

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

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



Michaela Novotná

Řízení genové exprese pomocí *cis*-působících nekódujících RNA
a jejich význam při regulaci genů udílejících rezistenci k antibiotikům

Control of the gene expression by *cis*-acting non-coding RNAs
and their importance in regulating genes conferring resistance to
antibiotics

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Gabriela Balíková Novotná, Ph.D.

Praha, 2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 9.5.2019

.....
Michaela Novotná

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především své školitelce Mgr. Gabriele Balíkové Novotné, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky poskytnuté v průběhu sepisování této práce. Poděkování patří i dalším členům Laboratoře biologie sekundárního metabolismu MBÚ AV ČR za jejich přínosné rady. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za jejich vydatnou podporu v době mého studia.

Abstrakt

Práce je zaměřená na regulaci genové exprese zprostředkovanou vnitřními regulačními RNA elementy, které jsou součástí 5' koncové nepřekládané oblasti mRNA. Tyto tzv. r5'UTR elementy jsou schopné vázat velké množství typově odlišných molekul, od iontů a malých metabolitů přes transferové RNA až po velké proteinové komplexy. Na základě této interakce pak řídí projev downstream lokalizovaného genu, jehož exprese se tak stává inducibilní. Tento typ riboregulace je u bakterií široce využíván a uplatňuje se i v kontrole mnoha genů udílejících rezistenci k antibiotikům. Právě modulace takových genů je pro buňku značně výhodná, neboť zajišťuje omezení negativního vlivu na fitness bakterie, se kterým je exprese rezistenčních genů často spojena. Cílem práce je na molekulární úrovni charakterizovat všechny typy vnitřních regulačních elementů a nastínit, jak by mohly být znalosti o těchto systémech využity v klinické praxi při léčbě infekcí vyvolaných bakteriemi rezistentními k antibiotikům.

Klíčová slova

Regulace genové exprese, ncRNA, *cis*-působící regulační RNA, r5'UTR element, atenuace, antibiotická resistance

Abstract

This work is focused on the regulation of gene expression mediated by intrinsic regulatory RNA elements that are part of the 5' end of mRNA untranslated region. These so-called r5'UTR elements are able to bind a wide spectrum of different types of molecules, from ions and small metabolites through the transfer RNA to large protein complexes. Based on this interaction, they modulate the expression of downstream gene, which therefore becomes inducible. This type of riboregulation is widely spread in bacteria and is employed even in the control of many antibiotic resistance genes. Modulation of such genes is considerably advantageous for the cell, as it provides reduction of the negative impact on the fitness of bacteria, which is often connected to the expression of resistance genes. The aim of this work is at the molecular level to characterize all types of intrinsic regulatory elements and outline how the knowledge of these systems could be used in clinical practise for the treatment of infections caused by bacteria resistant to antibiotics.

Key words

Regulation of gene expression, ncRNA, *cis*-acting regulatory RNA, r5'UTR element, attenuation, antibiotic resistance

Obsah

1	ÚVOD	1
2	REGULACE GENŮ ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE JAKO VÝSLEDEK SNAHY O ZACHOVÁNÍ FITNESS	2
3	REGULAČNÍ ncRNA U BAKTERIÍ	4
3.1	Intermolekulárně působící ncRNA.....	6
3.2	Vnitřní regulační RNA elementy.....	7
4	VNITŘNÍ r5'UTR ELEMENTY	8
4.1	r5'UTR element reagující na změny fyzikálně-chemických faktorů	8
4.1.1	RNA teplotní senzor	8
4.1.2	RNA detekující změny pH	9
4.2	r5'UTR element reagující na přítomnost specifických malých molekul	10
4.2.1	Existuje riboswitch pro kontrolu aminoglykosidové rezistence?	14
4.3	r5'UTR element reagující na přítomnost specifické nenabitě tRNA.....	15
4.4	r5'UTR element reagující na míru translace	17
4.4.1	Antibiotiky řízená atenuace	19
4.4.1.1	Atenuace indukovaná erythromycinem	19
4.4.1.2	Atenuace indukovaná linkomycinem	24
4.4.1.3	Atenuace indukovaná chloramfenikolem	25
4.4.1.4	Atenuace indukovaná tetracyklinem	26
4.5	r5'UTR element reagující na přítomnost ribozomálního proteinu	26
4.6	r5'UTR element reagující na přítomnost terminátorového/antiterminátorového proteinu....	28
5	ZÁVĚR	30
6	POUŽITÁ LITERATURA	31

Seznam použitých zkratek

AAC	aminoglycoside acetyltransferase	aminoglykosidová acetyltransferasa
AAD	aminoglycoside adenyltransferase	aminoglykosidová adenyltransferasa
AA-tRNA	aminoacyl-tRNA	aminoacyl-tRNA
ABC	ATP-binding cassette protein	nadrodina ATP-vazebných proteinů
AdoCbl	adenosylcobalamin (koenzym B ₁₂)	adenosylcobalamin (koenzym B ₁₂)
ARE ABC-F	antibiotic resistance proteins from ABC-F subfamily	proteiny antibiotické rezistence z ABC-F podrodiny
ATB	antibiotic	antibiotikum
ATP	adenosine triphosphate	adenosintrifosfát
Cat	chloramphenicol acetyltransferase	chloramfenikolová acetyltransferasa
CRISPR	<u>cl</u> ustered <u>r</u> egularly <u>i</u> nterspaced <u>s</u> hort <u>p</u> alindromic <u>r</u> epeats	klastr pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetit
crRNA	CRISPR RNA	CRISPR RNA
Cryo-EM	cryo-electron microscopy	kryo-elektronová mikroskopie
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
Erm	erythromycin ribosome methylation	erythromycinová ribozomální methylace
Fex	fluorfenicol exporter	fluorfenikolový exportér
HMP	4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine	4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidin
MLS _B	macrolides, lincosamides, streptogramins B	makrolidy, linkosamidy, streptograminy B
mRNA	messenger RNA	mediátorová RNA
ncRNA	non-coding RNA	nekódující RNA
NPET	nascent peptide exit tunnel	výstupní kanál nascentního peptidu
ORF	open reading frame	otevřený čtecí rámec
PRE	pH-responsive RNA element	RNA element citlivý ke změnám pH
PTC	peptidyl transferase center	peptidyltransferasové centrum
r5'UTR	regulatory 5' untranslated region of mRNA	regulační element lokalizovaný v 5' koncové nepřekládané oblasti mRNA
RBS	ribosome binding site	ribozom-vazebné místo
RNA	ribonucleic acid	ribonukleová kyselina
r-protein	ribosomal protein	ribozomální protein
SAM	S-adenosylmethionine	S-adenosylmethionin
SD	Shine-Dalgarno sequence	Shine-Dalgarno sekvence
sRNA	small RNA	malá RNA
SRC	stalled ribosome complex	„uzamčený“ translační komplex
SRP	signal recognition particle	signál rozpoznávající částice
tmRNA	transfer-messenger RNA	transferová-mediátorová RNA
TPP	thiamine pyrophosphate	thiaminpyrofosfát
tracrRNA	<i>trans</i> -activating crRNA	<i>trans</i> -aktivovaná crRNA
TRAP	<i>trp</i> RNA-binding attenuation protein	<i>trp</i> RNA-vazebný atenuační protein
tRNA	transfer RNA	transferová RNA
uORF	upstream open reading frame	upstream lokalizovaný otevřený čtecí rámec
UTR	untranslated region of mRNA	nepřekládaná oblast mRNA

1 ÚVOD

Objev antimikrobiálních látek patří bezesporu k nejvýznamnějším objevům moderní medicíny. Právě díky antibiotikům bylo možné začít účinně léčit infekční nemoci, které do té doby byly jednoznačně nejčastější příčinou úmrtí. První antibiotikum bylo objeveno Alexanderem Flemingem v roce 1928 (Fleming, 1929) a v následujících letech byly identifikovány a syntetizovány tisíce dalších antimikrobiálních látek (Spížek et al., 2016), z nichž některé se postupně od 40. let 20. století (Centers for Disease Control and Prevention, 2013) začaly využívat ve velkém, a to nejen v humánní a veterinární medicíně pro léčbu infekčních chorob, ale také v biotechnologiích a zpočátku též v zemědělství za účelem zvýšení přírůstku hospodářských zvířat.

Toto masivní a velice často také neuvážené užívání antibiotik (např. špatné dávkování, preventivní užívání či užívání pro potlačení virových onemocnění) vedlo k vytvoření velmi silného selekčního tlaku na vznik multirezistentních bakteriálních kmenů. Z tohoto důvodu se dnes potýkáme s problémem plošného rozšíření antibiotické rezistence, díky které přestávají být dostupné antimikrobiální látky účinné. Odhaduje se, že kolem roku 2050 bude ročně umírat 10 milionů lidí v důsledku infekce způsobené bakteriemi rezistentními k antibiotikům (O'Neill, 2014). Jedním z nejzávažnějších problémů je v současnosti vznik multirezistentních kmenů bakterií způsobujících nosokomiální infekce, zejména *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Enterococcus* spp., souhrnně označované jako ESKAPE patogeny. U infekcí způsobených těmito patogeny se předpokládá, že během několika málo let nebude k dispozici žádná účinná léčba (Rice, 2008).

Nicméně rezistence k antibiotikům není jev, který by se objevil až v posledních několika desetiletích. K jejímu rozvoji dochází už po miliony let, což prokázal Bhullar et al. objevem bakterií rezistentních ke 14 různým dnes komerčně dostupným antibiotikům, které pocházely z jeskyně v Novém Mexiku, jež byla izolovaná od vnějšího světa po více než 4 miliony let (Bhullar et al., 2012). Primárním důvodem je fakt, že buňka produkující antimikrobiální látku potřebuje být sama vůči ní odolná (Martínez, 2008). Je ale zjevné, že nadměrné užívání antibiotik šíření rezistence mezi bakteriemi značně urychlilo.

Právě z důvodu vzniku a rozšíření multirezistentních bakteriálních kmenů nastává potřeba vyvinout nová a účinnější terapeutika, která by buď zasahovala zcela odlišná cílová místa než doposud, nebo by cílila na systémy regulující expresi rezistenčních genů a dosáhla tak opětovného vzniku senzitivity bakterie k danému antibiotiku. Takovým cílovým místem by v obou zmíněných případech mohly být regulační nekódující RNA. Existuje např. představa antibiotika cílícího na bakteriální regulační element zvaný riboswitch (viz odd. 4.2). Tato struktura nebyla u člověka ani u jiných vyšších eukaryotních organismů doposud identifikována, a proto by byla zajištěna jeho antimikrobiální specifita účinku (Blount and Breaker, 2006; Mehdizadeh Aghdam et al., 2016). Avšak nadále přetrvává riziko, že si bakterie vytvoří rezistenční mechanismus chránící i tuto strukturu. V takovém

případě by se jako alternativní řešení nabízela možnost využití jiného typu regulačních RNA molekul jako terapeutických cílů, a to krátké regulační sRNA (viz odd. 3.1). Zde by byl vznik rezistence značně ztížen z důvodu existence více než jednoho cílového místa působení dané sRNA – bakterie by tedy musela vyvinout rezistenční mechanismus chránící každé takové místo, což by už bylo značně komplikované (Felden and Cattoir, 2018).

Dále se nabízí možnost vyvinout látku, která by interakcí s regulačním systémem rezistenčního genu zabránila jeho expresi. Pokud by se taková látka aplikovala současně s antibiotikem, ke kterému daný gen udílí rezistenci, mohla by se bakterie stát k tomuto antibiotiku znovu citlivá (Colameco and Elliot, 2017; Dar and Sorek, 2017).

V současné době žádná podobná látka (cílicí na regulační RNA) užívaná v klinické praxi neexistuje, nicméně do budoucna představuje zcela jistě slibnou alternativu k současně používaným léčivům. Avšak aby mohla být taková látka navržena, je potřeba v první řadě detailně porozumět všem aspektům regulačního působení nekódujících RNA, a proto je jejich studiu v poslední době věnována značná pozornost. Předložená práce si tak klade za cíl podat ucelený přehled o problematice regulace genové exprese pomocí ncRNA molekul, konkrétně se zaměřit na jeden z typů regulačních mechanismů, regulaci zprostředkovanou nepřekládanou 5' koncovou oblastí mediátorové RNA. Podrobně bude popsán zejména regulační element typu leader peptid, který je charakteristický pro některé geny antibiotické rezistence.

2 REGULACE GENŮ ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE JAKO VÝSLEDEK SNAHY O ZACHOVÁNÍ FITNESS

Genová exprese je proces, během kterého dochází k převedení informace z DNA do struktury finálního produktu, kterým může být protein, případně nekódující RNA (např. rRNA, tRNA). Tvorba genového produktu probíhá buď konstitutivně, nebo inducibilně. Konstitutivní exprese je typická pro geny kódující proteiny či RNA molekuly, které jsou nezbytné pro přežití buňky – jedná se o tzv. housekeeping geny. Naopak exprese inducibilní je typická pro geny, jejichž exprese je energeticky náročná a jejich produkty jsou potřebné pouze v určitých podmínkách. Pro spuštění exprese takových genů je nutný induktor, kterým může být mimo jiné chemická sloučenina, iont nebo také změna teploty či pH. Existuje mnoho různých typů stimulů, zpravidla se ale jedná o faktor relevantní k funkci regulovaného genu.

