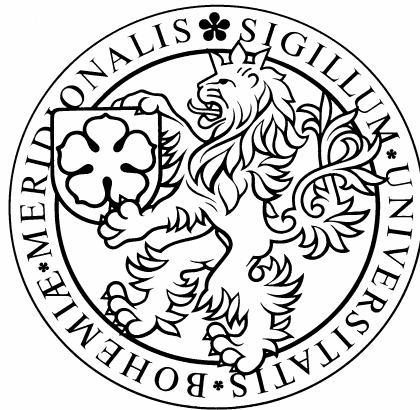


**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**



**Riboswitch jako všestranný kontrolní element
genové exprese**

(literární rešerše)

Bakalářská práce

Vypracoval: Michaela Veselíková
Vedoucí práce: RNDr. Silvie Trantírková, PhD.

České Budějovice, 2008

Veselíková, M., 2008: Riboswitch jako všestranný kontrolní element genové exprese [Riboswitch as a versatile gene control element. Bc. Thesis, in Czech.] – 36 p., Faculty of Biological Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Byla provedena literární rešerše na téma riboswitch. Práce je zaměřena na devět základních skupin regulačního systému „riboswitch“ a dvě skupiny syntetických aptamerů.

Anotation:

Background research of riboswitch issue was made. This thesis is focused on nine basic groups of riboswitch regulatory system and two groups of synthetic aptamers.

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat své školitelce za čas, cenné rady a poučení. Nemohu opomenout kolegy a přátele, jimž vděčím za energii a povzbuzení v náročných momentech. Svě spolubydlící, Terezce Stachové, děkuji za podnětné připomínky.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou diplomovou práci vypracovala samostatně pouze s použitím citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s §47 b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě, elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích, dne 25.4.2008

Michaela Veselíková

OBSAH

1. ÚVOD	3
2. OBECNÁ CHARAKTERISTIKA LIGAND-VÁZAJÍCÍ MOLEKULY RNA	3
3. STRUKTURA A MECHANISMUS REGULACE	8
3.1 PURINOVÉ RIBOSWITCHE.....	8
3.2 THIAMINPYROFOSFÁTOVÝ RIBOSWITCH (TPP)	10
3.3 FLAVIN MONONUKLEOTIDOVÝ RIBOSWITCH (FMN).....	11
3.4 KOENZYM B ₁₂ RIBOSWITCH (ADOCBL).....	13
3.5 S-ADENOSYLMETHIONINOVÝ RIBOSWITCH (SAM).....	15
3.6 LYSINOVÝ RIBOSWITCH	16
3.7 GLUKOSAMIN-6-FOSFÁTOVÝ RIBOSWITCH (GLMS).....	18
3.8 GLYCINOVÝ RIBOSWITCH	20
3.9 7-AMINOETHYL 7-DEZAGUANINOVÝ RIBOSWITCH (PREQ ₁)	21
3.10 TANDEMOVÉ RIBOSWITCHE	22
3.11 SYNTETICKÉ APTAMERY	23
3.12 JINÉ SYSTÉMY RNA OLIGONUKLEOTIDŮ S REGULAČNÍ FUNKCÍ	25
3.12.1 REAKCE NA METABOLITY SKRZE tRNA-MRNA INTERAKCI.....	26
3.12.2 RNA TEPLOMĚR.....	26
3.13 HLEDÁNÍ DALŠÍCH SEKVENCÍ POMOCÍ IN SILICO PŘÍSTUPU	27
4. PERSPEKTIVY.....	28
5. PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY	30

1. ÚVOD

Předpokladem úspěšného přežití řady organismů je schopnost odpovídajícím způsobem reagovat na změny okolního prostředí. Takovátó reakce spočívá v regulaci exprese proteinových kaskád.

Regulační funkce je tradičně přisuzována proteinům, je však možné, že původními katalyzátory byly samotné ribonukleové kyseliny. (Gilbert. 1986; Joyce. 2002) Jednou z možností regulace důležitých genů už na úrovni exprese jsou riboswitche. Právě tyto RNA kontrolní elementy nevyžadují asistenci proteinů. Jsou schopny reagovat na určitou koncentraci ligandu přímo, bez proteinových prostředníků. (Stormo & Ji. 2001)

Riboswitch je 5'netranslatovaný úsek (UTR) molekuly mRNA, který je schopen reagovat na přítomnost určité malé molekuly změnou své konformace a ovlivnit tak aktivitu genu. (Mandal & Breaker. 2004b) Funkcí riboswitche je pružně reagovat na změny koncentrace metabolitu tím, že změní úroveň exprese odpovídajícího genu a tudíž hladinu proteinu nebo častěji skupiny proteinů v buňce.

Riboswitch má dvě části: aptamer, který přímo váže ligand a expresní doménu (tzv. expression platform) což je část molekuly, která na navázání ligandu odpovídá změnou prostorové konformace a působí tak zablokování nebo spuštění exprese.

Změna konformace musí vyřadit z funkce vazebné místo pro ribozom (rbs – ribosomal binding site) a tím zamezit translaci, předčasně ukončit transkripci vytvořením vnitřní terminační vlásenky, popřípadě urychlit degradaci molekuly mRNA.

Aptamer je ta část molekuly riboswitche, která je zodpovědná za vazbu ligandu. Aptamer sám o sobě není schopen jakkoliv ovlivnit expresi, jedině ve spojení s expresní doménou můžeme pozorovat efekt „zapnutí/vypnutí“ na expresi sledovaného genu.

Byly vytvořeny syntetické struktury (nazvány též aptamery) s analogickými schopnostmi, jako má přírodní riboswitch. (Mairal & Özalp. 2007) Aptamer přirozeně se vyskytujících riboswitchů je několikanásobně větší oproti aptamerům syntetickým a to i v případě, že reagují na stejný nízkomolekulární ligand a mají k němu srovnatelně vysokou afinitu. (Schwalbe et al. 2007) Více informací o syntetizovaných aptamerech a jejich dalším využití podáváme v kapitole 3.11.

2. OBEČNÁ CHARAKTERISTIKA LIGAND-VÁZAJÍCÍ MOLEKULY RNA

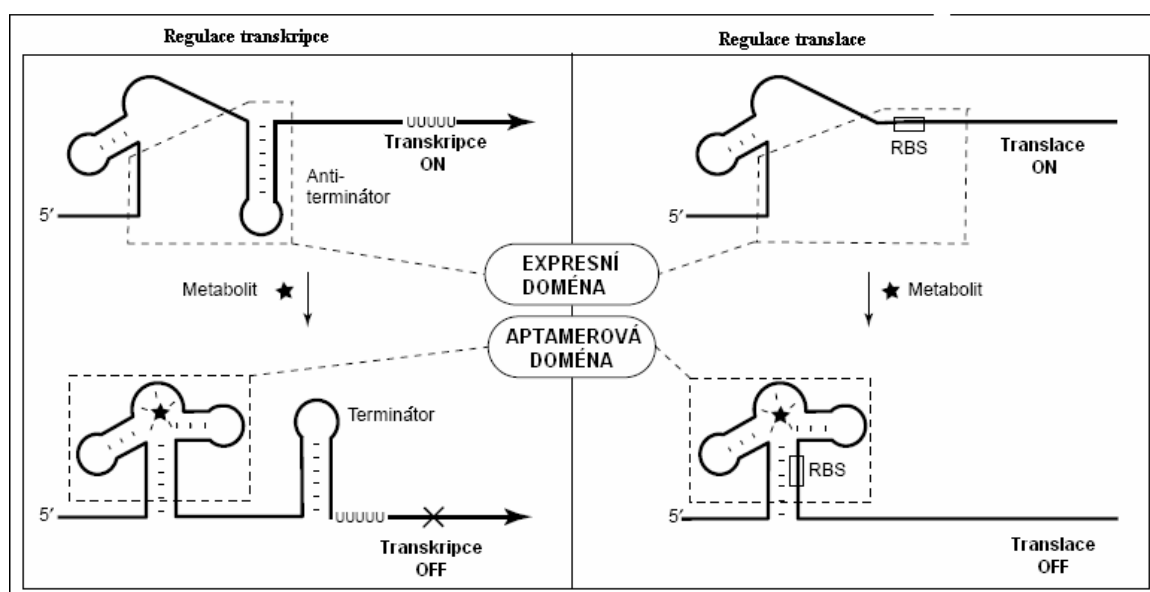
Bakterie využívají riboswitche citlivé na nízkomolekulární ligand pro kvantifikaci metabolického stavu buňky. Buňka je tak schopna zjistit koncentrace jednotlivých metabolitů a reagovat úpravou exprese souvisejících genů.

Regulační prvky přítomné v 5' UTR transkriptů reagují na vnitrobuněčné metabolické signály změnou konformace. Tyto strukturální změny pak zpětně kontrolují expresi genů.

Každý známý riboswitch má dvě části – aptamerovou doménu, která je vysoce konzervovaná na úrovni sekvence i struktury u širokého škály příbuzných organismů. Samotné konformační změny vedoucí ke změně exprese se dějí v expresní doméně situované bezprostředně za aptamerem, tedy tzv. downstream. Za vazbu samotného ligandu odpovídá výhradně aptamer, nezávisle na přítomnosti expresní domény nebo pomocného proteinu. Délka aptamerové domény je v rozpětí 70 – 200 nukleotidů, expresní doména je pak mnohem rozmanitější v sekvenci, struktuře i velikosti.

Riboswitche jsou svou strukturou a mechanismem funkce rozmanité. Většinou jsou to negativní regulátory genové exprese, což znamená, že přítomnost ligandu má na expresi tlumivý až inhibiční účinek, tzv. „OFF“ (zamezí expresi genu).

Mechanismy účinku jsou v zásadě dvojí v závislosti na poloze aptameru vzhledem ke start kodonu. První reguluje transkripci tím, že po navázání ligandu zformuje vnitřní terminační vlásečku. Terminační vlásečka je rozšířená „stonek-smyčka“ struktura po níž následuje šest či více uracilů. Tato smyčka ukončí předčasně transkripci tím, že uvolní RNA polymerázu



Obr.1: Schematické znázornění mechanismů regulace exprese downstream genu pomocí riboswitche. RBS – ribosomal binding site. Převzato z Tucker & Breaker. 2005

z templátového řetězce ještě před dokončením smysluplného transkriptu, který by mohl být bezprostředně translatován přítomnými ribozomy. (viz Obr.1)

Další mechanismus regulace funguje na úrovni iniciace translace. Navázání ligandu způsobí přestavbu celé expresní domény tak, že zamezí přístup ribozomu k rbs – místě navázání ribozomu a zahájení translace proteinu.

Speciálním případem je pak riboswitch s katalytickou funkcí – glmS (vázající glukosamin-6-fosfát). Funguje mechanismem degradace mRNA v přítomnosti ligandu (tedy spíše jako ribozym).

Další detaily k mechanismu funkce budou uvedeny u konkrétního riboswitchu.

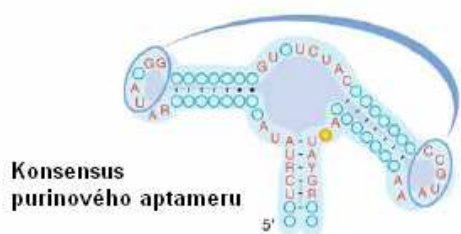
V přírodě je známo více než deset ligandů pro něž existuje riboswitch. Dále existuje skupina oligonukleotidů, která je od přirozeně se vyskytujících riboswitchů přímo odvozena a to jsou syntetické aptamery – tetracyklinový, theophyllinový a mnoho dalších. Tyto oligonukleotidy jsou získávány pomocí technologie SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment) (Mairal & Özalp. 2007)

Schopnost aptameru vázat ligand je kvantifikována pomocí disociační konstanty – K_D , udává se v jednotkách koncentrace ligandu, na kterou je aptamer již schopen reagovat. K_D pro interakci RNA-ligand se pohybuje mezi 1 nM – 30 μ M, byly však již uvedeny i nižší hodnoty, pohybující se v řádech stovek pikomolů.

Riboswitchu můžeme rozdělit do dvou tříd podle typu prostorového uspořádání v přítomnosti ligandu. (Schwalbe et al. 2007)

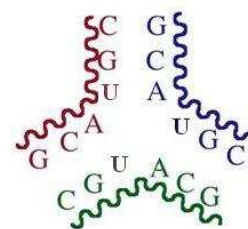
TYP I

Riboswitchu tohoto typu se vyznačují přítomností tzv. 3-way junction



Obr.3: Purinový aptamer se zřetelně patrnou formací 3-way junction, červeně jsou vyznačeny vysoce konzervované báze, žlutá kroužek označuje místo č. 74, které je obsazeno buď uracilem (váže adenin) nebo cytosinem (váže guanin). Převzato z Winkler & Breaker. 2005

(schematicky na obr. 2) ve své struktuře, příkladem může být purinový riboswitch (obr. 3).



Obr.2: Schematické znázornění struktury 3-way junction.

Vyskytuje se u něj jak standardní C-G (Watson-Crick párování) tak také nekanonické párování A-A a A-U.

