkB- oraz AlkB+) żaden sdRNA nie spełnił tego kryterium, wybrano po 2 sdRNA posiadające najwięcej odczytów (AlkB- oraz AlkB+). W Tabeli 9 umieszczono wybrane sdRNA, ich poziomy asocacji z frakcją podjednostek oraz wartości istotności statystycznej.

	Κ	K+	Н	H+	Wartość p
snR128 (1-25)	4770	404,5	0	29,1	0,0024
snR128 (1-29)	4759,2	223,7	691,5	33,4	0,0434
snR24 (67-89)	3077,4	1168,9	61,6	0	0,0094
snR24 (71-88)	3562	1183,8	97,2	31,3	0,0216
snR45 (141–171)	826,6	82,6	106,2	0	0,0421

Tab. 9 sdRNA wykazujące największą akumulację w bibliotekach rancRNAseq z hodowli w warunkach hiperosmotycznych w podjednostkach rybosomowych w stosunku do warunków optymalnych. Liczby przedstawiają ilości odczytów na 1 mln w bibliotece. K– krótkie RNA z hodowli w warunkach optymalnych, K+– krótkie RNA z hodowli w warunkach optymalnych AlkB+, H– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego, H+– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego AlkB+.

Analiza wspomnianej grupy sdRNA (Tab. 9) wykazała, że w warunkach kontrolnych największą akumulację do podjednostek rybosomowych osiągnęły snR128 (1–25) z 4 770 odczytami na milion, snR128 (1–29) z 4 759 odczytami na milion oraz snR24 (71–88) z 3 562 odczytami na milion. Te sdRNA odznaczały się znacznie mniejszą obecnością w frakcji wolnych RNA, co wskazuje na ich silną asocjację z podjednostkami rybosomalnymi (Wyk. 4). Jak wiadomo, snR128 jest związany z syntezą 18S rRNA [164], a snR24 jest komplementarny do 28S rRNA [165]. Dlatego silna asocjacja sdRNA pochodzących z snR128 i snR24 z podjednostkami rybosomowymi jest zapewne powiązana z ich funkcjami w małej i dużej podjednostce.

W bibliotekach rancRNAseq przygotowanych z frakcji podjednostek, hodowli w warunkach optymalnych AlkB+, najwyższy poziom akumulacji obserwowano dla snR24 (71–88) i snR24 (67–89), odpowiednio z 1 183,7 i 1 168,9 odczytami na milion, nie były one obecne we frakcji RNA niezwiązanych z rybosomami (co oznacza, że wszystkie kopie tych sdRNA istnieją w komórce jako związane z rybosomami, Wyk. 4). Wartości te były jednak zdecydowanie niższe w porównaniu z próbkami kontrolnymi AlkB-.



Wyk. 4 Porównanie akumulacji wybranych sdRNA w podjednostkach rybosomalnych z bibliotek rancRNAseq z hodowli w warunkach optymalnych oraz w stresie hiperosmotycznym. Przedstawiono sdRNA wykazujące istotnie statystycznie zmienioną akumulację w porównaniu do frakcji RNA niezwiązanych z rybosomami.

W warunkach stresu osmotycznego najwyższy poziom asocjacji z podjednostkami rybosomowymi obserwowano dla snR128 (1–29) i snR45 (141–171), odpowiednio z 691,5 i 106,1 odczytami na milion. Wartości te były niższe niż maksymalne poziomy zanotowane w warunkach optymalnych (Wyk. 4). W bibliotekach z wolnych RNA, poziom snR128 (1–29) był podobny do poziomu w podjednostkach rybosomalnych, z tą różnicą, że po demetylacji RNA jego obecność we frakcji RNA niezwiązanych z rybosomami była większa. Te wyniki wskazują na niejednorodny wpływ białek AlkB na tę samą cząsteczkę zasocjowaną z różnymi frakcjami rybosomalnymi.

W bibliotekach AlkB+ w warunkach stresu osmotycznego najwyższy poziom akumulacji we frakcji podjednostek osiągnęły snR128 (1–29) i snR24 (71–88), odpowiednio z 33,4 i 31,2 odczytami na milion. Wartości te były niższe w porównaniu z innymi analizowanymi warunkami.

Na Rysunku 30 umieszczono struktury drugorzędowe sdRNA wykazujących najwyższą asocjację z podjednostkami w stresie hiperosmotycznym w porównaniu do warunków optymalnych. W warunkach optymalnych oraz stresowych w bibliotekach AlkBnajwięcej odczytów posiadały sdRNA z końca 5': snR128 (1–25) oraz snR128 (1–29). Natomiast w bibliotekach AlkB+ najwięcej odczytów obserwowano u sdRNA zarówno z końca 5' jak i 3' końca: snR24 (71–88) oraz snR128 (1–29).



Rys. 30 Struktury drugorzędowe snoRNA z zaznaczonymi pozycjami sdRNA wykazujących najwyższą akumulację w podjednostkach rybosomowych z bibliotek rancRNAseq w hodowli ze stresu hiperosmotycznego względem warunków optymalnych. Czerwonymi strzałkami oznaczono miejsca cięcia snoRNA. Struktura drugorzędowa snoRNA została wygenerowana z wykorzystaniem RNAfold WebSerwer.

Analiza 26 sdRNA o istotnych statystycznie zmianach akumulacji w stresie hiperosmotycznym względem warunków optymalnych we frakcji podjednostek rybosomowych wykazała 4 sdRNA posiadające odczyty powyżej tysiąca na milion.

W warunkach optymalnych najwyższy poziom akumulacji zaobserwowano dla snR128 (1–25), snR128 (1–29) oraz snR24 (71–88). Wysoki poziom tych sdRNA w podjednostkach sugeruje, że mogą one odgrywać istotną rolę w procesach zachodzących przy składaniu podjednostek w rybosom w warunkach normalnych wzrostu, a spadek ich akumulacji w warunkach stresowych może być związany z przystosowywaniem komórki do warunków stresowych. W naszych wcześniejszych badaniach analizowaliśmy snR128 (1-22) [22], obserwując jego podwyższone stężenie w odpowiedzi na stresy związane z szokiem cieplnym, promieniowaniem UV oraz stresem hipoosmotycznym. Uzyskane wyniki wskazywały na zróżnicowaną akumulację

tego sdRNA, niezależną od prekursorowych snoRNA oraz sugrowały możliwość zależności przetwarzania snoRNA do sdRNA w zależności od stresu. W niniejszej pracy doktorskiej snR128 (1-22) nie został zidentyfikowany w puli cząsteczek wykazujących istotne statystycznie zmiany w akumulacji. Fakt ten implikuje zróżnicowanie procesów przetwarzania snoRNA do sdRNA oraz podkreśla znaczenie zastosowania sekwencjonowania wysokoprzepustowego w celu szczegółowej analizy sdRNA w komórkach. Dzięki tej technice możliwe jest nie tylko stanie wykrycie różnic w długości sdRNA rzędu 3-7 nukleotydów długości, ale również identyfikacja potencjalnie nowych sdRNA o istotnym wpływie na procecy translacji w komórkowej.

Interesujące jest, że w bibliotekach traktowanych białkami AlkB, najwyższą akumulację obserwowano dla dwóch sdRNA pochodzących z tego samego prekursorowego snoRNA: snR24 (71–88) i snR24 (67–89). Niemniej jednak, wymienione sdRNA nie wykazywały najwyższej akumulacji w podjednostkach w bibliotekach AlkB-, gdzie dominowały sdRNA128. W bibliotekach AlkB+ odnotowałam spadek akumulacji wspomnianych sdRNA128 o 11,8 i 21,2 razy. Istotnym jest podkreślenie, że wartości akumulacji wszystkich omawianych wyżej sdRNA były znacząco wyższe w bibliotekach AlkB-. Jedynym wyjątkiem jest snR128 (1–25), który w bibliotekach AlkB+ zawierających RNA z hodowli w stresie hiperosmotycznym został wykryty w ilości 29,1 odczytów na milion, a nie wykryto go w bibliotekach AlkB- z hodowli w stresie hiperosmotycznym.

W warunkach stresu hiperosmotycznego zaobserwowano wysoki poziom akumulacji snR128 (1–29) i snR45 (141–171). Fakt, że poziom akumulacji obu tych sdRNA był niższy niż w warunkach optymalnych, może świadczyć o zmianach w funkcjonowaniu rybosomów (w tym rearanżacji oddziaływań sdRNA/rybosom) podczas warunków hiperosmotycznych.

4.4.4.3.1.3. Wybrane sdRNA wykazujące istotne zmiany asocjacji z podjednostkami rybosomowymi w odpowiedzi na oba typy stresów

Zidentyfikowano 16 sdRNA pochodzących z 13 różnych snoRNA w podjednostkach rybosomowych, których poziom akumulacji zmienił się istotnie statystycznie w obu typach stresów abiotycznych względem warunków optymalnych. Tabela 40 (Materiał dodatkowy) przedstawia wartości istotności statystycznej zmian akumulacji dla każdego sdRNA. Na Rys. 31 umieszczono mapę cieplną z porównaniem poziomu akumulacji w podjednostkach wspomnianej grupy sdRNA względem frakcji wolnych RNA. Ponownie, najwyższe poziomy akumulacji obserwowałam w bibliotekach z hodowli w warunkach optymalnych AlkB-.



Rys. 31 Mapa cieplna sdRNA o istotnych statystycznie zmianach w warunkach głodu cukrowego oraz stresu hiperosmotycznego w porównaniu do warunków optymalnych we frakcji podjednostek rybosomowych. Liczby przy legendzie przedstawiają ilości odczytów na 1 mln w bibliotece.

Do dalszej analizy zdecydowano się wybrać sdRNA posiadające ponad tysiąc odczytów na milion – kryterium spełniły tylko sdRNA z bibliotek z warunków optymalnych AlkB-. W pozostałych bibliotekach wybrano po dwa sdRNA o najwyższej ilości odczytów. W Tabeli 10 umieszczono wybrane sdRNA, poziomy ich asocjacji z frakcją podjednostek rybosomowych w obu typach stresów abiotycznych oraz wartości istotności statystycznej.

	Wartość p*	BC	BC+	Κ	K+	Н	H+	Wartość p**
snR38 (68–95)	0,0326	129,4	0	1146,1	63,6	109,2	0	0,0145
snR40 (1-32)	0,0402	93,7	16	2797,4	175	92,8	0	0,0018
snR60 (2-44)	0,0332	272,7	0	2033,2	11,6	201,9	0	0,0114
snR61 (2-44)	0,0332	391,3	0	2913,2	16,5	209	0	0,0066
snR72 (1-29)	0,0337	170,7	0	2120,7	146,1	285,9	0	0.0317

Tab. 10 sdRNA wykazujące największą akumulację w bibliotekach rancRNAseq z hodowli w obydwu typach stresu w podjednostkach rybosomowych w stosunku do warunków optymalnych. Liczby przedstawiają ilości odczytów na 1 mln w bibliotece. BC– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego, BC+– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego AlkB+, K– krótkie RNA z hodowli w warunkach optymalnych, K+– krótkie RNA z hodowli w warunkach optymalnych AlkB+, H– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego, H+– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego (AlkB+, i AlkB-) z hodowli w warunkach optymalnych (AlkB+ i AlkB-). Wartość p**– porównanie hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego (AlkB+ i AlkB-).

Najwyższy poziom akumulacji we frakcji podjednostek rybosomalnych w warunkach optymalnych osiągnęły: snR61 (2–44) z 1 146 odczytami na milion, snR40 (1–32) z 2 797,3 odczytami na milion, snR72 (1–29) z 2 120,7 odczytami na milion, snR60 (2–44) z 2 033,1 odczytami na milion oraz snR38 (68–95) z 1 146 odczytami na milion.

Wszystkie te sdRNA wykazywały znacznie mniejszą obecność we frakcji wolnych RNA, co wskazuje na ich silną asocjację z podjednostkami rybosomalnymi (Wyk. 5).

W bibliotekach zawierających rancRNA poddane demetylacji (SU + AlkB na Wyk.5), najwyższy poziom akumulacji obserwowano dla snR72 (1–29) i snR40 (1–32), odpowiednio z 175 i 146,1 odczytami na milion, które również były prawie wyłącznie obecne w kompleksach z podjednostkami. Wartości te były jednak znacznie niższe w porównaniu z próbkami kontrolnymi bez demetylacji RNA (SU).

Należy podkreślić, że pomimo iż wspomniane sdRNA występują i asocjują z podjednostkami rybosomu również w warunkach stresowych, to ich obserwowany poziom jest znacznie niższy niż w warunkach optymalnych (Wyk. 5).



Wyk.5 Porównanie akumulacji wybranych sdRNA w podjednostkach rybosomalnych z bibliotek rancRNAseq z hodowli w warunkach optymalnych oraz obu stresów abiotycznych. Przedstawiono sdRNA wykazujące istotnie statystycznie zmienioną akumulację w porównaniu do frakcji RNA niezwiązanych z rybosomami.

W warunkach głodu cukrowego najwyższy poziom akumulacji we frakcji podjednostek rybosomalnych osiągnęły snR61 (2–44) z 391,3 odczytami na milion, snR60 (2–44) z 272,7 odczytami na milion. Natomiast w bibliotekach zawierających demetylowane RNA wykryto jedynie snR40 (1–32) na poziomie 16 odczytów na milion (Wyk. 5).

W warunkach stresu osmotycznego najwyższy poziom akumulacji osiągnęły snR72 (1– 29) z 285,8 odczytami na milion oraz snR61 (2–44) z 209 odczytami na milion, który charakteryzował się również jednym z najwyższych poziomów akumulacji w stresie cukrowym. Żaden sdRNA ze wspomnianej grupy nie został wykryty w bibliotekach zawierających demetylowane RNA z hodowli w warunkach stresu hiperomotycznego.

Na Rysunku 32 umieszczono struktury drugorzędowe snoRNA z zaznaczonymi pozycjami sdRNA wykazującymi najwyższą asocjację z podjednostkami w obydwu stresach abiotycznych w porównaniu do warunków optymalnych. Co istotne, wszystkie sdRNA o największej ilości odczytów zarówno w bibliotekach AlkB- jak i AlkB+ pochodzą z 5'końca prekursorowych snoRNA.



Rys.32 Struktury drugorzędowe snoRNA z zaznaczonymi pozycjami sdRNA wykazującymi najwyższą akumulację w podjednostkach rybosomowych z bibliotek rancRNAseq z hodowli w obu stresach abiotycznych względem warunków optymalnych. Czerwonymi strzałkami oznaczono miejsca cięcia snoRNA. Struktura drugorzędowa snoRNA została wygenerowana z wykorzystaniem RNAfold WebSerwer.

Analiza 16 sdRNA o istotnych statystycznie zmianach akumulacji w obu badanych stresach abiotycznych względem warunków optymalnych we frakcji podjednostek wykazała 5 sdRNA posiadających odczyty powyżej tysiąca na milion.

W warunkach optymalnych najwyższe poziomy akumulacji obserwowano dla: snR61 (2–44), snR40 (1–32), snR72 (1–29), snR60 (2–44) oraz snR38 (68–95). Na silną asocjację z podjednostkami rybosomowymi wskazuje dodatkowo znacznie mniejsza ilość odczytów we frakcji RNA niezwiązanych z rybosomami.

W obu analizowanych warunkach stresów abiotycznych obserwowałam znacznie niższe poziomy akumulacji wspomnianych sdRNA w porównaniu z warunkami optymalnymi. Spadek ilości wytwarzacnych sdRNA w warunkach stresowych wskazuje na ograniczenie wydatków energii przez komórkę narażoną na stres. Może to mieć niekorzystne konsekwencje w postaci zburzonego procesu biosyntezy białka przez wzgląd na prekursory tych cząsteczek zaangażowane w dojrzewanie rybosomu. Silna akumulacja sdRNA w warunkach optymalnych sugeruje, że mogą one pełnić funkcje wspomagające lub regulujące efektywne składanie podjednostek rybosomowych.

Należy zwrócić uwagę, że we wszystkich w bibliotekach zawierających RNA poddane demetylacji poziomy akumulacji sdRNA były niższe niż w bibliotekach AlkB-.

Podsumowując, wszystkie sdRNA posiadające istotną statystycznie asocjację we frakcji podjednostek rybosomowych są najsilniej akumulowane w bibliotekach z hodowli w warunkach optymalnych. Porównując najsilniej asocjujące sdRNA w bibliotekach AlkB- należały one wyłącznie do sdRNA pochodzących z końca 5'. Natomiast w bibliotekach AlkB+ najsilniej asocjowały z podjednostkami cząsteczki sdRNA zarówno z końca 5' jak i 3'.

4.4.4.3.2. Podsumowanie wyników opisujących sdRNA oddziałujące z podjednostkami rybosomowymi

We wszystkich trzech porównaniach zaobserwowałam łącznie 12 sdRNA (Tab.11) posiadających powyżej tysiąca odczytów we frakcji podjednostek rybosomowych. W bibliotekach AlkB- wszystkie te wysokie odczyty sdRNA zaobserwowałam w warunkach optymalnych. Może to wskazywać na rolę tych sdRNA w kontroli składania rybosomów w warunkach optymalnych. Natomiast w warunkach stresowych komórki muszą oszczędzać energię i swoje zasoby, kosztem ograniczenia produkcji rybosomów. Wskazuje na to dodatkowo, iż niemal wszystkie sdRNA z tej grupy pochodzą ze snoRNA klasy C/D związanych z 2'O metylacją małej lub dużej podjednostki [166]–[168]. Jedynym wyjątkiem jest tutaj snR44 (-1–40), którego macierzysty snoRNA należy do klasy H/ACA i jest związany z pseudourudylacją dużej i małej podjednostki rybosomu [166], [167], [169], [170].

Natomiast w bibliotekach AlkB+ tylko 2 sdRNA: snR24 (67-89) oraz snR24 (71-88) posiadały powyżej tysiąca odczytów na milion i również te obserwacje pochodzą z bibliotek z hodowli w warunkach optymalnych.

	Pod	Podjednostki				
	rybosomowe					
rancRNA	BC	Κ	Н			
snR24 (67–89)	\downarrow	31	\downarrow			
snR24 (71-88)	\downarrow	31	\downarrow			
snR38 (68–95)	\rightarrow	\leftarrow	\rightarrow			
snR40 (1-32)	\downarrow	$2\uparrow$	\downarrow			
snR40 (1–37)	\downarrow	\leftarrow	\rightarrow			
snR44 (-1-40)	\downarrow	\uparrow	\rightarrow			
snR60 (2-44)	\downarrow	21	\rightarrow			
snR61 (2–44)	\downarrow	21	\downarrow			
snR72 (1–29)	\downarrow	21	\rightarrow			
snR128 (1–25)	\downarrow	41	—			
snR128 (1-29)	\downarrow	41	\rightarrow			
snR190 (-2-21)	\downarrow	\uparrow	\rightarrow			
	BC+	K+	H+			
snR24 (67–89)	\downarrow	\uparrow	—			
snR24 (71–88)	\downarrow	\uparrow	_			

Tab. 11 sdRNA posiadające najwyższą ilość odczytów na milion w bibliotekach rancRNAseq we frakcji podjednostek rybosomowych. BC– krótkie RNA z hodowli w warunkach głodu cukrowego K– krótkie RNA z hodowli w warunkach optymalnych, H– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego . BC+– krótkie RNA z hodowli w warunkach głodu cukrowego AlkB+ K+– krótkie RNA z hodowli w warunkach optymalnych AlkB+, H+– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego AlkB+. ↓ oznacza odczyty poniżej tysiąca na milion, ↑ oznacza odczyty powyżej tysiąca na milion, numery obok strzałek odnoszą się do pełnych tysięcy zaobserwowanych odczytów (np. ↑ oznacza ponad tysiąc odczytów, a 50↑ oznacza ponad pięćdziesiąt tysięcy odczytów na milion). – oznaczono brak odczytów.

4.4.4.3.3. tRF o istotnych statystycznie zmianach w oddziaływaniu z podjednostkami rybosomalnymi pod wpływem stresu

4.4.4.3.3.1. Wybrane tRF wykazujące istotne zmiany akumulacji w podjednostkach rybosomowych tylko w odpowiedzi na stres głodu cukrowego

Zidentyfikowano 68 tRF pochodzących z 28 izoform tRNA w podjednostkach rybosomów w stresie głodu cukrowego względem warunków optymalnych. Tabela 41 (Materiał dodatkowy) przedstawia wartości istotności statystycznej dla każdego tRF. Na Rys. 33 umieszczono mapę cieplną z porównaniem poziomu akumulacji w podjednostkach wspomnianej grupy tRF względem frakcji wolnych RNA.



Rys.33 Mapa cieplna tRF o istotnych statystycznie zmianach w warunkach głodu cukrowego w porównaniu do warunków optymalnych we frakcji podjednostek rybosomowych. Liczby przy legendzie przedstawiają ilości odczytów na 1 mln w bibliotece.

	K	K+	BC	BC+	Wartość p
tD(GUC)D (57-74)	82,1	920,5	628,9	9710,8	0,0007
tD(GUC)J3 (39-74)	0	0	0	32849,2	0,0435
tD(GUC)J3 (41-62)	3504,6	1750,9	732,2	146,2	0,0444
tD(GUC)J3 (47-74)	431,2	644,7	2370,1	6347,2	0,0100
tD(GUC)J3 (51-74)	196,1	635,7	1138,7	8127,6	0,0039
tE(CUC)D (40-74)	0	0	418,2	2370,2	0,0002
tE(CUC)D (47-74)	109,9	212,2	448,3	1108,6	0,0282
tE(UUC)G3 (48-74)	513,8	738	3160,6	7506,3	0,0057
tE(UUC)I (44-74)	0	0	1437,5	6208,4	0,0114
tE(UUC)I (48-74)	604,9	749,6	3178,1	7506,9	0,0078
tE(UUC)I (55–74)	31,9	681,9	364,8	6094,2	0,0017
tE(UUC)L (48-75)	1044,2	2539,3	3839,7	9060,3	0,0329
tE(UUC)L (55–75)	70,9	2084,4	428,9	7171,4	0,0085
tE(UUC)P (48-74)	556	741,3	3174	7505,9	0,0066
tG(GCC)E (30-70)	340,1	835,4	1673,9	4453,7	0,0258
tG(UCC)G (36-74)	861,1	1513,2	0	576,6	0,0127
tP(AGG)N (52-74)	0	200,6	56,8	1483,6	0,0060
tP(UGG)A (37-75)	10,8	1389,4	0	102,4	0,0038
tS(AGA)D1 (49-85)	2159,3	11196,6	9088	0	0,0035
tS(AGA)L (44-81)	0	385,5	1253,7	518,8	0,0320
tS(AGA)L (56-87)	1557,1	176,7	216,9	0	0,0455

Do dalszej analizy zdecydowano się wybrać tRF posiadające ponad tysiąc odczytów na milion. W Tabeli 12 umieszczono wybrane tRF, poziomy ich asocjacji z frakcją podjednostek rybosomowych oraz wartości istotności statystycznej.

Tab. 12 tRF wykazujące największą akumulację w bibliotekach rancRNAseq z hodowli w warunkach głodu cukrowego w podjednostkach rybosomowych w stosunku do warunków optymalnych. Liczby przedstawiają ilości odczytów na 1 mln w bibliotece. K – krótkie RNA z hodowli w warunkach optymalnych, K+ – krótkie RNA z hodowli w warunkach optymalnych, K+ – krótkie RNA z hodowli w warunkach optymalnych AlkB+, BC – krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego, BC+ – krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego AlkB+.

Najsilniej reprezentowaną cząsteczką w bibliotece z warunków optymalnych był tD(GUC)J3 (41–62) z 3 504,5 odczytów na milion. Wyniki powyżej tysiąca odczytów na milion osiągnęły również: tS(AGA)D1 (49–85), tS(AGA)L (56–87) oraz tE(UUC)L (48–75) (Tab.12). Z tej grupy jedynie tS(AGA)L (56–87) wykazywał znacznie obniżony poziom akumulacji we frakcji wolnych RNA. Natomiast tS(AGA)D1 (49–85) był bardziej akumulowany we frakcji RNA niezwiązanych z rybosomami (Wyk.6).

W bibliotekach zawierających RNA poddane demetylacji najwyższą wartość odczytów (11 196,5) zaobserwowano dla tS(AGA)D1 (49–85), co stanowi wzrost o prawie 7 700 odczytów na milion w porównaniu z najwyższą wartością w bibliotece bez demetylacji (Tab.12). Największą różnicę między akumulacją we frakcji wolnych RNA a frakcją podjednostek wykazywał tS(AGA)D1 (49–85). Natomiast tE(UUC)L (48–75) był bardziej akumulowany we frakcjach RNA niezwiązanych z rybosomami niż w podjednostkach (Wyk.6). Pozostałe tRF z tej grupy wykazywały niewielkie różnice w akumulacji między tymi dwiema frakcjami.

W warunkach deficytu glukozy tS(AGA)D1 (49–85) również wykazywał najwyższy poziom akumulacji we frakcji podjednostek rybosomalnych w bibliotekach AlkB- (9 087,9 odczytów na milion), jednak nie został wykryty w bibliotekach posiadających demetylowane RNA (Tab.12, Wyk.6). Uzyskane wyniki, wskazują na to, że zmiany ilości odczytów tS(AGA)D1 (49–85), są najprawdopodobniej związane z mechanizmem przegupowania Dimrotha, opisanym przez zespół Dedona [171]. Zgodnie z tym mechanizmem, modyfikacja m⁶A może stanowić wtórny produkt uszkodzenia m¹A. Zatem w warunkach optymalnych, z użyciem enzymów AlkB, obserwujemy

oczekiwany wzrost ilości odczytów tS(AGA)D1 (49–85), związany z usunięciem modyfikacji powodującej bezwględne zatrzymanie polimerazy. Jednakże w warunkach stresu głodu cukrowego, obserwujemy odmienne zjawisko. Wzrost poziomu tRF w bibliotekach AlkB- sugeruje, że następuje tu indukcja metylacji RNA, które nie występują w warunkach optymalnych. A wedle hipotezy zespołu Dedon, spadek ilości odczytów po demetylacji może wynikać, z usunięcia wtórnego produktu metylacji, np. m⁶A. Taki scenariusz potwierdzałby również hipotezę twórców metody ARM-seq [33], o zmniejszonej ilości odczytów w przypadku braku metylacji. Z grupy tRF posiadających powyżej tysiąca odczytów na milion jedynie tS(AGA)L (44–81) był bardziej akumulowany w RNA niezwiązanych z rybosomami niż w podjednostkach rybosomów (Wyk.6).

Najwyższą akumulację we frakcji podjednostek rybosomlanych w bibliotece pochodzącej z warunków deficytu glukozy i posiadającej demetylowane RNA osiągnął tD(GUC)J3 (39–74) z 32 849,1 odczytami na milion (Tab.12). Wspomniany tRF nie został wykryty w żadnej innej analizowanej bibliotece pochodzącej z podjednostek rybosomalnych. tE(UUC)I (44–74) występował wyłącznie w podjednostkach (Rys.33).



Wyk. 6. Porównanie akumulacji wybranych tRF w podjednostkach rybosomalnych z bibliotek rancRNAseq z hodowli w warunkach optymalnych i stresie glodu cukrowego. Przedstawiono tRF wykazujące istotnie statystycznie zmienioną akumulację w porównaniu do frakcji RNA niezwiązanych z rybosomami.

Na Rysunku 34 umieszczono struktury drugorzędowe tRNA z naniesionymi pozycjami tRF wykazującymi najwyższą asocjację z podjednostkami w porównaniu stresu głodu cukrowego do warunków optymalnych. W warunkach optymalnych AlkB- najwyższą akumulację obserwowano dla tD(GUC)J3 (41–62), który należy do klasy innych tRF, zaczyna się w ramieniu antykodonu i obejmuje sekwencję sięgającą w prekursorowym tRBA aż za ramię pseudourydynowe. Natomiast w bibliotekach rancRNA z głodu cukrowego najwyższą asocjacją z podjednostkami charakteryzował się tS(AGA)D1 (49–85), również należący do klasy innych tRF, zaczynający się od ramienia zmiennego

i kończący na końcu 3' tRNA. Natomiast w bibliotekach AlkB+ obserwowano również tS(AGA)D1 (49–85) oraz tD(GUC)J3 (39–74) (3' połowa).



Rys.34 Struktury drugorzędowe tRNA z zaznaczonymi pozycjami tRF wykazujących najwyższą akumulację w podjednostkach rybosomowych z bibliotek rancRNAseq z hodowli w stresie głodu cukrowego względem warunków optymalnych. Czerwonymi strzałkami oznaczono miejsca cięcia tRNA. Źródło struktury: yeastgenome.org.

Analiza 68 tRF o istotnych statystycznie zmianach akumulacji w stresie głodu cukrowego względem warunków optymalnych we frakcji podjednostek rybosomowych wykazała 21 tRF posiadających odczyty powyżej tysiąca na milion.

W warunkach optymalnych, tD(GUC)J3 (41–62), tS(AGA)D1 (49–85), tS(AGA)L (56– 87), tE(UUC)L (48–75) były najliczniej reprezentowane we frakcji podjednostek rybosomowych. Oba tRF: tS(AGA)D1 (49–85) i tS(AGA)L (56–87), pochodzą z 3' tRF-Ser. We wcześniejszej pracy grupy prof. Kamilli Grzywacz badano 3'-tRF-Ser (AGA) (61-80) i wykazano jego wpływ na translację *in vitro* [20]. W aktualnym piśmiennictwie naukowym brak doniesień o badaniach funkcjonalnych tD(GUC)J3 (41–62) oraz tE(UUC)L (48–75), co sugeruje pełnienie nowej, nieznanej wcześniej funkcji w procesach zachodzących przy składaniu podjednostek w rybosomy w warunkach optymalnych.

W bibliotekach rancRNAseq z hodowli w warunkach optymalnych AlkB+ zaobserwowano znaczny wzrost akumulacji tS(AGA)D1 (49–85) we frakcji podjednostek rybosomalnych w porównaniu do bibliotek AlkB- z hodowli w warunkach optymalnych. Jednak wśród tRF o najwyszej asocjacji z podjednostkami jest to sytuacja unikatowa, gdyż pozostałe tRF z tej grupy wykazują obniżoną ilość odczytów. Sugeruje to na potencjalny wpływ metylacji tRF na stabilność cząsteczek.

W bibliotekach zawierających RNA z hodowli w warunkach głodu cukrowego najsilniej asocjujące z podjednostkami tRF to tS(AGA)D1 (49–85) oraz tE(UUC)I (44–74), jednak ich asocjacja jest niższa niż w przypadku bibliotek z hodowli w warunkach optymalnych.

Należy zwrócić uwagę, że silną asocjację w bibliotekach z hodowli w warunkach głodu cukrowego AlkB+ wykazał tD(GUC)J3 (39–74). Badania wskazują, że AlkB jest w stanie oddziaływać na zmetylowane bazy wielu struktur nukleinowych i wpływać na ich naprawę [172]. Brak wspomnianego tRF w pozostałych bibliotekach sugeruje, że

metylacje wpływają na jego stabilność, a ich pozbawienie przez demetylazy AlkB powoduje jego deradację.

Podsumowując, opisane w tym rozdziale wyniki wskazują na dynamiczne zmiany w profilach asocjacji tRF z podjednostkami rybosomalnymi, w zależności zarówno od warunków wzrostu jak i obecności metylacji. Zmiany te mogą odzwierciedlać adaptację rybosomów do zmieniających się warunków środowiska.

4.4.4.3.3.2. Wybrane tRF wykazujące istotne zmiany akumulacji w podjednostkach rybosomowych tylko w odpowiedzi na stres hiperosmotyczny

Zidentyfikowaliśmy 30 tRF, pochodzących z 20 izoform tRNA, w podjednostkach rybosomowych w stresie hiperosmotycznym, wykazujących statystycznie istotną zmianę w akumulacji względem warunków optymalnych. Tabela 42 (Materiał dodatkowy) przedstawia wartości p dla każdego tRF. Na Rys. 35 umieszczono mapę cieplną z porównaniem poziomu akumulacji w podjednostkach wspomnianej grupy tRF wzgledem frakcji wolnych RNA.



Rys. 35 Mapa cieplna tRF o istotnych statystycznie zmianach w warunkach hiperosmotycznych w porównaniu do warunków optymalnych we frakcji podjednostek rybosomowych. Liczby przy legendzie przedstawiają ilości odczytów na 1 mln w bibliotece.

Do dalszej analizy zdecydowano się wybrać tRF posiadające ponad tysiąc odczytów na milion. W bibliotekach, które nie spełniły tego wymogu, wybrano po 2 tRF o najwyższej ilości odczytów. W Tabeli 13 umieszczono wybrane tRF, poziomy asocjacji z frakcją podjednostek rybosomowych oraz wartości p.

	Κ	K+	Н	H+	Wartość p
tD(GUC)J3 (3-33)	0	0	98710,9	0	0,0176
tE(CUC)I (36–75)	0	0	1188,4	2445	0,0081
tG(UCC)O (49-74)	98,7	303,0	73,5	0	0,0297
tN(GUU)O2 (44-77)	0	142,8	256,3	319,3	0,0263
tQ(UUG)D3 (1-35)	17,5	368,2	0	0	0,0002
tS(AGA)L (59-83)	745,3	932,8	0	71,2	0,0008

Tab. 13 tRF wykazujące największą akumulację w bibliotekach rancRNAseq z hodowli w stresie hiperosmotycznym w podjednostkach rybosomowych w stosunku do warunków optymalnych. Liczby przedstawiają ilości odczytów na 1 mln w bibliotece. K– krótkie RNA z hodowli w warunkach optymalnych, K+– krótkie RNA z hodowli w warunkach optymalnych AlkB+, H– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego, H+– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego AlkB+.

Najwyższy poziom akumulacji w warunkach kontrolnych osiągnął tS(AGA)L (59–83) z 745,3 odczytami na milion. Drugim tRF pod względem ilości odczytów w tych bibliotekach był tG(UCC)O (49–74), z wynikiem 98,7 odczytów na milion (Tab.13, Wyk. 7).

W bibliotekach posiadających RNA poddane demetylacji, obserwowano wzrost poziomu asocjacji tS(AGA)L (59–83) do podjednostek - 932,8 odczytów na milion. Kolejnym tRF o wysokim poziomie asocjacji w tych bibliotekach był tQ(UUG)D3 (1–35) z 368,2 odczytów na milion. Obserwujemy tu zauważalny wzrost ilościu odczytów tRF w porównaniu do bibliotek nie traktowych białkami AlkB (Tab. 13, Wyk. 7).

W warunkach stresu hiperosmotycznego, obserwujemy najwyższy poziom akumulacji dla tD(GUC)J3 (3–33), osiągający 98 710,9 odczytów na milion. Akumulacja tego tRF jest znacząco, poand 18-krotnie wyższa w podjednostkach rybosomowych niż we frakcji wolnych RNA (5 457,3 odczytów na milion, Wyk.7). Należy podkreślić, że ilość odczytów które zaobserwowałam dla tD(GUC)J3 (3–33) jest bardzo wysoka i wskazuje na potencjalną, kluczową rolę tego tRF w odpowiedzi na stres hiperomotyczny. W komórkach jednawabnika domowego, wykryto również 5'tRF-Asp-GUC, gdzie prawdopodobnie są one prekursorami dla innych tRF wiążących się z białkami Ago [173]. Drugim tRF pod względem asocjacji w tych bibliotekach był tE(CUC)I (36–75) z wynikiem 1188,4 odczytów na milion (frakcja podjednostek rybosomowych, hodowla w stresie hiperosmotycznym).

Należy zwrócić uwagę, że najsilniej asocjujący tRF w bibliotekach z hodowli w stresie osmotycznym nie został wykryty w bibliotece AlkB+, co sugeruje potencjalną rolę modyfikacji metylowej w regulacji jego stabilności. W tych bibliotekach najsilniej akumulowane były tE(CUC)I (36–75) oraz tN(GUU)O2 (44–77) z akumulacją odpowiednio 2 445 oraz 319,3 odczytów na milion.



Wyk.7 Porównanie akumulacji wybranych tRF w podjednostkach rybosomowych w warunkach optymalnych i stresie hiperosmotycznym. Przedstawiono tRF wykazujące istotnie statystycznie zmienioną akumulację w porównaniu do frakcji RNA niezwiązanych z rybosomami

Na Rysunku 36 umieszczono struktury drugorzędowe tRNA z oznaczoną pozycją tRF wykazujących najwyższą asocjację z podjednostkami rybosomowymi w porównaniu stresu hiperosmotycznego do warunków optymalnych. W bibliotekach zawierających RNA z hodowli w warunkach optymalnych AlkB- oraz AlkB+, najwyższą ilość odczytów wykryto dla tS(AGA)L (59–83) należącym do klasy 3b tRF. Jednak w bibliotekach zawierających RNA z hodowli w stresie hiperosmotycznym AlkBzaobserwowano najpierw wysoką akumulację tD(GUC)J3 (3–33) (5' połowa), a w bibliotekach AlkB+ najwyższą asocjację obserwowano u tE(CUC)I (36–75) należącym do klasy 3' połówek.