Geny antibiotické rezistence jsou obvykle exprimovány inducibilně (Mak et al., 2014). Nicméně je známo, že vlivem silného selekčního tlaku může docházet k transformaci původně inducibilní exprese na expresi konstitutivní. Tento jev je opakovaně popisován v případě *erm* genů, které udílejí rezistenci k makrolidům, linkosamidům a streptograminům B (Leclercq, 2002; Weisblum, 1995a). Exprese *erm*

genů je indukována 14-člennými a 15-člennými makrolidy (Leclercq and Courvalin, 1991). Pokud se ale pro léčbu infekce použije neindukující antibiotikum, ke kterému Erm *N*-methyltransferasa udílí rezistenci, dojde k vytvoření selekčního tlaku na vznik konstitutivně exprimované varianty genu (Leclercq, 2002). Prvně byl tento případ popsán u pacienta s infekcí způsobenou *Staphylococcus aureus* – zde se konstitutivní mutanta *erm* genu vyselektovala v důsledku léčby klindamycinem (linkosamid) (Watanakunakorn, 1976). K přeměně inducibilní exprese na konstitutivní dochází vlivem delecí, tandemových duplikací nebo bodových mutací v oblasti atenuátoru (viz odd. 3.2). Dále pak mohou mutace v regulační oblasti genu vést ke změnám specifity indukce (Depardieu et al., 2007).

Na druhou stranu konstitutivní exprese rezistenčních faktorů může pro buňku v nestresových podmínkách (tzn. za nepřítomnosti antibiotika) znamenat ztrátu fitness a dále plýtvání zdroji a energií, čímž vzniká selekční tlak na vyřazení takových genů z populace. Snížená fitness v důsledku exprese rezistenčních determinant „na prázdno“ je vcelku logickým vyústěním, neboť antibiotika ve většině případů cílí na klíčové buněčné komponenty a rezistenční determinanty pracující proti nim často fungují na principu modifikace cílového místa (dochází tedy ke změnám v těchto klíčových komponentách) (Andersson and Hughes, 2010). Kromě změny zásahového místa vyvolané produktem rezistenčního genu může k modifikaci dojít také vlivem náhodné mutace, což znamená, že i tento typ rezistenčního mechanismu snižuje fitness (Melnyk et al., 2015). Experimentálně byl negativní vliv na fitness bakterie potvrzen např. u rezistenčních genů *ermC*, *ampC* a *vanA*.

Erm rezistenční geny udílí zkříženou rezistenci ke třem skupinám strukturně odlišných antibiotik inhibujících proteinovou syntézu – jedná se o výše zmíněná MLS_B antibiotika, jejichž částečně se překrývající vazebná místa jsou lokalizována ve výstupním kanálu nascentního peptidu (NPET) 50S ribozomální podjednotky (Roberts et al., 1999). Erm *N*-methyltransferasa katalyzuje monomethylaci či dimethylaci dusíku aminoskupiny v pozici 6 adeninu A2058 (*Escherichia coli* číslování), který se nachází v 23S rRNA (v konzervované oblasti domény V) a který je součástí onoho vazebného místa. Rezistenční mechanismus této posttranskripční modifikace spočívá ve znemožnění vazby antibiotika do ribozomu, díky čemuž nedochází k zastavení proteosyntézy (Weisblum, 1995a). Na druhou stranu methylace adeninu způsobuje zásadní změnu jeho chemického charakteru. Hydrofobicita aminoskupiny vzrůstá a zároveň je vyloučena tvorba vodíkových můstků, jejichž prostřednictvím dochází k interakci s bezprostředním okolím a v důsledku toho např. k rozpoznávání nascentního peptidu (Gupta et al., 2013). Například Nakatogawa a Ito prokázali nezbytnost interakce mezi A2508 a nascentním řetězcem v případě *secM/secA* operonu. Pokud je A2058 dimethylován, nedochází k rozpoznání nascentního řetězce SecM (regulační protein sekreční dráhy) a tedy ani k řízenému uzavření ribozomu (tzv. ribosome stalling; viz odd. 4.4) nezbytnému pro spuštění translace SecA proteinu, který je nutný pro funkčnost dané sekreční dráhy (Nakatogawa and Ito, 2002). Obdobný negativní vliv na expresi některých proteinů vyplývající z posttranskripční modifikace A2058 dokázal Gupta et al. u enzymu pyruvátdehydrogenasy PoxB (katalyzující oxidaci pyruvátu za vzniku acetyl-CoA), a pro několik dalších proteinů jej předpokládá. Je tedy zřejmé, že bude v tomto případě proti konstitutivní expresi *erm*

genu působit silný selekční tlak a naopak exprese inducibilní bude zvýhodněna, neboť díky ní bude negativní vliv na genovou expresi a potažmo fitness minimalizován a zároveň bude zajištěna vysoká efektivita rezistenčního působení v přítomnosti antibiotika (Gupta et al., 2013; Munita and Arias, 2016).

Morosini et al. dále prokázali, že s poklesem fitness je spojen i rezistenční gen *ampC* (kódující β -laktamasu) u bakterie *Salmonella* Typhimurium. AmpC enzym udílí rezistenci k β -laktamovým antibiotikům, neboť katalyzuje jejich inaktivaci. Kolonie buněk konstitutivně exprimující AmpC vykazovaly odlišnou morfologii (byly plošší a hrubější) a navíc byly jejich buňky větší a často obsahovaly zdvojený genom, což naznačuje, že byla narušena tvorba přepážky a/nebo proces buněčné segregace. Experimenty také ukázaly, že AmpC β -laktamasa je zodpovědná za sníženou růstovou rychlost a sníženou invazivitu buněk *Salmonella*. Pokud se ale do bakterie vložil regulační gen *ampR*, který zajistil inducibilní expresi *ampC*, morfologické rysy, rychlost růstu i invazivita se vrátily do normálu a vykazovaly stejné parametry jako kontrolní kmeny bez genu *ampC* (Morosini et al., 2000).

Přímou kvantifikaci fitness nákladů provedl Foucault s kolegy pro rezistenční gen *vanA*, který je součástí *vanA* rezistenčního operonu udílejícího rezistenci ke glykopeptidovým antibiotikům, která negativně působí na syntézu buněčné stěny. Mechanismus rezistence spočívá v modifikaci prekurzorů peptidoglykanu, v důsledku čehož se antibiotikum váže s výrazně nižší afinitou (Bugg et al., 1991). V případě tvorby enzymu VanA bakterie vykazuje o 20 až 38 % nižší rychlost růstu. Nicméně exprese tohoto rezistenčního operonu je přirozeně inducibilní. Pokud tedy není přítomen induktor (antibiotikum), enzym se nevyrábí a náklady na fitness jsou minimální (Foucault et al., 2009).

Zmíněné příklady tedy jednoznačně dokládají, že konstitutivní exprese rezistenčních determinant v určitých případech poskytuje buňce pouze dočasnou výhodu. Z tohoto důvodu vzniká potřeba vyvinout sofistikované regulační mechanismy umožňující inducibilní expresi rezistenčního genu pouze v přítomnosti antibiotika. Využitím inducibilní exprese vzniká kompromis mezi několika zájmy buňky – udržování fitness na co nejvyšší úrovni, šetrné zacházení s energetickým poolem a zdroji a zároveň zůstává možnost flexibilně se přizpůsobovat rychle se měnícím podmínkám prostředí. Tyto výhody inducibilně exprimovaných rezistenčních faktorů negativně ovlivňujících fitness, jsou tedy silným předpokladem pro snazší rozšíření a dlouhodobější přetrvání v populaci než je tomu u jejich konstitutivně exprimovaných variant, a znamenají pro buňku nemalou výhodu v evolučním boji (Chancey et al., 2012; Depardieu et al., 2007). Inducibilní charakter exprese může být zajišťován proteiny nebo regulačními RNA molekulami.

3 REGULAČNÍ ncRNA U BAKTERIÍ

Ribonukleová kyselina (RNA) je biopolymer skládající se z nukleotidových monomerů, k jejichž polymeraci dochází v procesu zvaném transkripce. Během ní je řetězec RNA syntetizován podle templátového vlákna DNA na základě komplementarity bází. Rozlišujeme dva základní typy RNA

molekul, nekódující (ncRNA) a kódující (mRNA). Kódující RNA zprostředkovává přenos informace z DNA do proteinů a u bakterií se vyskytuje ve dvou podobách, monocistronní, nesoucí pouze jeden gen a polycistronní, nesoucí dva či více genů. Výhoda transkripce několika genů do jedné polycistronní mRNA spočívá v možnosti jejich společné regulace (Jacob and Monod, 1961). Z tohoto důvodu se často jedná o funkčně související geny, které jsou součástí jednoho metabolického či fyziologického procesu nebo geny kódující podjednotky jednoho proteinového komplexu.

Nekódující RNA (ncRNA) nekódují smysluplný peptid a obvykle neobsahují žádný otevřený čtecí rámec (ORF). Můžeme je rozdělit do dvou hlavních funkčních skupin, housekeeping ncRNA a regulační ncRNA. ncRNA s housekeeping funkcí se podílejí zejména na zajišťování základních buněčných funkcí. Patří sem mimo jiné tři typy ribozomální RNA (23S rRNA, 5S rRNA a 16S rRNA), transferová RNA (tRNA), transferová-mediátorová RNA (tmRNA), 4,5S RNA (součástí SRP částice proteinové sekreční dráhy) nebo ribonukleasa P (ribozym). Speciálním příkladem bakteriálních nekódujících RNA jsou crRNA a tracrRNA systému adaptivní imunity. Tento systém zvaný CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) má schopnost cíleně degradovat cizorodé nukleové kyseliny typu virové DNA a RNA či plasmidové DNA. Tyto ncRNA tedy mají jak funkci housekeepingovou (ochrana bakterie před virem), tak i funkci regulační (regulace počtu kopií určitého plasmidu) (Lander, 2016).

Druhou skupinou jsou regulační ncRNA, jejichž hlavní funkcí je kontrola průběhu mnoha buněčných biologických procesů – zodpovídají primárně za regulaci transkripce a translace, stabilitu mRNA, údržbu DNA, genový silencing nebo za regulaci proteinové aktivity (Mandin et al., 2013; Waters and Storz, 2009).

Vůbec první hypotézu o možném regulačním působení RNA vyslovili Jacob a Monod roku 1961 (Jacob and Monod, 1961). Jejich domněnka byla potvrzena o zhruba desetiletí později, kdy byl objeven vnitřní regulační element řídící expresi *trp* operonu u *Escherichia coli* (Jackson and Yanofsky, 1973). Další typ regulačních RNA, sRNA, byl objeven v 80. letech, kdy byly identifikovány krátké nekódující antisense RNA molekuly regulující kopiové číslo plasmidů ColE1 a R1 prostřednictvím blokace jejich replikace (Stougaard et al., 1981; Tomizawa et al., 1981). Zajímavé je, že podobná regulační RNA (miRNA) byla u eukaryot objevena mnohem později, na začátku 90. let (Lee et al., 1993).

Regulační RNA mohou působit ve dvou formách, buď jako samostatné malé molekuly (odd. 3.1) regulující gen kódovaný na jiné molekule RNA (mRNA), nebo mohou být přímo součástí 5' koncové nepřekládané oblasti mRNA a tvořit tak tzv. vnitřní regulační element neboli 5'UTR element (odd. 3.2), který kontroluje expresi genu lokalizovaného na stejné molekule. Je tedy zřejmé, že vnitřní regulační RNA elementy působí vždy intramolekulárně a fungují *in cis*, zatímco malé regulační RNA vykonávají funkci intermolekulárně, a to buď způsobem *in cis* (antisense sRNA), nebo *in trans* (ostatní sRNA). Funkce obou základních typů regulačních RNA molekul může být aktivační, tj. spuštění exprese genu či zvýšení stability mRNA, nebo represivní, tj. utlumení genové exprese nebo zvýšení náchylnosti mRNA k degradaci ribonukleasami (Dersch et al., 2017; Mandin et al., 2013).

Jak již bylo diskutováno výše, geny antibiotické rezistence nezdědka podléhají přísné regulaci, která je velmi často zprostředkována právě regulačními RNA molekulami. Popsány byly regulace prostřednictvím sRNA (viz odd. 3.1), ze skupiny r5'UTR elementů (viz odd. 3.2) je pak velmi rozšířen tzv. leader peptid riboregulátor, který se typicky nachází u genů udílejících rezistenci k antibiotikům cílícím na translační aparát buňky (viz odd. 4.4). Dále byla publikována práce popisující riboswitch, který váže aminoglykosidová antibiotika a řídí expresi příslušných rezistenčních genů, nicméně o relevantnosti této studie se dosud vedou diskuze (viz odd. 4.2.1).

V následujících oddílech jsou přehledně a stručně představeny dva základní typy regulačních ncRNA molekul. Vnitřní regulační elementy, jejichž charakterizace je primárním zájmem této práce, jsou podrobně rozebrány v samostatné kapitole č. 4.

3.1 INTERMOLEKULÁRNĚ PŮSOBÍCÍ ncRNA

Intermolekulárně působící regulační ncRNA jsou krátké RNA molekuly o délce 50 až 300 nukleotidů, běžně označované jako sRNA (Storz et al., 2011). Podle umístění v genomu je dělíme na *cis*-kódované a *trans*-kódované. *Cis*-kódované sRNA vznikají přepisem komplementárního vlákna genu, který je touto ncRNA řízen, proto bývají označované jako antisense sRNA. Tyto malé regulační RNA vykazují minimálně svou částí stoprocentní shodu v párování s cílovou mRNA. Naproti tomu *trans*-kódované sRNA vznikají přepisem DNA úseku zcela mimo regulovaný gen, proto u nich nacházíme pouze částečnou komplementaritu s cílovou RNA (Mandin et al., 2013; Waters and Storz, 2009).