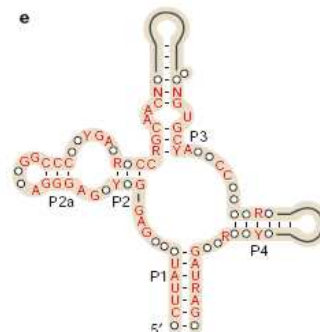
Podobné uspořádání můžeme pozorovat u TPP

(thiamin pyrofosfát) riboswitche, kde je trojcestný centrální motiv tvořen dvěma α -helixy a jednou tzv. stopkou. Navázání TPP je jednou z interakcí, která propojí helixová ramena a umožní molekule zaujmout aktivní konformaci. (Serganov & Yuan. 2004)

Do této třídy spadá také struktura glmS (systém vázající glukosamin-6-fosfát) ribozymu. V tomto případě však není 3-way uspořádání rozhodujícím funkčním prvkem terciární struktury.

TYP II

Typickým představitelem této třídy je SAM (S-adenosylmethionin) riboswitch jehož struktura má tzv. 4-way uspořádání (viz Obr. 4). Kolem tohoto čtyřcestného centrálního elementu pozorujeme další struktury různého typu. Toto uspořádání drží dvě části molekuly v úhlu 70° čímž tvoří vazebnou kapsu pro ligand. (Winkler et al. 2003b)



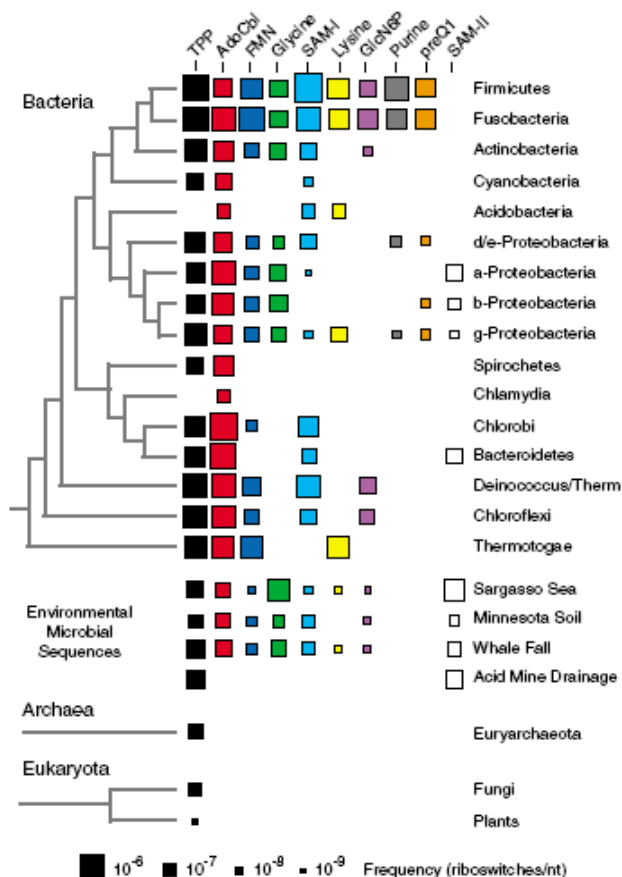
Obr.4: Konsensus SAM I riboswitche – typická struktura four way junction. Převzato z Mandal et al. 2004

2.1. VÝSKYT

Riboswitchem nazýváme přirozeně se vyskytující systém ligand - 5'UTR na vlákně mRNA. Riboswitche se jako přirozené součásti mRNA vyskytují převážně u prokaryotických organismů (viz. Tab 1), kde byly také objeveny a charakterizovány. U eukaryot byly nalezeny sekvence podobné TPP riboswitchi, ale s mírně odlišným mechanismem regulace. (Sudarsan N et al. 2003a) Riboswitche vždy leží v blízkosti nebo přímo přiléhají ke genům zodpovědným za syntézu nebo transport jejich ligandu.

Nejrozšířenější skupinou riboswitchů je AdoCbl, dalšími velmi rozšířenými

Tab.1: Výskyt jednotlivých systémů regulace napříč systémem bakterií, ve skupinách Archaea a Eukaryota, a v mikrobiálních sekvencích získaných z prostředí. Převzato z Barrick & Breaker. 2007



skupinami jsou pak TPP, FMN a SAM I. Glycinový a lysinový systém vykazuje roztroušený výskyt. Ostatní skupiny riboswitchů (preQ1, GlcN6P (glmS), puriny a SAM II) jsou identifikovány jen u některých bakteriálních kmenů. (Barrick & Breaker. 2007) Přibližný odhad zastoupení jednotlivých systémů v bakteriálních kmenech zobrazuje tab.1, přehled jednotlivých tříd pak podává tab. 2.

OBECNÁ CHARAKTERISTIKA LIGAND-VÁZAJÍCÍ MOLEKULY RNA

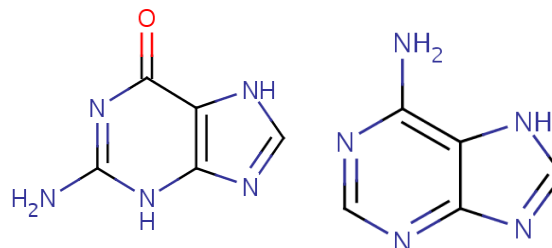
Tab.2: Přehled jednotlivých tříd riboswitchů, jejich ligandů, mechanismů regulace a základních referencí. Dále je ke každému systému uvedena orientační hodnota K_D .

	Typ switche	Ligand	Organismus	Mechanismus regulace	ON/OFF	Reference	K_D	
Riboswitch	Typ I	adenin	B. subtilis	aktivace translace	ON	Mandal et al. 2003	5 nM	
		guanin		antiterminace transkripce	ON			
				terminace transkripce	OFF			
			TPP	Rhizobium etli	zablokování translace	OFF	Sudarsan et al. 2003	50 nM
			Glycin	B. subtilis	aktivace transkripce	ON	Mandal et al. 2004	10 μ M
	Typ II		Coenzym B12	E. coli, S. typhimurium	terminace transkripce	OFF	Nahvi et al. 2004	300 μ M
					zablokování translace	OFF		
			FMN	20 druhů G+ i G- bakterií	terminace transkripce	OFF	Vitreschak et al. 2002	5 nM
			Lysin	B. subtilis	terminace transkripce	OFF	Sudarsan et al. 2003 b	1 μ M
				zablokování translace	OFF			
	SAM I SAM II	B. subtilis	terminace transkripce	OFF	Winkler et al. 2003 (SAM I) Corbino et al. 2005 (SAM II)	4 nM		
	PreQ1	B. subtilis	terminace transkripce	OFF	Roth et al. 2007	770 pM		
			zablokování translace	OFF				
Ribozym	Typ I	GlcN6P	B. subtilis	degradace mRNA	OFF	Barrick et al. 2004	50 μ M (pH=9)	

3. STRUKTURA A MECHANISMUS REGULACE

3.1 PURINOVÉ RIBOSWITCHE

Jako ligandy v tomto systému fungují v organismu přítomné puriny – adenin a guanin (viz. Obr. 5), vzácně xanthin a hypoxanthin (Mandal et al. 2003) Největší objem experimentálních dat se týká právě purinových riboswitchů.

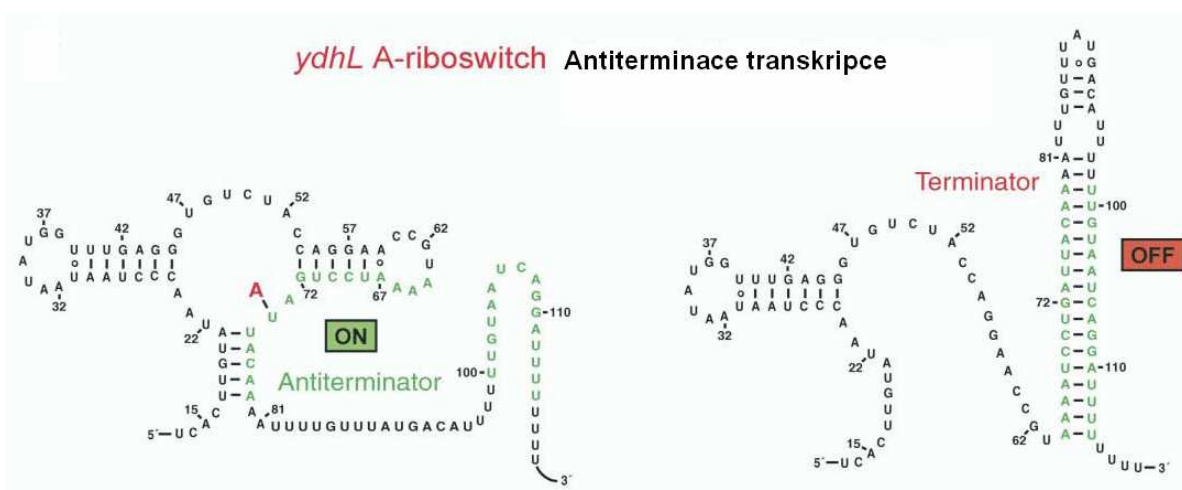


Obr.5: Schéma molekul purinových ligandů, guaninu a adeninu.

Patří mezi nejmenší riboswitche. Navzdory vysoké podobnosti svých ligandů vykazují vysokou afinitu k tomu svému a také silně odmítají analogy.

Výzkum na purin citlivých mRNA se zpočátku zaměřil na tři systémy. Byli to *xpt-pbuX* operon a *ydhL* (*pbuE*) u *B. subtilis*, a *add* gen pro adenindeaminázu u *C. perfringens* a *V.vulnificus*. Serganov et al. 2004

Add A-riboswitch funguje jako „ON“ regulátor translace *add* mRNA což znamená, že při vyšší koncentraci adeninu indukuje zformování dvouvláknového úseku, který uvolní zablokovanou SD (Shine-Dalgarnovu) sekvenci a start kodon čímž zvýší translaci *add* operonu. V nepřítomnosti adeninu je SD blokována párovou interakcí s částečnou GAA



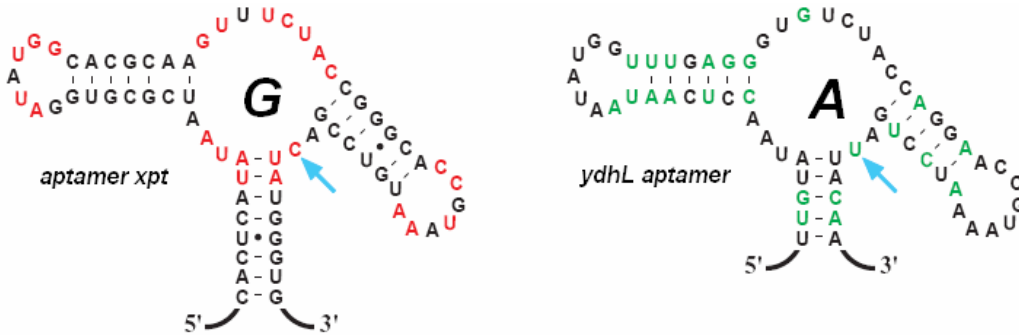
Obr.6: Regulace genové exprese pomocí zrušení terminační vlásky vazbou adeninu u riboswitche *ydhL*.
Převzato z Serganov & Yuan YR. 2004

sekvencí v aptameru. (Serganov et al. 2004)

Ačkoliv aptamery obou molekul vykazují vysokou podobnost, jejich expresní domény se velmi liší jak ve stavbě tak ve své funkci. Add A-riboswitch z *V. vulnificus* aktivuje translaci kdežto *pbuE* (*ydhL*) A-riboswitch z *B. subtilis* reguluje už transkripci. (viz. Obr. 6)

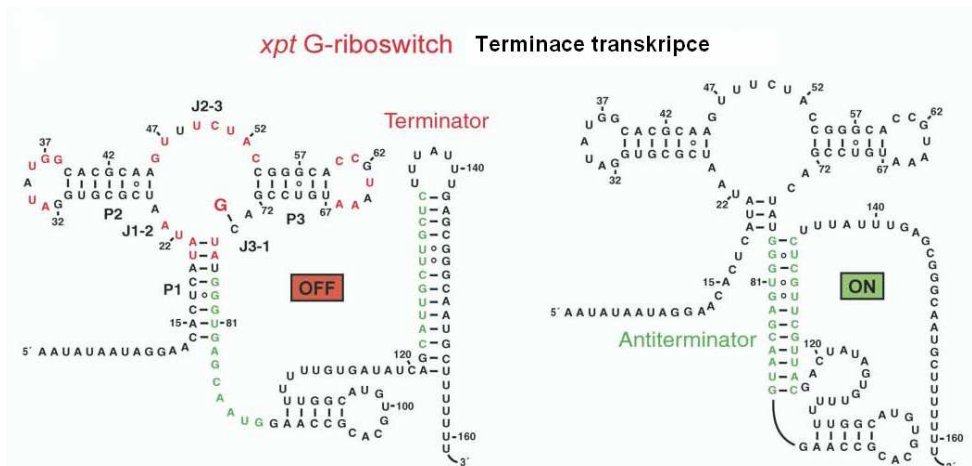
V nepřítomnosti adeninu zaujme vlákno tzv. „OFF“ stav, kdy se zformuje vnitřní terminační vlásenka a dojde k terminaci transkripce. V přítomnosti adeninu se vytvoří antiterminátor který umožní dokončení transkripce.