Rys. 36 Struktury drugorzędowe tRNA z zaznaczonymi pozycjami tRF wykazującymi najwyższą akumulację w podjednostkach rybosomowych z bibliotek rancRNAseq z hodowli w stresie hiperosmotycznym względem warunków optymalnych. Czerwonymi strzałkami oznaczono miejsca cięcia tRNA. Źródło struktury tRNA: yeastgenome.org.

Analiza 30 tRF o istotnych statystycznie zmianach akumulacji we frakcji podjednotesk rybosomalnych w stresie hiperosmotycznym względem warunków optymalnych wykazała 2 tRF posiadające odczyty powyżej tysiąca na milion.

W warunkach optymalnych, tS(AGA)L (59–83) i tG(UUC)O (49–74) były najliczniej reprezentowane we frakcji podjednostek rybosomowych. We wcześniejszych badaniach grupy prof. Kamilli Grzywacz wykazano potencjał regulatorowy 3'-tRF-Ser-AGA [20], [22]. Zidentyfikowany w niniejszej pracy doktorskiej tS(AGA) L (59–83), jest dłuższą cząsteczką, ale zawiera w swojej sekwencji wcześniej badany, krótszy 3'-tRF-Ser-AGA. Wysoka asocjacja obu tych tRF sugeruje ich potencjalną rolę w procesach zachodzących w rybosomach w warunkach optymalnych.

W bibliotekach z hodowli w warunkach optymalnych AlkB+ zaobserwowano wzrost akumulacji tS(AGA)D1 (49–85). Drugim pod względem ilości odczytów był tQ(UUG)D3 (1–35) i ponownie, obserwowana asocjacja była wyższa niż w bibliotece AlkB-. Wzrost akumulacji tRF w bibliotekach AlkB+, może być związany z tym, iż udowodniono że tRNA jest głównym substratem ALKBH1. Udowodniono, że ALKBH1 znacząco obniża poziom m¹A, ale nie m⁷G czy m⁵C [174]. Możliwe, że użyte do demetylacji białka, również mają tendencję do usuwania konkretnej metylacji, co przyczyni się do zwiększenia wykrywalności konkretnych tRF.

W bibliotekach zawierających RNA z hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego najsilniej asocjującymi tRF były tD(GUC)J3 (3–33) oraz tE(CUC)I (36–75). Należy podkreślić, że nie zostały one wykryte w żadnej bibliotece z warunków optymalnych, co sugeruje ich potencjalną rolę w adaptacji rybosomów do zmieniających się warunków środowiska. Jak już wspomniałam, w badaniach komórek jedwabnika, sugerowano rolę 5'tRNA-Asp-GUC jako prekursora dla innych tRF wiążących się z białkami Ago [173].

W bibliotekach rancRNAseq z hodowli w warunkach stresu osmotycznego AlkB+, tE(CUC)I (36–75) wykazywał silną asocjację, a jej poziom był wyższy niż przed traktowaniem białkami typu AlkB. Drugim pod względem ilości odczytów był tN(GUU)O2 (44–77), jego liczba odzytów również wzrosła w bibliotekach poddanych demetylacji RNA.

Podsumowując, zaobserwowane zmiany asocjacji tRF mogą odzwierciedlać adaptaję rybosomów do zmieniających się warunków oraz regulację procesów translacji.

4.4.4.3.3.3. Wybrane tRF wykazujące istotne zmiany akumulacji w podjednostkach rybosomowych w odpowiedzi na oba typy stresów

Zidentyfikowano 34 tRF pochodzące 21 różnych izoakceptorów tRNA w podjednostkach rybosomowych w obu typach stresów względem warunków optymalnych. Tabela 43 (Materiał dodatkowy) przedstawia wartości p dla każdego tRF. Na Rys. 37 umieszczono mapę cieplną z porównaniem poziomu akumulacji w podjednostkach wspomnianej grupy tRF względem frakcji wolnych RNA.



Rys 37. Mapa cieplna tRF o istotnych statystycznie zmianach w warunkach głodu cukrowego oraz hiperosmotycznych w porównaniu do warunków optymalnych we frakcji podjednostek rybosomowych. Liczby przy legendzie przedstawiają ilości odczytów na 1 mln w bibliotece.

Do dalszej analizy zdecydowano się wybrać tRF posiadające ponad tysiąc odczytów na milion. W Tabeli 14 umieszczono wybrane tRF, poziomy ich asocjacji z frakcją podjednostek rybosomowych oraz wartości p. Należy zwrócić uwagę, że, w tej grupie znalazła się również cząsteczka oznaczona jako tX(XXX)D (66–103), której nie udało się przypisać do żadnego izoakceptora tRNA, co sugeruje potencjalnie nowe, nieznane źródło tRF.

	Wartość p*	BC	BC+	K	K+	Н	H+	Wartość p**
tE(CUC)D (55-74)	0,0015	82	1628,5	0	246	46,5	164,8	0,0426
tF(GAA)G (40-76)	0,0221	0	0	0	2324,7	2036,4	1860,9	0,0496
tF(GAA)G (47-76)	0,0353	0	0	0	1794,7	0	0	0,0442
tG(CCC)O (39-75)	0,0035	53,5	2345	0	0	60,8	2818,8	0,0019
tG(GCC)E (38-74)	0,0076	0	0	0	6412,7	753,4	28647,8	0,0369
tG(UCC)G (33-75)	0,0177	592,6	928,2	0	822,2	714,5	1522,1	0,0156
tI(AAU)L1 (40-69)	0,0024	0	0	577,5	200,6	187,4	0	0,0268
tN(GUU)K (46-77)	0,0052	332,7	378,7	0	241,1	407,9	363,9	0,0070
tP(AGG)N (37-73)	0,0026	325,1	2281,7	0	358,3	126,6	251,2	0,0349
tQ(UUG)D3 (39-75)	0,0476	0	0	0	904,8	753,1	1007,1	0,0237
tR(CCU)J (38–71)	0,0250	0	606,2	1759,9	2353,6	1926,1	18494,9	0,0473
tS(AGA)H (53-85)	0,0355	0	0	504,4	0	1156,5	359,9	0,0358

Tab. 14 tRF wykazujące największą akumulację w bibliotekach rancRNAseq z hodowli w obydwu typach stresu abiotycznego w podjednostkach rybosomowych w stosunku do warunków optymalnych. Liczby przedstawiają ilości odczytów na 1 mln w bibliotece. BC– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego, BC+– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego, BC+– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego, BC+– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego, BC+– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego, H+– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego, H+– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego (AlkB+, H– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego AlkB+. Wartość p*– porównanie hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego (AlkB+ i AlkB-) z hodowlą w warunkach optymalnych (AlkB+ i AlkB-).

W warunkach kontrolnych najwyższą akumulację osiągneły tR(CCU)J (38–71) z 1759,9 odczytami na milion oraz tI(AAU)L1 (40–69) z 577,5 odczytów na milion.

W bibliotekach zawierających kontrolne RNA AlkB+ frakcji podjednostek, akumulację powyżej tysiąca odczytów na milion osiągnęły: tG(GCC)E (38–74), tF(GAA)G (40–76), tF(GAA)G (47–76) oraz tR(CCU)J (38–71). Wszystkie tRF z tej grupy były silniej akumulowane w bibliotekach z warunków optymalnych posiadających RNA poddane demetylacji. Wiadomo, że tRNA^{Arg}CCU posiada podobną dystrybucję m³C jak np. tRNA^{Ser} [175], może to być wskazówką, dlaczego tR(CCU)J (38–71) wykazuje tendencję wzrostu ilości odczytów we wszystkich bibliotekach AlkB+ z frakcji podjednostek. Te wyniki wskazują, że demetylacja tRF może znacząco wpływać na możliwości ich wykrywania w bibliotekach poddawanych sekwencjonowaniu wysokoprzepustowemu.

W warunkach deficytu glukozy najwyższą asocjację z podjednostkami wykazały tG(UCC)G (33–75) oraz tN(GUU)K (46–77) z odpowiednio 592,5 i 332,7 odczytami na milion. Należy zwrócić uwagę, iż oba tRF nie zostały wykryte w bibliotekach z warunków optymalnych AlkB-. tRNA^{Asn}GUU może być błędnie ładowane przez aspartylo-tRNA syntetazę (AspRS), co może prowadzić do toksyczności dla komórek drożdży [176]. Zidentyfikowany w niniejszej pracy doktorskiej tRF może być zatem wynikiem hydrolizy źle załadowanego tRNA^{Asn}GUU i jednocześnie jednym z mechanizmów obrony komórek *S. cerevisiae* przed toksycznością.

Po przeprowadzeniu demetylacji RNA w tych samych warunkach, w podjednostkach obserwuje się akumulację powyżej tysiąca odczytów dla: tG(CCC)O (39–75) i tP(AGG)N (37–73), tE(CUC)D (55–74) (Tab. 14). Warto podkreślić, że poziom tych tRF jest znacznie wyższy od odczytów obserwowanych u tych samych tRF w bibliotekach AlkB-. Sugeruje to wpływ metylacji na stabilność tRF. W badaniach u myszy wykryto, że niektóre tRNA np.tRNA^{Gly}CCC są częściej przetwarzane do tRF w warunkach stresowych [177]. W badaniach z 2019 roku, powiązano tRNA^{Pro}AGG z

różnicowaniem guzów w gruczolaku płuc [178], co wskazuj na potencjalną rolę tRF pochodzących z tych tRNA w odpowiedzi na stres.

W warunkach stresu hiperosmotycznego najwyższą akumulację osiągnęły: tF(GAA)G (40–76) z 2 036,4 odczytami na milion, tR(CCU)J (38–71) z 1 926 odczytami na milion oraz tS(AGA)H (53–85) z 1 156,5 odczytami na milion. Należy zwrócić uwagę, iż tF(GAA)G (40–76) nie został wykryty w bibliotekach z warunków optymalnych AlkB-. We współczensje literaturze naukowej nie ma badań związanych z rolą tF(GAA)G, co wskazuje na nową, nie znaną wcześniej rolę związaną z adaptacją do warunków hiperosmotycznych we frakcji podjednostek rybosomowych. Natomiast u drożdży określono, że nadmierna ekspresja tego tRNA^{Arg}CCU zmniejsza ryzyko przesunięcia ramki odczytu genu Ty1 [179]. Powstawanie tRF z tego tRNA może zatem wskazywać na potencjalną rolę tRF-Arg w adaptacji komórek drożdży do stresu osmotycznego poprzez regulację elemtów Ty1.

Po przeprowadzeniu demetylacji RNA w tych samych warunkach, obserwowano aż 6 tRF z odczytami powyżej tysiąca na milion: tG(GCC)E (38–74), tR(CCU)J (38–71), tG(CCC)O (39–75), tF(GAA)G (40–76), tG(UCC)G (33–75), tQ(UUG)D3 (39–75) (Tab. 14, Wyk. 8). Wartym zauważenia jest tF(GAA)G (40–76), który w warunkach optymalnych AlkB+ wykazał tendencję wzrostową ilości odczytów, natomiast w warunkach hiperosmotycznych jego ilość po demetylacji spadła. Zwiększony poziom akumulacji tR(CCU)J (38–71) w bibliotekach rancRNA poddanych demetylacji koreluje ze znaczącą ilością modyfilacji m³C w tym tRNA [175], co może wskazywać na zwiększoną preferencję białek AlkB/S do oddziaływania na ten typ metylacji.



Wyk. 8. Porównanie akumulacji wybranych tRF w podjednostkach rybosomalnych z bibliotek rancRNAseq z hodowli w warunkach optymalnych oraz obu stresach abiotycznych. Przedstawiono tRF wykazujące istotnie statystycznie zmienioną akumulację w porównaniu do frakcji RNA niezwiązanych z rybosomami.

Na Rysunku 38 umieszczono umieszczono struktury drugorzędowe tRNA z oznaczonymi miejscami występowania tRF wykazujących najwyższą asocjację z podjednostkami w porównaniu obydwu stresów abiotycznych do warunków

optymalnych. Większość tRF posiadających najwyższe ilości odczytów należy do klasy 3' połówek. Jedynie tF(GAA)G (40–76) należy do klasy innych tRF, zaczyna się w pętli antykodonu, a kończy w pętli pseudourydynowej i co warte zanotowania, zawiera znaczną część sekwencji wstawionej w pętli antykodonowej tRNA^{Phe}.



Rys. 38 Struktury drugorzędowe tRNA z zaznaczonymi pozycjami tRF wykazującymi najwyższą akumulację w podjednostkach rybosomowych z bibliotek rancRNAseq z hodowli w obu stresach abiotycznych względem warunków optymalnych. Czerwonymi strzałkami oznaczono miejsca cięcia tRNA. Źródło struktury tRNA: yeastgenome.org.

Analiza 34 tRF o istotnych statystycznie zmianach akumulacji w obu badanych stresach abiotycznych względem warunków optymalnych we frakcji podjednostek rybosomowych wyłoniła 10 tRF posiadających odczyty powyżej tysiąca na milion.

W warunkach optymalnych najwyższą asocjację obserwowałam dla: tR(CCU)J (38–71) i tI(AAU)L1 (40–69). Natomiast w bibliotekach AlkB+ były to: tG(GCC)E (38–74), tF(GAA)G (40–76), tF(GAA)G (47–76) oraz tR(CCU)J (38–71).

W bibliotekach rancRNAseq z hodowli w stresie głodu cukrowego żaden tRF nie przekroczył progu tysiąca odczytów na milion. tRF posiadające powyżej tysiąca odczytów na milion obserwowano tylko w bibliotekach z warunków stresowych (AlkB+). Natomiast w bibliotekach AlkB+, występowały 3 tRF z ilością odczytów powyżej tysiąca na milion.

W bibliotekach rancRNAseq z hodowli w stresie hiperomotycznym trzy tRF posiadały powyżej tysiąca odczytów na milion: tF(GAA)G (40–76), tR(CCU)J (38–71) oraz tS(AGA)H (53–85). W bibliotekach AlkB+ 6 tRF posiadało więcej niż tysiąc odczytów na milion. Interesujacy jest tF(GAA)G (40–76), który w bibliotekach z warunków optymalnych AlkB+ wykazał wzrost ilości odczytów, a w przypadku bibliotek ze stresu hiperosmotycznego jego ilość odczytów spadła.

4.4.4.3.4. Podsumowanie wyników opisujących tRF oddziałujące z podjednostkami rybosomowymi

We wszystkich trzech porównaniach zaobserwowałam łącznie 32 tRF (Tab. 15) posiadających powyżej tysiąca odczytów na milion we frakcji podjednostek rybosomowych. Z czego, 16 cząsteczek było obecnych w bibliotekach AlkB-, a 6 tRF nie posiadało podwyższonej ilości odczytów w bibliotekach AlkB+: tG(GCC)E (30–70), tS(AGA)L (44–81), tS(AGA)L (56–87), tD(GUC)J3 (3–33), tE(CUC)I (36–75), tS(AGA)H (53–85). Podwyższoną ilość odczytów tylko w bibliotekach ze stresu głodu cukrowego charakteryzowało się 6 tRF: tD(GUC)J3 (51–74), tE(UUC)G3 (48–74), tE(UUC)I (44–74), tE(UUC)I (48–74), tE(UUC)P (48–74) oraz tS(AGA)L (56–87). Podwyższoną ilość odczytów w bibliotekach ze stresu hiperosmotycznego obserwowano dla 4 tRF: tD(GUC)J3 (3–33), tE(CUC)I (36–75), tF(GAA)G (40–76) oraz tS(AGA)H (53–85). W obu warunkach stresowych podwyższone ilości odczytów zaobserwowano dla tD(GUC)J3 (47–74). We wszystkich trzech typach bibliotek podwyższoną ilość odczytów obserwowałam dla tE(UUC)L (48–75) oraz tS(AGA)D1 (49–85), należy podkreślić, że najwięcej odczytów zaobserwowałam w bibliotekach z warunków stresowych (Tab.15).

	Po	Podjednostki				
rancRNA	BC	Κ	Н			
tD(GUC)J3 (41-62)	\downarrow	31	31			
tD(GUC)J3 (47-74)	21	\downarrow	\uparrow			
tD(GUC)J3 (51-74)	\uparrow	\rightarrow	\rightarrow			
tE(UUC)G3 (48-74)	31	\downarrow	\downarrow			
tE(UUC)I (44-74)	\uparrow	-	-			
tE(UUC)I (48-74)	31	\downarrow	\rightarrow			
tE(UUC)I (44-74)	\uparrow	-				
tE(UUC)L (48-75)	31	\uparrow	41			
tE(UUC)P (48-74)	31	\downarrow	\rightarrow			
tG(GCC)E (30-70)	\uparrow	\downarrow	\uparrow			
tS(AGA)D1 (49-85)	9↑	21	11↑			
tS(AGA)L (44-81)	\uparrow	_	\uparrow			
tS(AGA)L (56-87)	\downarrow	\uparrow	\rightarrow			
tD(GUC)J3 (3-33)	_	_	98↑			
tE(CUC)I (36-75)	_	_	\uparrow			
tF(GAA)G (40-76)	_	_	21			
tR(CCU)J (38–71)	_	\uparrow	\uparrow			
tS(AGA)H (53-85)	_	\rightarrow	\uparrow			

Tab. 15 tRF posiadające najwyższą ilość odczytów na milion w bibliotekach rancRNAseq AlkB- we frakcji podjednostek rybosomowych. BC– krótkie RNA z hodowli w warunkach głodu cukrowego K– krótkie RNA z hodowli w warunkach optymalnych, H– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego. \downarrow oznacza odczyty poniżej tysiąca na milion, \uparrow oznacza odczyty powyżej tysiąca na milion, numery obok strzałek odnoszą się do pełnych tysięcy zaobserwowanych odczytów (np. \uparrow oznacza ponad tysiąc odczytów, a 50 \uparrow oznacza ponad pięćdziesiąt tysięcy odczytów na milion). – oznaczono brak odczytów.

W Tabeli 16 umieściłam tRF posiadające powyżej tysiąca odczytów na milion w bibliotekach AlkB+. Tylko 29 tRF posiadało powyżej tysiąca odczytów w bibliotekach AlkB+. Porównując ze sobą cząsteczki tRF posiadające powyżej tysiąca odczytów na milion z bibliotek z hodowli w stresie głodu cukrowego wytypowałam 1 tRF występujący tylko w bibliotekach AlkB+, tj. tD(GUC)J3 (39–74). Zaobserwowałam

również 1 tRF występujący tylko w bibliotekach z hodowli w stresie głodu cukrowego AlkB-, tj. tS(AGA)D1 (49–85). Dodatkowo zaobserwowałam 17 cząsteczek o większej ilości odczytów w bibliotekach AlkB+ w porównaniu z bibliotekami AlkB-: tD(GUC)D (57–74), tD(GUC)J3 (47–74), tD(GUC)J3 (51–74), tE(CUC)D (40–74), tE(CUC)D (47–74), tE(UUC)G3 (48–74), tE(UUC)I (44–74), tE(UUC)I (48–74), tE(UUC)I (55–74), tE(UUC)L (48–75), tE(UUC)L (55–75), tE(UUC)P (48–74), tG(GCC)E (30–70), tP(AGG)N (52–74), tE(CUC)D (55–74), tG(CCC)O (39–75) oraz tP(AGG)N (37–73).

Porównując ze sobą cząsteczki tRF posiadające powyżej tysiąca odczytów na milion z bibliotek rancRNAseq z hodowli w warunkach optymalnych wytypowałam 3 tRF występujące tylko w bibliotekach AlkB+: tF(GAA)G (40–76), tF(GAA)G (47–76) oraz tG(GCC)E (38–74). Nie zaobserwowałam cząsteczek występujących tylko w bibliotekach AlkB-. Jedynie 5 cząsteczek posiadało więcej odczytów w bibliotekach AlkB+ w porówaniu z bibliotekami AlkB-: tE(UUC)L (48–75), tE(UUC)L (55–75), tG(UCC)G (36–74), tP(UGG)A (37–75), tS(AGA)D1 (49–85) oraz tR(CCU)J (38–71).

Porównując ze sobą cząsteczki tRF posiadające powyżej tysiąca odczytów na milion z bibliotek z hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego nie zaobserwowałam cząsteczek występujących tylko w bibliotekach AlkB+. Zaobserwowałam jedną cząsteczek posiadało więcej odczytów w bibliotekach AlkB+ w porówaniu z bibliotekami AlkB-: tD(GUC)D (57–74), tD(GUC)J3 (51–74), tE(UUC)G3 (48–74), tE(UUC)I (48–74), tE(UUC)L (48–75), tE(UUC)L (55–75), tE(UUC)P (48–74), tS(AGA)D1 (49–85), tE(CUC)I (36–75), tG(CCC)O (39–75), tG(GCC)E (38–74), tG(UCC)G (33–75), tQ(UUG)D3 (39–75) oraz tR(CCU)J (38–71).

	Podjednostki				
rancRNA	BC+	K+	H+		
tD(GUC)D (57-74)	9↑	\downarrow	\uparrow		
tD(GUC)J3 (39-74)	32↑		—		
tD(GUC)J3 (41-62)	\downarrow	\uparrow	\uparrow		
tD(GUC)J3 (47–74)	6↑	\rightarrow	\uparrow		
tD(GUC)J3 (51-74)	8↑	\rightarrow	21		
tE(CUC)D (40-74)	21	_	\downarrow		
tE(CUC)D (47-74)	\uparrow	\downarrow	\downarrow		
tE(UUC)G3 (48-74)	7↑	\rightarrow	\uparrow		
tE(UUC)I (44-74)	61	I	—		
tE(UUC)I (48-74)	7↑	\rightarrow	\uparrow		
tE(UUC)I (55-74)	61	\rightarrow	\downarrow		
tE(UUC)L (48-75)	9↑	$2\uparrow$	6↑		
tE(UUC)L (55–75)	7↑	$2\uparrow$	2↑		
tE(UUC)P (48-74)	7↑	\rightarrow	\uparrow		
tG(GCC)E (30-70)	41	\rightarrow	\downarrow		
tG(UCC)G (36-74)	\downarrow	\uparrow	\downarrow		
tP(AGG)N (52-74)	\uparrow	\rightarrow	\downarrow		
tP(UGG)A (37-75)	\downarrow	\uparrow	\downarrow		
tS(AGA)D1 (49-85)	_	11↑	20↑		
tE(CUC)I (36-75)	—	-	21		
tE(CUC)D (55-74)	\uparrow	\rightarrow	\rightarrow		
tF(GAA)G (40-76)	_	21	\uparrow		
tF(GAA)G (47–76)	_	\uparrow	_		
tG(CCC)O (39-75)	21	_	2↑		
tG(GCC)E (38–74)	_	6↑	28↑		
tG(UCC)G (33-75)	\downarrow	\downarrow	\uparrow		
tP(AGG)N (37–73)	$2\uparrow$	\downarrow	\downarrow		
tQ(UUG)D3 (39-75)	_	\downarrow	\uparrow		
tR(CCU)J (38–71)	\downarrow	21	18↑		

Tab. 16 tRF posiadające najwyższą ilość odczytów na milion w bibliotekach rancRNAseq AlkB+ we frakcji podjednostek rybosomowych. \downarrow oznacza odczyty poniżej tysiąca na milion. BC+- krótkie RNA z hodowli w warunkach głodu cukrowego AlkB+ K+ – krótkie RNA z hodowli w warunkach optymalnych AlkB+, H+- krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego AlkB+. \uparrow oznacza odczyty powyżej tysiąca na milion, numery obok strzałek odnoszą się do pełnych tysięcy zaobserwowanych odczytów(np. \uparrow oznacza ponad tysiąc odczytów, a 50 \uparrow oznacza ponad pięćdziesiąt tysięcy odczytów na milion). – oznaczono brak odczytów.

4.4.4. Monosomy

Biblioteki monosomów zawierają krótkie RNA (sdRNA oraz tRF), które asocjowały z kompletnymi rybosomami (80S). Po złożeniu małej (40S) i dużej (60S) podjednostki rozpoczyna się proces elongacji. Następuje rozkodowanie mRNA przez komplementarny aminoacylo-tRNA, formuuje się wiązanie peptydowe, a następnie zachodzi translokacja kompleksu tRNA-mRNA [180].

4.4.4.1. sdRNA o istotnych statystycznie zmianach w oddziaływaniu z monosomami pod wpływem stresu

4.4.4.1.1. Wybrane sdRNA wykazujące istotne zmiany asocjacji z monosomami tylko w odpowiedzi na stres głodu cukrowego

Zidentyfikowano 9 sdRNA, pochodzących z różnych typów snoRNA w monosomach w stresie głodu cukrowego względem warunków optymalnych. Tabela 44 (Materiał dodatkowy) przedstawia wartości p dla każdego sdRNA. Na Rys. 39 umieszczono mapę cieplną z porównaniem poziomu akumulacji w monosomach wspomnianej grupy sdRNA względem frakcji wolnych RNA.





Do dalszej analizy zdecydowano się wybrać sdRNA posiadające ponad tysiąc odczytów na milion. W bibliotekach z warunków optymalnych AlkB+ oraz stresu głodu AlkB+ wybrano sdRNA posiadające najwięcej odczytów. W Tabeli 17 umieszczono wybrane sdRNA, poziomy ich asocjacji z frakcją monosomów oraz wartości p.

	K	K+	BC	BC+	Wartość p
snR61 (2-44)	639	0	29617,8	131,9	0,0472
snR60 (86-104)	0	0	1311,7	158,4	0
snR54 (38–74)	0	0	1521,6	92,5	0,0057
snR47 (78–99)	0	0	2282,3	171	0,0308
snR45 (141–171)	0	0	5902,6	205,2	0,0242
snR190 (175-192)	0	144,2	970,6	536,1	0,0396
snR128 (1-25)	1898,2	0	11411,6	303,7	0,0002

Tab. 17 sdRNA wykazujące największą akumulację w bibliotekach rancRNAseq z hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego w monosomach w stosunku do warunków optymalnych. Liczby przedstawiają ilości odczytów na 1 mln w bibliotece. K– krótkie RNA z hodowli w warunkach optymalnych, K+– krótkie RNA z hodowli w warunkach optymalnych AlkB+, BC– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego, BC+– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego AlkB+.

Warto zwrócić uwagę, że jedynie snR128 (1–25) oraz snR61(2–44) zostały wykryte w bibliotece z warunków optymalnych, z wynikami 1898,2 oraz 639 odczytów na milion (Tab.17). Jednak ich poziom akumulacji był znacznie niższy niż w warunkach stresowych. Oba tRF zostały wykryte we frakcji wolnych RNA, jednak na niższym poziomie niż w monosomach: 168,4 oraz 54,3 odczyty na milion. W naszych wcześniejszych badaniach z 2019 [22] badaliśmy snR128, również poczhodzący z części 5'snoRNA. Zidentyfikowana w niniejszej pracy doktorskiej cząsteczka jest o 4 nt dłuższa niż ta, którą wcześniej badaliśmy. Interesujace jest, że sdR128 (1-21) był silniej akumulowany w warunkach optymalnych niż w stresie głodu cukrowego (w cytoplazmie). Natomiast w monosomach snR128 (1–25) jest bardziej akumulowany w warunkach stresowych (Wyk.9).

W bibliotekach rancRNAseq zawierających RNA kontrolne AlkB+, wykryty został tylko snR190 (175–192), jednak jego akumulacja wyniosła jedynie 144,2 odczyty na milion. Niewielki wpływ białek AlkB na sdRNA może prawdopodobnie być związany z tym, że białka te są powiązywane przede wszystkim z usuwaniem metylacji z tRNA [174].

W warunkach stresu głodu cukrowego akumulację powyżej tysiąca odczytów na milion z monosomami osiągnęły: snR61 (2–44), snR128 (1–25), snR45 (141–171), snR47 (78–99), snR54 (38–74) oraz snR60 (86–104) (Tab. 17). Wszystkie sdRNA z tej grupy silniej asocjowały z frakcją monosomów warunkach stresu niż optymalnych. Sugeruje to, że oddziaływania tych sdRNA z monosomami może wpływać na adaptację rybosomów do warunków stresu głodu cukrowego. Co istotne, z tej grupy sdRNA jedynie snR45 (141–171) pochodzi ze snoRNA klasy H/ACA, pozostałe cząsteczki pochodzą ze snoRNA klasy C/D.

W bibliotekach rancRNA zawierających RNA z hodowli w stresie głodu cukrowego AlkB+, najwyższą akumulacją charakteryzowały się snR190 (175–192) oraz snR128 (1–25) z wynikiem 536,1 i 303,7 odczytów na milion. Wszystkie sdRNA poddane analizie wykazały spadek ilości odczytów po demetylacji RNA w bibliotekach z warunków stresowych. Interesujące jest to, że w przypadku wszystkich sdRNA posiadających wysoką akumulację w bibliotekach z hodowli w stresie głodu cukrowego obserwowałam spadek ilości odczytów w bibliotekach AlkB+.



Wyk.9 Porównanie akumulacji wybranych sdRNA w monosomach z bibliotek rancRNAseq z hodowli w warunkach optymalnych i stresie glodu cukrowego. Przedstawiono sdRNA wykazujące istotnie statystycznie zmienioną akumulację w porównaniu do frakcji RNA niezwiązanych z rybosomami.

Na Rysunku 40 umieszczono umieszczono struktury drugorzędowe snoRNA z zaznaczonymi pozycjami sdRNA wykazującymi najwyższą asocjację z monosomami w porównaniu stresu głodu cukrowego do warunków optymalnych. W bibliotekach AlkB-, najwyższą ilość odczytów wykryto dla sdRNA z 5' końców ich macierzystych cząsteczek. Natomiast w bibliotekach AlkB+, zarówno w warunkach optymalnych jak i stresie głodu cukrowego najwyższą ilość odczytów posiadał snR190 (175–192), pochodzący z końca 3' macierzystego snoRNA.



Rys. 40 Struktury drugorzędowe snoRNA z zaznaczonymi pozycjami sdRNA wykazującymi najwyższą akumulację w monosomach z bibliotek rancRNAseq z hodowli w stresie głodu cukrowego względem warunków optymalnych. Czerwonymi strzałkami oznaczono miejsca cięcia snoRNA. Struktura drugorzędowa snoRNA została wygenerowana z wykorzystaniem RNAfold WebSerwer.

Analiza 9 sdRNA o istotnych statystycznie zmianach akumulacji w stresie głodu cukrowego względem warunków optymalnych we frakcji monosomów wykazała 6 sdRNA posiadających odczyty powyżej tysiąca na milion.

W bibliotekach z warunków optymalnych AlkB- tylko jeden sdRNA posiadał więcej niż tysiąc odczytów na milion: snR128 (1–25). Ten sam sdRNA posiadał ponad 4 tysiące odczytów na milion w bibliotekach z frakcji podjednostek rybosomowych, również w warunkach optymalnych. Natomiast w bibliotekach rancRNAseq z hodowli w

warunkach głodu cukrowego, 6 sdRNA posiadało powyżej tysiąca odczytów na milion. Sugeruje to potenacjalną rolę sdRNA w adaptacji rybosomów do warunków stresowych.

Ponownie zaobserwowano, że jeden sdRNA w warunkach optymalnych AlkB+ wykazywał wzrost ilości odczytów.

4.4.4.1.2. Wybrane sdRNA wykazujące istotne zmiany asocjacji z monosomami tylko w odpowiedzi na stres hiperosmotyczny

Zidentyfikowano jeden sdRNA snR35 (184–204) w monosomach w stresie hiperosmotycznym w porównaniu do warunków optymalnych. W Tabeli 18 umieszczono wspomniany sdRNA, jego poziomy asocjacji z monosomami oraz wartość p.

		K	K+	Н	H+	Wartość p
	snR35 (184-204)	0	0	218,4	63	0,0236
_			-			

Tab. 18 sdRNA wykazujący największą akumulację w bibliotekach rancRNAseq z hodowli w stresie hiperosmotycznym w monosomach w stosunku do warunków optymalnych. Liczby przedstawiają ilości odczytów na 1 mln w bibliotece. K– krótkie RNA z hodowli w warunkach optymalnych, K+– krótkie RNA z hodowli w warunkach optymalnych AlkB+, H– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego, H+– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego AlkB+.

Akumulacja snR35 (184–204) w warunkach stresu hiperosmotycznego wyniosła 218,4 odczyty na milion. Nie został on wykryty ani we frakcji wolnych RNA ani w warunkach optymalnych. Wcześniejsze badania sugerują rolę jego prekursora w pseudourydylacji m¹acp³ Ψ w pozycji SSU-1189 [169].

W bibliotece rancRNAseq zawierającej RNA z warunków stresowych AlkB+, wykryto poziom asocjacji wspomnianego sdRNA na poziomie 63 odczytów na milion (Tab. 18). Został on również zidentyfikowany we frakcji RNA niezwiązanych z rybosomami z akumulacją 9,1 odczytu na milion (Tab.18, Wyk.10). We frakcji monosomów do tej pory obserwowałam głównie zmniejszenie ilości odczytów sdRNA w bibliotekach traktowanych białkami typu AlkB, z wyjątkiem snR190 (175–192).



Wyk. 10 Porównanie akumulacji wybranych sdRNA w monosomach z bibliotek rancRNAseq z hodowli w warunkach optymalnych i stresie hiperosmotycznym. Przedstawiono sdRNA wykazujące istotnie statystycznie zmienioną akumulację w porównaniu do frakcji RNA niezwiązanych z rybosomami. Kolorem niebieskim oznaczono snR35 (184–204).

Na Rysunku 41 umieszczono umieszczono strukturę drugorzędową snoRNA i pozycję sdRNA wykazującego najwyższą asocjację do frakcji monosomów w porównaniu stresu hiperosmotycznego do warunków optymalnych. Wykryty sdRNa pochodzi z 3'końca snoRNA.



Rys. 41 Struktura drugorzędowa snoRNA z zaznaczoną pozycją sdRNA wykazującego najwyższą akumulację w monosomach w stresie hiperosmotycznym względem warunków optymalnych. Czerwoną strzałką oznaczono miejsce cięcia snoRNA. Struktura drugorzędowa snoRNA została wygenerowana z wykorzystaniem RNAfold WebSerwer.

Wykryto tylko 1 sdRNA o istotnej statystycznie asocjacji we frakcji monosomów w stresie hiperosmotycznym względem warunków optymalnych. Mimo niskiej ilości odczytów snR35 (184–204) jest unikalnym sdRNA dla stresu hiperosmotycznego, co może wskazywać ja jego potencjalną rolę w adatacji rybosomów do tego stresu.

4.4.4.1.3. Wybrane sdRNA wykazujące istotne zmiany asocjacji w monosomach w odpowiedzi na oba typy stresów

Zidentyfikowano jeden sdRNA snR63 (232–255) w monosomach w obu stresach abiotycznych w porównaniu do warunków optymalnych. W Tabeli 19 umieszczono wspomniany sdRNA, jego poziomy asocjacji z monosomami oraz wartości p.

	Wartość p*	BC	BC+	K	K+	Н	H+	Wartość p**
snR63 (232-255)	0,0123	1469,1	278,5	0	0	449,7	91,3	0,0015

Tab. 19 sdRNA wykazujące największą akumulację w bibliotekach rancRNAseq z obydwu typów stresów abiotycznych w monosomach w stosunku do warunków optymalnych. Liczby przedstawiają ilości odczytów na 1 mln w bibliotece. BC– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego, BC+– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego AlkB+, K– krótkie RNA z hodowli w warunkach optymalnych, K+– krótkie RNA z hodowli w warunkach optymalnych AlkB+, H– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego, H+– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego AlkB+. Wartość p*– porównanie hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego (AlkB+ i AlkB-) z hodowlą w warunkach optymalnych (AlkB+ i AlkB-). Wartość p**– porównanie hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego (AlkB+ i AlkB-). Wartość p**– porównanie hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego (AlkB+ i AlkB-).

Nie został on wykryty w bibliotekach rancRNAseq monosomów z hodowli w warunkach optymalnych (AlkB- i AlkB+). Występuje on jedynie w bibliotekach rancRNAseq wolnych RNA AlkB+ na poziomie 6,5 odczytów na milion. Brak snR63 (232–255) w bibliotekach rancRNAseq z warunków optymalnych, może wskazywać na potencjalne funkcje regulatorowe poprzez asosjację z monosomami wyłącznie podczas warunków stresowych. Co istotne, prekursorowy snoRNA63 pełni fukcję w 2'O-metylacji RNA dużej podjednostki rybosomu w pozycji A2256 [181], [182].

W warunkach stresu głodu cukrowego akumulacja snR63 (232–255) we frakcji monosomów wyniosła 1469 odczytów na milion, a w bibliotece rancRNAseq AlkB+, 278,5 odczytów na milion. Nie został on wykryty we frakcjach RNA niezwiązanych z rybosomami, co wskazuje na asocjację z monosomami całej puli snR63 (232–255) obecnej w komórce podczas głodu cukrowego.