Malé regulační RNA molekuly kontrolují genovou expresi v pozitivním i negativním (častější) smyslu většinou na úrovni iniciace translace a mRNA stability, ale mohou ovlivňovat i proces transkripce (Mandin et al., 2013; Waters and Storz, 2009). Vazba sRNA do blízkosti ribozom-vazebného místa (RBS) znemožňuje nasedání malé ribozomální podjednotky, a tedy iniciaci translace. V jiných případech pak může párování s malou regulační RNA rozrušit vlásenku maskující RBS, což vede ke spuštění translace (Mandin et al., 2013). Vazba sRNA dále může podmiňovat zvýšení stability mRNA, nebo naopak může vést k degradaci mRNA ribonukleasami, záleží na poloze místa, kde k vazbě dochází (Mandin et al., 2013). Vedle toho existují také malé RNA, které neřídí buněčné děje párováním s nukleovými kyselinami, ale prostřednictvím interakce s proteiny, jejichž aktivitu tak přímo ovlivňují (Romby and Charpentier, 2010).

Regulace pomocí sRNA je u bakterií obecně velmi rozšířená a je známo, že některé z nich se podílejí i na modulaci genů, které ovlivňují citlivost buňky k antibiotikům (jedná se ale spíše o celkovou adaptaci než o specifické rezistenční mechanismy). sRNA mohou řídit mj. geny pro příjem látek z okolí (MicF, GcvB či RyhB sRNA), geny pro transport látek ven z buňky (DsrA či RyeB sRNA), geny kódující proteiny, které vytváří změny v cílových místech antibiotik (MgrR či SroC sRNA) nebo geny kódující proteiny pro tvorbu biofilmu (RybB sRNA) (Dersch et al., 2017; Felden and Cattoir, 2018).

3.2 VNITŘNÍ REGULAČNÍ RNA ELEMENTY

Vnitřní regulační RNA elementy jsou součástí nepřekládané oblasti mRNA (UTR), a protože se ve velké většině případů nacházejí na 5' konci, jsou zkráceně nazývány r5'UTR elementy nebo mRNA vedoucí elementy. Názvosloví těchto regulátorů není obecně sjednoceno a v literatuře se tak setkáváme s pojmy, které různí autoři definují jinak. V tomto textu je označení riboregulátor používáno jako nejobecnější název pro jakoukoli ribonukleovou kyselinu s regulační funkcí. Výraz atenuátor pak odkazuje na *cis*-působící regulační element lokalizovaný v 5' koncové oblasti mRNA, který má schopnost tvorby dvou vzájemně se vylučujících sekundárních struktur za účelem oslabení exprese příslušného genu (Dersch et al., 2017; Henkin, 2008; Naville and Gautheret, 2009; Winkler and Breaker, 2005).

Jak již bylo řečeno, tyto regulační elementy působí *in cis* – nachází se na stejné molekule jako regulovaný gen, a modulují expresi downstream kódovaného proteinu. Principem regulačního působení r5'UTR elementů je jejich schopnost zaujmout dvě alternativní sekundární struktury (stav „ON“ a „OFF“) na základě více či méně specifických buněčných nebo environmentálních signálů a prostřednictvím této změny ovlivnit expresi genu. Takový signál může být jednak charakteru látkového (iont, metabolit, tRNA, ribozomální protein nebo pozastavený ribozom) a jednak charakteru fyzikálně-chemického (změna teploty či pH) a riboregulátorem může být detekován buď přímo (typicky riboswitch nebo RNA teplotní senzor), nebo nepřímo (ribozom pozastavený na regulačním uORF kódovaným v 5'UTR oblasti – buňka detekuje přítomnost antibiotika nebo např. nepřítomnost kódované aminokyseliny na základě schopnosti ribozomu translatovat) (Mandin et al., 2013; Naville and Gautheret, 2009; Winkler and Breaker, 2005).

Regulace je možná na dvou úrovních, transkripční a translační. V případě transkripční atenuace je součástí „OFF“ struktury terminační vlásenka (struktura bohatá na GC páry zakončená několika po sobě jdoucími uridiny), která zapříčiní předčasné ukončení transkripce – RNA polymerasa nepřepíše downstream lokalizovaný ORF. A naopak „ON“ struktura vytváří tzv. antiterminační vlásenku, která umožňuje tvorbu kompletního transkriptu. Mechanismus translační atenuace se poněkud odlišuje, neboť to, zda bude daný gen exprimován nebo ne, závisí na přístupnosti ribozom-vazebného místa. Ve struktuře „OFF“ je RBS součástí stabilní vlásenky a ribozom tak na něj nemůže nasednout a začít translatovat, zatímco ve struktuře „ON“ je RBS volně přístupné a syntéza proteinu může probíhat (Dar and Sorek, 2017; Waters and Storz, 2009; Winkler and Breaker, 2003).

Vytvořit ucelený přehled a detailně popsat jednotlivé typy vnitřních regulačních elementů lokalizovaných ve vedoucí oblasti mRNA je cílem následující kapitoly. Zvláštní důraz je kladen zejména na regulační element typu leader peptid podílející se na řízení exprese mnoha genů, které udílí rezistenci k antibiotikům cílícím na buněčný translační aparát.

4 VNITŘNÍ r5'UTR ELEMENTY

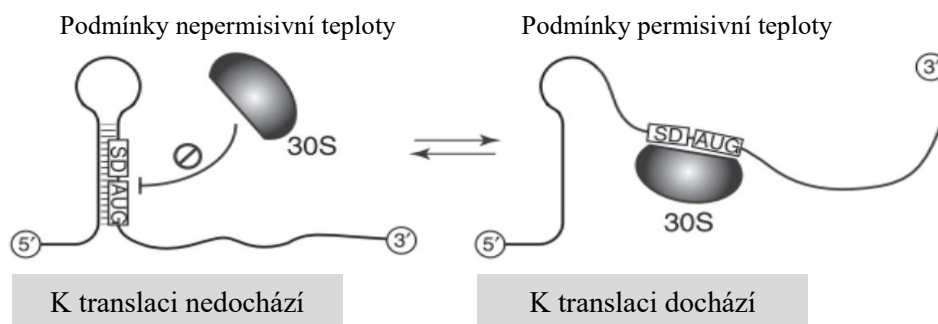
4.1 r5'UTR ELEMENT REAGUJÍCÍ NA ZMĚNY FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÝCH FAKTORŮ

Regulační působení mRNA vedoucích elementů je založené na schopnosti tvořit dvě různé sekundární struktury, tedy na možnosti formovat vodíkové můstky mezi různými oblastmi regulačního RNA řetězce nebo tyto nevazebné interakce zcela zrušit. Je známo, že stabilita vodíkových můstků je ovlivnitelná mnoha různými fyzikálně-chemickými faktory, mezi jinými teplotou, pH a osmolaritou (Mandin et al., 2013). Právě na principu změny sekundární struktury RNA molekuly způsobené rušením a přeskládáním vodíkových vazeb vlivem teploty a pH fungují následující dva typy 5' koncových regulačních elementů – RNA teplotní senzor a pH-dependentní regulační element. Oba tyto riboregulátory jsou některými autory řazeny mezi riboswitche a označovány za jejich nejjednodušší typ (Bastet et al., 2011; Grundy and Henkin, 2006; Henkin, 2008; Waters and Storz, 2009), nicméně jejich struktura i samotný mechanismus fungování vykazuje určité odlišnosti (viz dále) a v této práci jsou proto postaveny do samostatné skupiny regulačních mRNA elementů.

4.1.1 RNA TEPLITNÍ SENZOR

RNA teplotní senzor (RNA thermometer) je regulační element modulující genovou expresi na translační úrovni na základě měnící se teploty prostředí. Většinou platí, že pokud je element vystaven vyšší teplotě, dochází ke spuštění translace, a naopak v nízké teplotě je iniciace translace inhibována. Popsáno ale bylo i několik RNA teplotních senzorů fungujících opačně, tedy že ke spuštění exprese dochází v nízkých teplotách (Abduljalil, 2018; Ignatov and Johansson, 2017). Tento neobvyklý typ riboregulátoru se vyskytuje např. u proteinu chladového šoku zvaného CspA, který se nachází u bakterie *Escherichia coli* (Yamanaka et al., 1999). Příkladem klasického typu může být transkripční aktivátor virulencních faktorů LcrF bakterie *Yersinia pestis* (Hoe and Goguen, 1993).

Struktura RNA teplotních senzorů není obecně konzervovaná (Ignatov and Johansson, 2017). Obvykle je v nízkých teplotách tvořena stabilní vlásenkou, jejíž součástí je ribozom-vazebné místo – Shine-Dalgarno (SD) sekvence a start kodon AUG, což znamená, že nedochází k translaci. Zvýší-li se teplota, komplementární úseky se začnou oddělovat a do RBS může nasedat 30S ribozomální podjednotka. Pokud zvyšování teploty pokračuje, vlásenková struktura se rozvolní úplně, zformuje se iniciační komplex a dojde k započetí translace (Obr. 1) (Chowdhury et al., 2006).



Obr. 1: Schematické znázornění typického RNA teplotního senzoru. Při nepermissivní teplotě páruje oblast ribozom-vazebného místa s komplementárním úsekem na mRNA. Taktto zformovaná vlásenka neumožňuje nasednutí malé ribozomální podjednotky. Po vystavení permissivní teplotě jsou vodíkové vazby přerušeny a struktura se rozvolní. Ribozom nasedá na Shine-Dalgarno sekvenci a spouští se translace. (Mandin et al., 2013) - upraveno

Detekci teplotních změn může kromě RNA zprostředkovávat také DNA (na základě změn v nadšroubovicovém vinutí) nebo proteiny (na základě konformačních změn), nicméně regulace těmito molekulami je mnohem méně efektivní, mj. z důvodu delšího časového intervalu vyžadovaného k projevení se změny v expresi a stejně tak delšího časového úseku nutného pro úplné ukončení fyziologické odpovědi (Falconi et al., 1998; Hurme and Rhen, 1998; Johansson and Cossart, 2003).

RNA teplotní senzory (nebo jiné teplotně-dependentní regulátory exprese) jsou typické zejména pro geny kódující proteiny teplotního šoku a pro geny kódující virulenční faktory patogenních bakterií, které napadají teplotně závislé živočichy (Klinkert and Narberhaus, 2009; Maurelli, 1989).

4.1.2 RNA DETEKUJÍCÍ ZMĚNY pH

Druhým typem riboregulátoru detekujícím změny fyzikálně-chemických faktorů je tzv. PRE element (pH-responsive RNA element), který řídí expresi downstream genu v závislosti na hodnotách pH. První pH-závislý r5'UTR element byl charakterizován u *alx* genu kódujícího pravděpodobně transportový protein (Nechooshtan et al., 2009). Regulace se stejně jako v předchozím případě projevuje na translační úrovni. V podmínkách neutrálního pH riboregulátor tvoří strukturu označovanou „N“, která maskuje RBS a nedovoluje tak translaci. Dostane-li se buňka do prostředí alkalického (vysoké pH), interakce uvnitř regulačního elementu se přeorganizují a vznikne struktura zvaná „H“, která již translaci umožňuje, neboť RBS je zpřístupněno pro ribozom. Později bylo dokázáno (Nechooshtan et al., 2014), že pro změnu N struktury na H strukturu je potřeba, aby se RNA polymerasa během transkripce pozastavila na specifické pauzovací sekvenci, což zapříčiní právě zvýšené pH. Samovolná přeměna struktury N na H neprobíhá, protože N uspořádání vykazuje vyšší stabilitu (Nechooshtan et al., 2009).

4.2 r5'UTR ELEMENT REAGUJÍCÍ NA PŘÍTOMNOST SPECIFICKÝCH MALÝCH MOLEKUL

Vnitřní regulační element, který přímo specificky váže malé molekuly a na základě této interakce „přepíná“ genovou expresi do stavu vypnutého či zapnutého, se označuje jako riboswitch. Jde v podstatě o velmi jednoduchý regulační systém, který umožňuje bez potřeby dalších proteinových faktorů tvorbu genového produktu z mRNA na základě momentálního chemického složení prostředí (Nudler and Mironov, 2004; Sudarsan et al., 2003).

Riboswitchový element se skládá ze dvou funkčních domén, aptameru a expresní platformy (Winkler et al., 2002). Aptamerová neboli senzorová doména je zodpovědná za selektivní vazbu efektorové molekuly a vyznačuje se vysoce konzervovanou nukleotidovou sekvencí i sekundární strukturou. Toto zjištění není příliš překvapivé, neboť RNA molekula se skládá pouze ze čtyř druhů monomerů a existuje tedy jen omezené množství možností, jak vytvořit vazebnou kapsu specifickou pouze pro jedinou konkrétní molekulu. Naopak u proteinů, které jsou rovněž schopné specificky vázat různé ligandy, je k dispozici mnohem vyšší počet sekvenčních variant dosahujících stejného výsledku (selektivní vazby určitého ligandu), neboť tyto biomolekuly jsou tvořeny dvaceti různými monomery. To je důvodem, proč proteiny vázající tentýž ligand nevykazují tak vysokou uniformitu v charakteru svých vazebných kapes (Mandal and Breaker, 2004).

Mezi ligandy, které je aptamerová doména schopná selektivně vázat, patří především různé deriváty RNA monomerů a jejich prekurzorů (koenzymy, nukleotidové deriváty, signalizační molekuly), ionty, aminokyseliny a jiné malé metabolity (McCown et al., 2017). Typickým znakem riboswitchů je jejich vysoká specifita, neboť jsou při vazbě ligandu schopné rozlišovat i mezi tak podobnými molekulami, jako jsou např. prekurzory nebo jednoduché deriváty příslušné rozpoznávané molekuly (Peselis and Serganov, 2014). Vysoká specifita vazby byla demonstrována mj. u riboswitchu vázajícího guanin – v případě, že byl použit guaninový analog 2-aminopurin, disociační konstanta vzrostla více než desetitisícinásobně (Mandal et al., 2003).