Biochemické studie 5' UTR oblasti operonu *xpt-pbuX* – guaninový riboswitch (Mandal et al. 2003) a genu *pbuE* (*ydhL*) – adeninový riboswitch (Mandal & Breaker. 2004) u *B. subtilis*



Obr.7: *xpt* guaninový aptamer a *pbuE* (*ydhL*) adeninový aptamer, šipka označuje bazi č. 74 která rozhoduje o specifické afinitě k ligandu. Mandal & Breaker. 2004

ukázaly, že se liší ve třech pozicích smyčky aptameru. Dvě z nich jsou variabilní a zjevně nemají vliv na afinitu k ligandu, avšak pozice č. 74 je u *xpt* obsazena C kdežto u *pbuE* (*ydhL*) je zde U. (viz. Obr.7) Dochází zde ke standardnímu Watson-Crick párování báze v poloze 74 a ligandu: C74 - guanin a U74 - adenin. Experimentální výměna jedné báze za druhou má pak vysoce průkazný vliv na afinitu k jednotlivým ligandům. (Mandal & Breaker. 2004) K dokonalé *in vitro* formaci komplexů je zapotřebí fyziologická koncentrace iontů Mg^{2+} (2mM). (Serganov & Yuan. 2004)

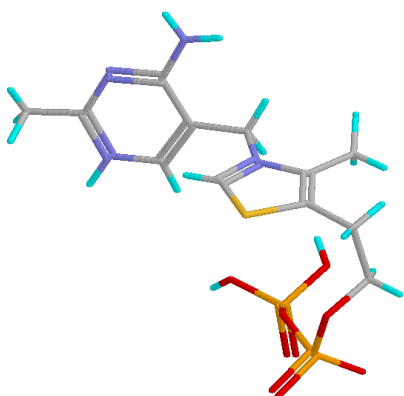


Obr.8: Schematický náčrt regulace transkripce pomocí *xpt* G-riboswitch, vysoce konzervované báze aptameru jsou vyznačeny červeně. Převzato z Serganov & Yuan YR. 2004

Xpt G-riboswitch ovlivňuje expresi genu regulací terminace transkripce (Mandal et al. 2003) V nepřítomnosti guaninu formuje expresní doména antiterminační vlásenku, která umožňuje

dokončit transkripci („ON“ stav). Guanin stabilizuje aptamer a způsobí formaci vnitřní terminační vlásenky („OFF“ stav). (viz Obr. 8) (Serganov & Yuan. 2004)

3.2 THIAMINPYROFOSFÁTOVÝ RIBOSWITCH (TPP)

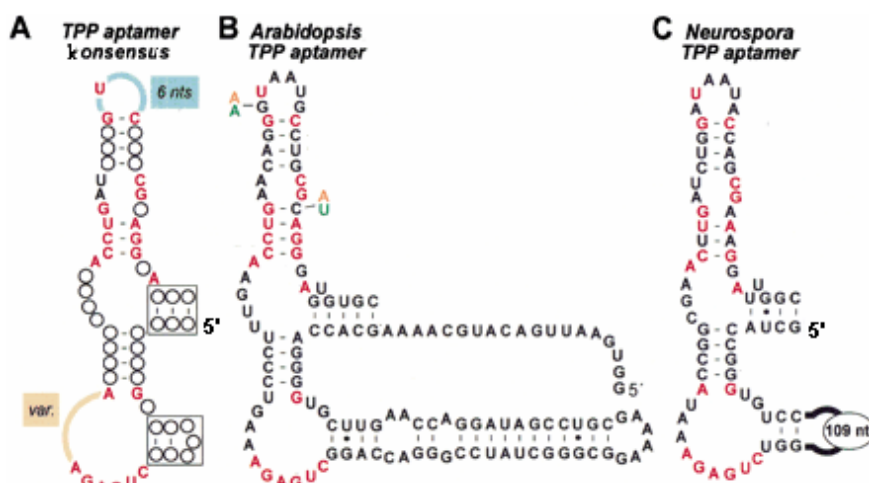


Obr.10: Model molekuly thiamin pyrofosfátu

Ligandem této RNA je thiamin pyrofosfát – aktivní forma thiaminu (vitamín B₁). (viz Obr. 10) Je to velmi podstatná látka pro správnou funkci organismu. Tvoří koenzym (neproteinovou část) pyruvát dehydrogenázy, pyruvát dekarboxylázy a několika dalších stěžejních enzymatických komplexů.

Tento druh riboswitche je nejrozšířenější mezi metabolity-rozeznávajícími RNA strukturami.

(Serganov et al. 2006) Jeho genetický motiv tzv. thi-box, byl nalezen jak ve většině známých eubakteriálních genomů, tak u Archeot, konkrétně rodu *Thermoplasma*. RNA sekvence vysoce analogické tomuto motivu byly navíc nalezeny u rostlin (*Arabidopsis thaliana*, *Oriza sativa*, *Poa secunda*) a hub (*Neurospora crassa*, *Fusarium oxysporum*) (Sudarsan et al. 2003). (viz Obr. 11) Thiamin-pyrofosfátový riboswitch je funkčně aktivní na úrovni translace.



Obr.11: Eukaryotní TPP riboswitche. A) Konsensus založený na bakteriální RNA, kroužky reprezentují vysoce variabilní oblasti. B) TPP aptamer u *Arabidopsis thaliana*, oranžově jsou vyznačeny rozdíly u *Oriza sativa* a zeleně pak u *Poa secunda*. C) TPP aptamer v intronu houby *Neurospora crassa*. Převzato z Sudarsan et al. 2003

V nepřítomnosti TPP je jednovláknová SD sekvence blokována vzdálenou interakcí anti-SD a anti-anti-SD sekvencí. S navázáním ligandu dojde k uvolnění anti-SD vlákna, které se pak páruje s SD sekvencí a ta je zablokována. (viz Obr. 12)

Jak prokaryotický tak eukaryotický TPP riboswitch vykazuje podobnou afinitu k ligandu. Disociační konstanty (K_D) se v obou případech pohybují kolem hodnoty 50 nM.

Konkrétně u bakterií se TPP riboswitch podílí na regulaci genů biosyntézy TPP a udržuje tak jeho fyziologickou hladinu v organismu.

Sekvence

homologních domén

nalezené u eukaryot

byly porovnány

s gram negativní

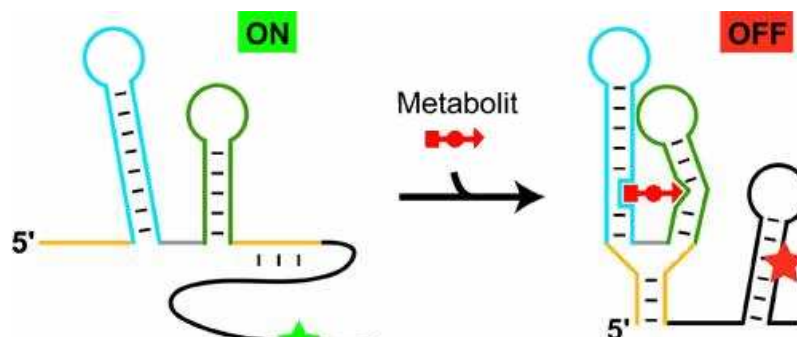
bakterií *E. coli* a gram

pozitivní *C.*

acetobutylicum.

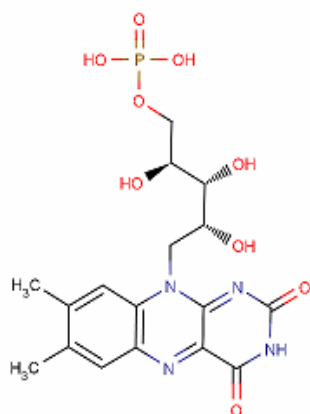
Analýza ukázala, že

jde o homologa genů *thiC* a *thiM* (*E.coli*) a *thiC* (*C. acetobutylicum*), které se podílí na biosyntéze thiamin fosfátu. (Begley. 1996)



Obr.12: Schematické znázornění funkce TPP riboswitchu, který v přítomnosti ligandu zablokuje iniciaci translace, různé části aptameru jsou barevně (šedá, oranžová, červená a zelená), expresní doména je černě. Zelená hvězdička označuje SD sekvenci připravenou k iniciaci translace, červená hvězdička značí konformační zablokování SD sekvence. Převzato z Serganov et al. 2006

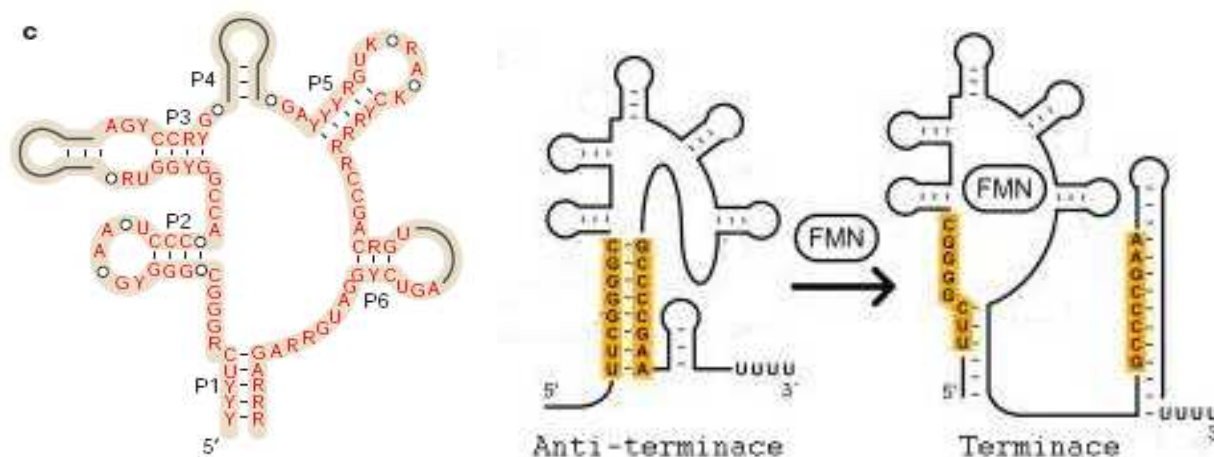
3.3 FLAVIN MONONUKLEOTIDOVÝ RIBOSWITCH (FMN)



Obr.13: Molekula flavinmononukleotidu (FMN).

Tento riboswitch se zdá být strukturně nejsložitější z riboswitchů. Je široce rozšířený mezi různými kmeny bakterií, u eukaryot nebyl nalezen. (Winkler. 2002a). Ligandem je biologicky aktivní flavinmononukleotid (riboflavin-5'-fosfát), který je součástí elektronových přenašečů FAD/FADH₂, FMN/FMNH₂ a hraje tak významnou roli v energetickém metabolismu buňky (viz obr. 13).

FMN riboswitch se nachází na mRNA genů pro transportní nebo biosyntetické proteiny riboflavinu a flavinmononukleotidu. U *B. subtilis* je tento element přítomen v 5' UTR genu *ribDEATH* (*ribD*) a jeho funkcí je v přítomnosti flavinmononukleotidu snižovat expresi genu



Obr.14: c) Strukturální model RFN elementu z FMN riboswitchu odvozený z fylogenetické analýzy prokaryotních mRNA sekvencí. Schéma mechanismu regulace transkripce vazbou anti-SD a anti-anti-SD sekvencí. Převzato z Mandal & Breaker, 2004b

Schéma mechanismu terminace transkripce v přítomnosti ligandu. Oranžově je vyznačena sekvence komplementární k terminátorové sekvenci. Převzato z Winkler, 2002a

ribD a regulovat tak biosyntézu ligandu.

Komplexnost aptameru zajišťuje 100 krát silnější vazbu FMN než jiných analogů např. riboflavinu, který se od FMN liší pouze nepřítomností jedné fosfátové skupiny. Dalším genem který využívá tento typ regulace je gen *ypaA* pro transportní protein riboflavinu u *B. subtilis*. Porovnáním RFN elementů v těchto mRNA byl nalezen sekvenční konsensus a byly ustanoveny konzervované oblasti. Struktura RFN elementu tvoří šest smyček, jejichž základny jsou nejvíce konzervovanou částí molekuly spolu s nukleotidy, které tvoří střední část. (viz Obr. 14c)

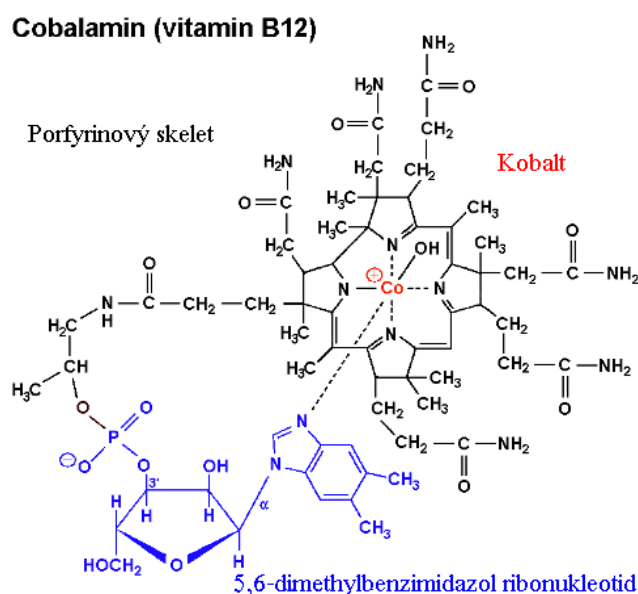
Mechanismus regulace je založen na zablokování SD sekvence v přítomnosti ligandu. RFN element je následován anti-SD a anti-anti-SD sekvencemi, které v přítomnosti ligandu přeruší vazbu a uvolní terminátor, který přeruší transkripci. (viz Obr.14 vpravo)

3.4 KOENZYM B₁₂ RIBOSWITCH (ADOCBL)

Adenosyl-kobalaminový riboswitch se nachází u široké škály bakteriálních kmenů v abundanci 1 – 13 lokusů na genom. Tento element je primárně přítomen u genů pro proteiny činné při syntéze kobalaminu, ale může regulovat i geny pro porfyrin a transportní proteiny kobaltu. Jeho aptamer je suverénně největší strukturou (202 bp) mezi dosud známými přírodními riboswitchy. Váže vysokomolekulární látku adenosyl-kobalamin (Mw = 1579,58) neboli vitamín B₁₂ (viz Obr. 15), což je koenzym mnoha zásadních enzymů a hraje významnou roli v metabolismu. Jeho nedostatek v těle může vést k mnoha různým poruchám, nejčastěji však k poruše krvetvorby a funkce nervového systému.