Natomiast w warunkach hiperosmotycznych asocjacja z monosomami wyniosła 449,7 odczytów na milion, w bibliotekach posiadających RNA poddane demetylacji, 91,3 odczytu na milion. We frakcji wolnych RNA został wykryty tylko w bibliotekach AlkB-, a jego zawartość wyniosła jedynie 3,5 odczytu na milion.



Wyk. 11. Porównanie akumulacji wybranych sdRNA w monosomach z bibliotek rancRNAseq z hodowli w warunkach optymalnych oraz obu stresach abiotycznych. Przedstawiono sdRNA wykazujące istotnie statystycznie zmienioną akumulację w porównaniu do frakcji RNA niezwiązanych z rybosomami.

Na Rysunku 42 umieszczono umieszczono strukturę drugorzędową snoRNA z oznaczoną pozycją sdRNA snR63 (232–255), wykazującego najwyższą asocjację z monosomami porównaniu obu stresów abiotycznych z warunkami optymalnymi.



Rys. 42 Struktura drugorzędowa snoRNA z zaznaczoną pozycją sdRNA wykazującego najwyższą akumulację w monosomach z bibliotek rancRNAseq z obu stresów abiotycznych względem warunków optymalnych. Czerwonymi strzałkami oznaczono miejsca cięcia snoRNA. Struktura drugorzędowa snoRNA została wygenerowana z wykorzystaniem RNAfold WebSerwer.

4.4.4.2. Podsumowanie wyników opisujących sdRNA oddziałujące z

monosomami

We wszystkich trzech porównaniach zaobserwowałam łącznie 7 sdRNA (Tab. 20) posiadających powyżej tysiąca odczytów we frakcji monosomów. W bibliotekach AlkB-, wszystkie najwyższe ilości odczytów zaobserwowałam w bibliotekach rancRNAseq z hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego. Nie zaobserwowałam sdRNA posiadających podwyższoną ilość odczytów w bibliotekach rancRNAseq z hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego. Obserwujemy, odmienną sytuację niż w podjednostkach rybosomowych, gdzie wszystkie obserwowane sdRNA o podwyższonej ilości odczytów pochodziły z bibliotek rancRNAseq z hodowli w warunkach optymalnych.

Podwyższony poziom sdRNA w monosomach w warunkach stresu, sugeruje, że komórki muszą szybko reagować i adaptować swoje mechanizmy tranlacji. Co prowadzi do produkcji sdRNA związanych z odpowiedzią na stres. Należy zwrócić też uwagę, że stres głodu cukrowego ma bardziej bezpośredni wpływ na funkcjonowanie rybosomów, gdyż ogranicza substraty. Natomiast stres hiperosmotyczny, wpływający na zmiany objętości komórki i regulację osmotyczną, nie prowadzi do tak silnych zmian, co potwierdzają moje wyniki badań. sdRNA silnie akumulowane w monosomach w warunkach głodu cukrowego, występują również podczas stresu hiperosmotycznego jednak na znacząco niższym poziomie (Tab. 20).

Nie zaobserwowałam sdRNA posiadających powyżej tysiąca odczytów w bibliotekach rancRNAseq AlkB+.

	Monosomy			
rancRNA	BC	Κ	Η	
snR45 (141–171)	5↑		\rightarrow	
snR47 (78–99)	21	-	\rightarrow	
snR54 (38–74)	\uparrow	-	_	
snR60 (86–104)	\uparrow	-		
snR61 (2-44)	29↑	\downarrow	\rightarrow	
snR63 (232–255)	\uparrow	_	\downarrow	
snR128 (1-25)	11↑	\uparrow	\rightarrow	

Tab. 20 sdRNA posiadające najwyższą ilość odczytów na milion w bibliotekach rancRNAseq we frakcji monosomów. \downarrow oznacza odczyty poniżej tysiąca na milion, BC– krótkie RNA z hodowli w warunkach głodu cukrowego K– krótkie RNA z hodowli w warunkach optymalnych, H– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego \uparrow oznacza odczyty powyżej tysiąca na milion, numery obok strzałek odnoszą się do pełnych tysięcy zaobserwowanych odczytów (np. \uparrow oznacza ponad tysiąc odczytów, a 50 \uparrow oznacza ponad pięćdziesiąt tysięcy odczytów na milion). – oznaczono brak odczytów.

4.4.4.3. tRF o istotnych statystycznie zmianach w oddziaływaniu z monosomami pod wpływem stresu

4.4.4.3.1. tRF wykazujące istotne zmiany asocjacji z monosomami tylko w odpowiedzi na stres głodu cukrowego

Zidentyfikowano 50 tRF pochodzących z 20 różnych izoakceptorów tRNA w monosomach w stresie głodu cukrowego względem warunków optymalnych. Tabela 47 (Materiał dodatkowy) przedstawia wartości p dla każdego tRF. Na Rys. 43 umieszczono mapę cieplną z porównaniem poziomu akumulacji w monosomach wspomnianej grupy tRF względem frakcji wolnych RNA.



Rys. 43 Mapa cieplna tRF o istotnych statystycznie zmianach w warunkach głodu cukrowego w porównaniu do warunków optymalnych we frakcji monosomów. Liczby przy legendzie przedstawiają ilości odczytów na 1 mln w bibliotece.

Do dalszej analizy zdecydowano się wybrać tRF posiadające ponad tysiąc odczytów na milion. W tabeli 21 umieszczono wybrane tRF, poziomy ich asocjacji z frakcją monosomów oraz wartości p.

	K	K+	BC	BC+	Wartość p
tA(UGC)G (37-71)	4144,2	221,4	1783,9	0	0,0052
tA(UGC)G (45-71)	1747,9	218,6	0	0	0,0483
tA(UGC)G (50-76)	3721,3	3829,7	0	1580,6	0,0360
tD(GUC)G1 (43-75)	5779,3	5845,9	0	5442,9	0,0202
tE(UUC)I (35-74)	0	115,6	1049,3	1302,4	0,0057
tF(GAA)G (38-73)	798,8	0	3830,1	750,4	0,0003
tG(GCC)E (30-70)	1099,5	333,9	629,6	0	0,0021
tH(GUG)E2 (42-65)	1296,8	190,5	0	0	0,0393
tL(CAA)K (42-84)	0	0	0	1147,2	0,0050
tL(CAA)K (45-84)	0	138,5	734,5	1762,2	0,0412
tL(CAA)K (50-84)	0	0	0	1029,7	0,0159
tL(CAA)N (1-25)	1071,3	250,8	0	74,6	0,0084
tL(CAA)N (62-80)	1146,5	190,5	0	0	0,0450
tL(CAA)N (62-85)	4332,1	10976,2	0	11336,7	0,0300
tL(UAA)J (61-87)	1578,7	1466,1	0	785,6	0,0492
tY(GUA)J2 (40–78)	704,8	1323,8	0	680	0,0336

Tab. 21 tRF wykazujące największą akumulację w bibliotekach rancRNAseq ze stresu głodu cukrowego w monosomach w stosunku do warunków optymalnych. Liczby przedstawiają ilości odczytów na 1 mln w bibliotece. K– krótkie RNA z hodowli w warunkach optymalnych, K+– krótkie RNA z hodowli w warunkach optymalnych AlkB+, BC– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego, BC+– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego AlkB+.

Najwyższą akumulację we frakcji monosomów w warunkach optymalnych osiągnął tD(GUC)G1 (43–75) z asocjacją na poziomie 5 779,3 odczytów na milion (Tab. 21, Wyk. 21). Został on wykryty w bibliotece zawierającej frakcje wolnych RNA, ale jego akumulacja jest tam niższa o ponad 4 845,9 odczytów na milion, co świadzy o silnej asocjacji z monosomami. Honda wraz ze swoim zespołem odkryła, że 5'tRNA^{Asp}GUC jest kluczowym prekursowem td-piRNA, wiążących się z białkami Ago w komórkach BmN4 [173]. Wyniki te wskazują na nowe informacje o funkcji tRF jako cząsteczek regulatorowych. *S. cerevisiae* nie posiada białek Ago, jednak nie wyklucza to podobnych mechanizmów wykorzystywania 5'tRNA^{Asp}GUC. Więcej niż tysiąc odczytów na milion w warunkach optymalnych posiadały również: tL(CAA)N (62–85), tA(UGC)G (37–71), tA(UGC)G (50–76), tA(UGC)G (45–71), tL(UAA)J (61–87), tH(GUG)E2 (42–65), tL(CAA)N (62–80), tG(GCC)E (30–70) oraz tL(CAA)N (1–25). Wszystkie tRF z tej grupy posiadały wyższą asocjację z monosomami w warunkach optymalnych niż w warunkach stresowych.

W bibliotekach z warunków optymalnych AlkB+, najwyższą akumulację posiadał tL(CAA)N (62–85) z wynikiem 10 976,2 odczytów na milion (Tab.21, Wyk. 12). Jest to ponad 5 000 odczytów na milion więcej niż najbardziej akumulowana cząsteczka w bibliotece zawierającej niedemetylowane RNA z monosomów. Pozostałe tRF posiadające więcej niż tysiąc odczytów na milion to: tL(UAA)J (61–87), tY(GUA)J2 (40–78), tD(GUC)G1 (43–75) oraz tA(UGC)G (50–76). Należy zwrócić uwagę, że tylko tL(UAA)J (61–87) z tej grupy wykazał spadek ilości odczytów po demetylacji RNA (Tab. 21, Wyk. 12).

W warunkach głodu cukrowego najwyższą asocjację obserwowano dla tF(GAA)G (38– 73) z wynikiem 3 830,1 odczytów na milion (Tab.21, Wyk.12). Jego akumulacja jest znacznie wyższa niż w monosomach z hodowli w warunkach optymalnych (Tab. 21, Wyk. 12). Wcześniej opisywałam tF(GAA)G (40–76), który posiadał ponad 2 tysiące odczytów na milion w bibliotekach ze stresu hiperosmotycznego we frakcji
podjednostek rybosomowych. Może to wskazywać na potencjalną rolę tRF pochodzących z tF(GAA)G w regulacji odpowiedzi na stresy abiotyczne u drożdży poprzez ich zależną od stresu acocjację zarówno z podjednostkami rybosomalnymi jak i kompletnym rybosomem. Inne tRF posiadające asocjację wyższą niż tysiąc na milion: tA(UGC)G (37–71) oraz tE(UUC)I (35–74). Tylko ostatni tRF z tej grupy nie występuje w bibliotekach z warunków optymalnych, jednak posiada on niższą akumulację w monosomach niż w wolnych RNA (10 403,9 odczytów na milion).

W bibliotekach z hodowli w stresie głodu cukrowego AlkB+, najwyższą ilość odczytów posiadał tL(CAA)N (62–85) i wyniosła ona 11 336,7 odczytów na milion (Tab.21, Wyk.12). Jest to ponad 7500 odczytów na milion więcej niż w warunkach stresowych bez demetylacji RNA. Jednak w przypadku tL(CAA)N (62–80), obserwujemy spadek ilości odczytów w warunkach optymalnych AlkB+ oraz brak odczytów w warunkach stresu głodu cukrowego AlkB+. Po demetylacji obserwujemy zatem wzrost ilości dłuższego tRF tL(CAA)N (62–85) oraz spadek ilości odczytów tL(CAA)N (62–80). Pozostałe tRF posiadające więcej niż tysiąc odczytów na milion: tA(UGC)G (50–76), tD(GUC)G1 (43–75), tE(UUC)I (35–74), tL(CAA)K (42–84), tL(CAA)K (45–84) oraz tL(CAA)K (50–84). Wszystkie tRF z tej grupy wykazały wzrost ilości odczytów w porównaniu do biblioteki z warunków stresowych AlkB-.



Wyk.12 Porównanie akumulacji wybranych tRF w monosomach z bibliotek rancRNAseq z warunków optymalnych i stresu głodu cukrowego. Przedstawiono tRF wykazujące istotnie statystycznie zmienioną akumulację w porównaniu do frakcji RNA niezwiązanych z rybosomami.

Na Rysunku 44 umieszczono umieszczono struktury drugorzędowe tRNA z zaznaczoną pozycją tRF wykazujących najwyższą asocjację z monosomami w porównaniu stresu głodu cukrowego do warunkach optymalnych. W bibliotekach AlkB- najwyższą ilość odczytów obserwowano dla tD(GUC)G1 (43–75) oraz tF(GAA)G (38–73). Pierwszy zaczyna się przed pętlą zmienną i kończy na wydłużonym ramieniu końca 3'. Natomiast tRF pochodzący od tRNA przenoszącego fenyloalaninę, należy do klasy innych tRF, zaczyna się na pętli antykodonu a kończy przed pętlą pseudourydynową. W bibliotekach AlkB+ najwięcej odczytów wykryto u tL(CAA)N (62–85), on również należy do klasy innych tRF, zaczyna się na pętli antykodonowej, a kończy na ramieniu zmiennym. Warto zauważyć, że zarówno tL(CAA)N (62–85) jak i tL(CAA)N (62–80) obejmują znaczną część sekwencji wstawnionych w tRNA w pętli antykodonu. Stąd, dyskutowana wyżej różnica w wykrywaniu dwóch tRF powstających z tRNA^{Leu}CAA

może wynikać z obecności modyfikacji w sekwencji między 80 a 85 nukleotydem tRNA^{Leu}.



Rys. 44 Struktury drugorzędowe tRNA z zaznaczonymi pozycjami tRF wykazującymi najwyższą akumulację w monosomach z bibliotek rancRNAseq ze stresu głodu cukrowego względem warunków optymalnych. Czerwonymi strzałkami oznaczono miejsca cięcia tRNA. Źródło struktury tRNA: yeastgenome.org.

Analiza 50 tRF o istotnych statystycznie zmianach w warunkach stresu głodu cukrowego względem warunków optymalnych we frakcji monosomów wykazała 16 tRF posiadających odczyty powyżej tysiąca na milion.

We wszystkich analizowanych bibliotekach wykryto wiele tRF posiadających powyżej tysiąca odczytów na milion, w tym 2 tRF unikatowe dla warunków głodu cukrowego AlkB-: tE(UUC)I (35–74) i tL(CAA)K (45–84).

4.4.4.3.2. Wybrane tRF wykazujące istotne zmiany asocjacji w monosomach tylko w odpowiedzi na stres hiperosmotyczny

Zidentyfikowano 24 tRF pochodzące z 20 różnych izoform tRNA, w monosomach w stresie hiperosmotycznym względem warunków optymalnych. Tabela 48 (Materiał dodatkowy) przedstawia wartości p dla każdego sdRNA. Na Rys. 45 umieszczono mapę cieplną z porównaniem poziomu akumulacji w monosomach wspomnianej grupy tRF względem frakcji wolnych RNA.



Rys. 45 Mapa cieplna tRF o istotnych statystycznie zmianach w warunkach hiperosmotycznych w porównaniu do warunków optymalnych we frakcji monosomów. Liczby przy legendzie przedstawiają ilości odczytów na 1 mln w bibliotece.

Do dalszej analizy zdecydowano się wybrać tRF posiadające ponad tysiąc odczytów na milion. W Tabeli 22 umieszczono wybrane tRF, poziomy ich asocjacji z frakcją monosomów oraz wartości p.

	K	K+	Н	H+	Wartość p
tA(AGC)L (39-67)	2349,3	495,7	516,7	0	0,0309
tF(GAA)G (40-76)	0	1080,1	1043,5	1576,5	0,0328
tH(GUG)G1 (52-75)	0	1645,6	1584,1	1425,4	0,0496
tK(UUU)G2 (1-28)	0	2027,7	2075,8	3467,5	0,0441
tY(GUA)F2 (50-73)	1907,6	181	0	122,3	0,0411

Tab.22 tRF wykazujące największą akumulację w bibliotekach rancRNAseq ze stresu hiperosmotycznego w monosomach w stosunku do warunków optymalnych. Liczby przedstawiają ilości odczytów na 1 mln w bibliotece. K– krótkie RNA z hodowli w warunkach optymalnych, K+– krótkie RNA z hodowli w warunkach optymalnych AlkB+, H– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego, H+– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego AlkB+.

Najwyższą akumulację we frakcji monosomów w warunkach optymalnych osiągnęły tA(AGC)L (39–67) oraz tY(GUA)F2 (50–73) z wynikiem 2 349,3 oraz 1 907,6 odczytów na milion. Wspomniane tRF wykryto również w bibliotekach z warunków optymalnych AlkB+, ale na znacznie niższym poziomie (Tab.22, Wyk.13). Spadek ilości odczytów tRF w warunkach stresu wskazuje na potencjalną rolę obu cząsteczek w regulacji prawidłowego funkcjonowania monosomów. tA(AGC)L (39–67) został wykryty również we frakcji podjednostek rybosomowych, jednak ilość odczytów nie

przekraczała tam tysiąca na milion. To wskazuje na silną asocjację z pełni złożonymi monosomami.

W bibliotekach AlkB+ z hodowli w warunkach optymalnych najwyższą ilość odczytów zaobserwowano dla tK(UUU)G2 (1–28), 2 027,7 odczytu na milion. Odczyty powyżej tysiąca na milion zaobserwowałam dla: tH(GUG)G1 (52–75) i tF(GAA)G (40–76) (Tab.22). Należy zwrócić uwagę, iż te trzy tRF nie zostały wykryte w bibliotekach z warunków optymalnych AlkB-. Może to ściadczyć o potencjalnej roli metylacji w regulacji ich stabilności. Należy zwrócić uwagę, iż wszystkie zostały wykryte w bibliotekach ze stresu hiperosmotycznego AlkB-, ale w przypadku tH(GUG)G1 (52–75) obserwujemy niewielki spadek ilości odczytów, gdy w pozostałych dwóch tRF obserwujemy wzrost ilości odczytów.

W warunkach osmotycznych najwyższa asocjację z monosomami zaobserwowano u tK(UUU)G2 (1-28), tH(GUG)G1 (52-75) oraz tF(GAA)G (40-76) z wynikami odpowiednio 2075,8, 1584,1 oraz 1043,5 odczytów na milion. Z tej grupy tylko tK(UUU)G2 (1-28) posiada wyższą akumulację we frakcji monosomów niż w RNA niezwiazanych z rybosomami (Wyk.13). Zaobserwowałam również obecność podobnego do tK(UUU)G2 (1-28) tRF tK(UUU)G2 (1-23) we frakcji monosomów, jednak ilości jego odczytów nie przekraczają tam 400 na milion. Należy zaznaczyć, że w literaturze opisano rolę modyfkacji nienaładowanych tRNA w odpowiedzi na stres niedoboru aminokwasów [183], [184]. Biorac pod uwagę powyższe obserwacje, sugeruję, że tK(UUU)G2 (1-28) może pełnić dotychczas nieznane funkcje w odposiwedzi na stres hiperosmotyczny. Dodatkowo chciałabym wspomnieć, że w obu analizowanych warunkach hodowli drożdży (optymalne i stres hiperomotyczny) w bibliotekach AlkB+ zaobserwowałam wzrost liczby odczytów tK(UUU)G2 (1-28). Żaden z tych trzech wspomnianych tRF nie został wykryty w bibliotekach z hodowli w warunkach optymalnych AlkB-, co może wkazywać na potencjalną rolę tRF w adaptacji rybosomów do warunków stresowych poprzez oddziaływanie tRF/rybosom.

W bibliotekach rancRNAseq z warunków stresowych AlkB+, najwyższą akumulacją we frakcji monosomów charakteryzował się tK(UUU)G2 (1–28), na poziomie 3 467,5 odczytów na milion. Jest ona większa o 1 391,6 odczytów na milion niż w bibliorekach rancRNAseq bez demetylacji RNA. Pozostałe tRF z odczytami powyżej tysiąca odczytów na milion to: tF(GAA)G (40–76) oraz tH(GUG)G1 (52–75) (Tab.22). Z tej grupy tylko dla tH(GUG)G1 (52–75) obserwowałam spadek ilości odczytów po demetylacji RNA.



Wyk.13 Porównanie akumulacji wybranych tRF w monosomach z bibliotek rancRNAseq w warunkach optymalnych i stresie hiperosmotycznym. Przedstawiono tRF wykazujące istotnie statystycznie zmienioną akumulację w porównaniu do frakcji RNA niezwiązanych z rybosomami.

Na Rysunku 46 umieszczono umieszczono struktury drugorzędowe tRNA z zaznaczonymi pozycjami tRF wykazującymi najwyższą asocjację z monosomami w stresie hiperosmotycznym w porównaniu do warunków optymalnych. W warunkach optymalnych AlkB- najwyższą ilość odczytów posiadał tA(AGC)L (39–67), należący do klasy inne tRF, zaczynający się w ramieniu antykodonu tRNA, a kończący na pętli pseudourydynowej. Natomiast w pozostałych bibliotekach w tym porównaniu najwyższą ilość odczytów obserwowano dla tK(UUU)G2 (1–28), należącego do klasy tRF-5b.



Rys. 46 Struktury drugorzędowe tRNA z zaznaczonymi pozycjami tRF wykazującymi najwyższą akumulację w monosomach z bibliotek rancRNAseq ze stresu hiperosmotycznego względem warunków optymalnych. Czerwonymi strzałkami oznaczono miejsca cięcia tRNA. Źródło struktury tRNA: yeastgenome.org

Analiza 24 tRF o istotnych statystycznie zmianach w akumulacji w monosomach w warunkach stresu głodu cukrowego względem warunków optymalnych wskazała 5 tRF posiadających odczyty powyżej tysiąca na milion.

W warunkach optymalnych najwyższą akumulację w monosomach osiągneły tA(AGC)L (39–67) oraz tY(GUA)F2 (50–73); należy zwrócić uwagę, że ich poziomy

akumulacji w stresie hiperosmotycznym są znacznie niższe. Natomiast w bibliotekach AlkB+ to tK(UUU)G2 (1–28), tH(GUG)G1 (52–75) i tF(GAA)G (40–76) były najsilniej akumulowane w monosomach.

W bibliotekach rancRNAseq z hodowli w warunkach hiperosmotycznych (AlkB- i AlkB+), najsilniej akumulowane w monosomach były te same trzy tRF: tK(UUU)G2 (52–75) i tF(GAA)G (40–76). Po demetylacji RNA (1–28), tH(GUG)G1 zaobserwowano spadek ilości odczytów u tH(GUG)G1 (52–75). Co istotne, ten sam tRF został wykryty w warunkach optymalnych dopiero po demetylacji RNA. Badania zespołu Kellner-Kaiser wskazują na zmienność metylacji pod wpływem stresu [185], [186]. Zatem obserwowane przeze mnie fluktuacje w liczbie odczytów tH(GUG)G1 (52–75), obejmujące wzrost ilości odczytów w warunkach optymalnych AlkB+ oraz spadek ilości odczytów w bibliotekach rancRNAseq z hodowli w stresie hiperosmotycznym AlkB+, może stanowić dalsze potwierdzenie słuszności tez przedstawionych przez zespół Dedona [171] oraz Toda Lowe [33]. Wyniki zaprezentowane w mojej rozprawie doktorskiej sugeruja, że liczba odczytów obserwowana w wyniku sekwencjonowania rancRNAseq jest wypadkowa złożonych procesów regulacyjnych występujących w komórkach drożdży pod wpływe stresu, w tym modyfikacji metylowych.

4.4.4.3.3. Wybrane tRF wykazujące istotne zmiany asocjacji w monosomach w odpowiedzi na oba typy stresów

Zidentyfikowano 13 tRF pochodzących z 11 różnych izoakceptorów tRNA w monosomacj w obu typach stresów względem warunków optymalnych. Tabela 49 (Materiał dodatkowy) przedstawia wartości p dla każdego tRF. Na Rys. 47 umieszczono mapę cieplną z porównaniem poziomu akumulacji w monosomach wspomnianej grupy tRF względem frakcji wolnych RNA.



Rys. 47 Mapa cieplna tRF o istotnych statystycznie zmianach w obu stresach abiotycznych w porównaniu do warunków optymalnych we frakcji monosomów. Liczby przy legendzie przedstawiają ilości odczytów na 1 mln w bibliotece.

-								
	Wartość	BC	BC+	K	K+	Н	H+	Wartość
	p*							p**
tD(GUC)J3 (46-71)	0,0261	0	0	0	462,6	0	0	0,0172
tE(UUC)L (55-75)	0,0368	0	2461,2	911,5	3721,2	0	2025,9	0,0183
tF(GAA)P1 (38-69)	0,0267	0	0	1014,9	152,4	0	0	0,0121
tK(CUU)M (43-71)	0,0015	0	0	1052,5	310,3	1265,9	281,2	0,0369
tK(UUU)G2 (48–71)	0,0253	918,2	311,7	0	0	689,7	0	0,0212
tS(AGA)L(56-87)	0.0043	120937	0	16463.8	343.7	2873 3	386.6	0.0387

Do dalszej analizy zdecydowano się wybrać tRF posiadające ponad tysiąc odczytów na milion. W tabeli 23 umieszczono wybrane tRF, poziomy ich asocjacji z monosomami oraz wartości p.

Tab. 23 tRF wykazujące największą akumulację w bibliotekach rancRNAseq z hodowli w obydwu typach stresów abiotycznych w monosomach w stosunku do warunków optymalnych. Liczby przedstawiają ilości odczytów na 1 mln w bibliotece. BC– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego, BC+– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego AlkB+, K– krótkie RNA z hodowli w warunkach optymalnych, K+– krótkie RNA z hodowli w warunkach optymalnych AlkB+, H– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego, H+– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego, H+– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego, H+– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego (AlkB+ i AlkB-) z hodowlą w warunkach optymalnych (AlkB+ i AlkB-). Wartość p**– porównanie hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego (AlkB+ i AlkB-).

W bibliotekach zawierających rancRNA z hodowli w warunkach optymalnych najwyższe akumulacje we frakcji monosomów obserwowano dla tS(AGA)L (56–87) oraz tK(CUU)M (43–71), z wynikami odpowiednio 16 463,8 oraz 1 052,6 odczytów na milion (Tab.23). Należy zwrócić uwagę, że we frakcji podjednostek rybosomowych w stresie hiperomotycznym zaobserwowałam akumulację powyżej tysiąca odczytów dla tS(AGA)H (53–85). Pokazuje to, że z jednego tRNA powstaje wiele tRF, asocjujących z rybosomem na różnych etapach translacji i potencjalnie pełniących różnorodne funkcje regulatorowe podczas biosyntezy białek w warunkach stresowych.

W bibliotekach AlkB+ z hodowli w warunkach optymalnych najwyższe poziomy asocjacji z monosomami obserwowano dla tE(UUC)L (55–75) oraz tD(GUC)J3 (46–71), odpowiednio 3 721,2 oraz 462,6 odczyty na milion (Tab.23). Należy zwrócić uwagę, że wszystkie tRF wykazujące wysoką asocjację (>1000) z monosomami w bibliotekach AlkB- wykazały spadek ilości odczytów w bibliotekach AlkB+. Badania z 2020 roku sugerują, że ALKBH1 odgrywa rolę nie tylko w demetylacji m¹A ale również w hydrolizie tRNA niezależnej od Dicer [44]. To może wskazywać, że obserwowane tRF w bibliotekach AlkB+, są nie tylko pozbawione demetylacji, ale mogą być również cięte przez białka AlkB.

W bibliotekach zawierających rancRNA z hodowli w stresie głodu cukrowego najwyższą asocjację z monosomami zaobserwowano dla tS(AGA)L (56–87) (12 093,7 odczyty na milion) i tK(UUU)G2 (48–71) (918,2 odczyty na milion). Spadek ilości odzytów u tS(AGA)L (56–87) w porównaniu z bibliotekami z hodowli w warunkach optymalnych może być związany z potencjalną rolą tRF w adaptacji drożdży do warunków stresowych poprzez asocjację tRF/rybosom. Należy zwrócić uwagę, że w monosomach w warunkach stresu hiperosmotyczego obserwowaliśmy tK(UUU)G2 (1–28), co może wskazywać, na potencjalną rolę tRF pochodzących z tRNA^{Lys}UUU w odpowiedzi na stres hiperosmotyczny oraz stres głodu cukrowego.

W bibliotekach AlkB+ z hodowli w stresie głodu cukrowego nawyższe poziomy akumulacji we frakcji rancRNA zasocjowaonych z monosomami zaobserwowano dla tE(UUC)L (55–75) i tK(UUU)G2 (48–71), z wynikami odpowiednio 2 461,2 oraz 311,7

odczytów na milion. Należy podkreślić, że tE(UUC)L (55–75) nie został wykryty w bibliotekach AlkB-.

W bibliotekach zawierających RNA z hodowli w stresie hiperosmotycznym najwyższe poziomy asocjacji z monosomami obserwowano dla tS(AGA)L (56–87) (2 873,3 odczyty na milion) i tK(CUU)M (43–71) (1 265,9 odczytów na milion). Kolejny raz obserwujemy silną asocjację tS(AGA)L (56–87) z frakcją monosomów. Zmienna ilość odczytów wykrywanych tRF asocjujących z monosomami wskazuje na to jak zmienia się profil akumulacji tego samego tRF pod wpływem warunków stresowych.

W bibliotekach zawierających rancRNA z hodowli w warunkach osmotycznych AlkB+, najwyższe poziomy akumulacji wykazały tE(UUC)L (55–75) i tS(AGA)L (56–87) z wynikami 2 025,9 oraz 386,6 odczytów na milion(Tab.23, Wyk.14). We wszystkich analizowanych w niniejszej pracy doktorskiej bibliotekach AlkB+ tE(UUC)L (55–75) wykazywał wzrost ilości odczytów w porównaniu do AlkB-. Może to wskazywać na rolę metylacji w regulacji jego stabilności.



Wyk. 14 Porównanie akumulacji wybranych tRF w monosomach z bibliotek rancRNAseq z warunków optymalnych oraz obu stresów abiotycznych. Przedstawiono tRF wykazujące istotnie statystycznie zmienioną akumulację w porównaniu do frakcji RNA niezwiązanych z rybosomami.

Na Rysunku 48 umieszczono strukturę drugorzędową tRNA z oznaczonymi pozycjami tRF wykazujących najwyższą asocjację z monosomami w obu stresach abiotycznych w porównaniu do warunków optymalnych. Należy zwrócić uwagę, że w tej grupie wykryto dwa tRF, po jedynym na biblioteki AlkB- i AlkB+, należące do klasy tRF-3b. W bibliotekach AlkB- najwyższą ilość odczytów obserwowano dla tS(AGA)L (56–87). Natomiast w bibliotekach AlkB+ najwięcej odczytów obserwowano u tE(UUC)L (55–75).



Rys. 48 Struktury drugorzędowe tRNA z zaznaczonymi pozycjami tRF wykazującymi najwyższą akumulację w monosomach w bibliotekach rancRNAseq z obu stresów abiotycznych względem warunków optymalnych. Czerwonymi strzałkami oznaczono miejsca cięcia tRNA. Źródło struktury tRNA: yeastgenome.org.

Analiza 13 tRF o istotnych statystycznie zmianach akumulacji w monosomach w obydwu badanych stresach abiotycznych względem warunków optymalnych wykazała 4 tRF posiadające odczyty powyżej tysiąca na milion. Najwyższą akumulację w monosomach we wszystkich bibliotekach zawierających RNA AlkB- osiągnęła cząsteczka tS(AGA)L (56–87). Jej poziom był najwyższy w warunkach optymalnych (16 463,8 odczytów na milion), niższy w stresie głodu cukrowego (12 093,7) oraz najniższy w stresie hiperosmotycznym (2 873,3). Już w 1994 roku donoszono o preferencyjnym występowaniu tRNA^{Ser}AGA w drożdżach hodowanych na pożywkach zawierających glukozę jako źródło wegla, w porównaniu do pożywek z innymi źródłami węgla [187]. Zatem obserwacja najwyższej liczby odczytów tS(AGA)L (56-87) w warunkach optymalnych oraz ich redukcja w warunkach stresowych może sugerować, że wspomniany tRF pełni kluczową rolę w procesach metabolicznych związanych z wykorzystaniem glukozy jako preferencyjnego źródła energii. W warunkach stresowych, gdy dostępność glukozy jest ograniczona lub gdy komórka musi adaptować się do zmian osmotycznych, ekspresja tego tRF ulega obniżeniu, co może odzwierciedlać zmiane priorvtetów metabolicznych komórki. Natomiast w bibliotekach zawierajacych demetylowane RNA, dominujaca czasteczka była tE(UUC)L (55–75), której poziom był najwyższy w warunkach optymalnych (3 721,2), a następnie stopniowo malał w kolejnych warunkach stresowych. Spadek ilości tS(AGA)L (56-87) w bibliotekach AlkB+, wskazuje na silną rolę metylacji w regulacji jego stabilności. Natomiast obserwacja, że we wszystkich typach bibliotek AlkB+ w tym porównaniu, obserwujemy wzrost ilości odczytów tE(UUC)L (55-75), wskazuje na potencjalną obecność modyfikacji metylowych hamujących jego akumulację w warunkach AlkB-.

4.4.4.4. Podsumowanie wyników opisujących tRF oddziałujące z monosomami

We wszystkich trzech porównaniach zaobserwowałam 25 tRF (Tab. 24), posiadających powyżej tysiąca odczytów na milion w bibliotekach rancRNAseq we frakcji monosomów AlkB-. Podwyższoną ilość odczytów tylko w bibliotekach z hodowli w stresie głodu cukrowego charakteryzowały się dwa tRF: tE(UUC)I (35–74), tF(GAA)G (38–73). Podwyższoną ilość odczytów w bibliotekach z hodowli w stresie hiperosmotycznym obserwowałam dla: tF(GAA)G (40–76) oraz tH(GUG)G1 (52–75). Należy zwrócić również uwagę na tA(UGC)G (50–76) oraz tD(GUC)G1 (43–75), mimo że posiadały dużo odczytów w bibliotekach rancRNAseq w warunkach stresu hiperosmotycznego oraz optymalnych, to ich akumulacja jest zróżnicowana. Większa w

stresie hiperosmotycznym i mniejsza w warunkach optymalnych, brak odczytów z bibliotek z hodowli w warunkach głodu cukrowego. Jeden tRF posiadał podwyższoną ilość odczytów w obu warunkach stresowych w stosunku do warunków optymalnych - tK(UUU)G2 (1–28).

	Monosomy				
	BC	K	Η		
tA(UGC)G (37-71)	\uparrow	41	\uparrow		
tA(UGC)G (45-71)	-	\uparrow	\downarrow		
tA(UGC)G (50-76)	_	31	41		
tD(GUC)G1 (43-75)	-	5↑	81		
tE(UUC)I (35-74)	\uparrow	-			
tF(GAA)G (38–73)	31	\downarrow	\downarrow		
tG(GCC)E (30-70)	\downarrow	\uparrow	\rightarrow		
tH(GUG)E2 (42-65)	-	\uparrow	\rightarrow		
tL(CAA)N (1-25)	-	\uparrow	\rightarrow		
tL(CAA)N (62-80)	-	\uparrow	_		
tL(CAA)N (62-85)	_	41			
tL(UAA)J (61-87)	-	\uparrow	\downarrow		
tA(AGC)L (39–67)	-	21	\rightarrow		
tF(GAA)G (40-76)	_	_	\uparrow		
tH(GUG)G1 (52-75)	_	-	\uparrow		
tK(UUU)G2 (1-28)	\uparrow	_	21		
tY(GUA)F2 (50–73)	_	\uparrow	_		
tF(GAA)P1 (38–69)	_	\uparrow	_		
tK(CUU)M (43–71)	_	\uparrow	\uparrow		
tS(AGA)L (56–87)	12↑	16↑	21		

Tab. 24 tRF posiadające najwyższą ilość odczytów na milion w bibliotekach rancRNAseq AlkB- we frakcji monosomów. BC– krótkie RNA z hodowli w warunkach głodu cukrowego, K– krótkie RNA z hodowli w warunkach optymalnych, H– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego. \downarrow oznacza odczyty poniżej tysiąca na milion, \uparrow oznacza odczyty powyżej tysiąca na milion, numery obok strzałek odnoszą się do pełnych tysięcy zaobserwowanych odczytów (np. \uparrow oznacza ponad tysiąc odczytów, a 50 \uparrow oznacza ponad pięćdziesiąt tysięcy odczytów na milion). – oznaczono brak odczytów.

W tabeli 25 umieściłam tRF posiadające powyżej tysiąca odczytów na milion w bibliotekach AlkB+. W bibliotekach rancRNAseq z hodowli w stresie głodu cukrowego wytypowałam 6 tRF występujących tylko w bibliotekach AlkB+: tA(UGC)G (50–76), tD(GUC)G1 (43–75), tL(CAA)K (42–84), tL(CAA)K (50–84), tL(CAA)N (62–85) oraz tE(UUC)L (55–75). Dodatkowo, dwie cząsteczki posiadały więcej odczytów w bibliotekach AlkB+ w porównaniu z bibliotekami AlkB-: tE(UUC)I (35–74), tL(CAA)K (45–84).