Existuje několik univerzálních strategií, jak je této vysoké selektivity dosaženo (Obr. 2). Na prvním místě stojí tvarové přizpůsobení ligand-vazebné kapsy, které vyloučí vazbu větších a strukturně rozdílných molekul. Vysokou úroveň tvarového přizpůsobení vykazuje např. lysinový riboswitch, který tvoří velice těsnou vazebnou kapsu a po navázání lysinu změní konformaci do podoby, kdy až 98 % povrchu ligandu je v kontaktu s RNA (Obr. 2A). Takto vysoká hodnota značí, že i jen málo strukturně odlišné molekuly se budou do tohoto aptameru vázat s velmi malou pravděpodobností (Peselis and Serganov, 2014; Serganov et al., 2008).

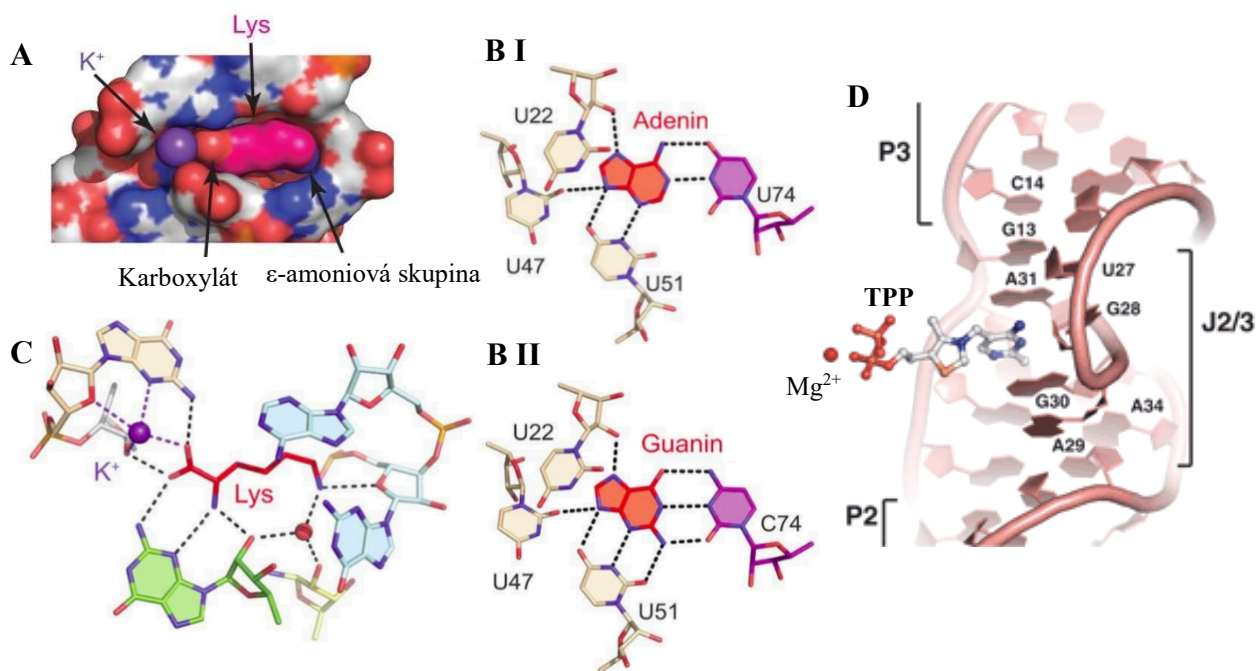
Druhou klíčovou strategií je tvorba různých typů nevazebných interakcí mezi ligandem a aptamerem, které zajišťují kromě selektivity i afinitu a správnou prostorovou orientaci vázané molekuly. Jedná se především o vodíkové můstky, které mohou mít i podobu Watson-Crickova párování (v případě

nukleotidů a jejich derivátů), dále pak různé elektrostatické interakce a stacking interakce (Peselis and Serganov, 2014).

Zajímavá situace byla popsána např. u adeninového a guaninového riboswitchu, u kterých jsou pro vazbu ligandu klíčové čtyři nukleotidy (Obr. 2B I a 2B II). Tři z těchto nukleotidů jsou v obou případech identické (U22, U47 a U51), čtvrtý nukleotid v pozici 74 je ale unikátní a určuje specifitu (U74 pro adenin, C74 pro guanin), neboť dovoluje pouze vazbu molekuly splňující pravidla o Watson-Crickově párování: uracil-adenin, cytosin-guanin. Vázaný adenin, resp. guanin využívá všech svých heteroatomů a tvoří ještě několik nekanonických vodíkových můstků. Soubor všech těchto interakcí tedy zajišťuje požadovanou prostorovou orientaci a dostatečně vysokou specifitu a afinitu (Serganov et al., 2004).

Jelikož riboswitchem vázanou molekulou může být i iont (F^- , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} a Co^{2+}) nebo sloučenina nesoucí nabitě funkční skupiny (především fosfátové, karboxylátové a amoniové), můžeme ve vazebné kapse nalézt také interakce elektrostatické (McCown et al., 2017; Peselis and Serganov, 2014). Tento typ interakcí se nachází mj. u již jednou zmiňovaného lysinového riboswitchu, jehož ligand nese jak záporně, tak kladně nabitě funkční skupiny (Obr. 2C). Elektrostatické interakce se zde vyskytují mezi kladně nabitou ϵ -aminoskupinou lysinu a záporně nabitým fosfátem RNA molekuly nebo mezi záporně nabitou α -karboxylátovou skupinou lysinu a přidruženým iontem K^+ , který se nachází ve vazebné kapse aptamerové domény společně s ligandem. Spolupráce riboswitchu s kladně nabitým iontem je poměrně běžná, protože právě díky němu je umožněna vazba ligandu se záporným nábojem – bez kooperujícího kationtu by docházelo ke vzájemnému odpuzování se se záporně nabitými fosfáty molekuly RNA (Peselis and Serganov, 2014; Serganov et al., 2008). Funkci stínění náboje může dále vykonávat např. Mg^{2+} , který je typický pro fluoridový či thiaminpyrofosfátový riboswitch (Ren et al., 2012; Serganov et al., 2006).

U thiaminpyrofosfátového (TPP) riboswitchu nacházíme i další typ nevazebných interakcí, stacking interakce (Obr. 2D). Thiaminpyrofosfát se skládá ze tří strukturních jednotek: pyrimidinového derivátu HMP (4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidin), thiazolu a difosfátu, a právě HMP kruh je v aptamerové vazebné kapse kotven mimo jiné prostřednictvím stacking interakcí s mRNA bázemi G30 a A31 (Serganov et al., 2006; Thore et al., 2006).



Obr. 2: Přehled univerzálních strategií využívaných riboswitchem k ukotvení ligandu do vazebné kapsy. Barevné znázornění atomů – červená: kyslík, modrá: dusík, oranžová: fosfor, šedá: uhlík, žlutá: síra. Nevazebné interakce jsou vyznačeny přerušovanou linií. (A) Lysinový riboswitch tvoří velmi těsnou ligand-vazebnou kapsu, čímž zvyšuje svou specifitu. Schéma ukazuje surface model aptamerové domény, navázaný lysin (růžově) a přidružený draselný iont (fialově). (B) Některé typy ligandů interagují s riboswitchem prostřednictvím Watson-Crickových vodíkových můstků. V případě adeninového (B I) a guaninového (B II) riboswitchu je tento typ interakcí esenciální pro rozpoznání příslušného ligandu (červeně). Znázorněny jsou pouze nukleotidy podílející se na kotvení efektorové molekuly. Nukleotid v pozici 74 (fialově) v obou případech udává specifitu. (C) Lysin je do příslušné aptamerové domény kotven mj. prostřednictvím elektrostatických interakcí. Vazba aminokyseliny do RNA struktury vyžaduje přítomnost K^+ kationtu (fialově), který odstíní záporně nabitou karboxylátovou skupinu. Dále ve vazebné kapse nacházíme molekulu vody (červeně), která zprostředkovává pomocí vodíkových můstků kontakt ligandu s aptamerem. (D) Thiaminpyrofosfát je do svého riboswitchu kotven v oblasti J2/3 výdutě mimo jiné pomocí stacking interakcí mezi HMP kruhem a nukleotidy G30 a A31. Pro odstínění záporného náboje fosfátu je zde využit iont Mg^{2+} . (Peselis and Serganov, 2014; Thore et al., 2006) - upraveno

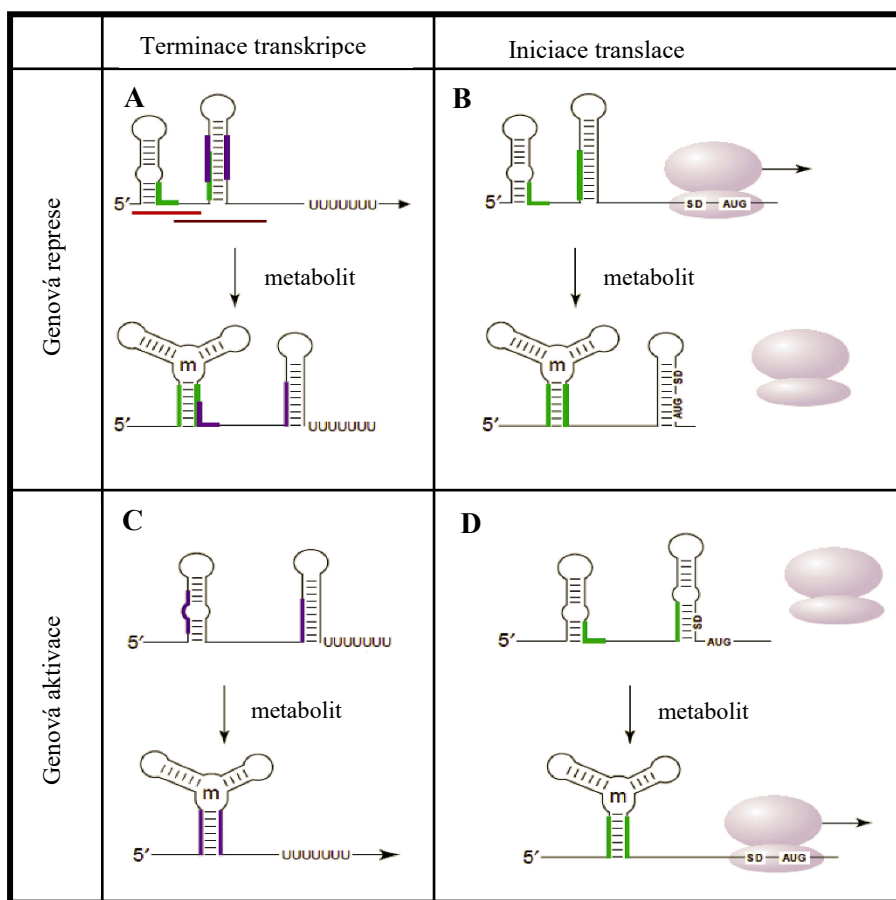
Na druhou stranu vazba molekul na základě hydrofobních sil, která se často objevuje u proteinů, je v případě RNA ligand-vazebných domén vyloučena. Důvodem jsou rozdílné chemické vlastnosti obou biomolekul – proteiny mohou být zčásti tvořeny nepolárními aminokyselinami (např. leucin, fenylalanin, valin) umožňujícími tento typ interakcí, zatímco RNA řetězec se skládá výhradně z hydrofilních komponent (heteroatomy a funkční skupiny nukleotidů slouží jako donory a akceptory vodíkových můstků), které vylučují takovou interakci (Peselis and Serganov, 2014).

Druhou funkční doménou riboswitchů je expresní platforma, jejíž úlohou je modulace genové exprese na základě signálu (změny sekundární struktury) přicházejícího z aptamerové domény. Komunikaci mezi oběma zmíněnými doménami zprostředkovává tzv. přepínací sekvence (switching sequence), která má možnost párovat jak s aptamerovou oblastí, tak s expresní platformou (Garst et al., 2011).

Atenuační působení bakteriálních riboswitchů je možné na transkripční nebo translační úrovni (Nudler and Mironov, 2004). Po vazbě ligandu do aptameru většinou dochází k vypnutí genové exprese, ale možné je i opačné fungování (Waters and Storz, 2009). Shrnující schéma viz Obr. 3.

Riboswitch může v závislosti na přítomnosti či nepřítomnosti rozpoznávané molekuly vytvořit vnitřní terminační vlásenku a ukončit tak předčasně transkripci (Obr. 3A, 3C). V případě, že dojde ke změně sekundární struktury v aptamerové doméně, projeví se změna sekundární struktury i v expresní platformě a zformuje se antiterminační vlásenka, která umožní tvorbu kompletního transkriptu (Sherwood and Henkin, 2016).

Regulace na translační úrovni (Obr. 3B, 3D) funguje obdobně jako u výše popisovaného RNA teplotního senzoru či pH-dependentního riboregulátoru (odd. 4.1), rozdíl je pouze v typu faktoru, který rozhoduje o změně sekundární struktury mRNA (Sherwood and Henkin, 2016).