Počáteční ideu, že mRNA je sama schopna vázat ligand potvrdilo objevení právě tohoto riboswitchu v 5' UTR genu *btuB* u *E. coli*, jež ovlivňuje translaci v závislosti na hladině vitamínu B₁₂ v cytoplazmě. Fragment izolovaný z *E. coli* byl schopen vázat ligand s afinitou (K_D) rovnou přibližně 300 nM (Nahvi et al. 2004) Srovnatelné výsledky byly získány analýzou homologických sekvencí u *S. typhimurium*. (Nahvi et

al. 2002) Pozdější výsledky naznačují, že jsou tyto molekuly modulárního charakteru. Skládají se z určitých funkčních domén, které se v průběhu evoluce skládají a znova rozdělují.



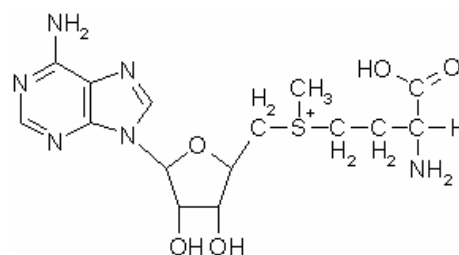
Obr.15: Adenosyl kobalamin je tvořen porfyrinovým skeletem s kobaltem jako centrálním atomem.

přibližně 57 nukleotidů, jejichž pozice je z 90% konzervována (viz Obr.16). Mechanismus regulace se liší u různých studovaných organismů, u některých dochází v přítomnosti B₁₂ k vytvoření terminační vlásenky a ukončení transkripce, jiné fungují na principu terminace translace zablokování rbs (viz Obr.17).

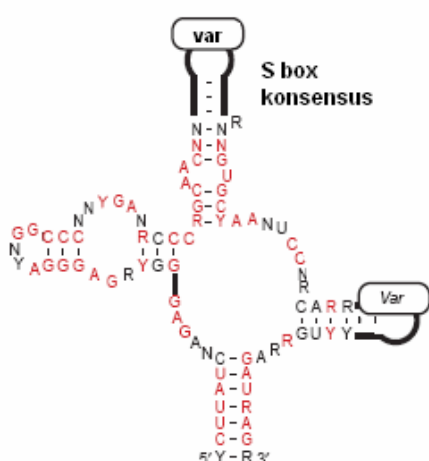
Struktura B₁₂ elementu byla pomocí *in silico* metod objevena v 67 bakteriálních genomech, což umožnilo konstrukci fylogenetického stromu, který sdužil Prokaryota podle přítomnosti různých B₁₂ domén a mechanismu regulace do skupin a ukázal tak přibližný směr vývoje tohoto regulačního systému.

3.5 S-ADENOSYLMETHIONINOVÝ RIBOSWITCH (SAM)

Tento systém využívá jako ligand S-adenosylmethionin (viz Obr. 18), obsahuje konzervovanou sekvenci, tzv. S box, který se nachází převážně v 5' UTR gram-pozitivních bakterií. (viz Obr. 19) (Winkler et al. 2003a) SAM riboswitch byl objeven u organismu *B. subtilis* jako regulační prvek pro regulon skládající se z 11 transkripčních jednotek. Tato mRNA kóduje 26 genů zodpovědných za metabolismus síry, biosyntézu a transport důležitých meziproductů pro



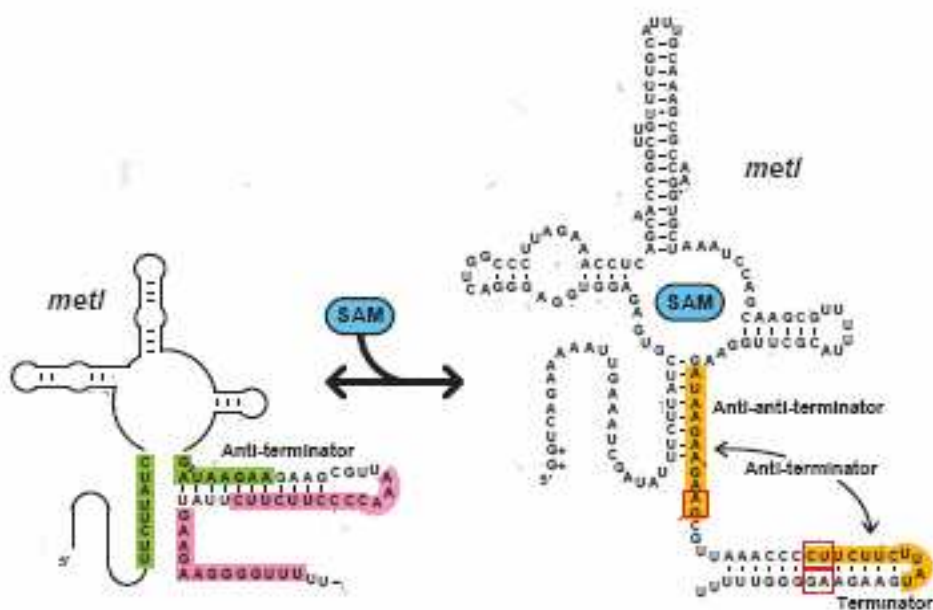
Obr.18: S-adenosylmethionin se skládá z adeninu, ribózy a methioninu



Obr.19: S-box, sekvence a model sekundární struktury SAM I riboswitche. Převazto z Mandal & Breaker. 2004b

syntézu cysteinu, methioninu a S-adenosylmethioninu.

Aptamerová doména izolovaná z *B.subtilis* má K_D přibližně 4 nM přestože celá molekula vykazuje K_D kolem 200nM. Její schopnost rozeznat a odmítnout příbuzné metabolity je u S-adenosylhomocysteinu asi stonásobná, u S-adenosylcysteinu až 10 000 násobná. Vazba riboswitch – SAM (1:1) je závislá na přítomnosti iontů Mg²⁺.



Obr.20: Sekvenční a strukturální model riboswitchu *metJ* ve dvou konformačních stavech. Zeleně zvýrazněné báze tvoří „stonek“ struktury, růžové pak anti-terminační vlásenku, oranžové báze tvoří terminační strukturu. Převzato z Winkler et al. 2003b

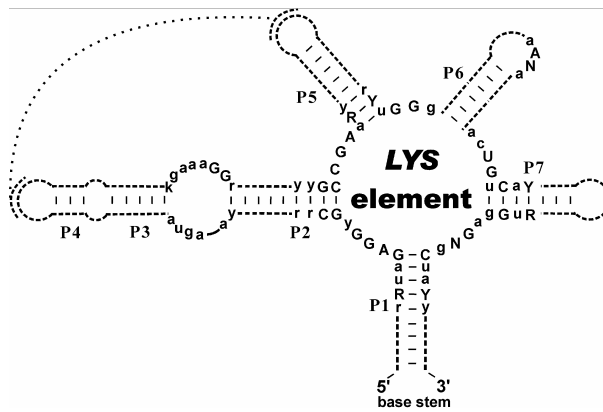
Vzhledem k poloze této sekvence bezprostředně před terminační vlásenkou je zřejmé, že aktivuje terminaci transkripce podobně jako už zmíněné TPP a FMN riboswitchu. Při nízké koncentraci SAM je zformována antiterminační struktura, která umožňuje produkci kompletních transkriptů. (viz Obr. 20)

Na S-adenosylmethionin jsou v bakteriálních genomech citlivé dvě struktury SAM I a SAM II. SAM I je rozšířenější a dříve objevenou třídou toho riboswitchu. Obě třídy se vyskytují hojně v bakteriích, nikoliv však oba systémy v jednom organismu. (Barrick & Breaker. 2007)

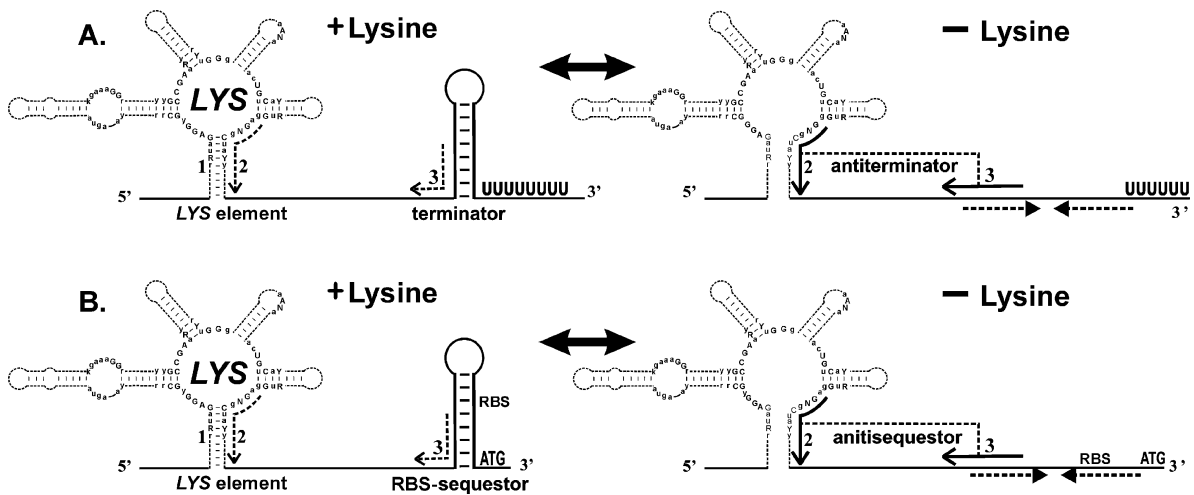
3.6 LYSINOVÝ RIBOSWITCH

Obsahuje specifický „L box“ neboli *LYS* element (viz Obr. 21) (Rodionov et al. 2003), který selektivně váže L-lysin. Tento motiv se nachází v 5' UTR genu *lysC* u *B. subtilis*. Gen *lysC* kóduje enzym aspartokinázu II, která katalyzuje první krok biosyntézy L-lysinu. Lysinový riboswitch se nachází také u *E. coli*, kde vykonává analogickou funkci jako u *B. subtilis*. (Patte et al. 1998)

Afinita (K_D) měřená pro minimální lysin-vázající aptamer (179 bp) je přibližně 1 μM , pro celou molekulu pak 500 μM , což odpovídá vysoké specifitě. (Sudarsan et al. 2003) Aptamer je schopen díky své struktuře velmi efektivně rozeznat chirální konformace (D-lysin) a blízké



Obr.21: Konsensus LYS elementu/ L-box motivu, přerušovaná čára symbolizuje libovolné nukleotidy, jsou zvýrazněny pouze baze konzervované. Byl získán analýzou a porovnáním sekvencí 71 Lys elementů v 37 prokaryotických organismech. P1-7 – značení vlásečkových struktur Převzato z Rodionov et al. 2003.



Obr.22: Pravděpodobné mechanismy funkce. A) Mechanismus regulace pomocí atenuace transkripce, v nepřítomnosti lysinu probíhá transkripce, v jeho přítomnosti se zformuje terminační vlásečka a dojde k atenuaci. Vyskytuje se u gram-pozitivních bakterií. B) Mechanismus regulace přes terminaci translace pomocí zablokování RBS – ribosome binding site v přítomnosti lysinu, platí pro gram-negativní bakterie. Převzato z Rodionov et al. 2003.

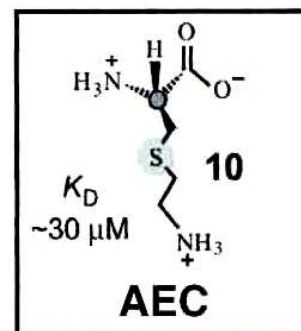
analogy lysinu jako jsou ornithin, homolysin nebo 5-hydroxylysin, nereaguje změnou konformace ani na dipeptidy Lys-Lys, Lys-Ala, Ala-Lys a Ala-Ala. Tyto dipeptidy způsobují alespoň určitou strukturní modulaci a to za zvláštních podmínek (6 M HCl, 115°C, 23 h) Sekvenční analýzou bylo zjištěno, že aptamer tvoří nejpravděpodobněji pětičetnou vlásečkovou strukturu kde jsou spárované domény tvořeny sekvencí 56 vysoce konzervovaných nukleotidů. (Sudarsan et al. 2003)

L-box v *lysC* se nachází přímo před terminační vlásečkou a skládá se asi z 200 bp. Mechanismy regulace se liší u různých skupin organismů.