W bibliotekach rancRNAseq z hodowli w warunkach optymalnych AlkB+ zaobserwowała 4 tRF występujące tylko w bibliotekach AlkB+: tE(UUC)I (35–74), tF(GAA)G (40–76), tH(GUG)G1 (52–75) oraz tK(UUU)G2 (1–28). Jedynie 5 cząsteczek posiadało więcej odczytów w bibliotekach AlkB+ w porówaniu z bibliotekami AlkB-: tA(UGC)G (50–76), tD(GUC)G1 (43–75), tL(CAA)N (62–85), tY(GUA)J2 (40–78) oraz tE(UUC)L (55–75).

W bibliotekach rancRNAseq z hodowli w stresie wytypowałam 2 tRF występujące tylko w bibliotekach AlkB+: tE(UUC)L (55–75) oraz tL(CAA)N (62–85). Zaobserwowałam 3 tRF posiadające więcej odczytów w bibliotekach AlkB+ w porównaniu z bibliotekami AlkB-: tL(UAA)J (61–87), tF(GAA)G (40–76) oraz tK(UUU)G2 (1–28).

	Monosomy				
	BC+	K+	H+		
tA(UGC)G (50-76)	\uparrow	31	21		
tD(GUC)G1 (43-75)	5↑	5↑	31		
tE(UUC)I (35–74)	\uparrow	\rightarrow	\rightarrow		
tL(CAA)K (42-84)	\uparrow	-	-		
tL(CAA)K (45-84)	\uparrow	\rightarrow	\rightarrow		
tL(CAA)K (50-84)	\uparrow	_	_		
tL(CAA)N (62-85)	11 1	10 ↑	7↑		
tL(UAA)J (61–87)	\downarrow	\uparrow	\uparrow		
tY(GUA)J2 (40–78)	\downarrow	\uparrow	\rightarrow		
tF(GAA)G (40-76)	\downarrow	\uparrow	\uparrow		
tH(GUG)G1 (52-75)	\downarrow	\uparrow	\uparrow		
tK(UUU)G2 (1-28)	2 1	2 1	3 1		
tE(UUC)L (55–75)	2 1	3↑	$2\uparrow$		

Tab. 25. tRF posiadające najwyższą ilość odczytów na milion w bibliotekach rancRNAseq AlkB+ we frakcji monosomów. BC+- krótkie RNA z hodowli w warunkach głodu cukrowego AlkB+ K+krótkie RNA z hodowli w warunkach optymalnych AlkB+, H+- krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego AlkB+. \downarrow oznacza odczyty poniżej tysiąca na milion, \uparrow oznacza odczyty powyżej tysiąca na milion, numery obok strzałek odnoszą się do pełnych tysięcy zaobserwowanych odczytów (np. \uparrow oznacza ponad tysiąc odczytów, a 50 \uparrow oznacza ponad pięćdziesiąt tysięcy odczytów na milion). – oznaczono brak odczytów.

4.4.4.5. Polisomy

Biblioteki polisomów zawierają krótkie RNA (sdRNA oraz tRF), które asocjowały z polisomami. Są to struktury składające się z wielu rybosomów translatujących jednocześnie tę samą cząsteczkę mRNA. Ten mechanizm umożliwia komórce szybkie i efktywne wytwarzanie dużych ilości określonego białka.

4.4.4.5.1. sdRNA o istotnych statystycznie zmianach w oddziaływaniu z polisomami pod wpływem stresu

4.4.4.5.1.1. Wybrane sdRNA wykazujące istotne zmiany asocjacji z polisomami tylko w odpowiedzi na stres głodu cukrowego

Zidentyfikowano 132 sdRNA pochodzące z 59 różnych typów snoRNA w polisomach w stresie głodu cukrowego w porównaniu do warunków optymalnych. Tabela 50 (Materiał dodatkowy) przedstawia wartości p dla każdego sdRNA. Na Rys. 49 umieszczono mapę cieplną z porównaniem poziomu akumulacji w polisomach wspomnianej grupy sdRNA względem frakcji wolnych RNA.



Rys. 49 Mapa cieplna sdRNA o istotnych statystycznie zmianach w warunkach stresu głodu cukrowego w porównaniu do warunków optymalnych we frakcji polisomów. Liczby przy legendzie przedstawiają ilości odczytów na 1 mln w bibliotece.

Do dalszej analizy zdecydowano się wybrać sdRNA posiadające ponad tysiąc odczytów na milion. Jednak to kryterium spełnił tylko 1 sdRNA we frakcji ze stresu głodu cukrowego (AlkB+). W związku z tym, do szczegółowej analizy wybrano po 2 sdRNA

	Κ	K+	BC	BC+	Wartość p
snR128 (107-127)	141,4	182,3	678,3	1170,8	0,0339
snR3 (152–191)	354,1	146	0	0	0,0462
snR38 (71–95)	266,7	229,2	222	516,4	0,0494

z każdej analizowanej biblioteki. W tabeli 26 umieszczono wybrane sdRNA, poziomy ich asocjacji z frakcją polisomów oraz wartości p.

Tab. 26 sdRNA wykazujące największą akumulację w bibliotekach rancRNAseq z hodowli w stresie głodu cukrowego w polisomach w stosunku do warunków optymalnych. Liczby przedstawiają ilości odczytów na 1 mln w bibliotece. K– krótkie RNA z hodowli w warunkach optymalnych, K+– krótkie RNA z hodowli w warunkach optymalnych AlkB+, BC– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego, BC+– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego AlkB+.

Najwyższą akumulację w warunkach optymalnych zaobserwowano dla snR3 (152–191) oraz snR38 (71–95) z wynikiem odpowiednio 354,1 i 266,7 odczytów na milion (Tab.26, Wyk. 15). Oba posiadają znacznie wyższą akumulację we frakcji polisomów niż RNA nie związanych z rybosomami (Wyk.15). Należy zwrócić uwagę na brak snR3 w bibliotekach z hodowli w warunkach stresowych. Może mieć to związek z ograniczeniem produkcji białek przez poliosomy i ograniczeniem wydatkowania energii. W badaniach sprawdzano już delecję genu snR3 i nie spowodowało to śmierci drożdży [188]. Możliwe więc, że ograniczenie produkcji snR3 (152–191) jest związane z oszczędnością energetyczną komórek narażonych na stres głodu.

W bibliotekach AlkB+ z warunków optymalnych, najwyższą akumulację obserwowano dla snR38 (71–95) - 229,2 odczytów na milion (Tab.26, Wyk.15) a następnie dla snR128 (107–127) z wynikiem 182,3 odczytów na milion. Pierwszy sdRNA wykazał spadek ilości odczytów w bibliotece AlkB+, natomiast drugi - wzrost.

W warunkach stresu głodu cukrowego najwyższą akumulację w polisomach zaobserwowano dla snR128 (107–127) i snR38 (71–95), odpowiednio 678,3 oraz 222 odczyty na milion. Największa ilość odczytów snR128 (107–127) w warunkach stresowych jest zatem większa o 536,8 odczytów na milion od ilości wykrytej w warunkach optymalnych. Jak wiadomo, represja genu snR128 u drożdży prowadzi do zaburzeń produkcji 18S rRNA [164]. Badania dotyczące snR38 wskazują, że cięcie tego snoRNA jest procesem prawdopodobnie regulowanym intronowo [189]. Wzrost akumulacji tych sdRNA w polisomach w warunkach stresu głodu, może być wywołana stresem komórkowym.

Natomiast w bibliotekach AlkB+ z hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego, najbardziej akumulowane były również snR128 (107–127) i snR38 (71–95) z 1 170,8 oraz 516,4 odczytami na milion. Oba sdRNA wykazały wzrost ilości odczytów w bibliotekach AlkB+ stresu głodu cukrowego. Możliwe, że wspomniane sdRNA są bardziej podatne na wpływ metylacji, a jej usunięcie przez białka typu AlkB umożliwia nam lepsze zobrazowanie środowiska sdRNA w komórkach. Istnieje jesdnak prawdopodobieństwo, iż są to produkty cięcia innych cząsteczek, gdyż białka AlkB mogą również prowadzić do ciętcia tRNA [44].



Wyk. 15 Porównanie akumulacji wybranych sdRNA w polisomach z bibliotek rancRNAseq z warunków optymalnych oraz w stresu głodu cukrowego. Przedstawiono sdRNA wykazujące istotnie statystycznie zmienioną akumulację w porównaniu do frakcji RNA niezwiązanych z rybosomami.

Na Rysunku 50 umieszczono struktury drugorzędowe snoRNA z zaznaczonymi pozycjami sdRNA wykazującymi najwyższą asocjację z polisomami w porównaniu stresu głodu cukrowego do warunków optymalnych. W warunkach optymalnych najwyższą ilość odczytów obserwowano dla snR3 (152–191), który pochodzi z końca 3'. Natomiast w biblitece AlkB+, również z warunków optymalnych najczęściej wykrywanym sdRNA był snR38 (71–95), również z końca 3'. W bibliotekach ze stresu głodu cukrowego najwyższą ilość odczytów posiadał snR128 (107–127), również pochodzący z końca 3'.



Rys. 50 Struktury drugorzędowe snoRNA z zaznaczonymi pozycjami sdRNA wykazującymi najwyższą akumulację w polisomach w bibliotekach rancRNAseq ze stresu głodu cukrowego względem warunków optymalnych. Czerwonymi strzałkami oznaczono miejsca cięcia snoRNA. Struktura drugorzędowa snoRNA została wygenerowana z wykorzystaniem RNA fold WebSerwer.

Analiza 123 sdRNA o istotnych statystycznie zmianach akumulacji w polisomach z hodowli w stresie głodu cukrowego względem warunków optymalnych wykazała tylko 1 sdRNA posiadający odczyty powyżej tysiąca na milion. Najwyższą akumulację w warunkach optymalnych wykazał snR3 (152–191), który nie został wykryty w bibliotekach z hodowli w stresie głodu cukrowego. Natomiast najbardziej akumulowany sdRNA wykryty w bibliotekach zawierających RNA z hodowli w stresie głodu cukrowego – snR128 (107–127) wykazał znacznie silniejszą asocjację z polisomami w

warunkach stresowych niż w warunkach optymalnych, co może sugerować jego potencjalną rolę w adaptacji polisomów do warunków stresowych.

4.4.4.5.1.2. Wybrane sdRNA wykazujące istotne zmiany asocjacji z polisomami tylko w odpowiedzi na stres hiperosmotyczny

Zidentyfikowano 17 sdRNA pochodzące z 14 typów snoRNA w polisomach w stresie hiperosmotycznym w porównaniu do warunków optymalnych. Tabela 51 (Materiał dodatkowy) przedstawia wartości p dla każdego sdRNA. Na Rys. 51 umieszczono mapę cieplną z porównaniem poziomu akumulacji w polisomach wspomnianej grupy sdRNA względem frakcji wolnych RNA.



Rys. 51 Mapa cieplna sdRNA o istotnych statystycznie zmianach w warunkach hiperosmotycznych w porównaniu do warunków optymalnych we frakcji polisomów. Liczby przy legendzie przedstawiają ilości odczytów na 1 mln w bibliotece.

W związku z tym, że żadem sdRNA z wspomnianej grupy nie osiągnął tysiąca odczytów na milion, do szczegółowej analizy wybrano po dwa sdRNA z każdych warunków hodowlanych. W Tabeli 27 umieszczono wybrane sdRNA, poziomy ich asocjacji z frakcją polisomów oraz wartości p.

	K	K+	Н	H+	Wartość p
snR190 (-2-21)	754,5	227,5	96,7	0	0,0004
snR190 (-2-26)	480,4	597,7	0	0	0,0317
snR38 (77–95)	0	0	69,7	54,7	0
snR44 (-1-18)	0	0	41,8	40,8	0,0268
snR70 (134-164)	101,2	64,6	119,4	0	0,0186
snR76 (74-105)	357	323,8	140,3	37	0,0143

Tab. 27 sdRNA wykazujące największą akumulację bibliotekach rancRNAseq z hodowli w stresie hiperosmotycznym w polisomach w stosunku do warunków optymalnych. Liczby przedstawiają ilości odczytów na 1 mln w bibliotece. K– krótkie RNA z hodowli w warunkach optymalnych, K+ – krótkie RNA z hodowli w warunkach optymalnych AlkB+, H– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego, H+– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego AlkB+.

Najczęściej występującymi sdRNA w warunkach optymalnych były snR190 (-2–21) i snR190 (-2–26) z odpowiednio 754,4 oraz 480,4 odczytami na milion (Tab.27). We frakcji wolnych RNA ich akumulacja była znacznie niższa (Wyk. 16). Jak wiadomo snR190 jest związany z dojrzewaniem podjednostki 60S rybosomu [190]. Jego obecność we frakcji polisomów może sugerować potencjalną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu polisomów w warunkach optymalnych. Należy zwrócić uwagę, że wykryte tu sdRNA posiadają niestandardową sekwencję, gdyż ich miejsce rozpoczęcia sekwencji znajduje się poza uznawanym za początek snoRNA190.

W bibliotece z warunków optymalnych AlkB+, najwięcej odczytów posiadały snR190 (-2–26) oraz snR76 (74–105). W obu przypadkach ilość odczytów była większa w bibliotekach AlkB-. Analiza snR190 (-2–21) i snR190 (-2–26) ujawnia, że po demetylacji RNA ponownie obserwujemy wzrost ilości odczytów dłuższej cząsteczki sdRNA. Wskazuje to na silną rolę metylacji w regulacji stabilności sdRNA.

W warunkach hiperosmotycznych najbardziej akumulowanymi sdRNA były snR76 (74–105) oraz snR70 (134–164) z odpowiednio 140,3 i 119,4 odczytami na milion (Tab.27). Ich asocjacja jest silniejsza we frakcji polisomów niż wolnych RNA. Należy zwrócić uwagę, iż akumulacja snR70 (134–164) jest nieznacznie wyższa w warunkach hiperosmotycznych niż w hodowli z warunków optylamnych. Badania sprawdzające delecję snoRNA70 wskazały na defekty wzrostu i produkcji rybosomów negatywnie wpływające na bilans energetyczny komórki [191]. Zatem możliwe, że tak jak jego prekursor, snR70 (134–164) pełni nieznane do tej pory funkcje związane między innymi z adaptacją polisomów do stresu hiperomotycznego.

W bibliotekach zawierających krótkie RNA asocjujące z polisomami z hodowli w stresie osmotycznym AlkB+, najwyższą akumulację zaobserwowano dla snR38 (77–95) i snR44 (-1–18) z odpowiednio 54,7 oraz 40,8 odczytami na milion. Należy zwrócić uwagę, że oba sdRNA wykazały spadek ilości odczytów w bibliotekach AlkB+. Wszystkie sdRNA umieszczone w Tab.27 wykazały spadek ilości odczytów po traktowaniu białkami typu AlkB. Kolejny raz widzimy, że wykorzystanie tych białek nie wpływa pozytywnie na ilośc wykrytych sdRNA, co wskazuje silną rolę metylacji w regulacji stabilności sdRNA.



Wyk. 16 Porównanie akumulacji wybranych sdRNA w polisomach z bibliotek rancRNAseq z hodowli w warunkach optymalnych oraz w stresie hiperosmotycznym. Przedstawiono sdRNA wykazujące istotnie statystycznie zmienioną akumulację w porównaniu do frakcji RNA niezwiązanych z rybosomami.

Na Rysunku 52 umieszczono umieszczono struktury drugorzędowe snoRNA z zaznaczonymi pozycjami sdRNA wykazujących najwyższą asocjację do frakcji polisomów w porównaniu stresu hiperosmotycznego do warunków optymalnych. W bibliotekach zawierających RNA z hodowli w warunkach optymalnych najczęściej obserwowano sdRNA pochodzące z snR190: snR190 (-2–21) oraz snR190 (-2–26), oba pochodzące z 5' końca snoRNA. Natomiast w bibliotekach zawierających RNA z hodowli w stresie osmotycznym najwięcej odczytów obserwowano u snR76 (74–105), pochodzący z końca 3'. Natomiast w bibliotekach AlkB+, zaobserwowano najwyższe ilości odczytów u snR38 (77–95), również pochodzący z końca 3'.



Rys. 52 Struktury drugorzędowe snoRNA z zaznaczonymi pozycjami sdRNA wykazującymi najwyższą akumulację w polisomach w bibliotekach rancRNAseq ze stresu hiperosmotycznego względem warunków optymalnych. Czerwonymi strzałkami oznaczono miejsca cięcia snoRNA. Struktura drugorzędowa snoRNA została wygenerowana z wykorzystaniem RNAfold WebSerwer.

Analiza 17 sdRNA o istotnych statystycznie zmianach akumulacji w stresie hiperomotycznym względem warunków optymalnych w polisomach nie ujawniła żadnych sdRNA przekraczających próg tysiąca odczytów na milion. W bibliotekach z warunków optymalnych AlkB- najczęściej oberwowanym sdRNA był snR190 (-2–21) natomiast w bibliotekach AlkB+ najczęściej obserwowano snR190 (-2–26). W bibliotekach z hodowli w stresie osmotycznym najczęściej akumulowanymi sdRNA w były snR76 (74–105) i snR70 (134–164). Zaobserwowano, że poziom asocjacji snR70 (134–164) był wyższy w warunkach stresowych niż w optymalnych. Natomiast w bibliotekach AlkB+ ze stresu hiperosmotycznego dominowały snR38 (77–95) i snR44 (-1–18). Należy podkreślić, że ich ilość spadła w stosunku do bibliotek AlkB-, ale są to unikatowe sdRNA dla stresu osmotycznego, nie zostały wykryte w hodowli z warunków optymalnych. Te obserwacje sugerują, że te dwa krótkie RNA mogą odgrywać kluczową rolę w adaptacji rybosomów do stresu hiperosmotycznego.

4.4.4.5.1.3. Wybrane sdRNA wykazujące istotne zmiany asocjacji z polisomami w odpowiedzi na oba typy stresów

Zidentyfikowano 5 sdRNA pochodzące z 9 różnych typów snoRNA w polisomach w obu typach stresu względem warunków optymalnych. Tabela 52 (Materiał dodatkowy) przedstawia wartości p dla każdego sdRNA. Na Rys. 53 umieszczono mapę cieplną z porównaniem poziomu akumulacji w polisomach wspomnianej grupy sdRNA względem frakcji wolnych RNA.



Rys. 53 Mapa cieplna sdRNA o istotnych statystycznie zmianach w warunkach głodu cukrowego oraz hiperosmotycznych w porównaniu do warunków optymalnych we frakcji polisomów. Liczby przy legendzie przedstawiają ilości odczytów na 1 mln w bibliotece.

Żaden z sdRNA nie spełnił założonego kryterium tysiąca odczytów na milion. Dlatego do szczegółowej analizy wybrano po dwa sdRNA posiadające najwięcej odczytów w danej bibliotece. W Tabeli 28 umieszczono wybrane sdRNA, poziomy ich asocjacji z frakcją polisomów oraz wartości p.

	Wartość	BC	BC+	Κ	K+	Н	H+	Wartość
	p*							p**
snR30 (572-609)	0,0001	121,9	97,1	0	0	42,7	35,9	0,0153
snR56 (52-88)	0,0054	0	0	79,4	125,6	0	0	0,0072
snR70 (147-164)	0,0002	167,2	192,9	14,6	0	108,9	46,8	0,0016
snR190 (89-128)	0,0296	0	0	26,9	29,4	0	0	0,041

Tab. 28 sdRNA wykazujące największą akumulację w bibliotekach rancRNAseq z hodowli w obydwu typach stresu w polisomach w stosunku do warunków optymalnych. Liczby przedstawiają ilości odczytów na 1 mln w bibliotece. BC– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego, BC+– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego AlkB+, K– krótkie RNA z hodowli w warunkach optymalnych, K+– krótkie RNA z hodowli w warunkach optymalnych AlkB+, H– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego, H+– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego (AlkB+ i AlkB-) z hodowlą w warunkach optymalnych (AlkB+ i AlkB-). Wartość p**– porównanie hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego (AlkB+ i AlkB-).

Najwyższy poziom akumulacji w warunkach optymalnych, zarówno w bibliotekach posiadających RNA poddane demetylacji jak i bez, obserwowano dla snR56 (52–88), z odpowiednio 79,3 oraz 125,6 odczytów na milion. snoRNA56 prowadzi 2'-O-metylacje małej podjednostki rybosomu w pozycji G1428 [166]–[168]. Obecność snR56 (52–88) w bibliotekach krótkich RNA z hodowli w warunkach optymalnych oraz jego brak w bibliotekach z hodowli w obu warunkach stresowych sugeruje, że może on służyć do sprawdzenia czy polisomy funkcjonują prawidłowo. Drugim sdRNA pod względem ilości odczytów był snR190 (89–128), z wynikiem 26,9 oraz 29,4 odpowiednio w bibliotekach AlkB- i AlkB+. Warto zwrócić uwagę, że oba te sdRNA nie zostały wykryte w bibliotekach z frakcji polisomów w żadnym ze stresów abiotycznych (Tab.28, Wyk. 21).

W obu analizowanych warunkach stresowych (stres głodu cukrowego i stres hiperomotyczny), zarówno w bibliotekach z przeprowadzoną demetylacją (AlkB+) jak i bez niej (AlkB-), najczęściej identyfikowno sdRNA snR70 (147–164) oraz snR30 (572–609). Najwyższa akumulacja obu tych sdRNA została zaobserwowana w bibliotekach z warunków głodu cukrowego, podczas gdy w warunkach hiperosmotycznych ich akumulacja była niższa (Tab. 28). Jak już wspomniałam delecja genu snR70 prowadzi do defektów wzrostu [191]. Podwyższona akumulacja sdRNA70 może być związana z adaptacją polisomów do warunków stresowych.

Analiza ilościowa wykazała, że poziom odczytów snR30 (572–609) obniżał się w bibliotekach AlkB+. Natomiast ilość odczytów snR70 (147–164) wskazywał tendencję wzrostową w bibliotekach z hodowli w warunkach głodu cukrowego AlkB+, podczas gdy w bibliotekach z hodowli w stresie hiperosmotycznym AlkB+ obserwowano jego spadek. Jak już wspominałam, proces metylacji jest zróżnicowany w różnych warunkach stresowych [185], dlatego obserwowane różnice w odpowiedzi na demetylacje krótkich RNA z hodowli w różnych typach stresów są obecne. Obserwowane różnice w odpowiedzi tego samego sdRNA na proces demetylacji wskazuje, że jest on złożony.

Warto zwrócić uwagę, że mimo niskiej ilości odczytów snR70 (147–164) oraz snR30 (572–609) wykazywały bardzo niski poziom asocjacji lub nie były wykrywane w warunkach optymalnych (Tab. 28, Wyk. 21).



Wyk. 21 Porównanie akumulacji wybranych sdRNA w polisomach w bibliotekach rancRNAseq z hodowli w warunkach optymalnych oraz obu typów stresów abiotycznych. Przedstawiono sdRNA wykazujące istotnie statystycznie zmienioną akumulację w porównaniu do frakcji RNA niezwiązanych z rybosomami.

Na Rysunku 54 umieszczono strukturę drugorzędową snoRNA z zaznaczonymi pozycjami sdRNA wykazującymi najwyższą asocjację do polisomów w porównaniu obu stresów abiotycznych do warunków optymalnych. We wszystkich bibliotekach zawierających RNA z hodowli w warunkach optymalnych (AlkB- oraz AlkB+), najwyższą ilość odczytów obserwowano u snR56 (52–88), pochodzącego z końca 3' snoRNA. Natomiast w bibliotekach zawierających RNA z warunków stresowych (AlkB- oraz AlkB+) najwięcej odczytów posiadał snR70 (147–164), również pochodzący z końca 3' snoRNA.



Rys. 54 Struktury drugorzędowe snoRNA z zaznaczonymi pozycjami sdRNA wykazującymi najwyższą akumulację w polisomach w bibliotekach rancRNAseq z obu stresów abiotycznych względem warunków optymalnych. Czerwonymi strzałkami oznaczono miejsca cięcia snoRNA. Struktura drugorzędowa snoRNA została wygenerowana z wykorzystaniem RNAfold WebSerwer.

Analiza 5 sdRNA o istotnych statystycznie zmianach akumulacji w obu stresach abiotycznych względem warunków optymalnych we frakcji polisomów nie wykazała żadnych krótkich RNA posiadających powyżej tysiąca odczytów na milion. Zaobserwowałam interesujące zmiany asocjacji sdRNA we frakcji polisomów. W warunkach optymalnych dominowały snR56 (52–88) oraz snR190 (89–128). Natomiast w warunkach stresowych obserwowałam, że dominującymi sdRNA były snR70 (147–164) oraz snR30 (572–609). Brak aoscjacji tych dwóch sdRNA z polisomami w warunkach optymalnych może wskazywać, że ich główna funkcja związana jest z odpowiedzią na stres abiotyczny. Możliwe, że w warunkach stresowych te sdRNA są rekrutowane do rybosomów, gdzie mogą wpływać na wydajność translacji specyficznych mRNA.

4.4.4.5.2. Podsumowanie wyników opisujących sdRNA oddziałujące z polisomami

We frakcji polisomów zaobserwowałam tylko jeden sdRNA posiadający powyżej tysiąca odczytów na milion - snR128 (107–127). Należy zwrócić uwagę, iż podwyższona ilość odczytów została zaobserwowana jedynie w warunkach stresu głodu cukrowego. Ilość odczytów w bibliotekach AlkB- była mniejsza niż AlkB+ (Tab.29).

	Polisomy				
rancRNA	BC +	K+	H+		
snR128 (107–127)	\uparrow	\rightarrow	\rightarrow		

Tab.29 sdRNA posiadające najwyższą ilość odczytów na milion w bibliotekach rancRNAseq AlkB+ we frakcji polisomów. BC+ – krótkie RNA z hodowli w warunkach głodu cukrowego AlkB+ K+ – krótkie RNA z hodowli w warunkach optymalnych AlkB+, H+– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego AlkB+. \downarrow oznacza odczyty poniżej tysiąca na milion, \uparrow oznacza odczyty powyżej tysiąca na milion, numery obok strzałek odnoszą się do pełnych tysięcy zaobserwowanych odczytów(np. \uparrow oznacza ponad tysiąc odczytów, a 50 \uparrow oznacza ponad pięćdziesiąt tysięcy odczytów na milion). – oznaczono brak odczytów.

4.4.4.5.3. tRF o istotnych statystycznie zmianach w oddziaływaniu z polisomami pod wpływem stresu

4.4.4.5.3.1. Wybrane tRF wykazujące istotne zmiany asocjacji w polisomach w odpowiedzi na stres głodu cukrowego

Zidentyfikowano 118 tRF pochodzących z 29 różnych izoakceptorów tRNA w polisomach w stresie głodu cukrowego względem warunków optymalnych. Tabela 53 (Materiał dodatkowy) przedstawia wartości p dla każdego tRF. Na Rys. 55 umieszczono mapę cieplną z porównaniem poziomu akumulacji w polisomach wspomnianej grupy tRF względem frakcji wolnych RNA.



Rys. 55 Mapa cieplna tRF o istotnych statystycznie zmianach w warunkach stresu głodu cukrowego w porównaniu do warunków optymalnych we frakcji polisomów. Liczby przy legendzie przedstawiają ilości odczytów na 1 mln w bibliotece.

Do dalszej analizy zdecydowano się wybrać tRF posiadające ponad tysiąc odczytów na milion. W Tabeli 30 umieszczono wybrane tRF, poziomy ich asocjacji z polisomami oraz wartości p.

	K	K+	BC	BC+	Wartość p
tD(GUC)J3 (39-74)	0	20092,2	0	0	0,0150
tE(CUC)I (1-36)	15510,9	13467,3	0	0	0,0026
tI(AAU)I1 (49-77)	122,2	448,2	8317,6	4801,3	0,0129
tK(CUU)M (39-68)	0	1068	381,6	477,4	0,0138
tK(CUU)M (43-71)	4968,2	3004,8	412,8	1314,1	0,0156
tQ(UUG)D3 (1-31)	2853	1981,4	505,4	880,3	0,0286
tR(CCU)J (38–71)	2708,9	3266,8	1427,4	785,8	0,0334
tT(CGU)K (1-33)	534,1	1292,5	0	0	0,0364

Tab. 30 tRF wykazujące największą akumulację w bibliotekach rancRNAseq z hodowli w stresie głodu cukrowego w polisomach w stosunku do warunków optymalnych. Liczby przedstawiają ilości odczytów na 1 mln w bibliotece. K – krótkie RNA z hodowli w warunkach optymalnych, K+ – krótkie RNA z hodowli w warunkach optymalnych AlkB+, BC – krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego, BC+ – krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego AlkB+.

W warunkach optymalnych we frakcji polisomów najbardziej akumulowanym tRF był tE(CUC)I (1–36), z asocjacją 15 510,9 odczytów na milion. Powyżej tysiąca odczytów na milion posiadały również: tK(CUU)M (43–71), tQ(UUG)D3 (1–31) oraz tR(CCU)J (38–71) (Tab. 30, Wyk. 17). Wszystkie tRF z tej grupy były silniej akumulowane w polisomach niż we frakcji wolnych RNA. Nie znalazłam danych literaturowych związanych z tE(CUC)I (1–36), co może wskazywać na potencjalnie nieznaną funkcję związaną z prawidłowym funkcjonowaniem polisomów. W analizowanych wcześniej frakcjach rybosomowych, obserwowałam jedynie 3'tRF pochodzące z tRNA^{Glu}CUC.

Natomiast w bibliotekach AlkB+ z warunków optymalnych najwyżej akumulowany był tD(GUC)J3 (39–74) z 20 092,2 odczytów na milion. Należy zwrócić uwagę, że wspomniany tRF nie został wykryty w bibliotekach AlkB-. Pozostałe cząsteczki posiadające więcej niż tysiąc odczytów na milion to: tE(CUC)I (1–36), tR(CCU)J (38–71), tK(CUU)M (43–71), tQ(UUG)D3 (1–31), tT(CGU)K (1–33) oraz tK(CUU)M (39–68) (Tab. 30). Po demetylacji zaobserwowałam spadek ilości odczytów dla: tE(CUC)I (1–36), tK(CUU)M (43–71) oraz tQ(UUG)D3 (1–31) (Wyk. 17). Interesujące, że w przypadku tE(CUC)I (1–36) obserwujemy spadek ilości odczytów po demetylacji. Natomiast w przypadku tE(CUC)D (40–74) oraz tE(CUC)D (47–74), silnie akumulowanych we frakcji podjednostek z hodowli w stresie głodu cukrowego AlkB+ obserwowaliśmy znaczny wzrost ilości odczytów (z 418,2/448,3 na 2370,2/1108,6 odczytów na milion). Sugeruje to istotną rolę modyfikacji w rejonie 40-74 nt w regulacji stabilności tRNA^{Glu}CUC.

W warunkach głodu cukrowego najwyżej akumulowany był tI(AAU)I1 (49–77) z 8 317,5 odczytów na milion. Brak danych literaturowych o tI(AAU)I1 (49–77), co może wskazywać na potencjalnie nieznaną funkcję związaną z adaptacją polisomów do warunków stresowych. Na Rys. 5 widoczne profile polisomowe wskazywały na niewielką aktywność w polisomach w warunkach stresu głodu cukrowego. Należy zwrócić uwagę, iż tI(AAU)I1 (49–77) posiada 7 869,4 odczytów więcej w warunkach stresu niż bibliotekach z hodowli w warunkach optymalnych, co może wskazywać na jego potencjalną rolę w adaptacji rybosomów do stresu głodu cukrowego. Tylko jeszcze jeden tRF, tR(CCU)J (38–71) posiada 1 427,4 odczyty na milion, pozostałe cząsteczki nie przekroczyły tysiąca na milion. Ten sam tRF został wykryty we frakcji podjednostek rybosomowych, gdzie akumulacja powyżej tysiąca na milion wystąpiła w warunkach optymalnych i stresie hiperosmotycznym, a w warunkach głodu cukrowego nie został on wykryty. Może to wskazywać na istotną rolę tego tRF w polisomach w warunkach stresu głodu cukrowego.

W bibliotekach zawierających krótkie RNA asocjujące z polisomami, z hodowli w stresie głodu cukrowego AlkB+, również tylko dwie cząsteczki posiadały więcej niż tysiąc odczytów na milion: tI(AAU)II (49–77) oraz tK(CUU)M (43–71) z odpowiednio 4 801,3 oraz 1 314 odczytów na milion. Obie były silniej akumulowane w polisomach niż w wolnych RNA (Wyk. 17). W przypadku wspomnianych tRF najsilniej akumulowanych w bibliotekach z hodowli w stresie głodu cukrowego AlkB-obserwujemy spadek ilości odczytów w bibliotekach zawierających RNA poddane demetylacji, jednak w dla: tK(CUU)M (39–68), tK(CUU)M (43–71) oraz tQ(UUG)D3 (1–31) obserwujemy wzrost ilości odczytów w bibliotekach AlkB+ (Tab. 30, Wyk. 17).



Wyk. 17 Porównanie akumulacji wybranych tRF w polisomach z bibliotek rancRNAseq z hodowli w warunkach optymalnych i stresie głodu cukrowego. Przedstawiono sdRNA wykazujące istotnie statystycznie zmienioną akumulację w porównaniu do frakcji RNA niezwiązanych z rybosomami.

Na Rysunku 56 umieszczono struktury drugorzędowe tRNA z zaznaczonymi pozycjami tRF wykazujących najwyższą asocjację z frakcją polisomów w porównaniu stresu głodu cukrowego do warunków optymalnych. W warunkach optymalnych AlkB- najczęściej obserowanym tRF był tE(CUC)I (1–36), należący do klasy 5'połówek. Natomiast w bibliotekach AlkB+ najwięcej odzytów obserwowano u tD(GUC)J3 (39–74), który należy do klasy 3' połówek. Natomiast w obu typach bibliotek z hodowli w stresie głodu cukrowego (AlkB- oraz AlkB+), najwyższą akumulację posiadał tI(AAU)I1 (49–77), należący do klasy tRF-3b.



Rys. 56 Struktury drugorzędowe tRNA z zaznaczonymi pozycjami tRF wykazującymi najwyższą akumulację w polisomach w bibliotekach rancRNAseq ze stresu głodu cukrowego względem warunków optymalnych. Czerwonymi strzałkami oznaczono miejsca cięcia tRNA. Źródło struktury tRNA: yeastgenome.org.

Analiza tRF o istotnych statystycznie zmianach w warunkach stresu głodu cukrowego względem warunków optymalnych we frakcji polisomów wykazała 8 tRF posiadających odczyty powyżej tysiąca na milion. W warunkach optymalnych najwyższą akumulację obserwowano u tE(CUC)I (1–36). Natomiast w bibliotekach AlkB+ dominował tD(GUC)J3 (39–74), którego nie zaobserwowałam w bibliotekach bez demetylacji RNA. W obu typach bibliotek z hodowli w warunkach osmotycznych najwyższe akumulacje wykazywały tI(AAU)II (49–77) oraz tK(CUU)M (43–71), jednak ich ilość odczytów w bibliotekach AlkB+ była niższa niż przed demetylacją. Co ponownie wskazuje na silną rolę metylacji w regulacji stabilności tRF. Należy zwrócić uwagę, iż tI(AAU)II (49–77) był silniej akumulowany w warunkach stresowych niż w hodowli z warunków optymalnych, co może wskazywać na jego potencjalną rolę w adaptacji rybosomów do stresu głodu cukrowego.

4.4.4.5.3.2. Wybrane tRF wykazujące istotne zmiany asocjacji z polisomami tylko w odpowiedzi na stres hiperosmotyczny

Zidentyfikowano 120 tRF pochodzących z 38 różnych izoakceptorów tRNA w polisomach w stresie hiperosmotycznym względem warunków optymalnych. Tabela 54 (Materiał dodatkowy) przedstawia wartości p dla każdego tRF. Na Rys. 57 umieszczono mapę cieplną z porównaniem poziomu akumulacji w polisomach wspomnianej grupy tRF względem frakcji wolnych RNA.



Rys. 57 Mapa cieplna tRF o istotnych statystycznie zmianach w warunkach stresu hiperosmotycznego w porównaniu do warunków optymalnych we frakcji polisomów. Liczby przy legendzie przedstawiają ilości odczytów na 1 mln w bibliotece.

Do dalszej analizy zdecydowano się wybrać tRF posiadające ponad tysiąc odczytów na milion. W Tabeli 31 umieszczono wybrane sdRNA, poziomy ich asocjacji z frakcją polisomów oraz wartości p.