Obr. 3: Schematické znázornění regulačních strategií riboswitchů. Horní polovina schématu: po navázání efektorové molekuly do aptamerové domény dojde ke změně sekundární struktury, která vede k zastavení genové exprese na transkripční (A) či translační (B) úrovni. Dolní polovina schématu: navázání ligandu do aptamerové domény vede ke změně sekundární struktury do podoby, která umožňuje další průběh transkripce (C) či translace (D). (Abduljalil, 2018) - upraveno

Přestože mechanismus regulačního fungování riboswitchů není komplikovaný, je tento systém schopný zajistit i značně sofistikovanou kontrolu genové exprese, a to prostřednictvím tandemového uspořádání dvou riboswitchových elementů na jedné molekule mRNA. Například Sudarsan et al. detailně charakterizoval takový atenuační systém u bakterie *Bacillus clausii*, konkrétně u genu *metE* kódujícího methioninsynthasu, jehož 5'UTR oblast mRNA obsahuje dva tandemové riboswitche, z nichž jeden váže S-adenosylmethionin (SAM) a druhý váže koenzym B₁₂ neboli adenosylcobalamin (AdoCbl). V uvedeném případě dochází v přítomnosti obou ligandů k maximální represí genové

exprese, zatímco vazba pouze jednoho z nich vede pouze k částečnému utlumení exprese. Toto uspořádání tedy zajišťuje jemnější kontrolu tvorby genového produktu (Sudarsan et al., 2006).

Rozšíření a diverzita riboswitchových 5'UTR elementů je značná u bakterií, naopak v doméně Archaea a Eukarya se s tímto typem regulátorů exprese setkáváme jen výjimečně. Doposud byly u těchto dvou skupin identifikovány pouze dvě třídy riboswitchů, fluoridový a thiaminpyrofosfátový, a to pouze u vývojově nižších organismů (Barrick and Breaker, 2007; McCown et al., 2017). Naproti tomu u bakterií jsou nezdědka pomocí různých typů riboswitchů řízeny mj. geny kódující proteiny, které jsou součástí určité biosyntetické či transportní dráhy, v níž hraje roli riboswitchem rozpoznávaný ligand. Tímto mechanismem je zajištěna zpětnovazebná regulace, která se podílí na udržení hladiny příslušných metabolitů ve fyziologických mezích (Romby and Charpentier, 2010).

4.2.1 EXISTUJE RIBOSWITCH PRO KONTROLU AMINOGLYKOSIDOVÉ REZISTENCE?

V roce 2013 byl publikován článek (Jia et al., 2013), který dle autorů dokládá existenci riboswitchu vázajícího některá aminoglykosidová antibiotika a na základě této vazby spouští expresi příslušného rezistenčního proteinu. V publikaci byly konkrétně popsány dva geny pod touto kontrolou, *aac* a *aad*, udílející rezistenci k aminoglykosidovým antibiotikům prostřednictvím jejich acetylace, resp. adenylace. O relevantnosti celé této studie se nicméně vedou diskuze (Chen and Murchie, 2014; He et al., 2013; Roth and Breaker, 2013) a existence riboswitchu vázajícího aminoglykosidy dosud nebyla potvrzena (Dar and Sorek, 2017).

Nejvíce problematická je v tomto případě skutečnost, že aminoglykosidové rezistenční geny jsou běžně asociované s integrony a vedoucí oblast mRNA nesoucí *aac/aad* se částečně překrývá s *attI1* rekombinačním místem. Z tohoto důvodu 5' konce takových genů vykazují značnou sekvenční uniformitu. Vedoucí oblast mRNA, která je sekvenčně homologická u většího počtu genů, pak může být milně interpretována jako riboregulatorová oblast řídící všechny tyto geny shodným mechanismem (Roth and Breaker, 2013). Dalším významným argumentem proti existenci aminoglykosidového riboswitchu je fakt, že aminoglykosidy jsou molekuly kladně nabitě, a tedy schopné se záporně nabitou RNA tvořit interakce, které nemusí být specifické, tzn. biologicky relevantní, a jejichž výsledkem tak není regulační působení (Roth and Breaker, 2013).

Obecně vzato ale není důvod, proč by riboswitchu vázající antibiotika nemohly existovat. Naopak se zdá, že regulace rezistenčních genů zprostředkovaná riboswitchem přímo vázajícím tuto antimikrobiální látku, by byla pro bakterii velmi výhodná. Důvodem je fakt, že riboswitch teoreticky může vázat jakýkoli typ antibiotika (naproti tomu např. riboregulator typu leader peptid je schopný detekovat pouze antibiotika inhibující translaci (viz odd. 4.4)). Skutečnost, že RNA může velmi specificky vázat například právě aminoglykosid neomycin a na základě toho modulovat expresi, dokázali Weigand et al., neboť se jim podařilo takový riboswitch uměle připravit (Weigand et al., 2008).

4.3 r5'UTR ELEMENT REAGUJÍCÍ NA PŘÍTOMNOST SPECIFICKÉ NENABITÉ tRNA

Regulaci exprese downstream lokalizovaného strukturního genu v závislosti na vazbě specifické nenabité tRNA molekuly zprostředkovává mRNA vedoucí oblast zkráceně nazývaná T-box. Tento typ vnitřního regulačního RNA elementu váže efektorovou neproteinovou molekulu přímo, stejně jako riboswitch, a proto je některými autory označován jako jejich podskupina (Gutiérrez-Preciado et al., 2009; Mehdizadeh Aghdam et al., 2016). Nicméně oba tyto riboregulátory se liší co do struktury i typu rozpoznávaných molekul – riboswitch váže malé molekuly, zatímco T-box je schopen vazby ligandu mnohem komplexnějšího (Naville and Gautheret, 2009), proto je zde zařazen do samostatné kategorie r5'UTR elementů.

Poprvé byl T-box element identifikován roku 1992 nezávisle u dvou genů ligas, genu pro tyrosyl-tRNA synthetasu a pro threonyl-tRNA synthetasu (Henkin et al., 1992; Putzer et al., 1992). Později byla prokázána jeho přítomnost i u genů kódujících enzymy aminokyselinové biosyntézy (syntéza těchto enzymů je velice energeticky náročná, proto by byla konstitutivní exprese značně nevýhodná (Gutiérrez-Preciado et al., 2009)) a u genů kódujících přenašečové systémy, které jsou zodpovědné za transport aminokyselin z vnějšího prostředí do buňky (Henkin, 2000).

Atenuační působení T-boxů se v naprosté většině případů odehrává na transkripční úrovni (Obr. 4C, 4D), ale popsána byla i atenuace translační (Seliverstov et al., 2005; Sherwood et al., 2015). Vazba nenabité tRNA molekuly do mRNA vedoucí oblasti vždy vyvolává změnu sekundární struktury vedoucí ke spuštění genové exprese, tedy ze struktury typu „OFF“ se vytvoří struktura typu „ON“, neboť tRNA stabilizuje antiterminační vlásenku (příp. vlásenku zpřístupňující RBS), která je za normální situace více labilní než vlásenka terminační (Green et al., 2010; Vitreschak et al., 2008). Zajímavé je, že tRNA zde vlastně funguje jako *trans*-působící regulační ncRNA (Mandin et al., 2013).

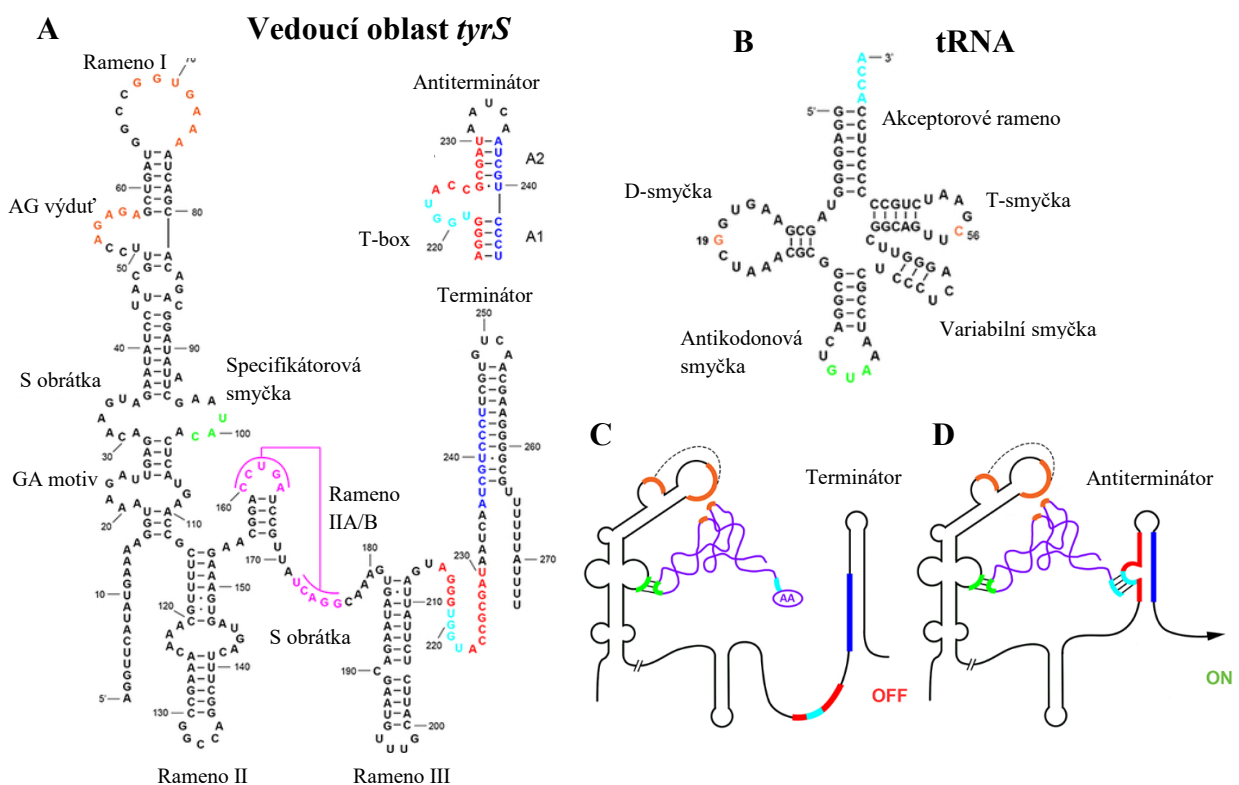
Další úroveň regulace je pak zajištěna kompeticí mezi nabitými a nenabitými tRNA. Nabitá tRNA se může částečně do T-boxu navázat, tato vazba ale nemá aktivační účinek, neboť terminační vlásenka zůstává i po její vazbě zachována (Obr. 4C). Regulační efekt spočívá v tom, že pokud je do riboregulátoru navázána nabitá tRNA, nenabitá varianta se již navázat nemůže. Exprese strukturního genu tak neproběhne, přestože určité množství nenabítených tRNA v prostředí přítomno je. Díky této dvojí kontrole může být exprese příslušných genů kontrolována daleko citlivěji (Green et al., 2010).

Strukturní organizace T-box elementu je do značné míry univerzální (Obr. 4A) (Gutiérrez-Preciado et al., 2009). Skládá se většinou ze tří helikálních oblastí – ramena I, II a III (stem I, II, III) a pseudouzlu – rameno IIA/B (stem IIA/B), které jsou následovány vzájemně se vylučujícími terminační a antiterminační vlásenkou, příp. vlásenkou blokující a vlásenkou zpřístupňující ribozom-vazebné místo (Grundy and Henkin, 1993).

Rameno I obvykle zahrnuje distální smyčku, AG výduť (AG bulge), specifikačnou smyčku, jejíž součástí je triplet bází párujících s antikodonem tRNA a S-obrátku (S-turn), která dohromady s GA

motivem tvoří tzv. K-obrátku (kink turn) způsobující ohyb RNA o cca 120° (Grigg et al., 2013; Klein et al., 2001; Wang and Nikonowicz, 2011; Wang et al., 2010; Winkler et al., 2001; Zhang and Ferré-D'Amaré, 2013). Za ramenem I následuje většinou rameno II (obsahující další S-obrátku) a dále pseudouzels vzniklý párováním dvou úseků RNA, označovaných IIA a IIB, které jsou od sebe odděleny několika nukleotidy. Dále downstream se pak nachází jednoduché rameno III, a nakonec výkonná oblast schopná reprimovat či indukovat genovou expresi (Gutiérrez-Preciado et al., 2009; Rollins et al., 1997).

Jak již bylo řečeno, výše vyjmenované struktury jsou mezi T-boxy obecně konzervované, přesto existuje několik případů, kdy T-box některý z těchto motivů postrádá (Kreuzer and Henkin, 2018). Například ramena II a IIA/B u všech glycin-specifických a u některých alanin-specifických T-boxů chybí a jsou nahrazeny jednořetězcovým linkerem (Grundy et al., 2002; Liu et al., 2015). Abnormální stavba T-boxu se vyskytuje také u některých genů *ileS*, které disponují výrazně kratším ramenem I než je obvyklé. V takovém případě specifikační triplet atypicky nacházíme jako součást distální smyčky (Sherwood et al., 2015).