Obecně pro grampozitivní bakterie platí schéma terminace transkripce kdežto pro gramnegativní schéma zablokování translace překrytím RBS. (viz Obr. 22) Je také známo, že tato poměrně rozšířená skupina riboswitchů reaguje na sloučeninu AEC (viz Obr.23), která je analogem lysinu a je vázána s afinitou asi 30 μM . Je to vlastně antimetabolit toxický pro mnohé bakterie nesoucí lysinový riboswitch. Působí jako ligand pro riboswitch místo lysinu a tím dereguluje metabolickou dráhu biosyntézy lysinu.

AEC-rezistentní kmeny *B. subtilis* nesou mutaci, která ruší funkci riboswitchu.

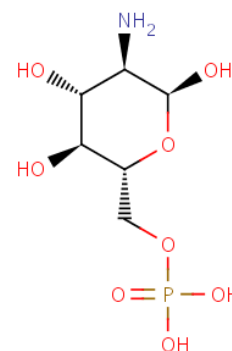
Toto je případ, který může pomoci v léčbě některých mikrobiálních onemocnění a upozorňuje na L-box jako na cílovou strukturu pro vývoj nových antibiotik.



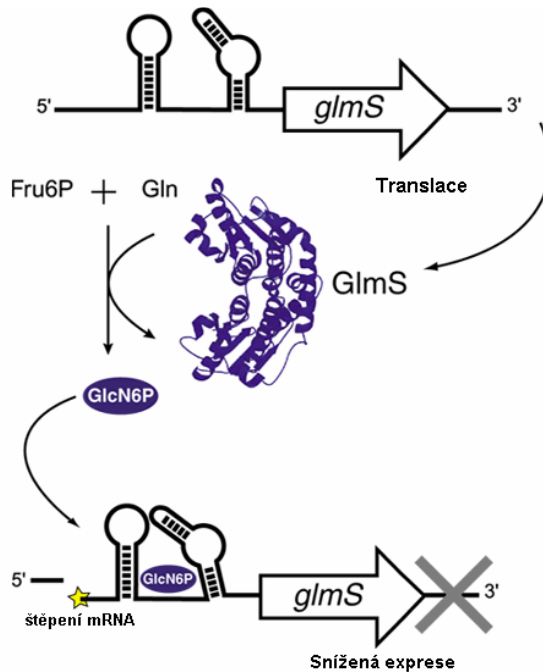
Obr.23: AEC – aminoethylkarbazol, látka používaná ve výzkumu jako chromofor; vykazuje vysokou afinitu vůči LYS/L-boxu. Převzato z Sudarsan et al. 2003.

3.7 GLUKOSAMIN-6-FOSFÁTOVÝ RIBOSWITCH (GLMS)

GlmS riboswitch se nachází v 5' netranslatované oblasti genu pro glukosamin-6-fosfát syntetázu (glmS), která katalyzuje štěpení glutaminu a fruktosa-6-fosfátu na glukosamin-6-fosfát (GlcN6P viz obr. 24). (Cochrane et al. 2006) Tato RNA struktura, obsahující primárně čtyři „stonek-smyčka“ oblasti, je přítomná před genem u mnoha Gram-pozitivních bakterií. Jejím ligandem je právě GlcN6P, jehož navázání způsobí aktivaci katalytického centra ribozymu a degradaci molekuly mRNA. Jako ostatní riboswitchu, vykonává takto negativní regulaci produkce enzymu v závislosti na koncentraci produktu štěpení. Mechanismus funkce je však odlišný od ostatních riboswitchů a tím, že navázání ligandu zahájí štěpení samotné molekuly mRNA se podobá ribozymům (viz Obr. 25). Štěpení probíhá stejně jako u ostatních katalytických molekul RNA (Fedor & Williamson.2005) Navázání ligandu na aptamer nemá žádné prokazatelné účinky na terciární strukturu expresní domény, jako je tomu u jiných skupin riboswitchů. Zdá se, že vazebná kapsa je zformována už předem, bez nutnosti interakce s ligandem, přesto je přítomnost ligandu základním předpokladem funkce systému. (Hampel & Tinsley. 2006; Winkler et al. 2004) Struktura ribozymu byla



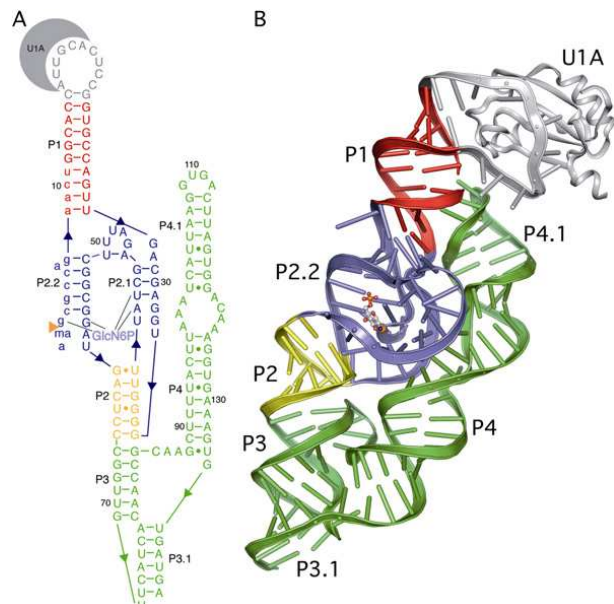
Obr.24: Molekula glukosamin-6-fosfátu (GlcN6P)



Obr.25: Schéma dráhy syntézy GlcN6P pomocí enzymu GlcN6P-syntetázy, která se v případě navázání ligandu na riboswitch přestává syntetizovat. Žlutá hvězdička v dolní části obrázku označuje místo štěpení mRNA. Převzato z Knudsen & Ellington. 2004

objasněna u dvou organismů, a to u *B. anthracis* (Cochrane et al. 2006) (viz Obr. 26) a *T. tencongenis* (Klein & Ferre-D'Amare. 2006) Katalytická činnost tohoto ribozymu je podpořena přítomností iontů Mg^{2+} , které se však neúčastní přímo katalýzy. Ionty Mg^{2+} , hydratované molekulami vody, zprostředkovávají vazbu ligandu podobně jako je tomu u thiaminpyrofosfátového riboswitchu. (Serganov et al. 2006)

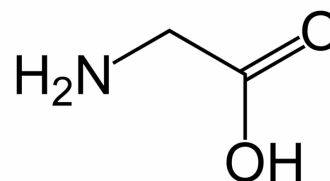
Mechanismus regulace však principiálně odpovídá jakémukoliv jinému riboswitchi, který po navázání ligandu zastaví nebo zablokuje další zpracování molekuly mRNA, jejíž je součástí.



Obr.26: Sekundární (A) a terciární struktura (B) GlmS ribozymu z organismu *B. anthracis*. Barevné oblasti si navzájem odpovídají, ligand je na obrázku B vyznačen šedočerveně. P1-4.1 značení vlásečkových struktur. Převzato z Cochrane et al. 2006

3.8 GLYCINOVÝ RIBOSWITCH

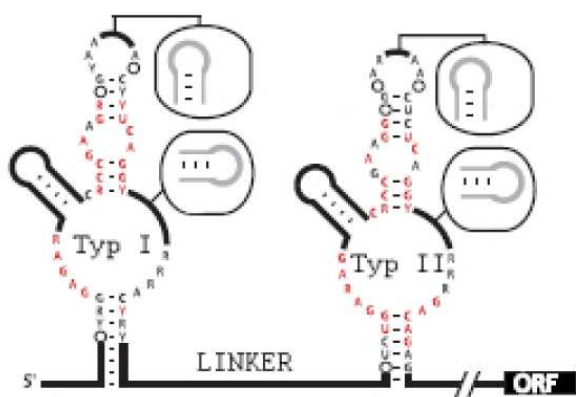
Jde o molekulu mRNA z organismu *B. subtilis* reagující na přítomnost glycinu (viz Obr. 27) konformační změnou. Je poslední z řady riboswitchů odpovídajících na aminokyseliny (lysin, SAM).



Obr.27: Vzorec glycinu

Struktura *gcvT* glycinového aptameru je oproti jiným riboswitchům význačná dvojitou vlásenkou. (viz Obr. 28) Dvě velmi podobné RNA struktury spojené krátkou spojující oblastí (short liker region) jsou konzervované v 5'UTR oblasti operonu (*gcvT-gcvPA-gcvPB*) kódujícího glycinovou katabolickou a transportní dráhu. (Mandal et al. 2004)

Konstrukty z *B. subtilis* a *V. cholerae* prokázaly, že na obě podjednotky aptameru se vždy



Obr.28: Sekvence přirozeného riboswitchu *gcvT* z *B. subtilis*, černé baze jsou z 80% konzervovány, červené z 95%, černá čára zastupuje nekonzervované sekvence. ORF – open reading frame; Linker – spojovací úsek. Převzato z Mandal et al. 2004.

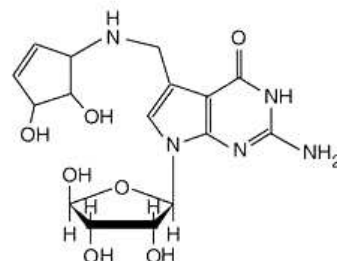
váže hned několik molekul glycinu. To vysvětluje kooperace obou podjednotek, která vede k několikanásobně vyšší afinitě k ligandu než je tomu u jednoduchých aptamerů. Pozoruhodně přesně aptamer odmítá vazbu s analogy glycinu – alaninem, serinem a glycyl-glycinem. Koncentrace ligandu potřebná k polovičnímu nasycení reakce (K_D) je pro glycin 10 μM , pro glycin-metyléster už 100 μM a pro další

analogy se pohybuje nad 1 mM. (Mandal et al. 2004) Tandemová architektura glycinového riboswitchu se vyznačuje jak vysokou selektivitou a afinitou k jednomu ligandu, tak vyšší rychlostí a přesností odpovědi.

Mechanismus regulace se podobá mechanismu adeninového riboswitchu v tom smyslu, že jde o „ON“ switch, který až v přítomnosti ligandu spouští blokovanou transkripci. V nepřítomnosti glycinu je expresní doména zformována do terminační vlásenky která předčasně ukončuje transkripci.

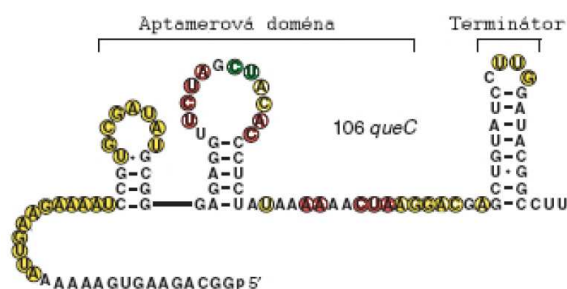
3.9 7-AMINOETHYL 7-DEZAGUANINOVÝ RIBOSWITCH (PREQ₁)

Posledním systémem je preQ₁ vázající riboswitch, součást 5' UTR operonu *ykvJKLM* u *B. subtilis*. (Reader et al. 2005) Jako ligand zde funguje produkt biosyntézy queosinu, 7-aminomethyl 7-dezaguanin neboli preQ₁. (Roth et al. 2007) Queosin (Q viz Obr. 29) je modifikovaný nukleotid (7-dezaguanosin) přítomný u 4 druhů tRNA na pozicích pro volné (tzv. wobble) párování bazí. U bakterií je queosin syntetizován z GTP (guanosen trifosfátu).



Queosine

Obr.29: Struktura molekuly queosinu



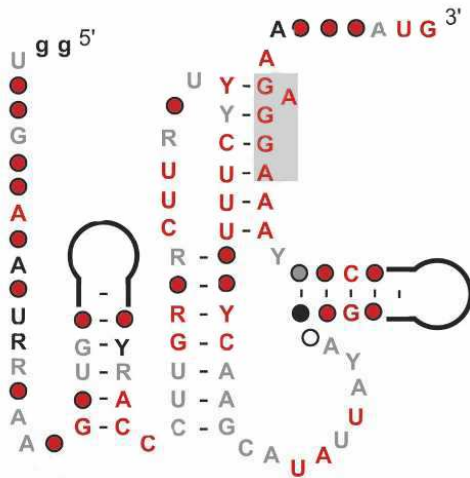
Obr.30: Konsensus sekvence a sekundární struktury 106 nt *queC* mitovu z *B. subtilis queC* 5' UTR. Mezi nukleotidem č.106 (U) a start kodonem (AUG) je dalších 106 nt. Převzato z Roth et al. 2007

Navzdory relativně malé velikosti ve srovnání s ostatními riboswitchi je ligand-vázající doména (tedy aptamer) citlivá na preQ₁ už v koncentraci řádově nanomolární. (Roth et al. 2007) PreQ₁ je vázán tzv. *queC* motivem v *B. subtilis*. Je to 106 nukleotidů (minimálně však 34 nukleotidů) dlouhý motiv v 5' UTR operonu *ykvJKLM*, který funguje jako aptamerová doména preQ₁ riboswitche. (viz obr. 30) Tento motiv obsahuje

konzervované sekvence pro vazbu preQ₁ a pro tvorbu vnitřní terminační vlásenky. Vazebnými místy ligandu jsou pravděpodobně aminomethylová skupina a záměna uhlíku za dusík v pozici 7 v guaninu, právě pomocí těchto dvou míst je aptamer schopen rozeznat svůj ligand od jeho analogů. (Roth et al. 2007)

Úkolem preQ₁ riboswitche je snižovat expresi následujících genů po navázání ligandu – tedy tzv. funkce OFF na expresi genu/genů metabolické dráhy. Mechanismus se liší podle typu, umístění a operonu, který reguluje. Uplatňují se zde oba základní mechanismy – předčasná terminace transkripce a zablokování iniciace translace.