	K	K+	Н	H+	Wartość p
tA(AGC)M1 (43-71)	12963,7	0	1394,4	0	0,0461
tA(UGC)G (37–71)	2364,7	1608,7	426,2	210,2	0,0183
tC(GCA)P2 (1-30)	3847,8	1780,5	0	665,5	0,0433
tD(GUC)J3 (3-33)	43713,1	27127,8	0	2437,4	0,0295
tD(GUC)J3 (41-62)	9737,4	6307,4	554,3	971,1	0,0002
tD(GUC)J3 (-4512)	1008,1	478,4	166,5	74,2	0,0297
tE(CUC)I (39-71)	1794,9	1548,6	664,1	421,2	0,0332
tE(UUC)M (42-71)	1974,0	647,0	292,8	185,4	0,0428
tG(CCC)D (3-30)	2485,2	1736,2	855,0	310,6	0,0457
tG(GCC)D2 (38-68)	4774,6	3887,8	0	1245,6	0,0003
tG(GCC)E (30-70)	1842,7	1455,7	313,7	580,4	0,0187
tG(GCC)E (35-68)	3868,8	2490,1	0	858,9	0,0002
tG(GCC)E (38–70)	4615,2	3660,3	0	1107,2	0,0003
tG(GCC)E (41-70)	3855,4	3349,9	481,1	780,8	0,0077
tG(UCC)G (1-31)	1333,5	0	160,4	99,7	0,0163
tG(UCC)G (3-28)	3378,1	2217,1	420,9	187,2	0,0059
tG(UCC)G (41–71)	1951,1	1663,8	257,1	315,0	0,0023
tH(GUG)E2 (42-65)	1040,3	660,4	47,1	114,1	0,0030
tH(GUG)M (-1-36)	0	0	57406,0	45408,8	0,0106
tI(AAU)L2 (40-73)	2634,2	1587,6	322,5	218,9	0,0174
tK(CUU)M (39–76)	3820,2	6547,0	2291,2	6190,4	0,0474
tL(CAA)K (45-84)	0	0	974,4	1032,9	0,0004
tL(UAA)J (50-81)	1547,3	1577,2	202,2	296,9	0,0157
tL(UAG)L2 (42-81)	1009,6	587,0	215,3	104,9	0,0159
tQ(UUG)B (1-30)	5901,7	4205,1	0	545,2	0,0005
tS(AGA)D1 (39-81)	8191,1	2578,7	847,1	378,2	0,0185
tS(AGA)D1 (49-79)	3747,9	2877,4	699,8	888,8	0,0376
tS(AGA)L (39-81)	8191,1	2578,7	847,1	393,2	0,0080
tS(AGA)L (44-81)	3219,1	1490,9	1023,2	610,7	0,0497
tS(AGA)L (49-81)	3747,8	4429,6	699,8	1162,7	0,0399
tS(UGA)I (1-18)	1333,4	589,3	67045,0	13007,0	0,0440
tT(CGU)K (1-30)	2434,2	1649,9	650,2	445,7	0,0170
tV(AAC)O (1-32)	1084,2	1301,2	0	208,1	0,0002

Tab.31 tRF wykazujące największą akumulację w bibliotekach rancRNAseq z hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego w polisomach w stosunku do warunków optymalnych. Liczby przedstawiają ilości odczytów na 1 mln w bibliotece. K – krótkie RNA z hodowli w warunkach optymalnych, K+– krótkie RNA z hodowli w warunkach optymalnych AlkB+, H – krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego, H+– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego AlkB+.

Najwyższy poziom akumulacji w warunkach optymalnych zaobserwowano dla tD(GUC)J3 (3–33) oraz tA(AGC)M1 (43–71) z odpowiednio 43 713,1 i 12 963,7 odczytów na milion. Interesujące, jest że ten sam tRF we frakcji podjednostek rybosomowych, nie został wykryty w warunkach optymalnych. Zaobserwowana akumulacja wystąpiła w bibliotekach z hodowli w stresie hiperosmotycznym. Natomiast tutaj nie zaobserwowano żadnych odczytów w stresie hiperosmotycznym. Więcej niż tysiąc odczytów na milion wykryto u jeszcze 29 innych cząsteczek tRF (Tab.31). Mimo wysokiej akumulacji w polisomach u: tD(GUC)J3 (3–33), tQ(UUG)B (1–30), tS(AGA)D1 (49–79), tS(AGA)L (49–81) oraz tV(AAC)O (1–32) porównanie z frakcją RNA niezwiązanych z rybosomami wykazuje, że w tej frakcji występują jeszcze intensywniej (Rys. 57, Wyk. 18).

W bibliotekach zawierających RNA poddane demetylacji z hodowli w warunkach optymalnych, najsilniej akumulowane były tD(GUC)J3 (3–33) oraz tK(CUU)M (39–76) z odpowiednio 27 127,7 i 6 547 odczytów na milion. Jeszcze 22 inne tRF posiadały więcej niż tysiąc odczytów na milion (Tab. 31). Chciałabym zwrócić uwagę na tD(GUC)J3 (3–33), który wykazuje spadek ilości odczytów w warunkach optymalnych AlkB+oraz wzrost ilości odczytów w bibliotekach ze stresu hiperomotycznego. Jednak

w bibliotekach z frakcji podjednostek demetylacja nie wpłynęła na wykrycie tej cząsteczki w bibliotekach AlkB+. Tylko 4 tRF posiadały więcej odczytów niż przed demetylacją: tK(CUU)M (39–76), tS(AGA)L (49–81), tL(UAA)J (50–81), tV(AAC)O (1–32).Taka zmnienność asocjacji może oznaczać potencjalną rolę metylacji w regulacji stabilności tRF. Łącznie 24 tRF posiadały w tej bibliotece akumulację na poziomie ponad tysiąc na milion.

W warunkach osmotycznych najwyższą akumulację posiadały tS(UGA)I (1–18) oraz tH(GUG)M (-1–36), z odpowiednio 67 044,9 i 57 406 odczytami na milion. Badanie z 1994 roku wskazywało, że tRNA^{Ser}UGA jest najmniej obfitym izoakceptorem seryny u drożdży [187]. W naszych badaniach widzimy, że tRF pochodzący z tego izoakcetora w warunkach hiperosmotycznych jest silnie akumulowany we frakcji polisomów. Jeszcze trzy tRF posiadały więcej niż tysiąc odczytów na milion: tK(CUU)M (39–76), tA(AGC)M1 (43–71) oraz tS(AGA)L (44–81) (Tab. 31). Jednak tylko dwa najsilniej akumulowane tRF posiadają więcej odczytów w stresie hiperosmotycznym niż w warunkach optymalnych.

W bibliotekach z frakcji polisomów zawierających RNA z hodowli w stresie hiperosmotycznym (AlkB+), więcej niż tysiąc odczytów obserwowano dla 8 tRF. Mimo, że tH(GUG)M (-1–36) i tS(UGA)I (1–18) były najsilniej asocjującymi tRF w tych bibliotekach (45 408,8 i 13 007 odczytów na milion) to ich asocjacja z polisomami w bibliotekach AlkB- była jeszcze większa. Pozostałe tRF z tej najsilniej asocjującej grupy wykazały wzrost akumulacji po demetylacji RNA: tK(CUU)M (39–76), tD(GUC)J3 (3–33), tG(GCC)D2 (38–68), tS(AGA)L (49–81), tG(GCC)E (38–70) oraz tL(CAA)K (45–84) (Tab. 31). Obserwowany spadek ilości odczytów tRF może ponownie wskazuje na silną rolę demetylacji w regulacji stabilności tRNA.



Wyk.18 Porównanie akumulacji wybranych tRF w polisomach z bibliotek rancRNAseq z hodowli w warunkach optymalnych i stresie hiperosmotycznym. Przedstawiono tRF wykazujące istotnie statystycznie zmienioną akumulację w porównaniu do frakcji RNA niezwiązanych z rybosomami.

Na Rysunku 58 umieszczono umieszczono struktury drugorzędowe tRNA z zaznaczonymi pozycjami tRF wykazujących najwyższą asocjację z polisomami w porównaniu stresu hiperosmotycznego do warunków optymalnych. Największą ilość odczytów w warunkach optymalnych AlkB- obserwowano dla tD(GUC)J3 (3–33), należący do klasy 5' połówek. Natomiast w bibliotekach AlkB+ najwyższą ilość

odzczytów wykryto dla tS(UGA)I (1–18), tRF-5a. Z kolei, w bibliotekach zawierających hodowli w stresie osmotycznym AlkB- najczęściej obserwowano tS(UGA)I (1–18), a w bibliotekach AlkB+ tH(GUG)M (-1–36), klasa 5' połówek.



Rys. 58 Struktury drugorzędowe tRNA z zaznaczonymi pozycjami tRF wykazującymi najwyższą akumulację w polisomach w bibliotekach rancRNAseq z hodowli w stresie hiperosmotycznym względem warunków optymalnych. Czerwonymi strzałkami oznaczono miejsca cięcia tRNA. Źródło struktury tRNA: yeastgenome.org.

Analiza tRF o istotnych statystycznie zmianach w warunkach stresu hiperosmotycznego względem warunków optymalnych we frakcji polisomów wykazała 33 tRF posiadające odczyty powyżej tysiąca na milion. W warunkach optymalnych najwyższą akumulację obserwowano dla tD(GUC)J3 (3–33). Biblioteki AlkB+ wskazywały na spadek ilości odczytów tego tRF. To wskazuje na silną rolę metylacji w regulacji jego stabilności. W obu typach bibliotek z hodowli w warunkach hiperosmotycznych najwyższe akumulacje wykazywały tS(UGA)I (1–18) oraz tH(GUG)M (-1–36), jednak ich ilość odczytów w bibliotekach AlkB+ była niższa niż przed demetylacją. Należy zwrócić uwagę, iż tS(UGA)I (1–18) oraz tH(GUG)M (-1–36) były silniej akumulowane w warunkach stresowych niż w hodowli z warunków optymalnych, co sugeruje ich potencjalną rolę w adaptacji rybosomów do stresu hiperosmotycznego.

4.4.4.5.3.3. Wybrane tRF wykazujące istotne zmiany asocjacji z polisomami w odpowiedzi na oba typy stresów

Zidentyfikowano 111 tRF pochodzące z 35 różnych izoakceptorów tRNA w polisomach w obu typach stresów względem warunków optymalnych. Tabela 55 (Materiał dodatkowy) przedstawia wartości p dla każdego tRF. Na Rys. 59 umieszczono mapę cieplną z porównaniem poziomu akumulacji w polisomach wspomnianej grupy tRF względem frakcji wolnych RNA.



Rys. 59 Mapa cieplna tRF o istotnych statystycznie zmianach w warunkach głodu cukrowego oraz hiperosmotycznych w porównaniu do warunków optymalnych we frakcji polisomów. Liczby przy legendzie przedstawiają ilości odczytów na 1 mln w bibliotece.

Do dalszej analizy zdecydowano się wybrać tRF posiadające ponad tysiąc odczytów na milion. W Tabeli 32 umieszczono wybrane tRF, poziomy ich asocjacji z frakcją polisomów oraz wartości p.

	Wartość	BC	BC+	K	K+	Н	H+	Wartość
	p*							p**
tA(AGC)L (39-71)	0,0063	8170,2	6045,9	24904,5	12916,8	3381,5	2855,2	0,0011
tA(UGC)G (34-76)	0,0167	910,6	826,6	275,9	701,2	480,2	1614,1	0,0098
tA(UGC)G (47-76)	0,0031	0	0	0	3003,5	0	6829,2	0,0045
tD(GUC)G1 (39-75)	0,0009	2929,3	3600,8	23051,2	24377,8	6169,5	18324	0,0124
tD(GUC)J3 (39-70)	0,0005	17078,2	16840,7	77938,3	45829,9	8315,1	8576,1	0,0002
tD(GUC)J3 (43-71)	0,0007	16839,2	17175,5	75584,2	45394	10411,1	7962,2	0,0004
tE(UUC)B (52-75)	0,0289	2005,5	2280,9	348,8	711,9	2062,9	1615,6	0,0149
tE(UUC)I (44-71)	0,0191	3607,6	4005,4	21993,3	10037,8	5435,7	1641,5	0,0331
tE(UUC)L (52-75)	0,0290	2012,1	2283,7	350,9	714	2071,6	1621,2	0,0150
tG(GCC)D2 (35-70)	0,0090	2203,8	2055,7	5486,9	7150,5	1755,2	3712,5	0,0118
tG(GCC)G1 (35-70)	0,0365	1796,7	1714,9	3868,4	2720,8	805,3	1734,3	0,0099
tG(GCC)G1 (38-70)	0,0003	0	1141,6	4616,2	3661,1	726,8	1435,7	0,0294
tG(GCC)G1 (41-70)	0,0123	1279	1767,4	3855,4	3350,9	482,8	732,6	0,0012
tG(UCC)O (52-74)	0,0326	0	0	165,6	93,4	0	1190,6	0,0430
tK(CUU)M (39-71)	0,0237	892,7	1262,3	5999,9	2303,7	746	456	0,0140
tL(CAA)N (42-81)	0,0417	1870,4	1825,6	9057,2	3451,2	0	1171,7	0,0002
tL(UAA)J (56–83)	0,0056	906,9	1197,2	5676,2	5129,5	615,3	554,8	0,0045
tR(CCG)L (42–71)	0,0269	0	370,6	1746,8	541,4	418,3	189,5	0,0068
tR(CCU)J (46-75)	0,0002	4997,1	3255,7	0	881,2	666,7	1295,2	0,0006
tS(AGA)D1 (44-79)	0,0223	359,9	1204,5	3219,1	1490,9	221,4	102,8	0,0013
tS(AGA)D1 (53-85)	0,0206	0	0	9700,2	0	0	46294,2	0,0243
tS(AGA)L (1-24)	0,0133	286,2	600,2	1524,5	1058,7	197	97,6	0,0028
tS(AGA)L (54-81)	0,0279	9398,2	7011,8	32859,9	15340	4083,1	2684,2	0,0110
tY(GUA)F2 (47-73)	0,0012	0	536,3	1073	924,6	0	205,1	0,0006

Tab. 32 tRF wykazujące największą akumulację w bibliotekach rancRNAseq z hodowli w obydwu typach stresów abiotycznych w polisomach w stosunku do warunków optymalnych. Liczby przedstawiają ilości odczytów na 1 mln w bibliotece. BC – krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego, BC+ – krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego AlkB+, K – krótkie RNA z hodowli w warunkach optymalnych, K+ – krótkie RNA z hodowli w warunkach optymalnych AlkB+, H – krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego, H+– krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego AlkB+. Wartość p*– porównanie hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego (AlkB+ i AlkB-) z hodowlą w warunkach optymalnych (AlkB+ i AlkB-).

Najwyższy poziom akumulacji w warunkach optymalnych osiągnągneły tD(GUC)J3 (39–70) oraz tD(GUC)J3 (43–71) z odpowiednio 77 938,2 i 75 584,2 odczytami na milion. Łącznie 18 tRF posiada akumulację wyższą niż tysiąc na milion. tD(GUC)J3 (39–70) oraz tD(GUC)J3 (43–71) posiadają bardzo wysoką ilość odczytów, co sugeruje ich istotność dla prawidłowego funkcjonowania polisomów w warunkach optymalnych. Mimo, że ich akumulacja w pozostałych warunkach hodowli również przekracza tysiąc odczytów na milion (>17 tys. i >8 tys. odczytów na milion), to jest znacznie niższa niż w przypadku warunków optymalnych.

Po demetylacji akumulację wyższą niż tysiąc odczytów na milion posiadało 16 tRF (Tab.32). Najwięcej odczytów posiadały te same tRF, co w bibliotekach AlkB-, jednak ich ilość odczytów zmniejszyła się (odpowiednio 45 829,9 oraz 45 394 odczyty na milion, Wyk.19). Należy zwrócić uwagę, że w bibliotekach AlkB+ wykryliśmy tA(UGC)G (47–76), który we frakcji polisomów był obecny tylko w bibliotekach AlkB+. Dodatkowo należy wspomnieć, że tylko 7 tRF posiada wyższą akumulację w bibliotekach AlkB+: tD(GUC)G1 (39–75), tG(GCC)D2 (35–70), tA(UGC)G (47–76), tR(CCU)J (46–75), tE(UUC)L (52–75), tE(UUC)B (52–75), tA(UGC)G (34–76). Wspomniane wyniki kolejny raz sugerują potencjalną rolę białek AlkB nie tylko w usuwaniu demetylacji i zwiększaniu stabilności tRNA, ale wskazują na istotność metylacji w regulacji z stabilności tRNA.

W warunkach głodu cukrowego również tD(GUC)J3 (39–70) oraz tD(GUC)J3 (43–71) wykazywały najwyższą akumulację, ale na niższym poziomie niż w bibliotekach z hodowli w warunkach optymalnych – 17 079,2 i 16 839,2 odczytów na milion (spadek odpowienio o 60 860,1 i 58 745 odczytów na milion w porównaniu z warunkami optymalnymi). Wysoką akumulację wykryto tu u 13 cząsteczek tRF (Tab. 32). Z tej grupy tylko u tR(CCU)J (46–75), tE(UUC)L (52–75) oraz tE(UUC)B (52–75) akumulacja była wyższa niż w warunkach optymalnych. W dostępnej literaturze, nie odnalazłam danych dotyczących tych tRF i ich potencjalnej funkcji w polisomach. To może wskazywać na potencjalnie nieznaną wcześniej rolę w adaptcji do warunków stresu głodu cukrowego, gdzie – jak obserwowałam w niniejszej rozprawie doktorskiejaktywność rybosomowa jest niewielka (Rys.5).

Po demetylacji w tych warunkach największą akumulację z frakcją polisomów osiągnąły ponownie tD(GUC)J3 (43–71) i tD(GUC)J3 (39–70) z odpowiednio 17 175,5 oraz 16 840,7 odczytów na milion. Aż 17 tRF posiada wysoki poziom akumulacji, ale tylko 7 z nich posiada wyższą akumulację po demetylacji: tD(GUC)J3 (39–70), tS(AGA)L (54–81), tA(AGC)L (39–71), tR(CCU)J (46–75), tG(GCC)D2 (35–70), tL(CAA)N (42–81) oraz tG(GCC)G1 (35–70). Kolejny raz,widzimy tu jak silną rolę ma metylacja na regulację stabilności tRNA.

W stresie hiperosmotycznym najwyższą akumulację wykryto również u tD(GUC)J3 (43–71) oraz tD(GUC)J3 (39–70) z odpowiednio 10 411,1 oraz 8 315,1 odczytów na milion. Poza nimi, jeszcze 8 cząsteczek posiada wysoką akumulację w polisomach (Tab.32). Tylko tE(UUC)L (52–75) oraz tE(UUC)B (52–75) z tej grupy posiadają wyższą akumulację w stresie niż w warunkach optymalnych, 2 071,6 oraz 2 062,9 odczytów na milion. Te same tRF są również silnie akumulowane w bibliotekach ze stresu głodu cukrowego, ich poziomy akumulacji są dość zbliżone w obu warunkach stresowych (Wyk.19).

Natomiast po demetylacji w tych warunkach dominowały również tD(GUC)J3 (43–71) i tD(GUC)J3 (39–70) z 17 007,3 oraz 16 959,4 odczytami na milion. Z grupy najsilniej akumulowanych cząsteczek: tA(UGC)G (47–76), tG(UCC)O (52–74), tL(CAA)N (42–81) oraz tS(AGA)D1 (53–85) nie zostały wykryte w bibliotekach AlkB-. Tylko dwa tRF posiadają niższą akumulację w bibliotekach AlkB+: tD(GUC)G1 (39–75), tE(UUC)I (44–71).



Wyk. 19 Porównanie akumulacji wybranych tRF w polisomach z bibliotek rancRNAseq z hodowli w warunkach optymalnych oraz obu typach stresów abiotycznych. Przedstawiono tRF wykazujące istotnie statystycznie zmienioną akumulację w porównaniu do frakcji RNA niezwiązanych z rybosomami.

Na Rysunku 60 umieszczono umieszczono struktury drugorzędowe tRNA z zaznaczonymi pozycjami tRF wykazujących najwyższą asocjację do frakcji polisomów w porównaniu obu stresów abiotycznych do warunków optymalnych. W obu typach bibliotek z warunków optymalnych (AlkB- oraz AlkB+) największą ilość odczytów posiadał tD(GUC)J3 (39–70), należący do klasy 3'połówek. W stresie głodu cukrowego AlkB- najwyższą asocjację wykryto u tego samego tRF. Natomiast w bibliotekach AlkB+ z hodowli w stresie hiperosmotycznym oraz w stresie głodu cukrowego obserwowano najwięcej odczytów tD(GUC)J3 (43–71).



Rys. 60 Struktury drugorzędowe tRNA z zaznaczonymi pozycjami tRF wykazującymi najwyższą akumulację w polisomach w bibliotekach rancRNAseq z hodowli w obu typach stresów abiotycznych względem warunków optymalnych. Czerwonymi strzałkami oznaczono miejsca cięcia tRNA. Źródło struktury tRNA: yeastgenome.org.

Analiza tRF o istotnych statystycznie zmianach w obydwu typach stresów abiotycznych względem warunków optymalnych, we frakcji polisomów wykazała 24 tRF posiadające odczyty powyżej tysiąca na milion. Z tej grupy, w każdej analizowanej bibliotece najwyższą akumulację obserwowano przemiennie u tD(GUC)J3 (39–70) oraz tD(GUC)J3 (43–71). Należy zwrócić uwagę, iż ich akumulacja była najwyższa w

warunkach optymalnych i malała w obydwu analizowanych stresach abiotycznych. Otrzymane wyniki, pokazują, że warunki stresowe wpływają na zmianę ogólnej puli tRF w komórce. Odkryłam również trzy tRF silniej akumulowane w warunkach stresowych niż w optymalnych: tR(CCU)J (46–75), tE(UUC)L (52–75) oraz tE(UUC)B (52–75). Ich poziomy akumulacji były zbliżone w obu warunkach stresowych, co sugeruje ich udział w adaptacji rybosomów do badanych stresów abiotycznych.

4.4.4.5.4. Podsumowanie wyników opisujących tRF oddziałujące z polisomami

Łącznie w trzech powyższych porównaniach 63 tRF posiadały powyżej tysiąca odczytów, we frakcji polisomów (Tab. 33). Aż 18 tRF z tej grupy posiadało powyżej tysiąca tylko w bibliotekach z warunków optymalnych: tK(CUU)M (43-71), tQ(UUG)D3 (1-31), tA(UGC)G (37-71), tC(GCA)P2 (1-30), tD(GUC)J3 (-45--12), tE(CUC)I (39-71), tG(GCC)D2 (38-68), tG(UCC)G (1-31), tI(AAU)L2 (40-73), tL(UAA)J (50-81), tV(AAC)O (1-32), tG(GCC)G1 (38-70), tK(CUU)M (39-71), tL(UAA)J (56-83), tR(CCG)L (42-71), tS(AGA)D1 (44-79), tS(AGA)D1 (53-85), tS(AGA)L (1-24). Tylko dwie cząsteczki tRF posiadały podwyższoną ilość odczytów tvlko w bibliotekach ze stresu głodu cukrowego: tI(AAU)I1 (49-77), tR(CCU)J (46-75). W bibliotekach ze stresu hiperosmotycznego, tylko jedna cząsteczka posiadała powyżej tysiąca odczytów: tH(GUG)M (-1-36). Jednak należy tutaj zwrócić uwagę również na tS(UGA)I (1-18), który w warunkach optymalnych oraz stresie głodu cukrowego posiadał powyżej jednego tysiąca odczytów, ale w bibliotekach ze stresu hiperosmotycznego zaobserwowałam powyżej 67 tysięcy odczytów na milion. Podwyższoną ilość odczytów tylko w bibliotekach ze stresów abiotycznych posiadały dwa tRF: tE(UUC)B (52–75), tE(UUC)L (52–75).

	Polisomy				
rancRNA	BC	Κ	Η		
tE(CUC)I (1-36)	_	15↑	29↑		
tI(AAU)I1 (49–77)	81	\rightarrow	\leftarrow		
tK(CUU)M (43–71)	\rightarrow	41	_		
tQ(UUG)D3 (1-31)	\downarrow	21	\downarrow		
tR(CCU)J (38–71)	\uparrow	21	21		
tA(AGC)M1 (43-71)	31	12↑	\uparrow		
tA(UGC)G (37–71)	\rightarrow	21	\downarrow		
tC(GCA)P2 (1-30)	_	3↑	_		
tD(GUC)J3 (3-33)	18↑	43↑	-		
tD(GUC)J3 (41-62)	41	9↑	\downarrow		
tD(GUC)J3 (-4512)	\rightarrow	\uparrow	\downarrow		
tE(CUC)I (39-71)	\downarrow	\uparrow	\downarrow		
tE(UUC)M (42-71)	\uparrow	\uparrow	\rightarrow		
tG(CCC)D (3-30)	\rightarrow	21	\rightarrow		
tG(GCC)D2 (38–68)	—	41	—		
tG(GCC)E (30-70)	\uparrow	\uparrow	\rightarrow		
tG(GCC)E (35-68)	\uparrow	3↑	—		
tG(GCC)E (38–70)	—	41	—		
tG(GCC)E (41-70)	\uparrow	3↑	\downarrow		
tG(UCC)G (1-31)	_	\uparrow	\downarrow		
tG(UCC)G (3-28)	21	31	\downarrow		
tG(UCC)G (41–71)	\uparrow	\uparrow	\downarrow		

tH(GUG)F2(42-65)	1	1	
tH(GUG)M(-1-36)		_	∨ 57↑
tI(AAU)L2 (40-73)	J	2↑	J/1
tK(CUII)M(39-76)	▼	31	× 2↑
tL(UAA)I(50-81)		 	
tL(UAG)L2(42-81)	↓ ↓	 ↑	▼ ↓
tO(UUG)B(1-30)	• 2↑		• _
tS(AGA)D1 (39–81)	31	81	\downarrow
tS(AGA)D1 (49–79)		31	↓ ↓
tS(AGA)L (39–81)	3↑	8↑	↓ ↓
tS(AGA)L (44–81)	\downarrow	3↑	↑
tS(AGA)L (49–81)	\uparrow	3↑	↓
tS(UGA)I (1–18)	2↑	↑	67↑
tT(CGU)K (1–30)	2↑	2↑	\downarrow
tV(AAC)O (1-32)	\downarrow	\uparrow	_
tA(AGC)L (39–71)	8↑	24↑	3↑
tD(GUC)G1 (39-75)	2↑	23↑	61
tD(GUC)J3 (39-70)	17↑	77↑	8↑
tD(GUC)J3 (43-71)	16↑	75↑	10↑
tE(UUC)B (52–75)	2↑	\rightarrow	21
tE(UUC)I (44–71)	31	21↑	5↑
tE(UUC)L (52–75)	21	\rightarrow	21
tG(GCC)D2 (35-70)	21	5↑	\uparrow
tG(GCC)G1 (35-70)	\uparrow	31	\downarrow
tG(GCC)G1 (38-70)	—	$4\uparrow$	\downarrow
tG(GCC)G1 (41-70)	\uparrow	3↑	\downarrow
tK(CUU)M (39-71)	\downarrow	5↑	\rightarrow
tL(CAA)N (42-81)	\uparrow	9↑	-
tL(UAA)J (56-83)	\downarrow	5↑	\downarrow
tR(CCG)L (42-71)	_	\uparrow	\downarrow
tR(CCU)J (46-75)	41	_	\downarrow
tS(AGA)D1 (44-79)	\downarrow	31	\downarrow
tS(AGA)D1 (53-85)	_	9↑	-
		•	
tS(AGA)L (1-24)	\downarrow		↓
tS(AGA)L (1–24) tS(AGA)L (54–81)	↓ 9↑	 32↑	↓ 4↑

Tab. 33 tRF posiadające najwyższą ilość odczytów na milion w bibliotekach rancRNAseq AlkB- we frakcji polisomów. BC – krótkie RNA z hodowli w warunkach głodu cukrowego K – krótkie RNA z hodowli w warunkach optymalnych, H – krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego. \downarrow oznacza odczyty poniżej tysiąca na milion, \uparrow oznacza odczyty powyżej tysiąca na milion, numery obok strzałek odnoszą się do pełnych tysięcy zaobserwowanych odczytów (np. \uparrow oznacza ponad tysiąc odczytów, a 50 \uparrow oznacza ponad pięćdziesiąt tysięcy odczytów na milion). – oznaczono brak odczytów.

W Tabeli 34 umieściłam tRF posiadające powyżej tysiąca odczytów w bibliotekach zawierającycj RNA poddane demetylacji – 56 tRF. Większość cząsteczek z tej grupy posiada dużą ilość odczytów zarówno w bibliotekach AlkB- jak i AlkB+, jednak 7 z nich posiada podwyższoną ilość odczytów, tylko po demetylacji RNA: tD(GUC)J3 (39–74), tK(CUU)M (39–68), tT(CGU)K (1–33), tG(CCC)D (3–30), tL(CAA)K (45–84), tL(UAG)L2 (42–81), tA(UGC)G (47–76). Wykryłam 1 tRF nie występujący w bibliotekach AlkB- w stresie głodu cukrowego: tG(GCC)G1 (38–70), 3 tRF występujące tylko w bibliotekach z warunków optymalnych AlkB+: tD(GUC)J3 (39–74) tK(CUU)M (39–68) oraz tA(UGC)G (47–76). Ponadto, w bibliotekach ze stresu hiperosmotycznego AlkB+ zidentyfikowałam 5 unikatowych tRF: tD(GUC)J3 (3–33),

tG(GCC)D2 (38–68), tG(GCC)E (38-70), tL(CAA)N (42–81), tG(GCC)G1 (35–70). Trzy tRF: tA(AGC)M1 (43–71), tG(UCC)G (1–31), tS(AGA)D1 (53–85), były specyficzne dla bibliotek niepoddanych demetylacji.

	Polisomy		
rancRNA	BC+	K+	H+
tD(GUC)J3 (39-74)	_	20 ↑	3 1
tE(CUC)I (1-36)	_	13↑	19↑
tI(AAU)I1 (49–77)	41	\downarrow	21
tK(CUU)M (39-68)	\rightarrow	↑	\rightarrow
tK(CUU)M (43-71)	↑	3↑	\rightarrow
tQ(UUG)D3 (1-31)	\rightarrow	\uparrow	\rightarrow
tR(CCU)J (38–71)	\rightarrow	3↑	31
tT(CGU)K (1-33)	_	\uparrow	\rightarrow
tA(UGC)G (37–71)	\rightarrow	\uparrow	\downarrow
tC(GCA)P2 (1-30)	\uparrow	1	\rightarrow
tD(GUC)J3 (3-33)	17↑	27↑	2↑
tD(GUC)J3 (41-62)	5↑	61	\downarrow
tE(CUC)I (39–71)	\downarrow	1	\downarrow
tG(CCC)D (3–30)	↑	1	\downarrow
tG(GCC)D2 (38–68)	_	31	\uparrow
tG(GCC)E (30–70)	↑	1	\downarrow
tG(GCC)E (35–68)	↑	2↑	\downarrow
tG(GCC)E (38–70)	_	31	↑
tG(GCC)E (41–70)	\uparrow	3↑	\downarrow
tG(UCC)G (3–28)	4↑	21	↓ ↓
tG(UCC)G (41–71)	↑	↑	\downarrow
tH(GUG)E2 (42–65)	↑	\rightarrow	\downarrow
tH(GUG)M (-1–36)	_	_	45↑
tI(AAU)L2 (40–73)	\downarrow	1	\downarrow
tK(CUU)M (39–76)	_	61	61
tL(CAA)K (45–84)	_	_	\uparrow
tL(UAA)J (50–81)	↑	1	\downarrow
tO(UUG)B (1–30)	51	4↑	\downarrow
tS(AGA)D1 (39–81)	<u>↑</u>	21	\rightarrow
tS(AGA)D1 (49–79)	3↑	21	• →
tS(AGA)L (39–81)	↑	21	↓ ↓
tS(AGA)L (44–81)	↑	 ↑	• →
tS(AGA)L (49–81)	3↑	4↑	↑
tS(UGA)I (1–18)	\rightarrow	\rightarrow	13↑
tT(CGU)K (1–30)	↑	↑	\downarrow
tV(AAC)O (1–32)	\rightarrow	1	\rightarrow
tA(AGC)L (39–71)	61	12↑	7↑
tA(UGC)G (47–76)	_	3↑	_
tD(GUC)G1 (39–75)	3↑	24↑	3↑
tD(GUC)J3 (39–70)	16↑	45↑	16↑
tD(GUC)J3 (43–71)	17↑	45↑	17↑
tE(UUC)B (52–75)	21	\downarrow	21
tE(UUC)I (44–71)	4↑	10↑	3↑
tE(UUC)L (52–75)	21	\downarrow	21
tG(GCC)D2 (35–70)	2↑	7↑	21
tG(GCC)G1 (35–70)	\uparrow	2↑	\uparrow
tG(GCC)G1 (38–70)	\uparrow	3↑	\rightarrow
tG(GCC)G1 (41-70)	\uparrow	31	\uparrow
-------------------	--------------	---------------	------------
tK(CUU)M (39–71)	\uparrow	21	\uparrow
tL(CAA)N (42-81)	\uparrow	3↑	\uparrow
tL(UAA)J (56–83)	\uparrow	5↑	-
tR(CCU)J (46–75)	3↑	\rightarrow	—
tS(AGA)D1 (44-79)	\uparrow	1	_
tS(AGA)L (1-24)	\downarrow	1	_
tS(AGA)L (54–81)	7↑	15↑	_

Tab. 34 tRF posiadające najwyższą ilość odczytów na milion w bibliotekach rancRNAseq AlkB+ we frakcji polisomów. BC+ – krótkie RNA z hodowli w warunkach głodu cukrowego AlkB+ K+ – krótkie RNA z hodowli w warunkach optymalnych AlkB+, H+ – krótkie RNA z hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego AlkB+. \downarrow oznacza odczyty poniżej tysiąca na milion, \uparrow oznacza odczyty powyżej tysiąca na milion, numery obok strzałek odnoszą się do pełnych tysięcy zaobserwowanych odczytów (np. \uparrow oznacza ponad tysiąc odczytów, a 50 \uparrow oznacza ponad pięćdziesiąt tysięcy odczytów na milion). – oznaczono brak odczytów.

5. Wnioski

5.1. Wnioski ogólne

- 1. Wytypowałam najsilniej asocjujące rancRNA (tRF oraz sdRNA) z podjednostkami rybosomowymi, monosomami oraz polisomami *S. cerevisiae*.
- 2. Porównałam wpływ metylacji na asocjację sdRNA i tRF z rybosomami S cerevisiae.
- 3. Wytypowałam unikatowe rancRNA występujące tylko w bibliotekach poddanych demetylacji RNA.
- 4. Określiłam możliwą funkcję najsilniej akumulowanych cząsteczek na podstawie frakcji, w której zostały zlokalizowane.

5.2. Wnioski szczegółowe dla rancRNA asocjujących z podjednostkami

rybosomalnymi

- 1. Wykryłam 12 sdRNA posiadających podwyższoną akumulację w podjednostkach rybosomowych z bibliotek rancRNAseq w warunkach optymalnych.
- 2. Nie zaobserwowałam sdRNA o podwyższonej akumulacji w żadnym z zastosowanych stresów abiotycznych w porównaniu do warunków optymalnych.
- 3. W bibliotekach rancRNAseq poddanych demetylacji zaobserwowałam jedynie 2 sdRNA o podwyższonej akumulacji w podjednostkach rybosomowych.
- 4. Wykryłam 2 tRF o podwyższonej akumulacji w podjednostkach rybosomowych w bibliotekach rancRNAseq z warunków optymalnych.
- 5. Zaobserwowałam 3 unikatowe tRF dla podjednostek rybosomowych w bibliotekach rancRNAseq z hodowli w warunkach optymalnych, poddanych demetylacji. Równocześnie 6 tRF wykazało podwyższoną akumulację w bibliotekach rancRNAseq z hodowli w warunkach optymalnych, poddanych demetylacji.
- 6. Wykryłam 9 tRF silnie akumulowanych w bibliotekach rancRNAseq z hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego, we frakcji podjednostek rybosomowych.
- Zidentyfikowałam 1 unikalny tRF dla bibliotek rancRNAseq z hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego poddanych demetylacji, oraz 17 tRF o podwyższonej akumulacji w podjednostkach rybosomowych bibliotek rancRNAseq z hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego poddanych demetylacji.
- 8. Wykryłam 7 tRF o podwyższonej akumulacji w podjednostkach rybosomowych bibliotek rancRNAseq z hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego.
- 9. Nie zaobserwowałam unikatowych tRF dla bibliotek rancRNAseq z hodowli w stresie hiperosmotycznym, poddanych demetylacji RNA. Natomiast wykryłam 14 tRF o podwyższonej akumulacji w bibliotekach rancRNAseq z hodowli w stresie hiperosmotycznym, poddanych demetylacji RNA.