Obr. 4: Sekundární struktura typického T-boxu a mechanismus jeho regulačního působení. Barevně jsou zvýrazněny klíčové sekvenční úseky: párující úseky AG výdutě/distální smyčky ramene I a D/T-smyčky tRNA (oranžově), párující triplet specifikační smyčky T-boxu a antikodonu tRNA (zeleně), párující sekvence pseudouzlu IIA/B (růžově), párující kvadruplet T-boxu a akceptorového ramene tRNA (azurově) a sekvence formující terminátorovou/antiterminátorovou strukturu (červeně, modře). (A) Schematické znázornění typického T-box regulačního elementu s vyznačenými konzervovanými oblastmi. (B) Schematické znázornění transferové RNA s vyznačenými konzervovanými strukturami. (C, D) Specifická tRNA (fialově) je do riboregulatoru kotvena prostřednictvím několika interakcí (vyznačené oranžově, zeleně, příp. azurově). (C) Nabitá tRNA má schopnost částečně se vázat do regulačního elementu, tato vazba ale nevyvolává aktivaci genové exprese. (D) Nenabitá tRNA interaguje s T-boxem navíc prostřednictvím svého volného akceptorového ramene, čímž vyvolává změnu sekundární struktury regulátoru vedoucí ke spuštění exprese downstream lokalizovaného genu. (Kreuzer and Henkin, 2018) - upraveno

Místa kotvící nenabitou tRNA do oblasti riboregulátoru jsou tři (Obr. 4D – znázorněny oranžově, zeleně a azurově). Z hlediska specificity je důležitá trojice nukleotidů specifikačtorové smyčky, která Watson-Crickovsky páruje s antikodonem tRNA. Experimentální důkaz tohoto tvrzení provedli např. Grundy a Henkin u T-boxu genu *tyrS*, v jehož přirozené specifikačtorové smyčce se nachází kodon 5'-UAC-3' párující s 5'-GUA-3' antikodonem tRNA^{Tyr}. Ke spuštění exprese downstream genů tedy dochází při limitaci tyrosinem. Když byla v tomto klíčovém tripletu provedena bodová mutace vedoucí ke vzniku 5'-UUC-3' kodonu, specificita T-boxu se posunula a míra exprese se stala závislou na limitaci fenylalaninem, neboť kodon 5'-UUC-3' páruje s antikodonem tRNA^{Phe} (Grundy and Henkin, 1993).

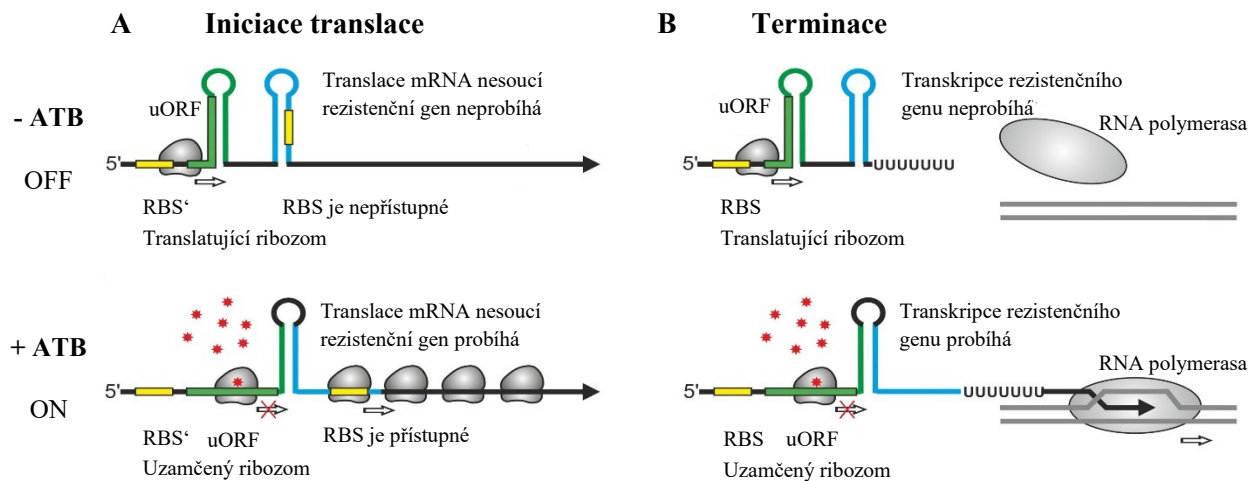
Ke druhé tRNA-mRNA interakci dochází mezi 5'-NCCA-3' koncem akceptorového ramene nenabitě tRNA a kvadrupletem 5'-UGGN-3' (vlastní T-box), který je součástí antiterminátorové výdutě. Již bylo naznačeno, že tato interakce je pro spuštění genové exprese esenciální, neboť má na antiterminační vlásenku stabilizační efekt (Grundy et al., 1994; Kreuzer and Henkin, 2018).

Poslední kotvící místo je zprostředkováno bázemi distální smyčky a AG výdutě ramene I a bázemi T a D smyčky tRNA, které jsou lokalizované v tzv. loktu (elbow) transferové RNA (Grigg et al., 2013; Zhang and Ferré-D'Amaré, 2013).

Skutečnost, že T-box regulátory nacházíme právě u genů kódujících enzymy, které se podílejí na utilizaci aminokyselin (viz výše), není náhodná. Tento r5'UTR element je v podstatě schopný nepřímo registrovat změny hladiny příslušné aminokyseliny přímou detekcí nenabitých tRNA. Na základě toho pak moduluje expresi genů kódujících enzymy aminokyselinové biosyntézy a membránové transportéry, jejichž přítomnost není při postačujícím množství aminokyselin nutná. Dále je T-boxem řízena exprese ligas vyrábějících AA-tRNA, které jsou potřeba pro „zpracování“ zvýšeného počtu volných aminokyselin v buňce v důsledku fungování biosyntetických a transportních drah (Yanofsky, 2004).

4.4 r5'UTR ELEMENT REAGUJÍCÍ NA MÍRU TRANSLACE

r5'UTR element upravující genovou expresi na základě schopnosti ribozomu provádět translaci se nazývá regulační element typu leader peptid. Jeho zvláštností je přítomnost krátkého ORF uvnitř vnitřního regulačního elementu, který bývá běžně označován uORF nebo leader ORF, protože se nachází na 5' konci mRNA upstream od strukturního genu, který je tímto systémem regulován. Funkcí krátké peptid kódující sekvence je monitoring míry translace. Pokud dojde k zablokování ribozomu syntetizujícího vedoucí peptid, např. v důsledku nedostatku některé AA-tRNA nebo vlivem vazby antibiotika do ribozomu, translatující ribozom se „uzamkne“ (tzv. ribosome stalling či translační arrest), čímž indukuje změnu sekundární struktury mRNA. Stejně jako v předchozích případech, změna sekundárního uspořádání vede k ovlivnění exprese downstream kódovaného genu, a to buď na úrovni transkripční, nebo translační (Obr. 5). Regulace pomocí leader peptid elementu se nezdívka vyskytuje u genů, které udílejí rezistenci k antibiotikům inhibujícím bakteriální proteosyntézu, a proto bude tato regulace rezistenčních genů podrobněji probrána (Dar and Sorek, 2017; Dersch et al., 2017).



Obr. 5: Mechanismus regulace genů antibiotické rezistence r5' UTR elementem typu leader peptid. Ribozom-vazebné místo (RBS) je znázorněno žlutě, uORF a sekvence tvořící anti-antiterminační vlásenku zeleně, sekvence tvořící terminační vlásenku modře, antibiotikum červeně. **(A)** Translační atenuace. V nepřítomnosti antibiotika se ribozom plynule přečte přes uORF a na mRNA se vytvoří vlásenka maskující RBS. Vlivem navázaného antibiotika dojde k uzamčení ribozomu na uORF (vzniká SRC) a na mRNA se zformuje alternativní vlásenka, která RBS nevyvazuje. To se stává přístupné pro ribozom a rezistenční gen je syntetizován. **(B)** Transkripční atenuace. V nepřítomnosti antibiotika se ribozom plynule přečte přes uORF a na mRNA se vytvoří terminační vlásenka. Vlivem navázaného antibiotika se tvoří SRC na uORF a na mRNA se zformuje antiterminační vlásenka, která umožní přepis rezistenčního genu. (Dersch et al., 2017) - upraveno

Tvorba tzv. SRC komplexu (stalled ribosome complex) může být zapříčiněna různými faktory, přičemž ne vždy je cílem modulovat genovou expresi. Pozastavení translace, které má regulační vliv na tvorbu genového produktu, může být způsobeno jednak výhradně vlastním charakterem nascentního regulačního vedoucího peptidu, a jednak interakcí translačního komplexu (včetně právě syntetizovaného vedoucího peptidu) se specifickou molekulou, která má negativní vliv na další průběh translace (Ito and Chiba, 2013). Klíčová role délky, aminokyselinové sekvence a konformace nascentního vedoucího peptidu je zřejmá u prvního typu uzamčení ribozomu. Nicméně i ve druhém případě je charakter vedoucího peptidu rozhodující, neboť významnou měrou určuje specifitu indukce vzniku SRC (Dar and Sorek, 2017).

Uzamčení ribozomu vyvolané nezávisle na inhibiční malé molekule je typické pro *secA* operon. Zde SRC vzniká vlivem vysoce specifické interakce mezi aminokyselinami nascentního řetězce regulačního vedoucího peptidu SecM (sekreci monitorující protein) a aminokyselinami ribozomálního proteinu L22 a nukleotidy 23S rRNA. Délétrvající pozastavení ribozomu na genu *secM* signalizuje nefunkčnost sekreční dráhy a vede ke změně sekundární struktury mRNA, která umožní translaci downstream kódovaného genu SecA translokasy (Nakatogawa and Ito, 2001, 2002).

Regulační pozastavení translace vyvolané interakcí ribozomu s nestandardní molekulou je charakteristické pro několik operonů aminokyselinové biosyntézy. V tomto případě je vedoucí otevřený čtecí rámeček obohacen o triplety pro aminokyselinu, jejíž syntézu downstream geny zajišťují. Je-li v buňce nedostatek této aminokyseliny, zvýší se počet příslušných nenabitých tRNA, které následně při

translaci uORF způsobí uzamčení ribozomu. To poté vede k vytvoření antiterminační vlásenky. Pokud se ribozom pročítá přes vedoucí kódující sekvenci plynule (značí dostatek dané aminokyseliny), tvorba antiterminační vlásenky nenastane a přepis biosyntetických genů je předčasně ukončen (Yanofsky, 1981).

Tento regulační systém má vlastně stejnou funkci jako výše popisovaný T-box, liší se pouze způsobem detekce signálu: T-box detekuje nenabitě tRNA přímo, leader peptid element nepřímo přes translatující ribozom (Naville and Gautheret, 2009). Zatímco např. u *trp* operonu *Escherichia coli* se setkáváme s regulací typu leader peptid (Jackson and Yanofsky, 1973; Yanofsky, 2004), *trp* operon *Staphylococcus aureus* je regulován pomocí T-boxu (Gutierrez-Preciado et al., 2005). Vedle toho existuje ještě třetí typ riboregulatoru, který pro detekci dostupného tryptofanu využívá tryptofanem aktivovaný terminátorový protein. Tento protein má schopnost vázat se v aktivované formě do regulační oblasti mRNA a kontrolovat tak míru exprese *trp* operonu např. *Bacillus subtilis* (viz odd. 4.6) (Yanofsky, 2004).

Ke zformování SRC může dále dojít vlivem vazby malé molekuly přímo do vnitřku ribozomu. Například u *tna* operonu, který sestává ze tří genů, *tnaC* (vedoucí peptid), *tnaA* (tryptofanasa) a *tnaB* (nízkoafinní tryptofan-specifická permeasa), bylo popsáno uzamčení ribozomu způsobené vazbou dvou molekul L-tryptofanu do hydrofobních kapes nascentního řetězce TnaC, které vznikají ještě uvnitř ribozomu. SRC následně způsobuje přeorganizování sekundární struktury mRNA, které vede k aktivaci exprese enzymů TnaA a TnaB (Bischoff et al., 2014; Gong and Yanofsky, 2002). Exprese permeasy a tryptofanasy indukovaná zvýšenou hladinou L-tryptofanu je velmi výhodná, neboť buňce umožňuje využít tuto aminokyselinu jako alternativní zdroj uhlíku, dusíku a energie (Hopkins and Cole, 1903).

4.4.1 ANTIBIOTIKY ŘÍZENÁ ATENUACE

Uzamčení ribozomu mohou obdobně způsobovat i ribozom-vazebná antibiotika interferující s translací určitého regulačního vedoucího peptidu, čehož je hojně využíváno při řízení genů, které k těmto antibiotikům udílejí rezistenci. Atenuátory odpovídající na přítomnost antibiotika vykazují v mnoha případech velmi vysokou specificitu, bohužel detailní vysvětlení pro tato pozorování zatím většinou chybí. Zřejmé je, že zcela zásadní roli hraje aminokyselinová sekvence a délka regulačního vedoucího peptidu (odrážející místo vazby a chemický charakter příslušného antibiotika). V následujících podkapitolách jsou probrány mechanismy tohoto typu atenuace na konkrétních příkladech inducibilně exprimovaných rezistenčních genů.

4.4.1.1 ATENUACE INDUKOVANÁ ERYTHROMYCINEM

Erythromycin je 14-členný makrolid, který se váže do výstupního tunelu nascentního peptidu (NPET) nedaleko peptidyltransferasového centra (PTC). Svou vazbou způsobuje zúžení ribozomového kanálu, které znamená pro většinu proteinů předčasné ukončení translace a odpoutání peptidyl-tRNA

z ribozomu (Dunkle et al., 2010; Tenson et al., 2003; Tu et al., 2005). Mimo to ale bylo popsáno několik proteinů, na jejichž syntézu nemá navázaný erythromycin vliv (např. proteiny H-NS a HspQ) (Kannan et al., 2012), příp. při jejichž syntéze nastane programované zablokování celého translačního komplexu, aniž by došlo k disociaci peptidyl-tRNA (tvoří se SRC, typické právě pro regulační vedoucí peptidy) (Johansson et al., 2014).