I preQ₁ riboswitch, stejně jako SAM, má dva konsensy aptameru. PreQ₁ I je popsán výše.



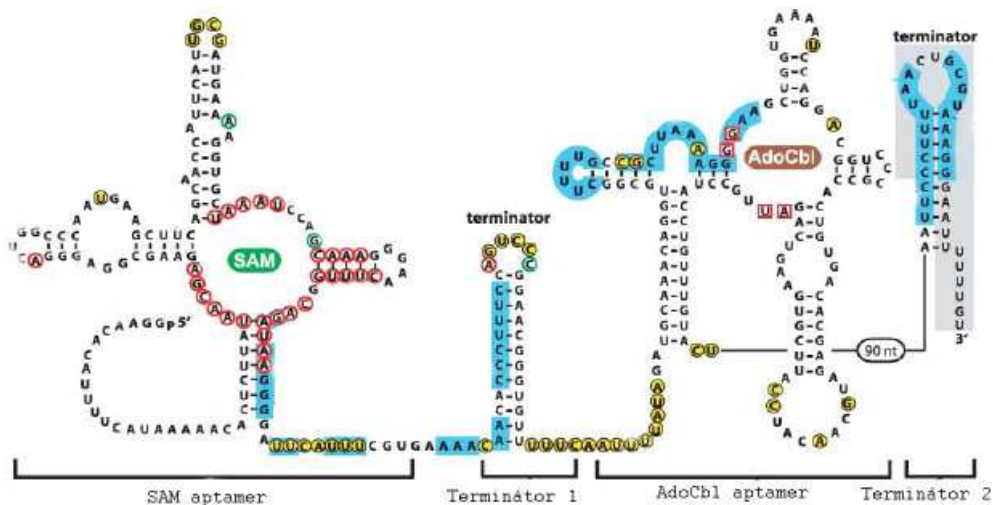
Obr.31: Konsensus struktury PreQ1 II aptameru vázajícího jako ligand preQ1. Převzato z Meyer et al. 2008.

Aptamer druhého typu je větší a vyskytuje se vzácně a pouze u několika druhů bakterií z rodů *Lactococcus* a *Streptococcus* (viz Obr. 31). (Meyer et al. 2008) U bacterie rodu *Streptococcus* se tento regulační prvek nachází v 5' UTR hypotetického membránového genu s označením COG4708 nebo DUF988. Později byl prokázán i u skupiny *Firmicutes* v 5' UTR oblasti homologních genů a konečně také u rodu *S. pneumoniae* opět v homologní oblasti. (Meyer et al. 2008)

3.9 TANDEMOVÉ RIBOSWITCHE

Většina riboswitchů reaguje na jeden typ ligandu a v závislosti na jeho koncentraci pak ovlivňuje expresi následujících genů. Známým komplexním riboswitchem je glycin vázající systém složený ze dvou podobných aptamerů za sebou, které kooperativně váží svůj ligand se stechiometrií $n = 1,64$, tento systém však neoznačujeme jako tandem. (Mandal et al. 2004)

Nejrozšířenější tandemový systém obsahující dva shodné riboswitche byl rozpoznán u *B. Subtilis* kde za sebou fungují dva TPP riboswitche. (Winkler et al. 2002b; Welz & Breaker.



Obr.32: Konsensus sekvence a model struktury tandemového regulačního systému genu *metE* z *B. clausii*. Převzato z Sudarsan et al. 2006

2007) U organismu *B. Clausii* byl před genem *metE* (gen syntetické dráhy methioninu) objeven regulační prvek složený ze dvou různých riboswitchů – AdoCbl(B₁₂) a SAM I (viz Obr. 32). (Sudarsan et al. 2006) Architektura tandemového riboswitchu naznačuje, že každá z částí váže každý svůj ligand nezávisle, vykonává tak mnohem komplexnější a citlivější regulaci než riboswitch jednoduché. Nezávislá funkce byla potvrzena stanovením disociační konstanty (K_D) pro jeden ligand v přítomnosti a nepřítomnosti ligandu druhého. Bylo zjištěno, že K_D odpovídá stechiometrii reakce kde jeden aptamer váže jednu molekulu ligandu, tedy jedna ku jedné a nikoliv více, jak bylo pozorováno u glycinového riboswitchu. (Sudarsan et al. 2006)

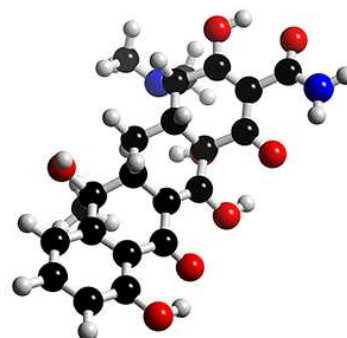
V průběhu prací na systému AdoCbl/SAM byly objeveny některé struktury reagující jako riboswitch, ovšem na neznámý ligand. Zdá se tedy, že tandemové struktury jsou v genomu některých bakterií rozšířeným regulačním systémem.

3.11 SYNTETICKÉ APTAMERY

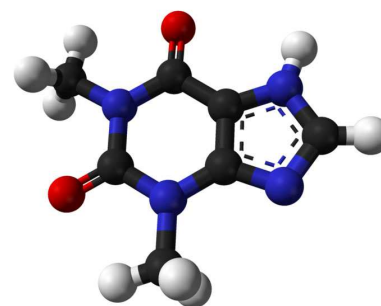
Syntetické riboswitchy – aptamery jsou úseky RNA vybrané technologií SELEX (Wilson & Szotak. 1999) pro jejich schopnost vázat s vysokou afinitou určený ligand. Obecně se vyznačují nižším počtem nukleotidů, nižší komplexitou terciární struktury a tolerancí k analogům svého ligandu. Z pozorování také vyplývá, že synteticky připravené aptamery vážou své ligandy s nižší afinitou než přirozeně se vyskytující riboswitchy (Breaker et al. 2006)

Technologie SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) je *in vitro* technologie na přípravu senzitivní molekuly RNA/DNA nezávisle na zvířecím imunitním systému a s větší specificitou vůči ligandu.

V této kapitole se budeme zabývat nejčastěji používanými syntetickými aptamery vázajícími tetracyklin (obr. 33) a theophyllin (obr. 34)



Obr.33: Tetracyklin – kuličkový model molekuly.



Obr.34: Theophyllin – kuličkový model molekuly.

Tetracyklinový aptamer byl využit skupinou B. Suessové k modifikaci expresního systému kvasinky *S. cerevisiae*, kdy byl do 5' UTR oblasti genu pro GFP (také uměle vloženého) vložen tetracyklinový aptamer (obr. 35). Vložení aptameru do 5' UTR způsobilo dva až stonásobné snížení fluorescence v nepřítomnosti tetracyklinu. Přidání tetracyklinu vedlo k dalšímu, až trojnásobnému, snížení fluorescence. (Suess et al. 2003; Weigand & Suess. 2007)

Tetracyklinový aptamer je zatím nejefektivnějším ligand vázajícím systémem. Jeho disociační konstanta K_D je 770 pM, což je zatím nejvyšší afinita pozorovaná u riboswitchů vůbec. (Müller et al. 2006)

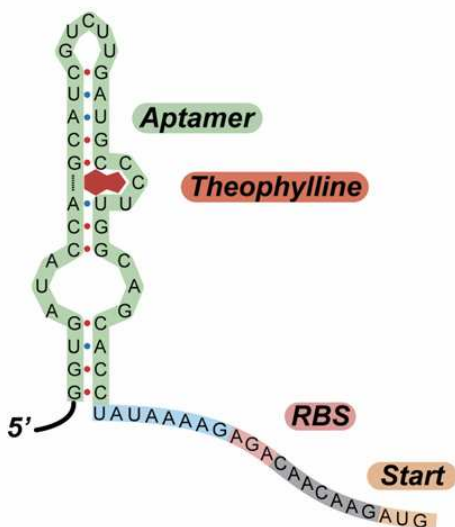
Dalším hojně využívaným systémem kontroly exprese se stal theophyllinový aptamer. Theophyllin neboli dimethylxantin je léčivo používané k léčbě respiračních onemocnění jako je astma nebo chronický zápal plic. Strukturně i svým účinkem je velmi podobný kofeinu.



Obr.35: Schéma mechanismu regulace tetracyklinového riboswitchu. Převzato z Suess. 2005.

Způsobuje uvolnění svalů průdušnice, zrychluje srdeční tep, zvyšuje krevní tlak a stimuluje centrální nervovou soustavu v dýchacích centrech. (Weinberger. 1986)

Theophyllinový riboswitch byl využit jako součást kontrolního systému represorového proteinu XylR u *B. subtilis* (viz Obr. 36). Inerce aptameru do DNA byla komplikována



Obr.36: Konsensus sekvence a model sekundární struktury theophyllinového riboswitchu s navázaným ligandem. Převzato z Lynch et al. 2007

krátkou vzdáleností (13 nukleotidů) mezi vazebným místem pro ribozom (rbs) a start kodonem. Autoři pokusu tento problém vyřešili vytvořením riboswitchu, který je schopen měnit své umístění. (Suess. 2005)

Skutečnost, že je theophyllinový systém přítomen v blízkosti sestřihových míst v intronech některých rostlin a hub, otevřela diskusi o účinku riboswitchu na alternativní sestřih některých genů.

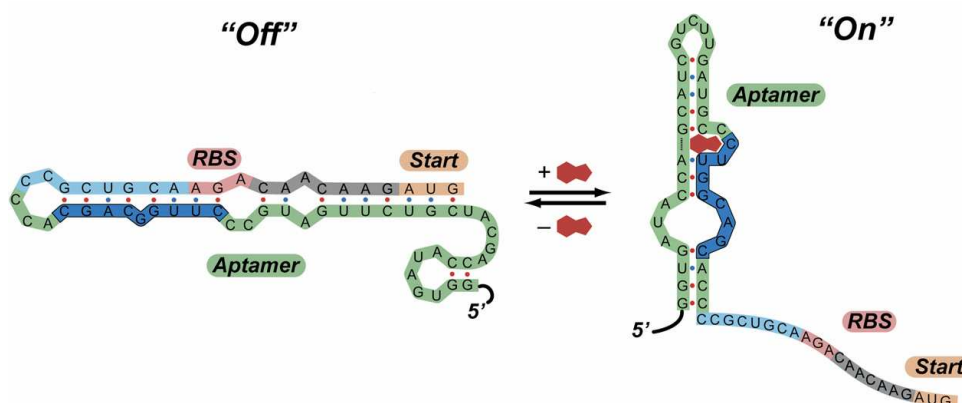
Byla publikována studie dokazující, že theophyllinový aptamer je skutečně schopen

ovlivnit sestřih, označovaný odborným termínem - splicing. (Nilsen. 2003; Butcher & Brow. 2005)

Do 3' sestřihového místa modelové pre-mRNA (tedy molekuly mRNA obsahující introny) byl vnesen theophyllin-vázající aptamer. Celá struktura byla pojmenována AdML-Theo29AG. Po přidání theophyllinu bylo pozorováno snížení hladiny sestřihu. (Kim et al. 2005)

Ačkoliv systém pro získávání ligand-vázající RNA je dobře propracovaný a funkční (SELEX), postupy pro zavedení riboswitchů do bakterie nejsou ještě dobře zvládnuté. Studie skupiny Dr. Lyche z roku 2007 nabízí postup, jak dosáhnout optimalizace theophyllin-vázajícího systému v bakterii a tak významně přispívá k poznání na tomto poli. Lynch et al. 2007

Theophyllin
ovým
systémem
(viz Obr. 37)
se zabývalo
ještě několik
pracovních



skupin a to s
různým
cílem:

Obr.37: Schéma mechanismu regulace translace zablokováním vazebného místa pro ribozom v nepřítomnosti ligandu, a naopak jeho uvolnění v případě zvýšení koncentrace ligandu. Převzato z Lynch et al. 2007.

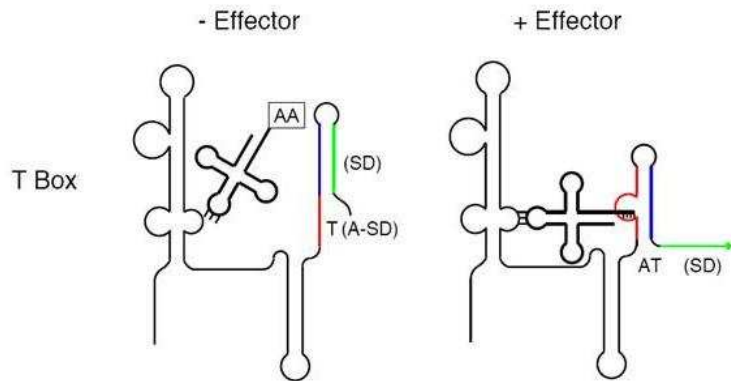
regulace exprese eukaryotického genu v bakterii(Grate & Wilson. 2001; Harvey et al. 2002; Suess et al. 2003), ligand-dependetní transkripce u kvasinek (Buskirk et al. 2004), ligand-dependentní RNA sestřih in vitro, (Kim et al. 2005) atd.