Podiednostki				
		Stres Głodu Cukrowego	Warunki Optymalne	Stres Hiperosmotyczny
		AlkB-		
sdRNA	Δ	_	snR24 (67–89) snR24 (71–88) snR38 (68–95)	_
			snR40 (1-32) snR40 (1-37)	
			snR40(1-37) snR44(-1-40)	
			snR60 (2–44)	
			snR61 (2–44)	
			snR/2(1-29) snR128(1-25)	
			snR128(1-23) snR128(1-29)	
			snR120(1-2) snR190(-2-21)	
tRF		tD(GUC)J3 (51–74) tE(UUC)G3 (48–74) tE(UUC)I (44–74) tE(UUC)I (48–74)	tE(UUC)L (48–75) tS(AGA)D1 (49–85)	tD(GUC)J3 (3–33) tE(CUC)I (36–75) tF(GAA)G (40–76) tS(AGA)H (53–85)
		tE(UUC)P(48-74)		tD(GUC)J3 (47-74)
		tS(AGA)L (56–87)		tE(UUC)L (48–75)
		tD(GUC)J3 (47–74)		tS(AGA)D1 (49–85)
		tE(UUC)L(48-75) tS(AGA)D1(49,85)		
		(AOA)D1 (49-03)	All/B +	
sdRNA		_	$rac{AIKD +}{snR24(67-89)}$	_
burth	1		snR24 (71-88)	
tRF	Wyłącznie	tD(GUC)J3 (39–74)	tF(GAA)G (40–76)	_
	AlkB+		tF(GAA)G(47-76)	
	Wiegoi	+D(CUC)D(57,74)	tG(GCC)E(38-74)	$\pm D(CUC)D(57,74)$
	odczytów	tD(GUC)D(37-74) tD(GUC)I3(47-74)	tE(UUC)L(46-75) tE(UUC)L(55-75)	tD(GUC)D(57-74) tD(GUC)I3(51-74)
	niż w	tD(GUC)J3(51-74)	tG(UCC)G (36–74)	tE(UUC)G3 (48–74)
	bibliotece	tE(CUC)D (40-74)	tP(UGG)A (37–75)	tE(UUC)I (48–74)
	AlkB-	tE(CUC)D (47–74)	tS(AGA)D1 (49-85)	tE(UUC)L (48–75)
		tE(UUC)G3 (48-74)	tR(CCU)J (38–71)	tE(UUC)L (55-75)
		tE(UUC)I (44–74)		tE(UUC)P (48–74)
		tE(UUC)I (48–74)		tS(AGA)D1 (49–85)
		tE(UUC)I(55-74)		tE(CUC)I(36-75)
		tE(UUC)L(48-75) tE(UUC)L(55-75)		tG(CCC) = (39-73)
		tE(UUC)P(48-74)		tG(UCC)G(33-75)
		tG(GCC)E (30–70)		tQ(UUG)D3 (39–75)
		tP(AGG)N (52-74)		tR(CCU)J (38–71)
		tE(CUC)D (55-74)		
		tG(CCC)O (39–75)		
		tP(AGG)N (37–73)		

 Tab. 35 Wybrane sdRNA oraz tRF o zmiennym poziomie akumulacji we frakcji podjednostek rybosomowych.

5.3. Wnioski szczegółowe dla rancRNA asocjujących z monosomami

- 1. Wykryłam 2 sdRNA posiadające podwyższoną akumulację w monosomach z bibliotek rancRNAseq z hodowli w warunkach optymalnych.
- 2. Wykryłam 2 sdRNA posiadające podwyższoną akumulację w monosomach z bibliotek rancRNAseq z hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego.
- 3. Nie zaobserwowałam sdRNA posiadających podwyższonej akumulacji w monosomach z bibliotek rancRNAseq z hodowli w warunkach stresu hiperomotycznego.
- 4. Nie zidentyfikowałam cząsteczek sdRNA o podwyższonej akumulacji w monosomach z bibliotek rancRNAseq, poddanych demetylacji RNA.
- 5. Wykryłam 2 tRF posiadające podwyższoną akumulację w monosomach z bibliotek rancRNAseq z hodowli w warunkach optymalnych.
- 6. Zaobserowałam 4 unikatowe tRF dla monosomów z bibliotek rancRNAseq z hodowli w warunkach optymalnych, poddanych demetylacji RNA. Ponadto wykryłam 5 tRF o podwyższonej akumulacji w bibliotkach z bibliotek rancRNAseq z hodowli w warunkach optymalnych, poddanych demetylacji RNA.
- 7. Wykryłam 3 tRF o podwyższonej akumulacji w monosomach z bibliotek rancRNAseq z hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego.
- 8. Zaobserwowałam 6 unikatowych tRF dla monosomów z bibliotek rancRNAseq z hodowli w stresie głodu cukrowego, poddanych demetylacji RNA. Dodatkowo zidentyfikowałam 2 tRF o zwiększonej akumulacji w bibliotekach z bibliotek rancRNAseq z hodowli w warunkach głodu cukrowego, poddanych demetylacji RNA.
- 9. Wykryłam 5 tRF o podwyższonej akumulacji w monosomach w bibliotekach rancRNAseq z hodowli w warunkach stresu hiperomotycznego.
- 10. Zaobserwowałam 2 unikatowe tRF w monosomach z bibliotek rancRNAseq z hodowli w stresie hiperosmotycznym, poddanych demetylacji RNA. Ponadto wykryłam 3 tRF o podwyższonej akumulacji w monosomach z bibliotek rancRNAseq z hodowli w stresie hiperosmotycznym, po demetylacji RNA.

	Monosomy				
		Stres Głodu Cukrowego	Warunki Optymalne	Stres Hiperosmotyczny	
		AlkB-			
sdRNA	L	snR45 (141–171)	snR45 (141–171)	-	
		snR128 (1–25)	snR128 (1–25)		
tRF		tE(UUC)I (35–74)	tA(UGC)G (50-76)	tF(GAA)G (40-76)	
		tF(GAA)G (38–73)	tD(GUC)G1 (43-75)	tH(GUG)G1 (52–75)	
		tK(UUU)G2 (1–28)		tA(UGC)G (50-76)	
				tD(GUC)G1 (43-75)	
				tK(UUU)G2 (1-28)	
		AlkB +			
sdRNA		-	—	—	
tRF	Wyłącznie	tA(UGC)G (50-76)	tE(UUC)I (35–74)	tE(UUC)L (55-75)	
	AlkB+	tD(GUC)G1 (43-75)	tF(GAA)G (40-76)	tL(CAA)N (62–85)	
		tL(CAA)K (42-84)	tH(GUG)G1 (52–75)		
		tL(CAA)K (50-84)	tK(UUU)G2 (1–28)		
		tL(CAA)N (62-85)			
		tE(UUC)L (55–75)			
	Więcej	tE(UUC)I (35–74)	tA(UGC)G (50-76)	tL(UAA)J (61–87)	
	odczytów	tL(CAA)K (45-84)	tD(GUC)G1 (43-75)	tF(GAA)G (40-76)	
	niż w		tL(CAA)N (62–85)	tK(UUU)G2 (1-28)	
	bibliotece		tY(GUA)J2 (40–78)		
	AlkB-		tE(UUC)L (55–75)		

Tab. 36 Wybrane sdRNA oraz tH	CF o zmiennym po	ziomie akumulacji [•]	we frakcji monosomów.
		, i i i i i j	

5.4. Wnioski szczegółowe dla rancRNA asocjujących z polisomami

- 1. Nie zaobserwowałam sdRNA o akumulacji powyżej 1000 odczytów na milion w polisomach z bibliotek rancRNAseq nie poddanych demetylacji RNA.
- 2. Zaobserwowałam 1 sdRNA o zwiększonej akumulacji w polisomach z bibliotek rancRNAseq hodowli w stresie głodu cukrowego, poddanych demetylacji RNA.
- 3. Wykryłam 1 tRF o podwyższonej akumulacji w polisomach z bibliotek rancRNAseq z hodowli w warunkach optymalnych.
- 4. Zaobserwowałam 3 unikatowe tRF dla polisomów z hodowli w warunkach optymalnych, poddanych demetylacji RNA. Ponadto zidentyfikowałam 8 tRF o zwiększonej akumulacji w polisomach z bibliotek rancRNAseq z hodowli w warunkach optymalnych, podanych demetylacji RNA.
- 5. Wykryłam 5 tRF o podwyższonej akumulacji w polisomach z bibliotek rancRNAseq z hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego.
- 6. Zaobserwowałam 1 unikatowy tRF dla polisomów z bibliotek rancRNAseq z hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego, poddanych demetylacji RNA. Dodatkowo zidentyfikowałam 10 tRF o zwiększonej akumulacji w polisomach z bibliotek rancRNAseq z hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego, poddanych demetylacji RNA.
- 7. Wykryłam 4 tRF posiadające podwyższoną akumulację w polisomach z bibliotek rancRNAseq z hodowli w stresie hiperomotycznym.
- Zaobserwowałam 5 unikatowych tRF dla polisomów z bibliotek rancRNAseq z hodowli w stresie hiperosmotycznym, poddanych demetylacji RNA. Ponadto zidentyfikowałam 12 tRF o podwyższonej akumulacji w polisomach z bibliotek rancRNAseq, poddanych demetylacji RNA.

Polisomy				
		Stres Głodu Cukrowego	Warunki Optymalne	Stres Hiperosmotyczny
			AlkB-	
sdRNA	1	_	_	_
tRF		tE(UUC)B (52–75)	tS(UGA)I (1–18)	tH(GUG)M (-1-36)
		tE(UUC)L (52–75)		tS(UGA)I (1–18)
		tI(AAU)I1 (49–77)		tE(UUC)B (52–75)
		tR(CCU)J (46-75)		tE(UUC)L (52–75)
		tS(UGA)I (1–18)		
			AlkB +	
sdRNA	1	snR128 (107-127)	—	—
tRF	Wyłącznie	tG(GCC)G1 (38–70)	tA(UGC)G (47–76)	tD(GUC)J3 (3-33)
	AlkB+		tD(GUC)J3 (39–74)	tG(GCC)D2 (38–68)
			tK(CUU)M (39–68)	tG(GCC)E (38-70)
				tL(CAA)N (42-81)
				tG(GCC)G1 (35-70)
	Więcej	tD(GUC)G1 (39-75)	tD(GUC)G1 (39–75)	tA(UGC)L (39–71)
	odczytów	tD(GUC)J3 (43–71)	tG(GCC)D2 (35–70)	tD(GUC)J3 (39–70)
	niż w	tE(UUC)B (52–75)	tK(CUU)M (39–76)	tD(GUC)J3 (43–71)
	bibliotece	tE(UUC)I (44–71)	tL(CAA)K (45–84)	tE(UUC)B (52–75)
	AlkB-	tE(UUC)L (52–75)	tR(CCU)J (38–71)	tE(UUC)L (52–75)
		tG(GCC)G1 (41–70)	tS(AGA)L (49–81)	tG(GCC)D2 (35–70)
		tK(CUU)M (39–71)	tT(CGU)K(1–33)	tG(GCC)G1 (41–70)
		tK(CUU)M (43–71)	tV(AAC)O (1-32)	tK(CUU)M (39–76)
		tL(UAA)J (56–83)		tKCUU)M (39–71)
		tS(AGA)D1 (44–79)		tL(CAA)K (45–84)
				tL(UAA)J (64–87)
				tS(AGA)L (49–81)

6. Finansowanie badań w ramach rozprawy doktorskiej

- grant Narodowego Centrum Nauki UMO-2017/27/B/NZ1/01416 pt. Zmiany w składzie białek rybosomalnych i w oddziałujących z rybosomami krótkich niekodujących RNA w Saccharomyces cerevisiae w odpowiedzi na stres środowiskowy, Opus, kierownik: dr hab. Kamilla Grzywacz, prof. ICHB PAN
- fundusze statutowe Zakładu Transkryptomiki Funkcjonalnej i Pracowni Modelowych Organizmów Bezkręgowych Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

7. Aktywność naukowa i osiągnięcia doktoranta

7.1. Udział w realizacji projektów badawczych

- Wykonawca w grancie Narodowego Centrum Nauki UMO-2014/13/D/NZ1/00061 pt. W poszukiwaniu nowych mechanizmów kontroli ekspresji genów odmiennych od RNAi – krótkie RNA powstające ze snoRNA, Sonata, kierownik: dr hab. Kamilla Grzywacz, prof. ICHB PAN
- Stypendysta doktorant w grancie Narodowego Centrum Nauki UMO-2017/27/B/NZ1/01416 pt. Zmiany w składzie białek rybosomalnych i w oddziałujących z rybosomami krótkich niekodujących RNA w Saccharomyces cerevisiae w odpowiedzi na stres środowiskowy, Opus, kierownik: dr hab. Kamilla Grzywacz, prof. ICHB PAN

7.2. Spis publikacji naukowych

- Mleczko, A.M., Machtel, P., Walkowiak, M., **Wasilewska, A.**, Pietras, P.J., 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 9, 18397. IF2019= 3,998 MEiN=140
- Machtel, P., Wasilewska-Burczyk, A., Zacharjasz, J., Bąkowska-Żywicka, K. (2021). PTT-quant a new method for direct identification and absolute quantification of premature transcription termination events, following the example of bacterial riboswitches. Applied Microbiology and Biotechnology 106, 1557–1570. IF2021= 5,560 MEiN=100
- Kaszyński, J., Bąkowski, P., Kiedrowski, B.; Stołowski, Ł., Wasilewska-Burczyk, A., Grzywacz, K., Piontek, T. (2022) Intra-Articular Injections of Autologous Adipose Tissue or Platelet-Rich Plasma Comparably Improve Clinical and Functional Outcomes in Patients with Knee Osteoarthritis. Biomedicines 10, 684. IF2022= 4,650 MEiN=100
- Pietras, P.J., Wasilewska-Burczyk, A., Pepłowska, K., Marczak, Ł., Tyczewska, A., Grzywacz, K., (2024) Dynamic protein composition of Saccharomyces cerevisiae ribosomes in response to multiple stress conditions reflects alterations in translation activity. International Journal of Biological Macromolecules, 268(Pt 2):132004, IF2024= 7,7 MEiN=100

7.3. Prezentacja wyników na konferencjach naukowych

- 25th Annual Meeting of the RNA Society, Maj 26-31 2020 r.
- International Conference of the Centenary of Natural Sciences Club of Adam Mickiewicz University, Listopad 19-20, 2021 r.
- 1st Polish Yeast Conference, Rzeszów, Czerwiec 24-26, 2022 r.

7.4. Opieka nad stażystami

- Antoni Mrozek, I Liceum Ogólnokształcące z Oddziałami Dwujęzyczynymi Fundacji EKOS w Swarzędzu, Praktyka w ramach stażu "Staż dla przyszłego Noblisty" w Zakładzie Transkryptomiki Funkcjonalnej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu w 2022 r.
- Maria Szydłowska, I Liceum Ogólnokształcące z Oddziałami Dwujęzyczynymi Fundacji EKOS w Swarzędzu, Praktyka w ramach stażu "Staż dla przyszłego Noblisty" w Zakładzie Transkryptomiki Funkcjonalnej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu w 2020 r.

7.5.Udział w działalności upowszechniającej i promującej naukę

- Noc Biologów, 11 stycznia 2019 r., Poznań pokazy dla uczniów szkół podstawowych pt. "Kolorowy świat biochemii" oraz "Laboratorium Szalonego Biochemika".
- Bal Karnawałowo Mikołajkowy ICHB PAN, 5 stycznia 2019 r., Poznań pokazy eksperymentów dla dzieci pracowników Instytutu.
- Poznański Festiwal Nauki i Sztuki, 11 kwietnia 2019 r., Poznań pokazy dla uczniów szkół podstawowych pt. "Kolorowy świat biochemii" oraz "Laboratorium Szalonego Biochemika".
- Dzień Dziecka Stowarzyszenia na Rzecz Dzieci Niepełnosprawnych, 2 czerwca 2019 r., Kiszkowo pokazy dla dzieci w różnym wieku pt. "Bioeksperymenty".
- Noc Naukowców, 27 września 2019 r. pokazy dla uczniów szkół podstawowych pt. "Kolorowy świat biochemii" oraz "Laboratorium Szalonego Chemika".
- Udział w Wirusowej Grupie Wsparcia ICHB Pan 2019 r.

7.6. Nagrody i wyróżnienia

- Brązowy krzyż zasługi 29.06.2020 Za działalność na rzecz zwalczania epidemii wirusa SARS-CoV-2.
- Dyplom uznania Dyrektora ICHB PAN za działalność charytatywną dla członków Zakładu Transkryptomiki Funkcjonalnej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, grudzień 2019 r.

8. WYKAZ SKRÓTÓW

Ago2	białko Argonaut (ang. Argonaute-2)
APS	nadsiarczan amonu
DTT	ditiotretol
EDTA	kwas wersenowy
FUS	białko FUS (ang. Fused in sarcoma)
m ⁶ A	metylacja N6-adenozyny (ang. N6-methyladenosine)
MgCl ₂	chlorek magnezu
miRNA	mikroRNA (ang. <i>microRNA</i>)
NaCl	chlorek sodu
ncRNA	niekodujące RNA (ang. non-coding RNA)
ORF	otwarta ramka odczytu (ang. open reading frame)
qPCR	ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. quantitative polymerase
chain	reaction)
rancRNA	krótkie niekodujące RNA oddziałujące z rybosomami (ang. <i>ribosome-associated noncoding RNAs</i>)
RBP	białko wiążące RNA (ang. RNA-binding protein)
rpm	obroty na minutę (ang. revolutions per minute)
SDS	dodecylosiarczan sodu
siRNA	mały interferujący RNA (ang. small interfering RNA)
sdRNA	krótkie RNA pochodzące ze snoRNA (ang. snoRNA-derived RNAs)
TEMED	N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina
Tris	hydroksymetyloaminometan
40S	mała podjednostka rybosomu
60S	duża podjednostka rybosomu
80S	kompletny rybosom
SU	podjednostki rybsomalne, mała oraz duża podjednostka (ang. subunits)

9. Materiał dodatkowy

	Wartość p
snR73 (76–95)	0
snR76 (74-105)	0,0064
snR31 (186-222)	0,0119
snR44 (-1-26)	0,0129
snR190 (-2-21)	0,0133
snR44 (-1-40)	0,023
snR33 (165-183)	0,0286
snR40 (1-37)	0,0287
snR128 (105-124)	0,0314
snR190 (170-192)	0,0361
snR128 (103-120)	0,0367
snR47 (61-99)	0,0387
snR47 (74–99)	0,0447

Tab.38 sdRNA wykazujące istotność statystyczną w porównaniu wyłącznie bibliotek stresu głodu cukrowego z warunkami optymalnymi we frakcji podjednostek.

	Wartość p
snR54 (38–74)	0,0002
snR128 (50-70)	0,0005
snR128 (1-25)	0,0024
snR59 (45-78)	0,0037
snR39B (78-96)	0,0067
snR51 (88-107)	0,0093
snR24 (67-89)	0,0094
snR40 (22-49)	0,0102
snR60 (89-107)	0,0182
snR128 (29-49)	0,0195
snR59 (59-78)	0,0204
snR24 (71-88)	0,0216
snR77 (39-73)	0,0217
snR39 (70-89)	0,0236
snR17a (300-333)	0,0266
snR47 (78–99)	0,0287
snR57 (1-20)	0,0359
snR45 (141-171)	0,0421
snR190 (137-165)	0,0426
snR128 (1-29)	0,0434
snR40 (22-44)	0,0464
snR74 (48-81)	0,0474
snR190 (-1-17)	0,048
snR83 (281-306)	0,0484
snR51 (68-107)	0,0487
snR32 (15-47)	0,0497

Tab.39 sdRNA wykazujące istotność statystyczną w porównaniu wyłącznie bibliotek stresu hiperosmotycznego z warunkami optymalnymi we frakcji podjednostek.

	Wartość p*	Wartość p**
snR69 (1-21)	0,0001	0,0001
snR40 (1-19)	0,0001	0,0001
snR40 (6-37)	0,0001	0,0001
snR64 (-1-17)	0,0005	0,0006
snR40 (1-24)	0,0009	0,0009
snR41 (1-26)	0,0131	0,0066
snR67 (65-82)	0,0168	0,0089
snR55 (1-29)	0,0203	0,0319
snR52 (1-28)	0,0287	0,0211
snR38 (68–95)	0,0326	0,0145
snR61 (2-44)	0,0332	0,0066
snR60 (2-44)	0,0332	0,0114
snR72 (1-29)	0,0337	0,0317
snR73 (76-102)	0,0401	0,034
snR40 (1-32)	0,0402	0,0018
snR128 (50-74)	0,0455	0,002

Tab.40 sdRNA wykazujące istotność statystyczną w porównaniu obu bibliotek stresowych z warunkami optymalnymi we frakcji podjednostek. p* - porównanie hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego (AlkB+ i AlkB-) z hodowlą w warunkach optymalnych (AlkB+ i AlkB-). Wartość p** - porównanie hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego (AlkB+ i AlkB-) z hodowlą w warunkach optymalnych (AlkB+ i AlkB-).

	Wartość p
tV(AAC)L (54-76)	0,0002
tE(CUC)D (40-74)	0,0002
tG(GCC)E (11-35)	0,0003
tN(GUU)K (1-35)	0,0003
tR(CCU)J (1-33)	0,0005
tA(AGC)M2 (33-75)	0,0005
tE(CUC)D (33-74)	0,0006
tD(GUC)D (57-74)	0,0007
tE(UUC)I (55-74)	0,0017
tG(UCC)G (1-31)	0,0019
tL(UAG)L2 (40-77)	0,0021
tH(GUG)E2 (42-62)	0,0022
tL(CAA)N (7-25)	0,0024
tP(UGG)A (46-75)	0,0027
tS(AGA)D1 (49-85)	0,0035
tP(UGG)A (37-75)	0,0038
tD(GUC)J3 (51-74)	0,0039
tR(ACG)L (31-52)	0,0041
tI(AAU)P2 (75–93)	0,0053
tS(AGA)L (54-77)	0,0057
tE(UUC)G3 (48-74)	0,0057
tP(AGG)N (52-74)	0,0060
tG(UCC)G (31-51)	0,0063
tE(UUC)P (48-74)	0,0066
tE(UUC)I (48-74)	0,0078
tT(UGU)G2 (42-74)	0,0082
tE(UUC)L (55-75)	0,0085
tW(CCA)M (46-69)	0,0093
tA(AGC)L (47-67)	0,0098
tD(GUC)J3 (47-74)	0,0100
tH(GUG)E2 (42-65)	0,0104
tW(CCA)M (1-25)	0,0106
tE(UUC)I (39-63)	0,0113
tE(UUC)I (44-74)	0,0114
tV(CAC)H (39-72)	0,0121

Ciąg dalszy tabeli 41	
tG(UCC)G (36-74)	0,0127
tC(GCA)G (34-73)	0,0139
tQ(UUG)L (47-75)	0,0146
tR(CCG)L (42-62)	0,0148
tT(AGU)N2 (56-75)	0,0149
tA(UGC)G (39-65)	0,0179
tR(CCU)J (46-65)	0,0182
tA(AGC)L (39-67)	0,0232
tS(GCU)F (49-66)	0,0240
tC(GCA)B (58-75)	0,0244
tS(AGA)L (49-66)	0,0247
tS(AGA)L (44-77)	0,0256
tG(GCC)E (30-70)	0,0258
tA(UGC)G (45-71)	0,0260
tE(CUC)D (47-74)	0,0282
tV(UAC)B (49-76)	0,0311
tS(AGA)L (44-81)	0,0320
tQ(CUG)M (53-75)	0,0322
tE(UUC)L (48-75)	0,0329
tD(GUC)N (9-35)	0,0344
tE(CUC)I (52-75)	0,0380
tG(UCC)O (33-74)	0,0385
tE(UUC)I (35-55)	0,0389
tW(CCA)K (37-78)	0,0398
tV(UAC)B (38-76)	0,0402
tV(AAC)O (54-73)	0,0410
tD(GUC)J3 (39-74)	0,0435
tD(GUC)J3 (41-62)	0,0444
tS(AGA)L (56-87)	0,0455
tA(UGC)G (53-71)	0,0457
tT(UGU)H (55-75)	0,0463
tQ(UUG)D3 (39-75)	0,0476
tE(UUC)I (30-50)	0,0489

Tab.41 tRF wykazujące istotność statystyczną w porównaniu wyłącznie bibliotek stresu glodu cukrowego z warunkami optymalnymi we frakcji podjednostek.

	Wartość p
tV(AAC)O (32-53)	0,0001
tQ(UUG)D3 (1-35)	0,0002
tS(AGA)L (59-83)	0,0008
tE(UUC)I (1-23)	0,0035
tT(AGU)N2 (39-56)	0,0041
tG(GCC)G1 (54-71)	0,0065
tL(GAG)G (59-79)	0,0071
tE(CUC)I (36-75)	0,0081
tN(GUU)K (1-25)	0,0093
tW(CCA)M (1-18)	0,0132
tD(GUC)J3 (3-33)	0,0176
tS(AGA)H (56-85)	0,0216
tC(GCA)G (53-73)	0,0236
tE(UUC)I (52-70)	0,0259
tE(UUC)L (52-70)	0,0259

Ciąg dalszy tabeli 42	
tN(GUU)O2 (44-77)	0,0263
tR(ACG)E (48-76)	0,0280
tG(UCC)O (49-74)	0,0297
tR(CCG)L(33-75)	0,0338
tH(GUG)E2 (42-59)	0,0343
tK(CUU)M (43-71)	0,0358
tV(UAC)B (57-74)	0,0362
tE(UUC)Q (1-26)	0,0372
tD(GUC)J3 (-3611)	0,0381
tW(CCA)M (33-75)	0,0382
tV(CAC)H (47-75)	0,0385
tE(UUC)I (42–59)	0,0466
tG(CCC)D (52-69)	0,0467
tM(CAU)Q2 (1-19)	0,0497
tP(AGG)C (1-32)	0,0499

Tab.42 tRF wykazujące istotność statystyczną w porównaniu wyłącznie bibliotek stresu hiperosmotycznego z warunkami optymalnymi we frakcji podjednostek.

	Wartość p*	Wartość p**
tE(CUC)D (52-74)	0,0001	0,0285
tG(GCC)E (24-41)	0,0002	0,0002
tV(UAC)D (55-74)	0,0002	0,0002
tV(AAC)G3 (52-77)	0,0011	0,0108
tE(CUC)D (55-74)	0,0015	0,0426
tS(AGA)D3 (49-82)	0,0015	0,0019
tT(UGU)G1 (34-75)	0,0018	0,0449
tI(AAU)L1 (40-69)	0,0024	0,0268
tP(AGG)N (37-73)	0,0026	0,0349
tV(AAC)L (40-76)	0,0027	0,0272
tV(AAC)H (40-76)	0,0027	0,0270
tT(UGU)G2 (34-74)	0,0033	0,0292
tG(CCC)O (39-75)	0,0035	0,0019
tN(GUU)K (46-77)	0,0052	0,0070
tG(GCC)E (38-74)	0,0076	0,0369
tC(GCA)B (39-75)	0,0126	0,0094
tL(UAG)L2 (65-85)	0,0128	0,0138
tR(ACG)E (1-18)	0,0139	0,0383
tS(UGA)I (62-85)	0,0155	0,0128
tT(UGU)G2 (46-70)	0,0160	0,0035
tY(GUA)F2 (47-78)	0,0172	0,0239
tS(AGA)L (30-47)	0,0174	0,0490
tG(UCC)G (33-75)	0,0177	0,0156
tF(GAA)G (40-76)	0,0221	0,0496
tX(XXX)D (66-103)	0,0240	0,0207
tR(CCU)J (38-71)	0,0250	0,0473
tC(GCA)B (34-75)	0,0281	0,0172
tF(GAA)G (47-76)	0,0353	0,0442
tS(AGA)H (53-85)	0,0355	0,0358
tK(CUU)M (55-76)	0,0365	0,0479
tL(UAG)L2 (43-85)	0,0373	0,0365
tQ(UUG)E2 (39-75)	0,0381	0,0151
tP(AGG)C (37-75)	0,0423	0,0159
tO(UUG)D3 (39-75)	0.0476	0.0237

Tab.43 tRF wykazujące istotność statystyczną w porównaniu obu bibliotek stresowych z warunkami optymalnymi we frakcji podjednostek. p* - porównanie hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego (AlkB+ i AlkB-) z hodowlą w warunkach optymalnych (AlkB+ i AlkB-). Wartość p** - porównanie hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego (AlkB+ i AlkB-) z hodowlą w warunkach optymalnych (AlkB+ i AlkB-).

	Wartość p
snR60 (86-104)	0
snR128 (1-25)	0,0002
snR54 (38–74)	0,0057
snR72 (78–95)	0,017
snR45 (141–171)	0,0242
snR68 (101-136)	0,0251
snR47 (78–99)	0,0308
snR190 (175-192)	0,0396
snR61 (2-44)	0,0472

Tab.44 sdRNA wykazujące istotność statystyczną w porównaniu wyłącznie bibliotek stresu głodu cukrowego z warunkami optymalnymi we frakcji monosomów.

	Wartość p
snR35 (184-204)	0,0236

Tab.45 sdRNA wykazujące istotność statystyczną w porówanniu wyłącznie bibliotek stresu hiperosmotycznego z warunkami optymalnymi we frakcji monosomów.

	Wartość p*	Wartość p**
snR63 (232-255)	0,0123	0,0015

Tab.46 sdRNA wykazujące istotność statystyczną w porównaniu obu bibliotek stresowych z warunkami optymalnymi we frakcji monosomów. p* - porównanie hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego (AlkB+ i AlkB-) z hodowlą w warunkach optymalnych (AlkB+ i AlkB-). Wartość p** - porównanie hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego (AlkB+ i AlkB-) z hodowlą w warunkach optymalnych (AlkB+ i AlkB-).

	Wartość p
tF(GAA)G (38-73)	0,0003
tV(UAC)D (51-77)	0,0009
tG(GCC)E (30-70)	0,0021
tE(CUC)D (33-74)	0,0033
tT(AGU)I1 (53-75)	0,0034
tV(AAC)H (40-76)	0,0035
tV(AAC)L (40-76)	0,0035
tC(GCA)G (53-73)	0,0035
tK(CUU)F (32-74)	0,0037
tG(UCC)O (41-74)	0,0038
tC(GCA)G (39-73)	0,0046
tL(CAA)K (42-84)	0,0050
tA(UGC)G (37-71)	0,0052
tC(GCA)G (34-73)	0,0056
tE(UUC)I (35-74)	0,0057
tL(CAA)N (1-25)	0,0084
tV(AAC)L (54-76)	0,0089
tF(GAA)D (47-75)	0,0091
tT(AGU)I1 (56-75)	0,0100
tL(UAA)J (1-25)	0,0107
tE(CUC)D (55-74)	0,0125
tL(CAA)K (50-84)	0,0159
tN(GUU)K (57-76)	0,0162
tE(CUC)I (46-69)	0,0166
tQ(UUG)L (47-75)	0,0166

Ciąg dalszy tabelki 47	
tQ(UUG)D3 (47-75)	0,0171
tR(ACG)E (59-76)	0,0199
tD(GUC)G1 (43-75)	0,0202
tR(ACG)L (59-76)	0,0202
tE(UUC)Q (52-72)	0,0209
tQ(UUG)D3 (36-75)	0,0210
tL(CAA)N (62-85)	0,0300
tM(CAU)O2 (1-19)	0,0307
tL(CAA)K (53-84)	0,0318
tY(GUA)J2 (40-78)	0,0336
tA(UGC)G (50-76)	0,0360
tE(UUC)I (1-43)	0,0381
tH(GUG)E2 (42-65)	0,0393
tL(CAA)K (45-84)	0,0412
tD(GUC)J3 (-498)	0,0413
tR(CCG)L (49-75)	0,0427
tQ(UUG)E2 (58-75)	0,0446
tL(CAA)N (62-80)	0,0450
tQ(UUG)B (58-75)	0,0450
tD(GUC)J3 (-448)	0,0465
tQ(UUG)B (39-75)	0,0468
tC(GCA)B (47-75)	0,0469
tA(UGC)G (45-71)	0,0483
tL(UAA)J (61-87)	0,0492
tY(GUA)J2 (44-78)	0,0497

Tab.47 tRF wykazujące istotność statystyczną w porównaniu wyłącznie bibliotek stresu głodu cukrowego z warunkami optymalnymi we frakcji monosomów.

	Wartość p
tH(GUG)E2 (39-71)	0,0024
tQ(UUG)D3 (47-71)	0,0053
tS(UGA)P (44-84)	0,0132
tW(CCA)M (37-66)	0,0230
tL(UAG)L2 (40-77)	0,0230
tP(AGG)N (37-70)	0,0244
tE(UUC)M (39-71)	0,0245
tR(CCG)L (38-71)	0,0259
tS(GCU)F (68-85)	0,0259
tA(AGC)L (39-67)	0,0309
tI(AAU)L1 (40-69)	0,0325
tF(GAA)G (40-76)	0,0328
tT(UGU)G2 (46-74)	0,0331
tI(UAU)L (38-80)	0,0353
tI(UAU)L (1-37)	0,0361
tL(CAA)N (53-81)	0,0368
tM(CAU)C (-2-41)	0,0371
tL(GAG)G (1-18)	0,0397
tY(GUA)F2 (50-73)	0,0411
tM(CAU)C (58-75)	0,0422
tE(UUC)I (55-74)	0,0433
tK(UUU)G2 (1-28)	0,0441
tG(CCC)O (1-30)	0,0471
tH(GUG)G1 (52-75)	0,0496

Tab.48 tRF wykazujące istotność statystyczną w porównaniu wyłącznie bibliotek stresu hiperosmotycznego z warunkami optymalnymi we frakcji monosomów.

	Wartość p*	Wartość p*
tK(CUU)M (43-71)	0,0015	0,0369
tS(AGA)L (56-87)	0,0043	0,0387
tG(CCC)O (1-34)	0,0188	0,0006
tE(UUC)I (1-23)	0,0205	0,0003
tK(UUU)G2 (48-71)	0,0253	0,0212
tD(GUC)J3 (46-71)	0,0261	0,0172
tF(GAA)P1 (38-69)	0,0267	0,0121
tT(CGU)K (55-75)	0,0324	0,0179
tE(UUC)L (55-75)	0,0368	0,0183
tR(CCG)L (42-62)	0,0377	0,0172
tV(CAC)H(1-29)	0,0450	0,0206
tD(GUC)J3 (-4515)	0,0456	0,0195
tT(UGU)G1 (43-70)	0,0461	0,0211

Tab. 49 tRF wykazujące istotność statystyczną w porównaniu obu bibliotek stresowych z warunkami optymalnymi we frakcji monosomów. p* - porównanie hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego (AlkB+ i AlkB-) z hodowlą w warunkach optymalnych (AlkB+ i AlkB-). Wartość p** - porównanie hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego (AlkB+ i AlkB-) z hodowlą w warunkach optymalnych (AlkB+ i AlkB-).