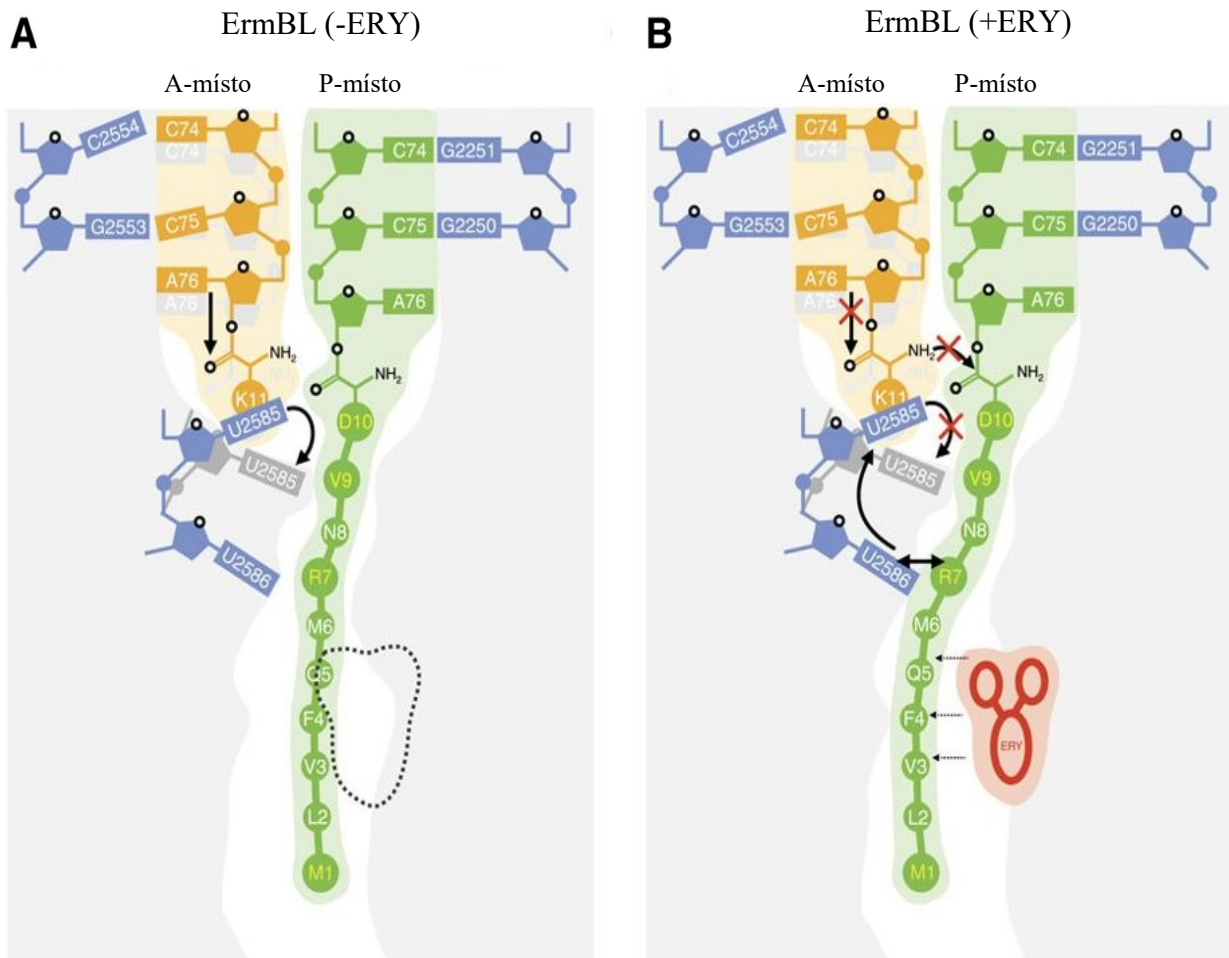
Tato pozorování a další provedené studie vedly k závěru, že faktorem rozhodujícím o průběhu translace peptidu v přítomnosti antibiotika (a tedy specifitě indukce ribozomového uzamčení), je aminokyselinová sekvence a také délka nascentního vedoucího peptidu, která odráží místo vazby antibiotika v ribozomu (toto platí univerzálně pro všechny systémy, kde tvorbu SRC indukují antibiotika) (Arenz et al., 2014a, 2014b; Dar and Sorek, 2017; Gupta et al., 2016; Johansson et al., 2014; Mayford and Weisblum, 1990; Ramu et al., 2009; Vázquez-Laslop et al., 2008).

Indukce erythromycinem je charakteristická pro *erm* skupinu genů, které kódují *N*-methyltransferasy a udílí bakteriím rezistenci k makrolidům, linkosamidům a streptograminům B. Rezistenční mechanismus spočívá v modifikaci adeninu A2058 (*E. coli* číslování) 23S rRNA, která následně brání vazbě těchto antibiotik do NPET ribozomu (Weisblum, 1995a). Společnou vlastností všech inducibilně exprimovaných *erm* genů je, že ke spuštění jejich exprese dochází v odpovědi na přítomnost pouze 14-členných a 15-členných makrolidů, tzn. expresi neindukují všechna antibiotika, ke kterým Erm *N*-methyltransferasy udílejí rezistenci (Leclercq and Courvalin, 1991). Rozdílem naopak je, že jednotlivé varianty genu se liší způsobem, jakým je u nich vyvoláváno ribozomové uzamčení během translace regulačního uORF (Vázquez-Laslop et al., 2010).

ErmB je první gen regulovaný ribozomem-zprostředkovanou atenuací (vyvolanou vazbou antibiotika), u kterého byla získána cryo-EM struktura SRC komplexu, na jejímž základě byl mechanismus tohoto děje detailně popsán (Arenz et al., 2014b).

ErmB mRNA nese na svém 5' konci uORF *ermBL* kódující peptid o 27 aminokyselinách. Probíhá-li jeho translace za přítomnosti erythromycinu, dochází po polymeraci prvních deseti aminokyselin (MLVFQMRNVD) k uzamčení ribozomu, které se projevuje neschopností uvolnit peptidyl-tRNA a zároveň neschopností tvořit další peptidovou vazbu. SRC komplex pak vyvolává změnu v uspořádání vláseňkových struktur na mRNA, které v základním stavu blokují RBS_{*ermB*}. Po uvolnění RBS_{*ermB*} nastává syntéza rezistenčního proteinu ErmB (Obr. 5A – obecné schéma). Peptidyl-tRNA^{Asp} se v daný moment nachází v P-místě a lysyl-tRNA^{Lys} přinášející jedenáctou aminokyselinu v A-místě (Min et al., 2008).

Na základě zmíněné cryo-EM struktury bylo odhaleno, jak konkrétní interakce v SRC komplexu vyvolávají ztrátu schopnosti ribozomu vytvořit peptidovou vazbu. Zásadní roli v tomto procesu hrají tři klíčové interakce nascentního řetězce ErmBL s 23S rRNA. Konkrétně se jedná o interakci Arg7 s U2586 a Val9/Asp10 s U2585. Díky těmto kontaktům je narušena standardní konformace báze U2585, což má za následek, že AA-tRNA nemůže zaujmout optimální polohu nutnou pro úspěšné zformování nové peptidové vazby (Obr. 6) (Arenz et al., 2014b).



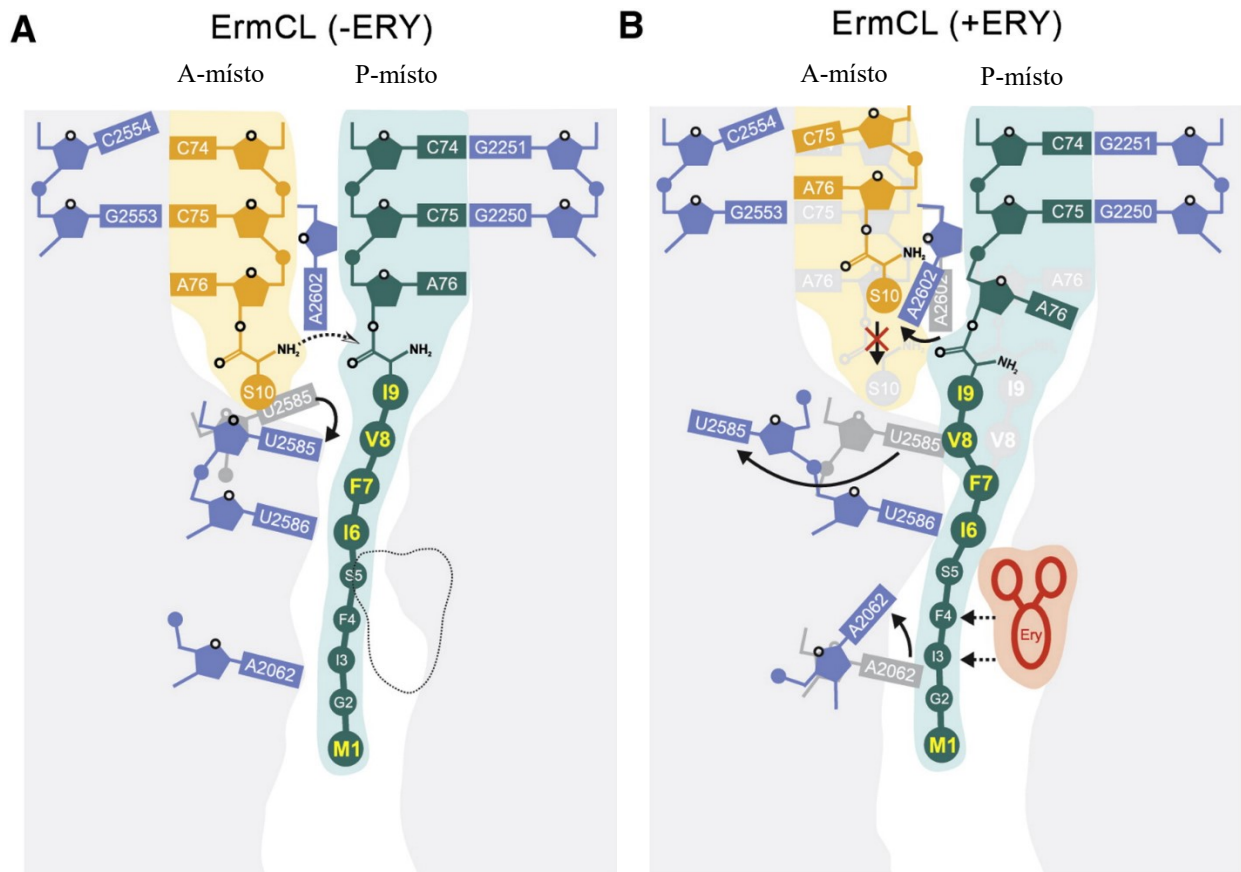
Obr. 6: Schematický model programovaného zablokování translace ErmBL. AA-tRNA je znázorněna žlutě, P-tRNA zeleně, nukleotidy rRNA modře a erythromycin červeně. (A) V nepřítomnosti antibiotika translace probíhá normálně. Lys-tRNA vstupuje do A-místa ribozomu, tvoří se peptidová vazba mezi D10 a K11 a řetězec ErmBL je prodlužován. (B) Vlivem navázaného erythromycinu zaujímá nascentní řetězec ErmBL abnormální prostorovou orientaci, která si vynucuje konformační změny 23S rRNA. Nukleotid U2585 získává jinou prostorovou orientaci a brání AA-tRNA v zaujetí optimální pozice, která by umožnila průběh peptidyltransferasové reakce. (Arenz et al., 2014b) - upraveno

Druhým zástupcem třídy *erm* genů, u něž je mechanismus indukce translačního blokování detailně znám, je *ermC* (vůbec první gen, u kterého byla regulace elementem typu leader peptid popsána) (Gryczan et al., 1980; Horinouchi and Weisblum, 1980; Vázquez-Laslop et al., 2011).

mRNA nesoucí gen *ermC* obsahuje ve své 5' koncové oblasti konstitutivně exprimovaný uORF *ermCL*, který kóduje peptid o délce 19 aminokyselin (MGIFSIFVISTVHYQPNNK) (Gryczan et al., 1980; Ramu et al., 2009). Pokud se do ribozomu naváže indukující antibiotikum, syntéza ErmCL se v určité fázi programově zastaví a dojde ke změně sekundární struktury mRNA, která odkryje RBS_{*ermC*} a umožní translaci *ermC* (Obr. 5A – obecné schéma) (Mayford and Weisblum, 1989).

V případě *ermCL* dochází k uzamčení ribozomu po polymeraci prvních devíti aminokyselin (MGIFSIFVI). V momentě zastavení se v P-místě nachází peptidyl-tRNA^{Ile}, seryl-tRNA^{Ser} je připravená v A-místě, nicméně ribozom nemůže provést další elongaci proteinu, tzn. vytvořit peptidovou vazbu mezi Ile9 a Ser10 (Vázquez-Laslop et al., 2008). Jak ukázala cryo-EM struktura SRC komplexu,

důvodem je pozměněná konformace 23S rRNA, kterou vyvolala specifická sekvence nascentního řetězce ErmCL interferující s navázaným erythromycinem. Hlavní roli zde hraje A2602, jehož prostorová orientace je oproti normálnímu stavu značně pozměněná a bezprostředně brání tvorbě peptidové vazby (Obr. 7). Zde nacházíme hlavní rozdíl oproti situaci u *ermBL*, kde nukleotid č. 2602 nehraje v blokování peptidyltransferasové reakce žádnou roli (viz výše).