3.12 JINÉ SYSTÉMY RNA OLIGONUKLEOTIDŮ S REGULAČNÍ FUNKCÍ

Existuje nepřeberné množství druhů regulačních či jinak aktivně činných oligonukleotidových sekvencí RNA, které si zaslouží větší pozornost. V této práci se však omezíme jen na několik zajímavých případů, kdy molekula RNA vykonává i jinou, než konvenčně uznávanou roli jako tRNA, mRNA či rRNA.

3.12.1 REAKCE NA METABOLITY SKRZE tRNA-MRNA INTERAKCI

Unikátní variací na toto téma je případ tzv. T-boxu, který slouží k regulaci exprese aminoacyl-tRNA syntetázy (viz Obr. 38). (Grundy & Henkin. 2003) Stejně jako většina typů riboswitchů, se nachází v 5' UTR molekuly mRNA a reaguje na přítomnost nenabitě specifické tRNA. Příkladem



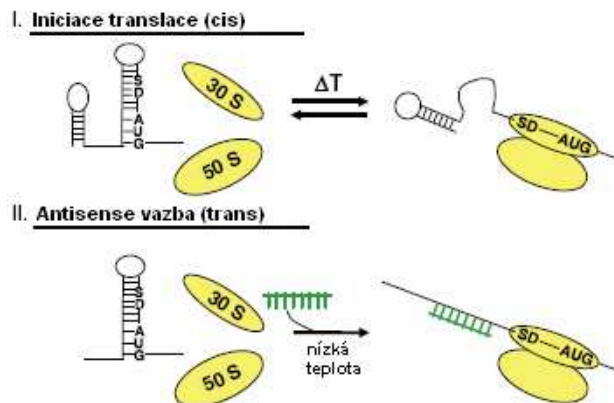
Obr.38: Schéma mechanismu regulace na úrovni transkripce. Nenabitá tRNA interaguje se strukturou T boxu za zformování antiterminační vlásenky. Převzato z Grundy & Henkin. 2003

může být případ, kdy pokles vnitrobuněčné hladiny tyrosinu sníží rovněž poměr nabitě-kunenabitě tRNA^{Tyr} což vede k zvýšení exprese genů souvisejících s metabolismem tyrosinu v důsledku interakce nenabitě tRNA^{Tyr} s mRNA aminoacyl-tRNA syntetázy. (Grundy et al. 1997) Tyto a další poznatky ukazují, že RNA-RNA interakce nevyžaduje přítomnost žádných proteinů jako katalytických či jiných pomocných jednotek.

3.12.2 RNA TEPLOMĚR

Organismy musí být také schopny reagovat na změny vnějších podmínek. Tyto reakce je potřeba regulovat a zároveň co nejvíce zjednodušit a urychlit. (Narberhaus. 2005)

RNA je schopna tvořit metastabilní struktury v závislosti na teplotě a proto je také vhodným „čidlem“ vnějších podmínek. (viz Obr. 39) Například *L. monocytogenes*, savčí patogenní organismus, zvyšuje svou virulenci pokud její okolí dosáhne teploty 37°C. V tomto konkrétním případě vede zvýšení teploty ke



Obr.39: Schéma regulace translace v závislosti na teplotě. 30S a 50S – podjednotky ribosomu, SD – Shine-Dalgarno sekvenční, AUG - start kodon. Převzato z Narberhaus et al. 2005

změně v expresi genu *PrfA*, který slouží jako transkripční faktor pro geny virulence. (Johansson et al. 2002) Podobné teplotně senzitivní riboswitche byly nalezeny u fága λ

(Altuvia et al. 1989) a *E. coli* u níž je tímto systémem regulována exprese heat-shock σ faktoru, proteinu RpoH a několika dalších. (Naberhaus. 2002)

3.10 HLEDÁNÍ DALŠÍCH SEKVENCÍ POMOCÍ *IN SILICO* PŘÍSTUPU

V zásadě jsou možné dva přístupy v hledání nových riboswitchů. Prohledávání databází vyžaduje RNA alignmenty – tedy srovnávání jednotlivých řetězců z hlediska podobnosti sekvence. Kvalita alignmentu je klíčová pro nalezení nového riboswitchu.

Hledání možných dalších sekvencí přístupem použitím algoritmu pro vyhledávání sekvencních podobností v nekódujících oblastech a porovnávání prediktivní funkčnosti produktů odvozených od down-stream genů jsou další volbou. Tímto přístupem byly potvrzeny známé třídy riboswitchů a bylo nalezeno 8 nových kandidátů.

Jsou známy další způsoby prověřování a hledání nových oligonukleotidů. (Avihoo et al. 2007) Skupina informatiků z Izraele ve spolupráci s univerzitou v San Diegu, USA, vytvořila program schopný relativně rychle srovnat dva bakteriální genomy a najít v nich určité nekódující sekvence typické například pro riboswitchu. (Zhang et al. 2006) Testování programu odhalilo několik riboswitchů známého typu, ale nového umístění (viz Tab.3).

Tab.3: Shrnutí nalezených riboswitchů při testování programu na genomech Bakterií a Archeí. #known- známé riboswitchu, #TP-počet predikovaných riboswitchů, #new-nově predikované zásahy v genomech, #new*-počet nových riboswitchů v genomech (podle Rfam) Převzato z Zhang et al. 2006

Family	#know	#TP	#new	#new*
FMN	103	92	34	2
TPP	305	235	89	6
YybP-ykoY	109	74	65	25
SAM	204	182	80	3
Purin	82	72	31	10
Lysin	82	61	23	5
Kobalamin	189	141	70	15
GlmS	24	23	8	1
YdaO-yuaA	68	62	17	57
ykoK	44	39	7	2
YkkC-yxkD	14	14	11	1
gcvT	148	98	28	1

4. PERSPEKTIVY

V této rešeršní práci jsem se omezila na několik nejvýznamnějších skupin riboswitchů. A to na systémy reagující na aminokyseliny (glycin, lysin a S-adenosylmethionin), puriny (adenin a guanin), FMN, TPP, B₁₂, PreQ₁ a GlcN6P. Tyto metabolit-vázající molekuly RNA jsou v genomu bakterií široce rozšířeny a stále se objevují nové skupiny.

Existence RNA-switchu neboli riboswitchu byla potvrzena a několikrát ověřena teprve v nedávné době. (Tuerk & Gold. 1990; Ellington & Szostak. 1990)

V některých ohledech mohou jak přírodní riboswitchu tak syntetické aptamery poskytnout pružnější nástroj ke genové manipulaci než jsou dosud používané proteinové systémy (tab. 4). (Liu et al. 2006) Využití přírodních riboswitchů jako *in vivo* kontrolního systému v sobě nese komplikaci. Je to přirozená schopnost riboswitchu reagovat na velmi nízké koncentrace látek normálně přítomných v buňce a těžko regulovatelných zvenčí. V tomto případě jsou vhodnějším kandidátem syntetické oligonukleotidy – aptamery, které mohou být vytvořeny tak, aby reagovaly na látky, které se v buňce normálně nevyskytují.

Dále mohou riboswitchu sloužit jako cíl pro analogy ligandu. Z faktu, že se vyskytují v mnoha bakteriálních kmenech lze usoudit, že riboswitch může být jedním z vhodných cílů pro novou generaci léčiv. (Burgstaller et al. 2002)

Další využití aptamerů cestou *in vitro* umožňuje jejich specifita a relativní stabilita. Mohou v široké škále aplikací nahradit monoklonální protilátky (viz tab. 4) či být využity jako biosenzory (Hesselberth et al. 2003; Seetharaman et al. 2001), aptamery mají široké využití také na poli afinitní chromatografie (Ravelet et al. 2006), afinitní PCR (Fredriksson et al. 2002), kapilární elektroforézy (Ruta et al. 2006) a metod klinické diagnostiky.

Tab.4: Přehled výhod aptamerů proti bílkovinným protilátkám. Převzato z Mairal et al. 2007

Bílkovinná protilátka	Aptamer
Variace v různých dávkách těže protilátky	Malá velikost, bez variací
Značení může způsobit ztrátu afinity k antigenu	Značení bez nebezpečí ztráty afinity
Použití zvířat při produkci	Produkce <i>in vitro</i>
Manipulace pouze ve fyziologických podmínkách	Manipulovatelné podmínky (pH, pufr, teplota)
Pouze proti imunogenům	Schopnost vázat i léčiva a toxické látky
Citlivé na změny teploty a vlhkosti	Skladování a transport v pokojové teplotě

Několik praktických aplikací již bylo publikováno. Například využití elektrochemických aptamerů jako „majáku“ k detekci thrombinu v krevním séru (Xu et al. 2006) nebo kokainu ve slinách a krevním séru (Radi et al. 2006).

Největší dosavadní úspěch byl zaznamenán na poli léčení zrakových poruch tzv: AMD (age-related macular degeneration). Léčivo pod komerčním názvem Macugen je PEGnylovaný anti-VEGF aptamer tedy oligonukleotid s afinitou k faktoru VEGF (vascular endothelial growth factor) a modifikovaný polyethylenglykolem. (OSI Pharmaceuticals. 2007)

Aptamery se zatím nepoužívají v takovém měřítku jako např. bílkovinné protilátky. Jejich potenciál a možnosti jejich syntézy technologií SELEX (Wilson & Szostak. 1999) je předurčují k plnění mnohem širší škály funkcí.

Vhodnost a možnosti zavedení aptameru jako součásti standardních metod a aplikací jsou stále předmětem diskuse.

5. PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

- Avihoo A et al. 2007: IN SILICO DESIGN OF SMALL RNA SWITCHES. *IEEE Transactions on NanoBioscience*, Vol. 6, Issue 1, p. 4 – 11
- Altuvia S, Kornitzer D, Teff D. 1989: ALTERNATIVE MRNA STRUCTURES OF THE CIII GENE OF BACTERIOFAGE λ DETERMINE THE RATE OF IT'S TRANSLATION INITIATION. *Journal of molecular biology*, Vol. 210, Issue 2, p. 265 – 280
- Barrick et al. 2004: NEW RNA MOTIFS SUGGEST AN EXPANDED SCOPE FOR RIBOSWITCHES IN BACTERIAL GENETIC CONTROL. *PNAS*, Vol. 101, Issue 17, p. 6421 – 6426
- Barrick JE, Breaker RR. 2007: THE DISTRIBUTIONS, MECHANISMS, AND STRUCTURES OF METABOLITE-BINDING RIBOSWITCHES. *Genome Biology*, Vol. 8, Nr. R239
- Breaker RR et al. 2006: *The RNA World* 3rd edition. P. 89 – 107
- Burgstaller P et al. 2002: APTAMERS AND APTAZYMES: ACCELERATING SMALL MOLECULE DRUG DISCOVERY. *Curr. opinion in drug discovery and dev.* Vol. 5, Issue 5, p. 690-700
- Buskirk AR et al. 2004: ENGINEERING A LIGAND-DEPENDENT RNA TRANSCRIPTIONAL ACTIVATOR. *Chem. Biol.* Vol. 11, p. 1157–1163.
- Butcher SE, Brow DA. 2005: TOWARDS UNDERSTANDING THE CATALYTIC CORE STRUCTURE OF THE SPLICEOSOME. *Biochem. Soc. Trans.* Vol. 33, p. 447 – 449
- Cochrane JC et al. 2006: STRUCTURAL INVESTIGATION OF THE GLMS RIBOZYME BOUND TO ITS CATALYTIC COFACTOR. *Chemistry and biology*, Vol. 14, p. 95
- Corbino KA et al. 2005: EVIDENCE FOR A SECOND CLASS OF *S*-ADENOSYLMETHIONINE RIBOSWITCHES AND OTHER REGULATORY RNA MOTIFS IN ALPHA-PROTEOBACTERIA. *Genome Biology*, Vol. 6, Issue 8, R70
- Ellington AD, Szostak JW. 1990: IN VITRO SELECTION OF RNA MOLECULES THAT BIND SPECIFIC LIGANDS. *Nature* Vol. 346, p. 818–822
- Fedor MJ, Williamson JR. 2005: THE CATALYTIC DIVERSITY OF RNAs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol. 6, p. 399 – 412
- Fredriksson S et al. 2002: PROTEIN DETECTION USING PROXIMITY-DEPENDENT DNA LIGATION ASSAYS. *Nature biotechnology*, Vol. 20, Issue 5, p. 473-477
- Gelfand MS et al. 1999: A CONSERVED RNA STRUCTURE ELEMENT INVOLVED IN THE REGULATION OF BACTERIAL RIBOFLAVIN SYNTHESIS. *Trends Genet.* Vol. 15, p. 439 – 442
- Gilbert W. 1986: THE RNA WORLD. *Nature*, Vol. 319, p. 618