	Wartość p
snR128 (1-35)	0
snR128 (88-127)	0
snR17a (192–209)	0
snR34 (164–203)	0
snR39 (70–89)	0
snR40 (68–97)	0
snR42 (313-351)	0
snR42 (320-331) snR42 (180, 200)	0
snR43 (180-209) snR57 (59-88)	0
snR57 (66–88)	0
snR72 (78–95)	0
snR76 (70–107)	0
snR77 (44-85)	0
snR83 (275-306)	0
snR3 (167-194)	0,0001
snR31 (183-222)	0,0001
snR39B (64–96)	0,0001
snR42 (330–351)	0,0001
snK/1 (48–90)	0,0001
snR (150-100)	0,0001
snR37 (360–386)	0.0003
snR68 (101–136)	0.0004
snR69 (61–101)	0,0004
snR48 (86–113)	0,0006
snR83 (281-306)	0,0014
snR30 (592-609)	0,0018
snR33 (143–183)	0,0019
snR83 (271–306)	0,0029
snR55 (77–98)	0,0046
snR10 (205–245)	0,005
snR18(03-102) snR58(50,06)	0,0053
snR58(39-90) snR60(81-104)	0,0055
snR66 (45–86)	0.0073
snR13 (87–124)	0,0075
snR4 (154–186)	0,0079
snR41 (76–110)	0,0085
snR128 (91-127)	0,0105
snR40 (22-44)	0,011
snR42 (323–351)	0,0116
snR40 (72–97)	0,012
snR37(354-386)	0,0124
snR32(02-92) snR8(173-190)	0,0127
snR0(173-170) snR41(80-110)	0.0132
snR78 (59–84)	0.0143
snR59 (59–78)	0,0144
snR55 (61–98)	0,0146
snR13 (95-124)	0,015
snR40 (19-48)	0,0163
snR53 (56–91)	0,0164
snR87 (69–104)	0,0165
snR35 (163–204)	0,0174
snR51(/1-10/)	0,0174
snR37 (364–39)	0.0105
snR59 (1-43)	0.0206
snR50 (67–90)	0,0209
snR64 (81–101)	0,0211
snR67 (58-82)	0,0212
snR40 (61–97)	0,0217
snR39 (49-89)	0,0219
snR61 (26–44)	0,0221
snR73 (62–103)	0,0223
snR69 (84–101)	0,0226
snR34 (1/4–203)	0,0231

Ciąg dalszy tabeli 50		
snR39B (54–96)	0.0233	
an D 28 (54, 05)	0.0229	
SIIK 38 (34–93)	0,0238	
snR52 (1–34)	0,0241	
snR41 (84–110)	0,0243	
snR55 (56–98)	0.0245	
$= P_1 T_2 (202, 222)$	0,0249	
snR1/a (303–333)	0,0248	
snR5 (169–197)	0,0272	
snR40 (22–49)	0,0277	
snR67 (51_82)	0.0282	
B20 (66, 00)	0,0202	
snR39 (66–89)	0,0284	
snR75 (61–83)	0,0289	
snR13 (107–124)	0.0294	
snR33 (1/9-183)	0.031	
D(7 (46, 92))	0,031	
snRo7 (40–82)	0,0315	
snR58 (68–96)	0,0316	
snR59 (55–78)	0.0316	
an P60 (86, 104)	0.0216	
SIIK00 (80–104)	0,0310	
snR63 (226–255)	0,0321	
snR11 (216-258)	0,0333	
snR8 (168–190)	0.0334	
mD128(107, 127)	0.0220	
SIIK128 (107–127)	0,0559	
snR83 (265–306)	0,0352	
snR190 (137-159)	0,0353	
snR87 (67_89)	0.0359	
anD22(165, 102)	0.0200	
snR33 (165–183)	0,0366	
snR82 (239–268)	0,037	
snR81 (-50– -15)	0.0371	
an P A (146, 186)	0.0274	
SIIK4 (140–180)	0,0374	
snR56 (33–75)	0,0381	
snR44 (171–210)	0,0383	
snR190 (137–165)	0.0385	
sin(1)0 (137 103)	0,0303	
SIIK05 (252–255)	0,0387	
snR8 (89–107)	0,0391	
snR78 (53-84)	0,0403	
snR64 (66–101)	0.0411	
	0.0416	
snR128 (105–124)	0,0416	
snR45 (136–171)	0,0416	
snR58 (71–96)	0,0421	
snR190 (156_192)	0.0423	
P(1(50,00))	0,0423	
snR61 (59–90)	0,0423	
snR37 (346–386)	0,0442	
snR9 (55–72)	0.0446	
nP2(111, 145)	0.0448	
SIIK3 (111–143)	0,0446	
snR35 (1/1–193)	0,0448	
snR3 (123–142)	0,045	
snR41 (1-33)	0,045	
snR191(247-274)	0.0451	
$\operatorname{D2}(114, 145)$	0.0451	
snR3 (114–145)	0,0451	
snR32 (162-188)	0,0453	
snR9 (17–46)	0.0454	
snR61 (22 /11)	0.0455	
D 57 (21 57)	0,0455	
snR57 (31–59)	0,0457	
snR48 (54-83)	0,0458	
snR128 (73-94)	0.0459	
mP11(101,212)	0.0462	
SIIK11 (191–212)	0,0402	
snR3 (152–191)	0,0462	
snR62 (64-100)	0,0464	
snR3 (64-88)	0.0466	
D11 (124 176)	0,0400	
snk11 (134–156)	0,0471	
snR81 (-5012)	0,0474	
snR17a (308–333)	0.0483	
mD32 (00 107)	0.0401	
SIIK32 (90–107)	0,0491	
snR38 (71–95)	0,0494	
snR17a (314-333)	0,0495	
. ,		

Tab.50 sdRNA wykazujące istotność statystyczną w porównaniu wyłącznie bibliotek stresu głodu cukrowego z warunkami optymalnymi we frakcji polisomów.

	Wartość p
snR38 (77–95)	0
snR77 (39-73)	0
snR77 (39-79)	0
snR190 (-2-21)	0,0004
snR18 (1-31)	0,0012
snR66 (63-86)	0,0017
snR190 (-1-17)	0,0074
snR76 (74-105)	0,0143
snR70 (134-164)	0,0186
snR85 (3-25)	0,0247
snR44 (-1-18)	0,0268
snR43 (1-21)	0,0296
snR78 (-1-19)	0,0312
snR190 (-2-26)	0,0317
snR40 (1-24)	0,0389
snR81 (5-41)	0,0435
snR83 (1-28)	0,0484

Tab.51 sdRNA wykazujące istotność statystyczną w porównaniu wyłącznie bibliotek stresu hiperosmotycznego z warunkami optymalnymi we frakcji polisomów.

	Wartość p*	Wartość p**
snR30 (572-609)	0.0001	0.0153
snR70 (147-164)	0.0002	0.0016
snR56 (52-88)	0.0054	0.0072
snR61 (64–90)	0.0262	0.0413
snR190 (89-128)	0.0296	0.041

Tab.52 sdRNA wykazujące istotność statystyczną w porównaniu obu bibliotek stresowych z warunkami optymalnymi we frakcji polisomów. p* - porównanie hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego (AlkB+ i AlkB-) z hodowlą w warunkach optymalnych (AlkB+ i AlkB-). Wartość p** - porównanie hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego (AlkB+ i AlkB-) z hodowlą w warunkach optymalnych (AlkB+ i AlkB-).

	Wartość p
tI(AAU)I1 (57–77)	0,0001
tF(GAA)P1 (-3712)	0,0002
tG(GCC)E (14-32)	0,0003
tV(CAC)H (39–72)	0.0004
tV(AAC)O (40–73)	0.0004
tW(UCA)O(42-69)	0.0005
tV(AAC)I(39-73)	0,0006
tI(IIAII)I(1-28)	0.0008
tI(0AU)P2(75, 93)	0,0000
tV(AAC)O(49, 76)	0,0011
tV(AAC)O(49-70)	0,0010
tO(UUG)D2(36-74)	0,0019
tV(AAC)O(5,32)	0,0020
tV(AAC)O(5-52)	0,0021
tP(AGG)C(1-30)	0,0020
(AOO)C(1-22)	0,0021
tA(AOC)L(47-07)	0,0031
tP(AGG)C(46-75)	0,0040
tM(CAU)O2(47-73)	0,0041
1Q(UUG)D2(47-75)	0,0005
tQ(UUG)H(47-75)	0,0065
tE(UUC)I(35-74)	0,0069
tL(UAG)L2(50-77)	0,0080
tP(AGG)C (49–75)	0,0084
tI(AAU)L2 (57–77)	0,0095
tT(AGU)N2 (39–66)	0,0096
tV(UAC)B (64–81)	0,0103
tH(GUG)E2 (42–59)	0,0105
tQ(UUG)D3 (51–68)	0,0113
tM(CAU)C (-2-41)	0,0122
tL(UAA)J (49–68)	0,0126
tR(ACG)L (38–71)	0,0129
tI(AAU)I1 (49–77)	0,0129
tD(GUC)J3 (5–23)	0,0133
tK(CUU)M (39–68)	0,0138
tS(CGA)C (1–37)	0,0142
tD(GUC)J3 (39–74)	0,0150
tV(UAC)D (64–81)	0,0152
tM(CAU)O2 (1-23)	0,0153
tK(CUU)M (43-71)	0,0156
tT(UGU)H (55–75)	0,0161
tL(CAA)N (39–73)	0,0166
tH(GUG)E2 (38-56)	0,0181
tV(CAC)H (53-76)	0,0184
tE(CUC)D (44-73)	0,0191
tE(CUC)I (34-69)	0,0208
tT(UGU)H (50-75)	0,0210
tK(UUU)G2 (47-68)	0,0214
tK(CUU)M (34-70)	0,0232
tR(ACG)J (52-76)	0,0236
tQ(UUG)B (6-33)	0,0237
tQ(UUG)L(36-71)	0,0239
tK(UUU)G2 (1-23)	0,0240
tK(UUU)G2 (45-71)	0,0244
tV(AAC)O (1-37)	0,0244
tK(UUU)G2 (59-76)	0,0253
tQ(UUG)D3 (1-31)	0,0286
tT(UGU)G1 (38–55)	0,0301
tW(CCA)M (1-29)	0,0302
tK(CUU)M (47-70)	0,0313
tT(CGU)K (55-75)	0,0313
tT(AGU)N2 (35-56)	0,0330

Ciąg dalszy tabeli 53	0.0000
tQ(CUG)M (1–35)	0,0332
tR(CCU)J (38–71)	0,0334
tD(GUC)J3 (10–27)	0,0350
tA(UGC)G (37–54)	0,0355
tG(CCC)O (47–70)	0,0356
tP(UGG)Q (37–75)	0,0358
tR(CCU)J (34–51)	0,0360
tT(CGU)K (1–33)	0,0364
tR(CCG)L(1–26)	0,0369
tW(CCA)M (46-65)	0,0372
tV(CAC)H (53-70)	0,0377
tE(UUC)Q (1–31)	0,0381
tY(GUA)F2 (54-71)	0,0386
tF(GAA)Q (46-75)	0,0399
tE(UUC)M (30-71)	0,0399
tI(AAU)L2 (52–69)	0,0399
tI(AAU)B (53–71)	0,0401
tV(AAC)O (40-57)	0,0404
tE(CUC)I (31-50)	0,0405
tQ(CUG)M (38-71)	0,0405
tC(GCA)B (52–69)	0,0406
tW(CCA)M (42-66)	0,0407
tE(CUC)I (1–23)	0,0408
tK(UUU)G2 (31–52)	0.0410
tT(UAG)O2 (38–74)	0.0415
tT(AGU)N1 (7–24)	0.0416
tM(CAU)P(-2–36)	0.0417
tS(AGA)L (44–65)	0.0417
tG(GCC)D2 (57–74)	0.0420
tG(UCC)G (30–68)	0.0421
tG(GCC)C(57-74)	0.0421
tT(AGU)N2(34-76)	0.0422
tG(GCC)E (57–74)	0.0422
tN(GUU)K(1-25)	0.0423
tF(GAA)P1 (1-28)	0.0425
tP(UGG)O(37-71)	0.0427
tK(CUU)M(1-34)	0.0428
tE(UUC)O(51-75)	0.0436
$t_{A}(A_{C}C)P(48-83)$	0.0446
tT(AGU)N2(35-52)	0.0447
$tI(A \Delta II)I1 (49-71)$	0.0447
tT(CGU)K(73.96)	0,0440
t1(COU)K(75-50)	0,0449
$t_{G}(CCC) D(26, 71)$	0,0455
(CUC)D(50-71)	0,0458
1D(GUC)G1(38-73)	0,0461
tQ(UUG)D3(23-42)	0,0461
tS(GCU)F(41-81)	0,0463
tA(AUC)L(48-80)	0,0409
IS(AGA)L(6-24)	0,0471
tivi(CAU)02(56-76)	0,0477
tG(CCC)D (31–51)	0,0484
tA(AGC)L (54–71)	0,0489
tG(CCC)O (52–69)	0,0489
tS(AGA)L (32–72)	0,0490
tF(GAA)P1 (38–69)	0,0491
tR(UCU)J2 (29-51)	0,0499
tF(GAA)P1 (17–35)	0,0499

Tab.53 tRF wykazujące istotność statystyczną w porównaniu wyłącznie bibliotek stresu głodu cukrowego z warunkami optymalnymi we frakcji polisomów

•	
	Wartość p
tT(UGU)G1 (3-24)	0,0001
tD(GUC)J3 (41-62)	0,0002
tV(AAC)O (1-32)	0,0002
tI(AAU)L1 (40-69)	0,0002
tS(AGA)L (59-83)	0,0002
tG(GCC)E (35–68)	0,0002
tG(GCC)E (38-70)	0,0003
tL(UAA)J (56–74)	0,0003
tG(GCC)D2 (38–68)	0,0003
tE(UUC)I (1–23)	0,0003
tL(CAA)N(7-25)	0,0004
tL(CAA)K(43-64)	0,0004
tA(UUC)U(35-71)	0,0004
tL(UUC)I(40-09)	0,0004
tE(UUC)I(42-62)	0,0005
tO(UUG)B(1-30)	0.0005
tQ(UUG)D3(47-71)	0.0007
tR(CCU)J (46–69)	0,0008
tA(AGC)L (45–62)	0,0009
tV(AAC)O (49-76)	0,0010
tA(UGC)G (39-65)	0,0014
tT(AGU)N2 (39-72)	0,0014
tT(CGU)K (34-75)	0,0019
tR(CCG)L (1-30)	0,0020
tV(UAC)D (38-73)	0,0020
tG(UCC)G (41-71)	0,0023
tD(GUC)J2 (-3517)	0,0028
tV(AAC)G3 (45–77)	0,0029
tH(GUG)E2 (42–65)	0,0030
tR(CCG)L (42–62)	0,0030
tP(UGG)A(3/-/5)	0,0031
tL(UAA)J(56-79)	0,0032
tS(UCC)G(41-67)	0,0033
tI(UAII)I(1-25)	0,0038
tG(GCC)E(41-61)	0.0041
tT(UGU)G1(43-70)	0.0048
tH(GUG)E2(51-68)	0.0052
tE(UUC)I(52-70)	0.0053
tH(GUG)E2 (46–65)	0,0054
tG(UCC)G (3-28)	0,0059
tR(ACG)L (48-74)	0,0060
tN(GUU)O2 (46-73)	0,0063
tS(AGA)L (30-47)	0,0069
tL(CAA)K (61-84)	0,0072
tG(GCC)E (41-70)	0,0077
tH(GUG)E2 (42-62)	0,0077
tL(UAA)J (1–25)	0,0080
tS(AGA)L (39–81)	0,0080
t1(UGU)GI (38–65)	0,0082
tS(LICA)I (40, 70)	0,0084
tV(GUA)E(49-79)	0,0086
tG(UCC)O(41,74)	0,0080
tO(UUC)O(41-74)	0,0093
tI(AAII)I 2 (11-32)	0,0099
tL(CAA)N(39-57)	0.0101
tD(GUC)N(9-35)	0.0103
tH(GUG)M (-1–36)	0,0106
tA(UGC)G (43–65)	0,0108
tA(AGC)L (39–64)	0,0119

Ciąg dalszy tabeli 54	
tC(GCA)B (8-33)	0,0120
tQ(UUG)D3 (44-75)	0,0120
tV(AAC)O (1–27)	0.0125
tP(AGG)N (41–73)	0.0143
tL(UAA)L(1-22)	0.0154
tL(UAA)L(50-81)	0.0157
tT(A GU)N2 (52-69)	0.0159
tI(AGO)I(2(32-6)) tI(IIAG)I(2(42-81))	0,0159
tC(UCC)C(1, 31)	0,0153
tE(CAA)O(47,71)	0,0103
IF(GAA)Q(4/-/1)	0,0160
tV(AAC)O(10-35)	0,0108
tI(CGU)K(1-30)	0,0170
tE(UUC)I(38–57)	0,0171
tV(UAC)D(39–77)	0,0171
tl(AAU)L2 (40–73)	0,0174
tT(UGU)G1 (38–70)	0,0175
tQ(UUG)Q (38–58)	0,0176
tP(UGG)Q (50-70)	0,0178
tA(UGC)G (37–71)	0,0183
tS(AGA)D1 (39-81)	0,0185
tG(GCC)E (30-70)	0,0187
tV(CAC)H (1-29)	0,0220
tA(UGC)G (50-67)	0,0223
tL(CAA)N (1–25)	0.0227
tA(UGC)G(41-72)	0.0227
tO(UUG)D3(15-36)	0.0236
tQ(000)DS(13, 50) tP(AGG)C(17-35)	0.0238
t (HOG) C (17 - 55)	0,0240
tH(GUG)O(52,71)	0,0240
H(UUU)Q(32-71)	0,0241
E(00C)E(38-73)	0,0240
tF(AOO)C(10-34)	0,0200
D(0CU)F(1-24)	0,0208
tP(AGG)N(57-70)	0,0277
tM(CAU)Q2(45-63)	0,0290
tP(AGG)C (3–28)	0,0293
tD(GUC)J3 (3–33)	0,0295
tD(GUC)J3 (-45– -12)	0,0297
tG(CCC)D (47–72)	0,0321
tK(UUU)G2 (41–76)	0,0321
tY(GUA)Q (42-84)	0,0325
tE(CUC)I (39-71)	0,0332
tT(UAG)Q2 (45-62)	0,0343
tN(GUU)K (40-72)	0,0355
tP(AGG)C (37-70)	0,0357
tS(AGA)D1 (49-79)	0,0376
tS(UGA)I (44-65)	0,0377
tL(GAG)G (65–85)	0.0397
tS(AGA)L (49–81)	0.0399
tE(UUC)M(42-71)	0.0428
tA(UGC)G(31-72)	0.0431
tC(GCA)P2(1-30)	0.0433
tS(UGA)I(1, 18)	0.0440
tG(CCC)D(2, 20)	0.0457
$t_{A}(ACC)M1(3-30)$	0,0457
tA(AOC)WI1(43-/1)	0,0401
IL(GAG)G (59-85)	0,0469
tK(CUU)M (39–76)	0,0474
tN(GUU)Q (1–21)	0,0486
tS(AGA)L (44-81)	0,0497

Tab.54 tRF wykazujące istotność statystyczną w porównaniu wylącznie bibliotek stresu hiperosmotycznego z warunkami optymalnymi we frakcji polisomów.

	XXX . // .t.	XXX . // dut
	Wartość p*	Wartość p**
tD(GUC)J3 (32–74)	0,0002	0,0124
tR(CCU)J (46–75)	0,0002	0,0006
tG(GCC)G1 (38–70)	0,0003	0,0294
tT(UGU)G1 (46-72)	0,0004	0,0006
tD(GUC)J3 (39-70)	0,0005	0,0002
tA(AGC)L (38–76)	0,0006	0,0007
tE(CUC)I (30-71)	0,0006	0,0009
tG(CCC)D(39-71)	0,0007	0,0007
tD(GUC)J3 (43-71)	0,0007	0,0004
tD(GUC)G1 (39-75)	0,0009	0,0124
tL(UAA)J (39–81)	0,0009	0,0012
tW(CCA)M (37-71)	0,0010	0,0014
tN(GUU)P(49-74)	0,0012	0,0380
tY(GUA)F2 (47-73)	0,0012	0,0006
tT(UGU)H (38-70)	0,0013	0,0019
tQ(UUG)L (42-75)	0,0014	0,0031
tR(CCG)L (47-68)	0,0015	0,0020
tW(CCA)M (52-69)	0,0019	0,0026
tE(CUC)D (33-74)	0,0019	0,0136
tL(CAA)N (62-80)	0,0022	0,0010
tR(UCU)J2 (8-32)	0,0022	0,0032
tA(UGC)Q (44-72)	0,0029	0,0042
tI(AAU)L2 (49-73)	0,0030	0,0044
tL(GAG)G (39-81)	0,0030	0,0020
tM(CAU)D (74-93)	0,0031	0,0045
tA(UGC)G (47-76)	0,0031	0,0045
tG(CCC)D (52-69)	0,0036	0,0055
tV(AAC)G3 (52-77)	0,0038	0,0028
tL(CAA)N (42-73)	0,0048	0,0001
tG(CCC)O (43-71)	0,0052	0,0087
tL(UAA)J (56-83)	0,0056	0,0045
tL(UAA)J (44-80)	0,0057	0,0077
tA(AGC)L (39-71)	0,0063	0,0011
tL(CAA)N (31-48)	0,0077	0,0113
tG(GCC)D2 (35-70)	0,0090	0,0118
tT(AGU)N2 (43-76)	0,0105	0,0230
tL(UAA)J (64-87)	0,0114	0,0141
tL(UAA)D (64-86)	0,0114	0,0141
tG(GCC)G1 (41-70)	0,0123	0,0012
tS(AGA)L (1-24)	0,0133	0,0028
tA(UGC)G (30-52)	0,0153	0,0198
tW(CCA)M (29-50)	0,0156	0,0202
tR(ACG)L (31-52)	0,0159	0,0206
tA(UGC)G (34-76)	0,0167	0,0098
tI(AAU)L2 (30-53)	0,0172	0,0226
tD(GUC)J3 (30-68)	0,0173	0,0228
tR(ACG)L (42-71)	0,0178	0,0240
tV(AAC)L (42-73)	0,0179	0,0237
tA(UGC)G (30-69)	0,0183	0,0246
tK(CUU)M (30-51)	0,0183	0,0243
tD(GUC)J3 (30-50)	0,0184	0,0243
tL(UAA)J (49-74)	0,0185	0,0246
tC(GCA)B (29-51)	0,0186	0,0247
tE(UUC)I (44-71)	0,0191	0,0331
tQ(UUG)B (36–71)	0,0191	0,0256
tG(UCC)G (31–51)	0,0194	0,0260
tX(XXX)L(60-83)	0,0194	0,0397
tE(UUC)I (30–50)	0.0195	0.0259

Ciąg dalszy tabeli 55		
tR(ACG)E (45-71)	0,0199	0,0266
tS(AGA)D1 (53-85)	0,0206	0,0243
tP(AGG)C (52–75)	0,0222	0,0296
tS(AGA)L (48–72)	0,0223	0,0300
tS(AGA)D1 (44-79)	0,0223	0,0013
tS(UGA)P (53–84)	0,0225	0,0299
tK(CUU)M (34-52)	0,0234	0,0318
tC(GCA)B (33–51)	0,0235	0,0320
tK(CUU)M (39-71)	0,0237	0,0140
tR(ACG)J (38–71)	0,0241	0,0330
tL(GAG)G (43-81)	0,0243	0,0334
tG(UCC)G (37–69)	0,0244	0,0389
tT(UGU)G2 (46-70)	0,0244	0,0333
tD(GUC)J3 (-4932)	0,0248	0,0346
tK(CUU)M (30-70)	0,0249	0,0342
tW(CCA)M (5–29)	0,0268	0,0368
tR(CCG)L(42–71)	0.0269	0.0068
tV(AAC)O (32–53)	0,0278	0,0380
tS(AGA)L (54–81)	0.0279	0.0110
tM(CAU)O2 (30–52)	0.0281	0.0388
tE(CUC)I (51–71)	0.0282	0.0388
tE(UUC)B(52-75)	0.0289	0.0149
tE(UUC)L (52–75)	0.0290	0.0150
tL(UAA)J (7–25)	0.0290	0.0402
tS(AGA)L (30–61)	0.0291	0.0401
tH(GUG)O (43–75)	0.0295	0.0051
tV(AAC)L (54–76)	0.0295	0.0330
tG(GCC)E (1–27)	0.0298	0.0147
tY(GUA)F2 (34–53)	0,0308	0,0428
tV(AAC)O (40–65)	0,0310	0,0429
tN(GUU)K (33–53)	0.0314	0.0437
tW(CCA)M (29-66)	0,0314	0,0438
tS(AGA)L (1–30)	0,0315	0,0436
tV(AAC)O (39–69)	0,0315	0,0438
tR(UCU)J2 (29–71)	0,0316	0,0440
tQ(UUG)B (40-65)	0,0316	0,0440
tQ(UUG)E2 (38-71)	0,0324	0,0455
tG(UCC)O (52–74)	0,0326	0,0430
tN(GUU)K (44–73)	0,0328	0,0192
tE(UUC)I (35-52)	0,0329	0,0450
tL(CAA)N (58–76)	0,0332	0,0464
tV(UAC)D (48-81)	0,0332	0,0469
tI(UAU)L (29–52)	0,0335	0,0471
tQ(UUG)D3 (40-62)	0,0338	0,0473
tA(AGC)K1 (59-76)	0,0347	0,0423
tA(AGC)K2 (59-76)	0,0348	0,0425
tA(AGC)L (59-76)	0,0349	0,0425
tV(UAC)D (31-53)	0,0352	0,0495
tW(UCA)Q (42-74)	0,0357	0,0497
tG(GCC)G1 (35-70)	0,0365	0,0099
tA(UGC)G (47-65)	0,0396	0,0025
tL(CAA)N (42-81)	0,0417	0,0002
tL(UAG)L2 (39-81)	0,0443	0,0205

Tab.55 tRF wykazujące istotność statystyczną w porównaniu obu bibliotek stresowych z warunkami optymalnymi we frakcji polisomów. p* - porównanie hodowli w warunkach stresu głodu cukrowego (AlkB+ i AlkB-) z hodowlą w warunkach optymalnych (AlkB+ i AlkB-). Wartość p** - porównanie hodowli w warunkach stresu hiperosmotycznego (AlkB+ i AlkB-) z hodowlą w warunkach optymalnych (AlkB+ i AlkB-).

10. Referencje

- [1] G. E. PALADE, "A small particulate component of the cytoplasm.," *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, vol. 1, no. 1, 1955, doi: 10.1083/jcb.1.1.59.
- [2] J. W. LITTLEFIELD, E. B. KELLER, J. GROSS, and P. C. ZAMECNIK, "Studies on cytoplasmic ribonucleoprotein particles from the liver of the rat.," *J. Biol. Chem.*, vol. 217, no. 1, 1955, doi: 10.1016/s0021-9258(19)57162-9.
- [3] M. B. HOAGLAND, M. L. STEPHENSON, J. F. SCOTT, L. I. HECHT, and P. C. ZAMECNIK, "A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis.," *J. Biol. Chem.*, vol. 231, no. 1, 1958, doi: 10.1016/s0021-9258(19)77302-5.
- [4] R. Weinberg and S. Penman, "Metabolism of small molecular weight monodisperse nuclear RNA," BBA Sect. Nucleic Acids Protein Synth., vol. 190, no. 1, 1969, doi: 10.1016/0005-2787(69)90150-6.
- [5] H. Busch, R. Reddy, L. Rothblum, and Y. C. Choi, "SnRNAs, SnRNPs, and RNA processing.," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 51, 1982, doi: 10.1146/annurev.bi.51.070182.003153.
- [6] J. Speer, C. W. Gehrke, K. C. Kuo, T. P. Waalkes, and E. Borek, "tRNA breakdown products as markers for cancer," *Cancer*, vol. 44, no. 6, 1979, doi: 10.1002/1097-0142(197912)44:6<2120::AID-CNCR2820440623>3.0.CO:2-6.
- [7] T. P. Waalkes *et al.*, "Urinary excretion of polyamines by patients with advanced malignancy," *CANCER CHEMOTHER.REP.*, vol. 59, no. 6, 1975.
- [8] W. Phillip and W. Troll, "High Turnover Rate of Transfer RNA in Tumor Tissue," *Cancer Res.*, vol. 37, no. 9, 1977.
- [9] S. Blanco *et al.*, "Aberrant methylation of t RNA s links cellular stress to neuro-developmental disorders," *EMBO J.*, vol. 33, no. 18, pp. 2020–2039, Sep. 2014, doi: 10.15252/embj.201489282.
- [10] T. Bratkovič, J. Bozič, and B. Rogelj, "Functional diversity of small nucleolar RNAs," *Nucleic Acids Res.*, vol. 48, no. 4, 2020, doi: 10.1093/nar/gkz1140.
- [11] A. Pircher, K. Bakowska-Zywicka, L. Schneider, M. Zywicki, and N. Polacek, "An mRNA-Derived Noncoding RNA Targets and Regulates the Ribosome," *Mol. Cell*, vol. 54, no. 1, 2014, doi: 10.1016/j.molcel.2014.02.024.
- [12] H. Luidalepp, S. Berger, O. Joss, T. Tenson, and N. Polacek, "Ribosome Shut-Down by 16S rRNA Fragmentation in Stationary-Phase Escherichia coli," *J. Mol. Biol.*, vol. 428, no. 10, 2016, doi: 10.1016/j.jmb.2016.01.033.
- [13] J. Gebetsberger, M. Zywicki, A. Künzi, and N. Polacek, "TRNA-derived fragments target the ribosome and function as regulatory non-coding RNA in Haloferax volcanii," *Archaea*, vol. 2012, 2012, doi: 10.1155/2012/260909.
- [14] R. Fricker *et al.*, "A tRNA half modulates translation as stress response in Trypanosoma brucei," *Nat. Commun.*, vol. 10, no. 1, 2019, doi: 10.1038/s41467-018-07949-6.
- [15] B. Felden, H. Himeno, A. Muto, J. P. McCutcheon, J. F. Atkins, and R. F. Gesteland, "Probing the structure of the Escherichia coli 10Sa RNA (tmRNA)," *RNA*, vol. 3, no. 1, 1997.
- [16] Y. Komine, M. Kitabatake, T. Yokogawa, K. Nishikawa, and H. Inokuchi, "A tRNA-like structure is present in 10Sa RNA, a small stable RNA from Escherichia coli," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 91, no. 20, 1994, doi: 10.1073/pnas.91.20.9223.
- [17] J. Rudinger-Thirion, R. Giege, and B. Felden, "Aminoacylated tmRNA from Escherichia coli interacts with prokaryotic elongation factor Tu," *RNA*, vol. 5, no. 8. 1999, doi: 10.1017/S135583829999101X.
- [18] G. F. Tu, G. E. Reid, J. G. Zhang, R. L. Moritz, and R. J. Simpson, "C-terminal extension of truncated recombinant proteins in Escherichia coli with a 10Sa RNA decapeptide," *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 16, 1995, doi: 10.1074/jbc.270.16.9322.
- [19] S. K. Archer *et al.*, "A Dual Program for Translation Regulation in Cellular Proliferation and Differentiation," *Cell*, vol. 6, no. 1, 2014.
- [20] A. M. Mleczko, P. Celichowski, and K. Bąkowska-Żywicka, "Transfer RNA-derived fragments

target and regulate ribosome-associated aminoacyl-transfer RNA synthetases," *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.*, vol. 1861, no. 7, 2018, doi: 10.1016/j.bbagrm.2018.06.001.

- [21] K. Bakowska-Zywicka, M. Kasprzyk, and T. Twardowski, "TRNA-derived short RNAs bind to Saccharomyces cerevisiae ribosomes in a stress-dependent manner and inhibit protein synthesis in vitro," *FEMS Yeast Res.*, vol. 16, no. 6, 2016, doi: 10.1093/femsyr/fow077.
- [22] A. M. Mleczko, P. Machtel, M. Walkowiak, A. Wasilewska, P. J. Pietras, and K. Bąkowska-Żywicka, "Levels of sdRNAs in cytoplasm and their association with ribosomes are dependent upon stress conditions but independent from snoRNA expression," *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, 2019, doi: 10.1038/s41598-019-54924-2.
- [23] S. J. Sharp, J. Schaack, L. Cooley, D. J. Burke, and D. Soil, "Structure and transcription of eukaryotic tRNA gene," *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 19, no. 2, 1985, doi: 10.3109/10409238509082541.
- [24] W. D. Hardt, J. Schlegl, V. A. Erdmann, and R. K. Hartmann, "Role of the D Arm and the Anticodon Arm in tRNA Recognition by Eubacterial and Eukaryotic RNase P Enzymes," *Biochemistry*, vol. 32, no. 48, 1993, doi: 10.1021/bi00211a014.
- [25] S. Neidle and M. Sanderson, "RNA structures and their diversity," in *Principles of Nucleic Acid Structure*, 2022.
- [26] R. W. Holley *et al.*, "Structure of a ribonucleic acid," *Science* (80-.)., vol. 147, no. 3664, 1965, doi: 10.1126/science.147.3664.1462.
- [27] M. A. Machnicka *et al.*, "MODOMICS: A database of RNA modification pathways 2013 update," *Nucleic Acids Res.*, vol. 41, no. D1, 2013, doi: 10.1093/nar/gks1007.
- [28] R. Krutyhołowa, K. Zakrzewski, and S. Glatt, "Charging the code tRNA modification complexes," *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 55. 2019, doi: 10.1016/j.sbi.2019.03.014.
- [29] F. Alings, L. P. Sarin, C. Fufezan, H. C. A. Drexler, and S. A. Leidel, "An evolutionary approach uncovers a diverse response of tRNA 2-thiolation to elevated temperatures in yeast," *RNA*, vol. 21, no. 2, 2015, doi: 10.1261/rna.048199.114.
- [30] S. Laxman *et al.*, "XSulfur amino acids regulate translational capacity and metabolic homeostasis through modulation of tRNA thiolation," *Cell*, vol. 154, no. 2, 2013, doi: 10.1016/j.cell.2013.06.043.
- [31] D. D. Nedialkova and S. A. Leidel, "Optimization of Codon Translation Rates via tRNA Modifications Maintains Proteome Integrity," *Cell*, vol. 161, no. 7, 2015, doi: 10.1016/j.cell.2015.05.022.
- [32] G. R. Björk, K. Jacobsson, K. Nilsson, M. J. O. Johansson, A. S. Byström, and O. P. Persson, "A primordial tRNA modification required for the evolution of life?," *EMBO J.*, vol. 20, no. 1–2, 2001, doi: 10.1093/emboj/20.1.231.
- [33] A. E. Cozen, E. Quartley, A. D. Holmes, E. Hrabeta-Robinson, E. M. Phizicky, and T. M. Lowe, "ARM-seq: AlkB-facilitated RNA methylation sequencing reveals a complex landscape of modified tRNA fragments," *Nat. Methods*, vol. 12, no. 9, 2015, doi: 10.1038/nmeth.3508.
- [34] H. Hori, "Methylated nucleosides in tRNA and tRNA methyltransferases," *Frontiers in Genetics*, vol. 5, no. MAY. 2014, doi: 10.3389/fgene.2014.00144.
- [35] A. W. Struck, M. L. Thompson, L. S. Wong, and J. Micklefield, "S-Adenosyl-Methionine-Dependent Methyltransferases: Highly Versatile Enzymes in Biocatalysis, Biosynthesis and Other Biotechnological Applications," *ChemBioChem*, vol. 13, no. 18. 2012, doi: 10.1002/cbic.201200556.
- [36] C. Lee, G. Kramer, D. E. Graham, and D. R. Appling, "Yeast mitochondrial initiator tRNA is methylated at guanosine 37 by the Trm5-encoded tRNA (guanine-N1-)-methyltransferase," J. Biol. Chem., vol. 282, no. 38, 2007, doi: 10.1074/jbc.M704572200.
- [37] E. Vilardo, F. Amman, U. Toth, A. Kotter, M. Helm, and W. Rossmanith, "Functional characterization of the human tRNA methyltransferases TRMT10A and TRMT10B," *Nucleic Acids Res.*, vol. 48, no. 11, 2021, doi: 10.1093/NAR/GKAA353.

- [38] C. Cosentino *et al.*, "Pancreatic -cell tRNA hypomethylation and fragmentation link TRMT10A deficiency with diabetes," *Nucleic Acids Res.*, vol. 46, no. 19, 2018, doi: 10.1093/nar/gky839.
- [39] A. Martinez, S. Yamashita, T. Nagaike, Y. Sakaguchi, T. Suzuki, and K. Tomita, "Human BCDIN3D monomethylates cytoplasmic histidine transfer RNA," *Nucleic Acids Res.*, vol. 45, no. 9, 2017, doi: 10.1093/nar/gkx051.
- [40] C. W. Reinsborough *et al.*, "BCDIN3D regulates tRNAHis 3' fragment processing," *PLoS Genet.*, vol. 15, no. 7, 2019, doi: 10.1371/journal.pgen.1008273.
- [41] J. Anderson *et al.*, "The essential Gcd10p-Gcd14p nuclear complex 15 required for 1methyladenosine modification and maturation of initiator methionyl-tRNA," *Genes Dev.*, vol. 12, no. 23, 1998, doi: 10.1101/gad.12.23.3650.
- [42] M. J. Renda, J. D. Rosenblatt, E. Klimatcheva, L. M. Demeter, R. A. Bambara, and V. Planelles, "Mutation of the Methylated tRNA3Lys Residue A58 Disrupts Reverse Transcription and Inhibits Replication of Human Immunodeficiency Virus Type 1," J. Virol., vol. 75, no. 20, 2001, doi: 10.1128/jvi.75.20.9671-9678.2001.
- [43] Z. Chen *et al.*, "Transfer RNA demethylase ALKBH3 promotes cancer progression via induction of tRNA-derived small RNAs," *Nucleic Acids Res.*, vol. 47, no. 5, 2019, doi: 10.1093/nar/gky1250.
- [44] S. Rashad *et al.*, "The stress specific impact of ALKBH1 on tRNA cleavage and tiRNA generation," *RNA Biol.*, vol. 17, no. 8, 2020, doi: 10.1080/15476286.2020.1779492.
- [45] Z. Su *et al.*, "TRMT6/61A-dependent base methylation of tRNA-derived fragments regulates gene-silencing activity and the unfolded protein response in bladder cancer," *Nat. Commun.*, vol. 13, no. 1, 2022, doi: 10.1038/s41467-022-29790-8.
- [46] S. Ozanick, A. Krecic, J. Andersland, and J. T. Anderson, "The bipartite structure of the tRNA m1A58 methyltransferase from S. cerevisiae is conserved in humans," *RNA*, vol. 11, no. 8, 2005, doi: 10.1261/rna.5040605.
- [47] P. Vitali and T. Kiss, "Cooperative 2'-o-methylation of the wobble cytidine of human elongator tRNAmet(cat) by a nucleolar and a cajal bodyspecific box C/D RNP," *Genes Dev.*, vol. 33, no. 13–14, 2019, doi: 10.1101/gad.326363.119.
- [48] H. Li *et al.*, "A dual role of human tRNA methyltransferase hTrmt13 in regulating translation and transcription," *EMBO J.*, vol. 41, no. 6, 2022, doi: 10.15252/embj.2021108544.
- [49] C. He et al., "TET2 chemically modifies tRNAs and regulates tRNA fragment levels," Nat. Struct. Mol. Biol., vol. 28, no. 1, 2021, doi: 10.1038/s41594-020-00526-w.
- [50] F. Tuorto *et al.*, "RNA cytosine methylation by Dnmt2 and NSun2 promotes tRNA stability and protein synthesis," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 19, no. 9, 2012, doi: 10.1038/nsmb.2357.
- [51] M. Schaefer *et al.*, "RNA methylation by Dnmt2 protects transfer RNAs against stress-induced cleavage," *Genes Dev.*, vol. 24, no. 15, 2010, doi: 10.1101/gad.586710.
- [52] M. G. Goll *et al.*, "Methylation of tRNAAsp by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2," *Science* (80-.)., vol. 311, no. 5759, 2006, doi: 10.1126/science.1120976.
- [53] Z. X. Huang, J. Li, Q. P. Xiong, H. Li, E. D. Wang, and R. J. Liu, "Position 34 of tRNA is a discriminative element for m5C38 modification by human DNMT2," *Nucleic Acids Res.*, vol. 49, no. 22, 2021, doi: 10.1093/nar/gkab1148.
- [54] Z. Durdevic, M. B. Mobin, K. Hanna, F. Lyko, and M. Schaefer, "The RNA methyltransferase dnmt2 is required for efficient dicer-2-dependent siRNA pathway activity in Drosophila," *Cell Rep.*, vol. 4, no. 5, 2013, doi: 10.1016/j.celrep.2013.07.046.
- [55] F. Tuorto *et al.*, "The tRNA methyltransferase Dnmt2 is required for accurate polypeptide synthesis during haematopoiesis," *EMBO J.*, vol. 34, no. 18, 2015, doi: 10.15252/embj.201591382.
- [56] Y. Zhang *et al.*, "Dnmt2 mediates intergenerational transmission of paternally acquired metabolic disorders through sperm small non-coding RNAs," *Nat. Cell Biol.*, vol. 20, no. 5, 2018, doi: 10.1038/s41556-018-0087-2.

- [57] N. A. Gkatza *et al.*, "Cytosine-5 RNA methylation links protein synthesis to cell metabolism," *PLoS Biol.*, vol. 17, no. 6, 2019, doi: 10.1371/journal.pbio.3000297.
- [58] P. Studte *et al.*, "tNA and protein methylase complexes mediate zymocin toxicity in yeast," *Mol. Microbiol.*, vol. 69, no. 5, 2008, doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06358.x.
- [59] S. Muthukumar, C. T. Li, R. J. Liu, and C. Bellodi, "Roles and regulation of tRNA-derived small RNAs in animals," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 25, no. 5. 2024, doi: 10.1038/s41580-023-00690-z.
- [60] J. F. Hu *et al.*, "Quantitative mapping of the cellular small RNA landscape with AQRNA-seq," *Nat. Biotechnol.*, vol. 39, no. 8, 2021, doi: 10.1038/s41587-021-00874-y.
- [61] M. C. Lucas *et al.*, "Quantitative analysis of tRNA abundance and modifications by nanopore RNA sequencing," *Nat. Biotechnol.*, vol. 42, no. 1, 2024, doi: 10.1038/s41587-023-01743-6.
- [62] T. Suzuki, "The expanding world of tRNA modifications and their disease relevance," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 22, no. 6. 2021, doi: 10.1038/s41580-021-00342-0.
- [63] G. Zheng *et al.*, "Efficient and quantitative high-throughput tRNA sequencing," *Nat. Methods*, vol. 12, no. 9, 2015, doi: 10.1038/nmeth.3478.
- [64] M. Raina and M. Ibba, "TRNAs as regulators of biological processes," *Frontiers in Genetics*, vol. 5, no. JUN. 2014, doi: 10.3389/fgene.2014.00171.
- [65] Z. Su, B. Wilson, P. Kumar, and A. Dutta, "Noncanonical Roles of tRNAs: TRNA Fragments and beyond," *Annual Review of Genetics*, vol. 54. 2020, doi: 10.1146/annurev-genet-022620-101840.
- [66] P. Kumar, J. Anaya, S. B. Mudunuri, and A. Dutta, "Meta-analysis of tRNA derived RNA fragments reveals that they are evolutionarily conserved and associate with AGO proteins to recognize specific RNA targets," *BMC Biol.*, vol. 12, no. 1, 2014, doi: 10.1186/preaccept-5867533061403216.
- [67] S. Yamasaki, P. Ivanov, G. F. Hu, and P. Anderson, "Angiogenin cleaves tRNA and promotes stress-induced translational repression," *J. Cell Biol.*, vol. 185, no. 1, 2009, doi: 10.1083/jcb.200811106.
- [68] Y. S. Lee, Y. Shibata, A. Malhotra, and A. Dutta, "A novel class of small RNAs: tRNA-derived RNA fragments (tRFs)," *Genes Dev.*, vol. 23, no. 22, 2009, doi: 10.1101/gad.1837609.
- [69] D. Haussecker, Y. Huang, A. Lau, P. Parameswaran, A. Z. Fire, and M. A. Kay, "Human tRNAderived small RNAs in the global regulation of RNA silencing," *RNA*, vol. 16, no. 4, 2010, doi: 10.1261/rna.2000810.
- [70] A. G. Telonis *et al.*, "Dissecting tRNA-derived fragment complexities using personalized transcriptomes reveals novel fragment classes and unexpected dependencies," *Oncotarget*, vol. 6, no. 28, 2015, doi: 10.18632/oncotarget.4695.
- [71] D. J. Strydom et al., "Amino Acid Sequence of Human Tumor Derived Angiogenic," Biochemistry, vol. 24, no. 20, 1985, doi: 10.1021/bi00341a031.
- [72] H. Fu *et al.*, "Stress induces tRNA cleavage by angiogenin in mammalian cells," *FEBS Lett.*, vol. 583, no. 2, 2009, doi: 10.1016/j.febslet.2008.12.043.
- [73] E. Pizzo *et al.*, "Ribonuclease/angiogenin inhibitor 1 regulates stressinduced subcellular localization of angiogenin to control growth and survival," *J. Cell Sci.*, vol. 126, no. 18, 2013, doi: 10.1242/jcs.134551.
- [74] Z. Li, C. Ender, G. Meister, P. S. Moore, Y. Chang, and B. John, "Extensive terminal and asymmetric processing of small RNAs from rRNAs, snoRNAs, snRNAs, and tRNAs," *Nucleic Acids Res.*, vol. 40, no. 14, 2012, doi: 10.1093/nar/gks307.
- [75] D. M. Thompson and R. Parker, "The RNase Rny1p cleaves tRNAs and promotes cell death during oxidative stress in Saccharomyces cerevisiae," J. Cell Biol., vol. 185, no. 1, 2009, doi: 10.1083/jcb.200811119.
- [76] Z. Su, C. Kuscu, A. Malik, E. Shibata, and A. Dutta, "Angiogenin generates specific stressinduced tRNA halves and is not involved in tRF-3-mediated gene silencing," *J. Biol. Chem.*, vol. 294, no. 45, 2019, doi: 10.1074/jbc.RA119.009272.

- [77] C. Cole *et al.*, "Filtering of deep sequencing data reveals the existence of abundant Dicerdependent small RNAs derived from tRNAs," *RNA*, vol. 15, no. 12, 2009, doi: 10.1261/rna.1738409.
- [78] M. Kazimierczyk *et al.*, "Characteristics of Transfer RNA-Derived Fragments Expressed during Human Renal Cell Development: The Role of Dicer in tRF Biogenesis," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 7, 2022, doi: 10.3390/ijms23073644.
- [79] A. Di Fazio, M. Schlackow, S. K. Pong, A. Alagia, and M. Gullerova, "Dicer dependent tRNA derived small RNAs promote nascent RNA silencing," *Nucleic Acids Res.*, vol. 50, no. 3, 2022, doi: 10.1093/nar/gkac022.
- [80] V. Oberbauer and M. R. Schaefer, "tRNA-derived small RNAs: Biogenesis, modification, function and potential impact on human disease development," *Genes*, vol. 9, no. 12. 2018, doi: 10.3390/genes9120607.
- [81] G. Kaufmann, "Anticodon nucleases," *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 25, no. 2. 2000, doi: 10.1016/S0968-0004(99)01525-X.
- [82] T. Kiss, "Small nucleolar RNA-guided post-transcriptional modification of cellular RNAs," EMBO Journal, vol. 20, no. 14. 2001, doi: 10.1093/emboj/20.14.3617.
- [83] G. Nechooshtan, D. Yunusov, K. Chang, and T. R. Gingeras, "Processing by RNase 1 forms tRNA halves and distinct y RNA fragments in the extracellular environment," *Nucleic Acids Res.*, vol. 48, no. 14, 2020, doi: 10.1093/nar/gkaa526.
- [84] J. P. Tosar, F. Gámbaro, L. Darré, S. Pantano, E. Westhof, and A. Cayota, "Dimerization confers increased stability to nucleases in 5 halves from glycine and glutamic acid tRNAs," *Nucleic Acids Res.*, vol. 46, no. 17, 2018, doi: 10.1093/nar/gky495.
- [85] B. Costa *et al.*, "Nicked tRNAs are stable reservoirs of tRNA halves in cells and biofluids," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 120, no. 4, 2023, doi: 10.1073/pnas.2216330120.
- [86] U. Jo and Y. Pommier, "Structural, molecular, and functional insights into Schlafen proteins," *Experimental and Molecular Medicine*, vol. 54, no. 6. 2022, doi: 10.1038/s12276-022-00794-0.
- [87] N. Guzzi *et al.*, "Pseudouridylation of tRNA-Derived Fragments Steers Translational Control in Stem Cells," *Cell*, vol. 173, no. 5, 2018, doi: 10.1016/j.cell.2018.03.008.
- [88] P. Ivanov, M. M. Emara, J. Villen, S. P. Gygi, and P. Anderson, "Angiogenin-Induced tRNA Fragments Inhibit Translation Initiation," *Mol. Cell*, vol. 43, no. 4, 2011, doi: 10.1016/j.molcel.2011.06.022.
- [89] A. Sobala and G. Hutvagner, "Small RNAs derived from the 5' end of tRNAs can inhibit protein translation in human cells," *RNA Biol.*, vol. 10, no. 4, 2013, doi: 10.4161/rna.24285.
- [90] S. M. Lyons, C. Achorn, N. L. Kedersha, P. J. Anderson, and P. Ivanov, "YB-1 regulates tiRNAinduced Stress Granule formation but not translational repression," *Nucleic Acids Res.*, vol. 44, no. 14, 2016, doi: 10.1093/nar/gkw418.
- [91] S. P. Keam, A. Sobala, S. Ten Have, and G. Hutvagner, "TRNA-Derived RNA Fragments Associate with Human Multisynthetase Complex (MSC) and Modulate Ribosomal Protein Translation," J. Proteome Res., vol. 16, no. 2, 2017, doi: 10.1021/acs.jproteome.6b00267.
- [92] H. K. Kim *et al.*, "A transfer-RNA-derived small RNA regulates ribosome biogenesis," *Nature*, vol. 552, no. 7683, 2017, doi: 10.1038/nature25005.
- [93] J. Y. Liao *et al.*, "Deep sequencing of human nuclear and cytoplasmic small RNAS reveals an unexpectedly complex subcellular distribution of mirnas and tRNA 3' trailers," *PLoS One*, vol. 5, no. 5, 2010, doi: 10.1371/journal.pone.0010563.
- [94] X. Liu *et al.*, "A pro-metastatic tRNA fragment drives Nucleolin oligomerization and stabilization of its bound metabolic mRNAs," *Mol. Cell*, vol. 82, no. 14, 2022, doi: 10.1016/j.molcel.2022.05.008.
- [95] L. Chen *et al.*, "5' Half of specific tRNAs feeds back to promote corresponding tRNA gene transcription in vertebrate embryos," *Sci. Adv.*, vol. 7, no. 47, 2021, doi: 10.1126/sciadv.abh0494.
- [96] H. Goodarzi, X. Liu, H. C. B. Nguyen, S. Zhang, L. Fish, and S. F. Tavazoie, "Endogenous

tRNA-derived fragments suppress breast cancer progression via YBX1 displacement," *Cell*, vol. 161, no. 4, 2015, doi: 10.1016/j.cell.2015.02.053.

- [97] M. Esteller, "Non-coding RNAs in human disease," *Nature Reviews Genetics*, vol. 12, no. 12. 2011, doi: 10.1038/nrg3074.
- [98] G. Dieci, M. Preti, and B. Montanini, "Eukaryotic snoRNAs: A paradigm for gene expression flexibility," *Genomics*, vol. 94, no. 2. 2009, doi: 10.1016/j.ygeno.2009.05.002.
- [99] Z. Kiss-László, Y. Henry, J. P. Bachellerie, M. Caizergues-Ferrer, and T. Kiss, "Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: A novel function for small nucleolar RNAs," *Cell*, vol. 85, no. 7, 1996, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81308-2.
- [100] M. L. Bortolin, P. Ganot, and T. Kiss, "Elements essential for accumulation and function of small nucleolar RNAs directing site-specific pseudouridylation of ribosomal RNAs," *EMBO J.*, vol. 18, no. 2, 1999, doi: 10.1093/emboj/18.2.457.
- [101] P. Ganot, M. Caizergues-Ferrer, and T. Kiss, "The family of box ACA small nucleolar RNAs is defined by an evolutionarily conserved secondary structure and ubiquitous sequence elements essential for RNA accumulation," *Genes Dev.*, vol. 11, no. 7, 1997, doi: 10.1101/gad.11.7.941.
- [102] A. G. Balakin, L. Smith, and M. J. Fournier, "The RNA world of the nucleolus: Two major families of small RNAs defined by different box elements with related functions," *Cell*, vol. 86, no. 5, 1996, doi: 10.1016/S0092-8674(00)80156-7.
- [103] T. Bratkovič and B. Rogelj, "The many faces of small nucleolar RNAs," *Biochimica et Biophysica Acta Gene Regulatory Mechanisms*, vol. 1839, no. 6. 2014, doi: 10.1016/j.bbagrm.2014.04.009.
- [104] M. Morlando *et al.*, "FUS stimulates microRNA biogenesis by facilitating co-transcriptional Drosha recruitment," *EMBO J.*, vol. 31, no. 24, 2012, doi: 10.1038/emboj.2012.319.
- [105] Y. Motorin, S. Muller, I. Behm-Ansmant, and C. Branlant, "Identification of Modified Residues in RNAs by Reverse Transcription-Based Methods," *Methods in Enzymology*, vol. 425. 2007, doi: 10.1016/S0076-6879(07)25002-5.
- [106] G. A. Stepanov et al., "Regulatory role of Small nucleolar RNAs in human diseases," BioMed Research International, vol. 2015, 2015, doi: 10.1155/2015/206849.
- [107] J. Ni, A. L. Tien, and M. J. Fournier, "Small nucleolar RNAs direct site-specific synthesis of pseudouridine in ribosomal RNA," *Cell*, vol. 89, no. 4, 1997, doi: 10.1016/S0092-8674(00)80238-X.
- [108] P. Ganot, M. L. Bortolin, and T. Kiss, "Site-specific pseudouridine formation in preribosomal RNA is guided by small nucleolar RNAs," *Cell*, vol. 89, no. 5, 1997, doi: 10.1016/S0092-8674(00)80263-9.
- [109] G. Jin, M. Xu, M. Zou, and S. Duan, "The Processing, Gene Regulation, Biological Functions, and Clinical Relevance of N4-Acetylcytidine on RNA: A Systematic Review," *Molecular Therapy Nucleic Acids*, vol. 20. 2020, doi: 10.1016/j.omtn.2020.01.037.
- [110] S. Ito *et al.*, "A single acetylation of 18 S rRNA is essential for biogenesis of the small ribosomal subunit in saccharomyces cerevisiae," *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 38, 2014, doi: 10.1074/jbc.M114.593996.
- [111] S. Sharma, J. L. Langhendries, P. Watzinger, P. Kotter, K. D. Entian, and D. L. J. Lafontaine, "Yeast Kre33 and human NAT10 are conserved 18S rRNA cytosine acetyltransferases that modify tRNAs assisted by the adaptor Tan1/THUMPD1," *Nucleic Acids Res.*, vol. 43, no. 4, 2015, doi: 10.1093/nar/gkv075.
- [112] W. Filipowicz and V. Pogači, "Biogenesis of small nucleolar ribonucleoproteins," *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 14, no. 3. 2002, doi: 10.1016/S0955-0674(02)00334-4.
- [113] M. Falaleeva *et al.*, "Dual function of C/D box small nucleolar RNAs in rRNA modification and alternative pre-mRNA splicing," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 113, no. 12, 2016, doi: 10.1073/pnas.1519292113.
- [114] R. J. Taft, E. A. Glazov, T. Lassmann, Y. Hayashizaki, P. Carninci, and J. S. Mattick, "Small RNAs derived from snoRNAs," *RNA*, vol. 15, no. 7, 2009, doi: 10.1261/rna.1528909.

- [115] M. Ono, M. S. Scott, K. Yamada, F. Avolio, G. J. Barton, and A. I. Lamond, "Identification of human miRNA precursors that resemble box C/D snoRNAs," *Nucleic Acids Res.*, vol. 39, no. 9, 2011, doi: 10.1093/nar/gkq1355.
- [116] Y. Pekarskya *et al.*, "Dysregulation of a family of short noncoding RNAs, tsRNAs, in human cancer," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 113, no. 18, 2016, doi: 10.1073/pnas.1604266113.
- [117] E. M. Phizicky and A. K. Hopper, "tRNA biology charges to the front," *Genes and Development*, vol. 24, no. 17. 2010, doi: 10.1101/gad.1956510.
- [118] N. L. Godang *et al.*, "Global Switch from DICER-dependent MicroRNA to DICER-independent SnoRNA-derived RNA Biogenesis in Malignancy," *microPublication Biol.*, vol. 2023, 2023.
- [119] J. Höck and G. Meister, "The Argonaute protein family," *Genome Biology*, vol. 9, no. 2. 2008, doi: 10.1186/gb-2008-9-2-210.
- [120] J. S. Yang and E. C. Lai, "Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis in vertebrates," *Cell Cycle*, vol. 9, no. 22. 2010, doi: 10.4161/cc.9.22.13958.
- [121] S. Cheloufi, C. O. Dos Santos, M. M. W. Chong, and G. J. Hannon, "A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis," *Nature*, vol. 465, no. 7298, 2010, doi: 10.1038/nature09092.
- [122] J. Höck *et al.*, "Proteomic and functional analysis of Argonaute-containing mRNA-protein complexes in human cells," *EMBO Rep.*, vol. 8, no. 11, 2007, doi: 10.1038/sj.embor.7401088.
- [123] N. Agrawal, P. V. N. Dasaradhi, A. Mohmmed, P. Malhotra, R. K. Bhatnagar, and S. K. Mukherjee, "RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 67, no. 4, 2003, doi: 10.1128/mmbr.67.4.657-685.2003.
- [124] M. S. Scott, F. Avolio, M. Ono, A. I. Lamond, and G. J. Barton, "Human miRNA precursors with box H/ACA snoRNA features," *PLoS Comput. Biol.*, vol. 5, no. 9, 2009, doi: 10.1371/journal.pcbi.1000507.
- [125] F. Yu *et al.*, "p53 represses the oncogenic Sno-MiR-28 derived from a SnoRNA," *PLoS One*, vol. 10, no. 6, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0129190.
- [126] S. Kishore, A. R. Gruber, D. J. Jedlinski, A. P. Syed, H. Jorjani, and M. Zavolan, "Insights into snoRNA biogenesis and processing from PAR-CLIP of snoRNA core proteins and small RNA sequencing," *Genome Biol.*, vol. 14, no. 5, 2013, doi: 10.1186/gb-2013-14-5-r45.
- [127] M. S. Scott, M. Ono, K. Yamada, A. Endo, G. J. Barton, and A. I. Lamond, "Human box C/D snoRNA processing conservation across multiple cell types," *Nucleic Acids Res.*, vol. 40, no. 8, 2012, doi: 10.1093/nar/gkr1233.
- [128] J. LaCava *et al.*, "RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex," *Cell*, vol. 121, no. 5, 2005, doi: 10.1016/j.cell.2005.04.029.
- [129] A. Nag and J. A. Steitz, "Tri-snRNP-associated proteins interact with subunits of the TRAMP and nuclear exosome complexes, linking RNA decay and pre-mRNA splicing," *RNA Biol.*, vol. 9, no. 3, 2012, doi: 10.4161/rna.19431.
- [130] F. Zhong et al., "A SnoRNA-derived piRNA interacts with human interleukin-4 pre-mRNA and induces its decay in nuclear exosomes," *Nucleic Acids Res.*, vol. 43, no. 21, 2015, doi: 10.1093/nar/gkv954.
- [131] J. Liao et al., "Small nucleolar RNA signatures as biomarkers for non-small-cell lung cancer," Mol. Cancer, vol. 9, 2010, doi: 10.1186/1476-4598-9-198.
- [132] A. Liu *et al.*, "MicroRNA expression profiling outperforms mRNA expression profiling in formalin-fixed paraffin-embedded tissues," *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, vol. 2, no. 6, 2009.
- [133] Z. Kiss-László, Y. Henry, and T. Kiss, "Sequence and structural elements of methylation guide snoRNAs essential for site-specific ribose methylation of pre-rRNA," *EMBO J.*, vol. 17, no. 3, 1998, doi: 10.1093/emboj/17.3.797.
- [134] A. Goeze, K. Schlüns, G. Wolf, Z. Thäsler, S. Petersen, and I. Petersen, "Chromosomal imbalances of primary and metastatic lung adenocarcinomas," *J. Pathol.*, vol. 196, no. 1, 2002, doi: 10.1002/path.1009.

- [135] D. Ronchetti *et al.*, "The expression pattern of small nucleolar and small Cajal body-specific RNAs characterizes distinct molecular subtypes of multiple myeloma," *Blood Cancer J.*, vol. 2, no. 11, 2012, doi: 10.1038/bcj.2012.41.
- [136] X. Y. Dong *et al.*, "SnoRNA U50 is a candidate tumor-suppressor gene at 6q14.3 with a mutation associated with clinically significant prostate cancer," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 17, no. 7, 2008, doi: 10.1093/hmg/ddm375.
- [137] X. Y. Dong *et al.*, "Implication of snoRNA U50 in human breast cancer," J. Genet. Genomics, vol. 36, no. 8, 2009, doi: 10.1016/S1673-8527(08)60134-4.
- [138] L. Aravind and E. V. Koonin, "The DNA-repair protein AlkB, EGL-9, and leprecan define new families of 2-oxoglutarate- and iron-dependent dioxygenases," *Genome Biol.*, vol. 2, no. 3, 2001, doi: 10.1186/gb-2001-2-3-research0007.
- [139] T. F. H. R. P. H. T. L. B. S. Sarah C. Trewick, "Oxidative demethylation by Escherichia coli AlkB directly reverts DNA base damage," *Nature*, pp. 174–1778, 2002.
- [140] T. W. Roy and A. S. Bhagwat, "Kinetic studies of Escherichia coli AlkB using a new fluorescence-based assay for DNA demethylation," *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, no. 21, 2007, doi: 10.1093/nar/gkm1031.
- [141] P. Falnes, "Repair of 3-methylthymine and 1-methylguanine lesions by bacterial and human AlkB proteins," *Nucleic Acids Res.*, vol. 32, no. 21, 2004, doi: 10.1093/nar/gkh964.
- [142] Y. Wang *et al.*, "A high-Throughput screening method for evolving a demethylase enzyme with improved and new functionalities," *Nucleic Acids Res.*, vol. 49, no. 5, 2021, doi: 10.1093/nar/gkaa1213.
- [143] G. Zheng, Y. Fu, and C. He, "Nucleic acid oxidation in DNA damage repair and epigenetics," *Chemical Reviews*, vol. 114, no. 8. 2014, doi: 10.1021/cr400432d.
- [144] J. B. Russell and G. M. Cook, "Energetics of bacterial growth: Balance of anabolic and catabolic reactions," *Microbiological Reviews*, vol. 59, no. 1. 1995, doi: 10.1128/mmbr.59.1.48-62.1995.
- [145] A. Choi and A. Barrientos, "Sucrose Gradient Sedimentation Analysis of Mitochondrial Ribosomes," in *Methods in Molecular Biology*, vol. 2192, 2021.
- [146] R. F. dos Santos, C. M. Arraiano, and J. M. Andrade, "Isolation and analysis of bacterial ribosomes through sucrose gradient ultracentrifugation," in *Methods in Molecular Biology*, vol. 2106, 2020.
- [147] A. Panda, J. Martindale, and M. Gorospe, "Polysome Fractionation to Analyze mRNA Distribution Profiles," *BIO-PROTOCOL*, vol. 7, no. 3, 2017, doi: 10.21769/bioprotoc.2126.
- [148] Y. Chikashige *et al.*, "Gcn2 eIF2α kinase mediates combinatorial translational regulation through nucleotide motifs and uORFs in target mRNAs," *Nucleic Acids Res.*, vol. 48, no. 16, 2020, doi: 10.1093/nar/gkaa608.
- [149] E. S. Pringle, C. McCormick, and Z. Cheng, "Polysome Profiling Analysis of mRNA and Associated Proteins Engaged in Translation," *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, vol. 125, no. 1, 2019, doi: 10.1002/cpmb.79.
- [150] S. Liang *et al.*, "Polysome-profiling in small tissue samples," *Nucleic Acids Res.*, vol. 46, no. 1, 2018, doi: 10.1093/NAR/GKX940.
- [151] Z. N. Karamysheva *et al.*, "Polysome profiling in Leishmania, human cells and mouse testis," *J. Vis. Exp.*, vol. 2018, no. 134, 2018, doi: 10.3791/57600.
- [152] H. Y. Jin and C. Xiao, "An integrated polysome profiling and ribosome profiling method to investigate in vivo translatome," in *Methods in Molecular Biology*, vol. 1712, 2018.
- [153] S. Aboulhouda, R. Di Santo, G. Therizols, and D. Weinberg, "Accurate, Streamlined Analysis of mRNA Translation by Sucrose Gradient Fractionation," *BIO-PROTOCOL*, vol. 7, no. 19, 2017, doi: 10.21769/bioprotoc.2573.
- [154] M. Kudla and F. V. Karginov, "Measuring mRNA translation by polysome profiling," in *Methods in Molecular Biology*, vol. 1421, 2016.
- [155] M. D. Faye, T. E. Graber, and M. Holcik, "Assessment of selective mRNA translation in

mammalian cells by polysome profiling," J. Vis. Exp., no. 92, 2014, doi: 10.3791/52295.

- [156] L. Coudert, P. Adjibade, and R. Mazroui, "Analysis of translation initiation during stress conditions by polysome profiling," *J. Vis. Exp.*, no. 87, 2014, doi: 10.3791/51164.
- [157] K. Bąkowska-Żywicka, A. M. Mleczko, M. Kasprzyk, P. Machtel, M. Żywicki, and T. Twardowski, "The widespread occurrence of tRNA-derived fragments in Saccharomyces cerevisiae," *FEBS Open Bio*, vol. 6, no. 12, 2016, doi: 10.1002/2211-5463.12127.
- [158] M. Zywicki, K. Bakowska-Zywicka, and N. Polacek, "Revealing stable processing products from ribosome-associated small RNAs by deep-sequencing data analysis," *Nucleic Acids Res.*, vol. 40, no. 9, 2012, doi: 10.1093/nar/gks020.
- [159] M. Walkowiak, A. M. Mleczko, and K. Bąkowska-Żywicka, "Evaluation of methods for the detection of low-abundant snoRNA-derived small RNAs in Saccharomyces cerevisiae," *Biotechnologia*, vol. 97, no. 1, 2016, doi: 10.5114/bta.2016.58540.
- [160] P. J. Pietras, A. Wasilewska-Burczyk, K. Pepłowska, Ł. Marczak, A. Tyczewska, and K. Grzywacz, "Dynamic protein composition of Saccharomyces cerevisiae ribosomes in response to multiple stress conditions reflects alterations in translation activity," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 268, May 2024, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.132004.
- [161] M. T. Couvillion, G. Bounova, E. Purdom, T. P. Speed, and K. Collins, "A Tetrahymena Piwi Bound to Mature tRNA 3' Fragments Activates the Exonuclease Xrn2 for RNA Processing in the Nucleus," *Mol. Cell*, vol. 48, no. 4, 2012, doi: 10.1016/j.molcel.2012.09.010.
- [162] A. G. Hinnebusch and J. R. Lorsch, "The mechanism of eukaryotic translation initiation: New insights and challenges," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 4, no. 10, 2012, doi: 10.1101/cshperspect.a011544.
- [163] R. J. Jackson, C. U. T. Hellen, and T. V. Pestova, "The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 11, no. 2. 2010, doi: 10.1038/nrm2838.
- [164] H. D. Li, J. Zagorski, and M. J. Fournier, "Depletion of U14 small nuclear RNA (snR128) disrupts production of 18S rRNA in Saccharomyces cerevisiae.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 10, no. 3, 1990, doi: 10.1128/mcb.10.3.1145.
- [165] L. hu Qu *et al.*, "U24, a novel intron-encoded small nucleolar RNA with two 12 nt long, phylogenetically conserved complementaritiesm to 28S rRNA," *Nucleic Acids Res.*, vol. 23, no. 14, 1995, doi: 10.1093/nar/23.14.2669.
- [166] D. Piekna-Przybylska, W. A. Decatur, and M. J. Fournier, "New bioinformatic tools for analysis of nucleotide modifications in eukaryotic rRNA," *RNA*, vol. 13, no. 3, 2007, doi: 10.1261/rna.373107.
- [167] D. A. Samarsky and M. J. Fournier, "A comprehensive database for the small nucleolar RNAs from Saccharomyces cerevisiae," *Nucleic Acids Research*, vol. 27, no. 1. 1999, doi: 10.1093/nar/27.1.161.
- [168] T. M. Lowe and S. R. Eddy, "A computational screen for methylation guide snoRNAs in yeast," *Science* (80-.)., vol. 283, no. 5405, 1999, doi: 10.1126/science.283.5405.1168.
- [169] C. Torchet, G. Badis, F. Devaux, G. Costanzo, M. Werner, and A. Jacquier, "The complete set of H/ACA snoRNAs that guide rRNA pseudouridylations in Saccharomyces cerevisiae," *RNA*, vol. 11, no. 6, 2005, doi: 10.1261/rna.2100905.
- [170] P. Schattner, W. A. Decatur, C. A. Davis, M. Ares, M. J. Fournier, and T. M. Lowe, "Genomewide searching for pseudouridylation guide snoRNAs: Analysis of the Saccharomyces cerevisiae genome," *Nucleic Acids Res.*, vol. 32, no. 14, 2004, doi: 10.1093/nar/gkh768.
- [171] C. T. Y. Chan, M. Dyavaiah, M. S. DeMott, K. Taghizadeh, P. C. Dedon, and T. J. Begley, "A quantitative systems approach reveals dynamic control of tRNA modifications during cellular stress," *PLoS Genet.*, vol. 6, no. 12, 2010, doi: 10.1371/journal.pgen.1001247.
- [172] R. Ougland *et al.*, "AlkB restores the biological function of mRNA and tRNA inactivated by chemical methylation," *Mol. Cell*, vol. 16, no. 1, 2004, doi: 10.1016/j.molcel.2004.09.002.
- [173] S. Honda, T. Kawamura, P. Loher, K. Morichika, I. Rigoutsos, and Y. Kirino, "The biogenesis

pathway of tRNA-derived piRNAs in Bombyx germ cells," *Nucleic Acids Res.*, vol. 45, no. 15, 2017, doi: 10.1093/nar/gkx537.

- [174] F. Liu *et al.*, "ALKBH1-Mediated tRNA Demethylation Regulates Translation," *Cell*, vol. 167, no. 3, 2016, doi: 10.1016/j.cell.2016.09.038.
- [175] A. G. Arimbasseri *et al.*, "Evolving specificity of tRNA 3-methyl-cytidine-32 (m3C32) modification: A subset of tRNAsSer requires N6-isopentenylation of A37," *RNA*, vol. 22, no. 9, 2016, doi: 10.1261/rna.056259.116.
- [176] M. Ryckelynck, R. Giegé, and M. Frugier, "Yeast tRNAAsp charging accuracy is threatened by the N-terminal extension of aspartyl-tRNA synthetase," J. Biol. Chem., vol. 278, no. 11, 2003, doi: 10.1074/jbc.M211035200.
- [177] A. Fiselier, B. Byeon, Y. Ilnytskyy, O. Kovalchuk, and I. Kovalchuk, "Scatter Irradiation of Rat Brain Triggers Sex- and Brain Region-Specific Changes in the Expression of Non-Coding RNA Fragments," *Epigenomes*, vol. 6, no. 4, 2022, doi: 10.3390/epigenomes6040035.
- [178] M. Kuang et al., "tRNA-based prognostic score in predicting survival outcomes of lung adenocarcinomas," Int. J. Cancer, vol. 145, no. 7, 2019, doi: 10.1002/ijc.32250.
- [179] K. Kawakami *et al.*, "A rare tRNA-Arg(CCU) that regulates Ty1 element ribosomal frameshifting is essential for Ty1 retrotransposition in Saccharomyces cerevisiae," *Genetics*, vol. 135, no. 2, 1993, doi: 10.1093/genetics/135.2.309.
- [180] T. E. Dever and R. Green, "The elongation, termination, and recycling phases of translation in eukaryotes," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 4, no. 7, 2012, doi: 10.1101/cshperspect.a013706.
- [181] B. Rothé et al., "Characterization of the interaction between protein Snu13p/15.5K and the Rsa1p/NUFIP factor and demonstration of its functional importance for snoRNP assembly," *Nucleic Acids Res.*, vol. 42, no. 3, 2014, doi: 10.1093/nar/gkt1091.
- [182] P. Grzechnik *et al.*, "Nuclear fate of yeast snoRNA is determined by co-transcriptional Rnt1 cleavage," *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 1, 2018, doi: 10.1038/s41467-018-04094-y.
- [183] B. El Yacoubi, M. Bailly, and V. De Crécy-Lagard, "Biosynthesis and function of posttranscriptional modifications of transfer RNAs," *Annu. Rev. Genet.*, vol. 46, 2012, doi: 10.1146/annurev-genet-110711-155641.
- [184] P. C. Thiaville and V. de Crécy-Lagard, "The emerging role of complex modifications of tRNALysUUU in signaling pathways," *Microb. Cell*, vol. 2, no. 1, 2015, doi: 10.15698/mic2015.01.185.
- [185] V. F. Reichle, V. Weber, and S. Kellner, "NAIL-MS in E. coli Determines the Source and Fate of Methylation in tRNA," *ChemBioChem*, vol. 19, no. 24, 2018, doi: 10.1002/cbic.201800525.
- [186] M. Heiss, F. Hagelskamp, V. Marchand, Y. Motorin, and S. Kellner, "Cell culture NAIL-MS allows insight into human tRNA and rRNA modification dynamics in vivo," *Nat. Commun.*, vol. 12, no. 1, 2021, doi: 10.1038/s41467-020-20576-4.
- [187] T. Heyman, B. Agoutin, C. Fix, G. Dirheimer, and G. Keith, "Yeast serine isoacceptor tRNAs: Variations of their content as a function of growth conditions and primary structure of the minor tRNASerGCU," *FEBS Lett.*, vol. 347, no. 2–3, 1994, doi: 10.1016/0014-5793(94)00524-9.
- [188] D. Tollervey, J. A. Wise, and C. Guthrie, "A U4-like small nuclear RNA is dispensable in yeast," *Cell*, vol. 35, no. 3 PART 2, 1983, doi: 10.1016/0092-8674(83)90108-3.
- [189] C. Giorgi, A. Fatica, R. Nagel, and I. Bozzoni, "Release of U18 snoRNA from its host intron requires interaction of Nop1p with the Rnt1p endonuclease," *EMBO J.*, vol. 20, no. 23, 2001, doi: 10.1093/emboj/20.23.6856.
- [190] G. Chanfreau, G. Rotondo, P. Legrain, and A. Jacquier, "Processing of a dicistronic small nucleolar RNA precursor by the RNA endonuclease Rnt1," *EMBO J.*, vol. 17, no. 13, 1998, doi: 10.1093/emboj/17.13.3726.
- [191] J. Esguerra, J. Warringer, and A. Blomberg, "Functional importance of individual rRNA 2'-Oribose methylations revealed by high-resolution phenotyping," *RNA*, vol. 14, no. 4, 2008, doi: 10.1261/rna.845808.