- Grundy FJ et al. 1997: SPECIFICITY OF tRNA-MRNA INTERACTIONS IN *BACILLUS SUBTILIS* TYRS ANTITERMINATION. *Journal of Bacteriology*, Vol. 179, p. 2587 – 2594
- Grundy FJ, Henkin TM. 2003: THE T BOX AND S BOX TRANSCRIPTION TERMINATION CONTROL SYSTEMS. *Frontiers in bioscience*, Vol. 8, p. D20
- Hampel KJ, Tinsley MM. 2006: EVIDENCE OF PREORGANIZATION OF THE GLMS RIBOZYME LIGAND BINDING POCKET. *Biochemistry*, Vol. 45, p. 7861 – 7871
- Harvey I et al. 2002: INHIBITION OF TRANSLATION BY RNA-SMALL MOLECULE INTERACTIONS. *RNA* Vol. 8, p. 452–463.
- Hesselberth JR et al. 2003: SIMULTANEOUS DETECTION OF DIVERSE ANALYTES WITH AN APTAZYME LIGASE ARRAY. *Analytical Biochemistry*, Vol. 312, p. 106 – 112
- Johansson J et al. 2002: AN RNA THERMOSENSOR CONTROLS EXPRESSION OF VIRULENCE GENES IN *LISTERIA MONOCYTOGENES*. *Cell*, Vol. 110, p. 551 – 561
- Joyce GF. 2002: THE ANTIQUITY OF RNA-BASED EVOLUTION. *Nature*, Vol. 418, p. 214 – 221
- Kim DS et al. 2005: AN ARTIFICIAL RIBOSWITCH FOR CONTROLLING PRE-MRNA SPLICING. *RNA* Vol. 11, p. 1667–1677.
- Klein DJ, Ferre-D'Amare AR. 2006: STRUCTURAL BASIS OF GLMS RIBOZYME ACTIVATION BY GLUKOSAMINE-6-PHOSPHATE. *Science*, Vol. 313, p. 1752 – 1756
- Knudsen SM, Ellington AD. 2004: RIBOZYME DEJA VU. *Nature structural and molecular biology*. Vol. 11, p. 301
- Liu JW et al. 2006: A SIMPLE AND SENSITIVE "DIPSTICK" TEST IN SERUM BASED ON LATERAL FLOW SEPARATION OF APTAMER-LINKED NANOSTRUCTURES. *Sngewandte chemie (int. edd)*, Vol. 45, Issue 47, p. 7955-7959
- Lynch SA et al. A HIGH-THROUGHPUT SCREEN FOR SYNTHETIC RIBOSWITCHES REVEALS MECHANISTIC INSIGHT INTO THEIR FUNCTION. *Chemistry and Biology*, Vol. 14, Issue 2, p. 173 - 184
- Mairal T et al. 2007: APTAMERS: MOLECULAR TOOLS FOR ANALYTICAL APPLICATIONS. *Analytical and bioanalytical chemistry*, Vol.390, p. 989
- Mandal M, Breaker RR. 2004a: ADENINE RIBOSWITCHES AND GENE ACTIVATION BY DISRUPTING OF A TRANSCRIPTION TERMINATOR. *Nature structural and molecular biology*, Vol. 11, p. 29
- Mandal M, Breaker RR. 2004b: GENE REGULATION BY RIBOSWITCHES. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol. 5, p.451
- Mandal M et al. 2003: RIBOSWITCHES CONTROL FUNDAMENTAL BIOCHEMICAL PATHWAYS IN *B. SUBTILIS* AND OTHER BACTERIA. *Cell*, Vol. 113, p. 577

- Mandal M et al. 2004: A GLYCINE-DEPENDENT RIBOSWITCH THAT USES COOPERATIVE BINDING TO CONTROL GENE EXPRESSION. *Science*, Vol. 306, Issue 5694, p. 275
- Meyer MM et al. 2008: CONFIRMATION OF A SECOND NATURAL PREQ₁ APTAMER CLASS IN STREPTOCOCCACEAE BACTERIA. *RNA-A publication of RNA society*, Vol. 14, p. 685-695
- Müller M et al. 2006: THERMODYNAMIC CHARACTERIZATION OF AN ENGINEERED TETRACYKLIN-BINDING RIBOSWITCH. *Nucleic acid research*, Vol. 34, p. 2607 – 2617
- Nahvi A et al. 2002: GENETIC CONTROL BY A METABOLITE BINDING MRNA. *Chemistry and biology*, Vol. 9, p. 1043
- Nahvi A et al. 2004: COENZYME B₁₂ RIBOSWITCHES ARE WIDESPREAD GENETIC CONTROL ELEMENTS IN PROKARYOTES. *Nucleic acids research*, Vol. 32, p. 143
- Narberhaus F. 2002: MRNA MEDIATED DETECTION OF ENVIROMENTAL CONDITIONS. *Archives of Microbiology*, Vol. 178, Issue 6, p. 404 – 410
- Narberhaus F et al. 2005: RNA THERMOMETERS. *FEMS Microbiol. Rev.* Vol. 30, p. 3 – 16
- Nilsen TW. 2003: THE SPLICEOSOME: THE MOST COMPLEX MACROMOLECULAR MACHINE IN THE CELL? *Bioessays*, Vol. 25, p. 1147 – 1149
- OSI Pharmaceuticals. 2007: http://www.osip.com/macugen_a
- Patte J-C et al. 1998: THE LEADER SEQUENCE OF THE ESCHERICHIA COLI LYSC GENE IS INVOLVED IN THE REGULATION OF LYSC SYNTHESIS. *FEMS Microbil. Lett.* Vol. 169, p. 165 – 170
- Radi AE et al. 2006: REAGENTLESS, REUSABLE, ULTRASENSITIVE ELECTROCHEMICAL MOLECULAR BEACON APTASENSOR. *Journal of american chemical society*, Vol. 128, Issue 1, p. 117 - 124
- Ravelet C et al. 2006: LIQUID CHROMATOGRAPHY, ELECTROCHROMATOGRAPHY AND CAPILLARY ELECTROPHORESIS APPLICATIONS OF DNA AND RNA APTAMERS. *Journal of chromatography A*, Vol. 1117, Issue 1p. 1-10
- Ravnum S, Andersson DI. 2001: AN ADENOSYL-COBALAMIN(COENZYME-B12)- REPRESSED TRANSLATIONAL ENHANCER IN THE *COB* MRNA OF *SALMONELLA TYPHIMURIUM*. *Molecular microbiology*, Vol. 39, p. 1585
- Reader JS et al. 2005: IDENTIFICATION OF FOUR GENES NECESSARY FOR BIOSYNTHESIS OF THE MODIFIED NUCLEOSIDE QUENOSINE. *J. Biol. Chem.* Vol. 279, p. 6280 – 6285
- Rodionov DA et al. 2003: REGULATION OF LYSINE BIOSYNTHESIS AND TRANSPORT GENES IN BACTERIA: YET ANOTHER RNA RIBOSWITCH? *Nucleic acid research*, Vol. 31, p. 6748

- Roth A et al. 2007: A RIBOSWITCH SELECTIVE FOR THE QUENOSINE PRECURSOR PREQ(1) CONTAINS UNUSUALLY SMALL APTAMER DOMAIN. *Nature structural and molecular biology*, Vol. 35, Issue 4, p. 308
- Ruta J et al. 2006: ENANTIOMERIC SEPARATION USING AN L-RNA APTAMER AS CHIRAL ADDITIVE IN PARTIAL-FILLING CAPILLARY ELECTROPHORESIS. *analytical chemistry*, VOL. 78, Issue 9p. 3032-3039
- Seetharaman S et al. 2001: IMMOBILIZED RNA SWITCHES FOR THE ANALYSIS OF COMPLEX CHEMICAL AND BIOLOGICAL MIXTURES. *Nat. Biotech.* Vol. 19, p. 336 – 341
- Serganov A et al. 2004: STRUCTURAL BASIS FOR DISCRIMINATIVE REGULATION OF GENE EXPRESSION BY ADENINE- AND GUANINE SENSING MRNAs. *Chemistry and Biology*, Vol. 11, p. 1729
- Serganov A et al. 2006: STRUCTURAL BASIS FOR GENE REGULATION BY THIAMINE PYROPHOSPHATE-SENSING RIBOSWITCH. *Nature*, Vol. 441, p. 1167 – 1171
- Schwalbe et al. 2007: STRUCTURES OF RNA SWITCHES: INSIGHT INTO MOLECULAR RECOGNITION AND TERTIARY STRUCTURE. *Angewandte chemie-international edition*, Vol. 46, p. 1212
- Stormo GD, Ji Y. 2001: DO MRNA ACTS AS DIRECT SENSORS OF SMALL MOLECULES TO CONTROL THEIR EXPRESSION?. *Proc Natl Acad. Sci USA*, Vol. 98, p. 9465 – 9467
- Sudarsan N et al. 2003a: METABOLITE-BINDING RNA DOMAINS ARE PRESENT IN THE GENES OF EUKARYOTES. *RNA-A publication of RNA society*, Vol. 9, p. 644
- Sudarsan N et al. 2003b: AN MRNA STRUCTURE IN BACTERIA THAT CONTROLS GENE EXPRESSION BY BINDING LYSINE. *Genes and development*, Vol. 17, p. 2688
- Sudarsan N et al. 2006: TANDEM RIBOSWITCH ARCHITECTURES EXHIBIT COMPLEX GENE CONTROL FUNCTIONS. *Science*, Vol. 314, p. 300
- Venables, JP. 2006: UNBALANCED ALTERNATIVE SPLICING AND ITS SIGNIFICANCE IN CANCER. *Bioessays*, Vol. 28, p. 378
- Suess B et al. 2003: CONDITIONAL GENE EXPRESSION BY CONTROLLING TRANSLATION WITH TETRACYCLINE-BINDING APTAMERS. *Nucleic acid research*, Vol. 31, p.1853 – 1858
- Suess B. 2005: ENGINEERED RIBOSWITCHES CONTROL GENE EXPRESSION BY SMALL MOLECULES. *Biochemical society transactions*, Vol. 33, p. 474 - 476
- Tucker BJ, Breaker RR. 2005: RIBOSWITCHES AS VERSATILE GENE CONTROL ELEMENT. *Curr. Opinion in Structural Biology*, Vol. 15, p. 342 - 348
- Tuerk C, Gold L. 1990: SYSTEMATIC EVOLUTION OF LIGANDS BY EXPONENTIAL ENRICHMENT: RNA LIGANDS TO BACTERIOPHAGE T4 DNA POLYMERASE. *Science* Vol. 249, p. 505–510

- Vitreschak AG et al. 2003: REGULATION OF THE VITAMIN B12 METABOLISM AND TRANSPORT IN BACTERIA BY A CONSERVED RNA STRUCTURAL ELEMENT. RNA-A publication of the RNA society, Vol. 9, p. 1084
- Weigand JE, Suess B. 2007: TETRACYCLIN APTAMER-CONTROLLED REGULATION OF PRE-MRNA SPLICING IN YEAST. Nucleic Acid Research, Vol. 34, p. 2607
- Weinberger M. 1986: PHARMACOLOGY AND THERAPEUTIC USE OF THEOPHYLLINE. Journal of allergy and clinical immunology, Vol. 77, Issue 3, p. 525-525
- Welz R, Breaker RR. 2007: LIGAND BINDING AND GENE CONTROL CHARACTERISTICS OF TANDEM RIBOSWITCHES IN BACILLUS ANTHRACIS. RNA – a publication of the RNA society, Vol. 13, Issue 4, p. 573 – 582
- Wilson DS, Szostak JW. 1999: IN VITRO SELECTION OF FUNCTIONAL NUCLEIC ACIDS. Annu. Rev. Biochem. Vol. 68, p. 611 – 647
- Winkler WC, Breaker RR. 2005: REGULATION OF BACTERIAL GENE EXPRESSION BY RIBOSWITCHES. Annual review of microbiology, Vol. 59, p. 487
- Winkler WC et al. 2002a: AN MRNA STRUCTURE THAT CONTROLS GENE EXPRESSION BY BINDING FMN. Proceedings of the NAOs of the USA, Vol. 99, Issue 25, p. 15908
- Winkler W et al. 2002b: THIAMINE DERIVATIVES BIND MESSENGER RNAs DIRECTLY TO REGULATE BACTERIAL GENE EXPRESSION. Nature, Vol. 419, p. 952
- Winkler WC et al. 2003a: AN MRNA STRUCTURE THAT CONTROLS GENE EXPRESSION BY BINDING S-ADENOSYLMETHIONINE. Nature structural biology, Vol. 10, Issue 9, p. 701
- Winkler WC et al. 2003b: GENETIC CONTROL BY METABOLITE BINDING RIBOSWITCHES. ChemBiochem, Vol. 4, p. 1024
- Winkler WC et al. 2004: CONTROL OF GENE EXPRESSION BY A NATURAL METABOLITE BINDING-RESPONSIVE RIBOZYME. Nature, Vol. 428, p. 281 – 286
- Xu Y et al. 2006: AN APTAMER-BASED PROTEIN BIOSENSOR BY DETECTING THE AMPLIFIED IMPEDANCE SIGNAL. Elektroanalysis, Vol. 18, Issue 15, p. 1449 - 1456
- Zhang S et al. 2006: A SEQUENCE-BASED FILTERING METHOD FOR NCRNA IDENTIFICATION AND ITS APPLICATION TO SEARCHING FOR RIBOSWITCH ELEMENTS. Bioinformatics, Vol. 22, Issue 14 2006, p. e557–e565