Obr. 7: Schematický model programovaného zablokování translace ErmCL. AA-tRNA je znázorněna žlutě, P-tRNA zeleně, nukleotidy rRNA modře a erythromycin červeně. (A) V nepřítomnosti antibiotika je umožněn normální průběh translace. Ser-tRNA vstupuje do ribozomového A-místa, vytváří se nová peptidová vazba mezi I9 a S10 a řetězec ErmCL je prodlužován. (B) Vlivem navázaného erythromycinu zaujímá nascentní řetězec ErmCL abnormální prostorovou orientaci, která si vynucuje konformační změny 23S rRNA patrné především u nukleotidů A2062, U2585 a A2602. Tato změna vede k zablokování celého komplexu a nemožnosti vytvořit další peptidovou vazbu. (Arenz et al., 2014a) – upraveno

Již dříve bylo pomocí molekulárně-biologických metod dokázáno, že pro navození uzamčení ribozomu na *ermCL* je esenciální čtveřice aminokyselin IFVI v pozicích 6 až 9 nascentního regulačního vedoucího peptidu, nebyly ale známy podrobnosti na molekulární úrovni (Vázquez-Laslop et al., 2008; Weisblum, 1995b). Získaná cryo-EM struktura tedy pomohla odhalit kromě mechanismu, který brání syntéze peptidové vazby, i konkrétní interakce mezi ribozomem a nascentním peptidovým řetězcem (především klíčové interakce s úsekem IFVI), které vyvolávají změnu prostorového uspořádání ribozomových komponent a jsou zodpovědné za navození vzniku SRC (Obr. 7) (Arenz et al., 2014a).

Obdobný systém zabezpečující uzamčení ribozomu byl popsán u genu *ermA*, který je *ermC* genu fylogeneticky blízký (Park et al., 2010; Vázquez-Laslop et al., 2011). Rozdílem mezi těmito geny je přítomnost dvou uORF u *ermA* genu, *ermAL1* (kóduje peptid o 15 aminokyselinách) a *ermAL2* (kóduje peptid o 19 aminokyselinách) (Murphy, 1985). Předpokládá se, že v přítomnosti indukujícího antibiotika nejprve dochází k tvorbě SRC na *ermAL* a následně ke spuštění translace *ermAL2*. SRC se poté vytvoří i zde a translace *ermA* se spustí (Murphy, 1985; Sandler and Weisblum, 1988). Zatímco *ermAL2* vykazuje vysokou homologii s *ermCL* (stejná délka, SRC vzniká po polymeraci 9 aminokyselin, sekvenčně se liší v pěti aminokyselinách), *ermAL1* je značně odlišný. Ke vzniku SRC na *ermAL2* dochází tedy obdobně jako u výše popsaného vzniku SRC na *ermCL*, u *ermAL1* je ale mechanismus rozdílný.

K uzamčení ribozomu na *ermAL1* dochází po polymeraci osmi aminokyselin (MCTSI~~A~~VV). Bylo ukázáno, že v tomto ději jsou esenciální aminokyseliny IAVV v pozicích 5 až 8 a zároveň i charakter aminokyseliny, která se v daný moment nachází v A-místě (přirozeně E). Existují totiž aminokyseliny, které jsou slabými akceptory nascentního řetězce ErmAL1 – netvoří se peptidová vazba, vzniká SRC (E, D, K, R, H, příp. W, I, Y), a aminokyseliny, které jsou silnými akceptory – tvoří se peptidová vazba, nevzniká SRC (A, F, M, C) (Ramu et al., 2011).

Zcela odlišný systém indukce vzniku SRC vykazují *erm* geny s regulačními vedoucími peptidy, které obsahují aminokyselinový motiv RLR. Patří sem např. uORF *ermDL* (MTHSMRLRFPTLNQ), *ermQL* (MIMNGGIASIRLRR), *ermXL* (MLISGTAFLRLRTNRKAFPTP), *erm34L* (MHFIRLRLFLVLNK) nebo *erm39L* (MSVTYIRLRIT) (Sothiselvam et al., 2014; Vázquez-Laslop et al., 2011). K uzamčení ribozomu dochází (bez ohledu na pozici význačné sekvence v nascentním peptidu) v momentě, kdy se má zformovat peptidová vazba uvnitř RLR motivu mezi L2 a R3. Na vedoucím ORF genu *ermD* bylo ukázáno, že inhibici peptidyltransferasové reakce nevyvolávají interakce mezi nascentním peptidem, navázaným antibiotikem a složkami NPET jako v předchozích případech, ale dostačující je změna konformace 23S rRNA (klíčová se jeví pozměněná orientace nukleotidů U2585 a A2602), kterou vyvolává navázané antibiotikum a přítomná RLR sekvence. Toto tvrzení dokládá experiment, při kterém bylo dosaženo indukce vzniku SRC při využití zkráceného *ermDL* kódujícího peptid MRLRFPTLNQ (Sothiselvam et al., 2014).

Druhou skupinou genů indukovaných erythromycinem, jsou geny *msr*, které udílejí rezistenci k makrolidům a streptograminům B (Singh et al., 2001). Přestože u žádného z *msr* genů není k dispozici detailní vysvětlení mechanismu vzniku SRC, jsou známy sekvence jejich vedoucích regulačních ORF. uORF *msrA* a *msrC* mají vysoce homologickou aminokyselinovou sekvenci (MTASMRLK, resp. MTASMKLRFE~~L~~LNNN) a jsou řazeny do skupiny regulačních vedoucích peptidů obsahujících tzv. RLR motiv (bylo dokázáno, že záměna argininu za lysin nemá na funkčnost vedoucího peptidu vliv (Sothiselvam et al., 2014)). Vznik SRC indukují tedy pravděpodobně stejně jako výše popsaný *ermDL* uORF. Zcela rozdílnou sekvenci má pak *msrDL* (MYLIFM), což naznačuje, že vznik SRC zde bude

zajištěn jiným mechanismem (Ramu et al., 2009; Ross et al., 1990; Singh et al., 2001; Sothiselvam et al., 2014).

4.4.1.2 ATENUACE INDUKOVANÁ LINKOMYCINEM

Linkomycin je antibiotikum, které se váže do těsné blízkosti PTC, kde blokuje proteinovou syntézu ve velmi časně fázi (přibližně po spojení prvních dvou aminokyselin). Tímto se výrazně liší od předchozího typu induktoru, erythromycinu, který se váže dále do NPET a inhibuje syntézu po polymeraci prvních šesti až osmi aminokyselin (Tenson et al., 2003). Indukce linkomycinem byla blíže popsána u atenuátorů genů *lmo0919* a *bmrCD*.

Lmo0919 je gen *Listeria monocytogenes* kódující ARE ABC-F protein, který udílí bakteriím rezistenci k linkomycinu jeho vytěsňováním z ribozomu (Chesneau et al., 2005; Murina et al., 2018). Tento gen je regulován na transkripční úrovni atenuátorem, který vykazuje značnou specificitu – k syntéze proteinu dochází výhradně v přítomnosti linkomycinu. *Lmo0919* je jedním z mnoha genů nalezených pomocí nedávno vyvinuté metody term-seq, která umožňuje kvantitativní mapování všech nechráněných 3' konců RNA v buňce a slouží tak k identifikaci genů regulovaných mechanismem předčasné terminace transkripce (Dar et al., 2016).

Pro regulační upstream oblast *lmo0919* je charakteristický velmi krátký uORF kódující peptid o délce pouhých tří aminokyselin (MKF). Předpokládá se, že právě délka regulačního ORF je zde jedním z hlavních faktorů zodpovědných za velmi vysokou specificitu indukce (Dar and Sorek, 2017; Dar et al., 2016). Ve studii z roku 2016 Dar et al. sledovali aktivitu tohoto riboregulátoru v přítomnosti linkomycinu (indukující), erythromycinu a chloramfenikolu (neindukující). Důvod, proč erythromycin expresi *lmo0919* neindukuje, je zřejmý ze znalosti vazebných míst obou těchto látek (viz výše) – nascentní regulační vedoucí peptid je příliš krátký na to, aby se dostal do kontaktu s erythromycinem, zatímco s linkomycinem interferovat může (Dar et al., 2016). Odlišný mechanismus zajišťující specificitu indukce se musí uplatňovat v případě chloramfenikolu, který může indukovat vznik SRC a zároveň má s linkomycinem téměř shodné vazebné místo. Zde je pravděpodobně rozhodujícím faktorem aminokyselinová sekvence vedoucího peptidu, neboť chloramfenikol inhibuje translaci (indukuje tvorbu SRC) pouze v přítomnosti specifických aminokyselin, typicky alaninu, serinu, nebo threoninu, které se v momentě uzamčení nacházejí na předposlední pozici nascentního řetězce (viz odd. 4.4.1.3). Ani jedna z těchto aminokyselin součástí uORF *lmo0919* není (Dar et al., 2016; Marks et al., 2016).

Na základě násobného sekvenčního alignmentu je predikováno, že obdobně fungující riboregulátor se vyskytuje i u dalších ARE ABC-F proteinů, homologů *Lmo0919*, mezi které patří mj. rezistenční proteiny VgaA a VmlR (Dar et al., 2016; Ohki et al., 2005).

Linkomycinem je dále indukována exprese genu *Bacillus subtilis bmrCD* (dříve YheI/YheH), který kóduje multirezistenční heterodimerní ABC transportér, jehož funkcí je aktivní efflux antibiotik. Specificita indukce je v případě *bmrCD* výrazně nižší než u výše zmiňovaného genu *lmo0919*. Ze 46

testovaných antibiotik expresi indukovalo 11 látek, mimo linkomycin např. azithromycin, erythromycin či chloramfenikol. Lze předpokládat, že vysokou senzitivitu k rozmanitým typům antibiotik zajišťuje aminokyselinová sekvence vedoucího peptidu BmrB (dříve YheJ), který je nápadně dlouhý – kóduje peptid o délce 53 aminokyselin (Galián et al., 2011; Reilman et al., 2014; Torres et al., 2009). Exprese *bmrCD* je kontrolována na dvou úrovních. Regulace pomocí transkripčního atenuátoru je časově omezená, neboť je podřízena kontrole zajišťované proteinem AbrB (transkripční regulátor přechodové fáze), který v průběhu exponenciální fáze reprimuje geny specifické pro stacionární fázi (Reilman et al., 2014; Strauch and Hoch, 1993).

4.4.1.3 ATENUACE INDUKOVANÁ CHLORAMFENIKOLEM

Chloramfenikol se váže do A-místa 50S ribozomální podjednotky, čímž brání AA-tRNA v zaujetí optimální polohy (Dunkle et al., 2010). Bylo ukázáno, že toto antibiotikum inhibuje tvorbu peptidové vazby pouze ve specifickém kontextu, konkrétně nachází-li se na předposlední pozici nascentního peptidu (v momentě uzamčení ribozomu) alanin – vykazuje největší efektivitu v indukci zastavení translace, dále pak serin, nebo threonin (Marks et al., 2016).

Chloramfenikolem indukovaná exprese zprostředkovaná elementem typu leader peptid je typická např. pro rezistenční geny *catA86* a *cmlA*. Oba tyto geny jsou regulovány stejným způsobem, translační atenuací, přestože se výrazně liší jak svým rezistenčním mechanismem (CatA86 antibiotikum chemicky modifikuje, CmlA ho aktivně exportuje z buňky), tak i distribucí mezi bakteriemi (gen *catA86* se nachází u Gram-pozitivních bakterií, *cmlA* u Gram-negativních bakterií) (Lovett, 1990, 1996; Stokes and Hall, 1991).

Vedoucí regulační peptidy CatA86L a CmlAL jsou shodně dlouhé devět aminokyselin, liší se ale svou sekvencí i pozicí, v jaké vyvolávají uzamčení ribozomu. V případě *catA86L* se ribozom zastavuje na pátém kodonu (po polymeraci MVKTD), v případě *cmlAL* pak na osmém kodonu (po polymeraci MSTSKNAD). Toto pozorování je v souladu s výše uvedeným tvrzením, že uzamčení ribozomu v přítomnosti chloramfenikolu je indukováno přítomností alaninu či threoninu na předposlední pozici nascentního peptidu. V případě, že byl u *catA86L* zaměněn čtvrtý kodon pro threonin za kodon pro alanin (v přítomnosti chloramfenikolu vyvolává zastavení translace nejsilněji), efektivita indukce translačního zastavení se mnohonásobně zvýšila (Lovett, 1990, 1996; Marks et al., 2016; Stokes and Hall, 1991).

CatA86L a *cmlAL* se v průběhu evoluce specializovaly pro navozování translačního uzamčení v přítomnosti přirozeně syntetizovaného chloramfenikolu, nicméně se ukázalo, že tvorbu SRC mohou navodit i v přítomnosti syntetického linezolidu a tedizolidu (ale s nižší efektivitou) (Marks et al., 2016).

FexA, který udílí rezistenci k chloramfenikolu a fluorfenikolu jejich aktivním effluxem, je dalším příkladem genu regulovaného translačním atenuátorem. Analýzou jeho upstream oblasti byla zjištěna vysoká homologie s regulačními oblastmi genů *catA86* a *cmlA*. Stejně jako vedoucí peptid těchto genů

má i FexAL délku devět aminokyselin. Uzamčení ribozomu zde nastává po polymeraci aminokyselin MVKAV, tedy v momentě, kdy se na předposlední pozici nascentního peptidu nachází alanin (Kehrenberg and Schwarz, 2004).

4.4.1.4 ATENUACE INDUKOVANÁ TETRACYKLINEM

Leader peptid element regulačně odpovídající na přítomnost tetracyklinu (antibiotikum vázající se na 30S ribozomální podjednotku), byl nalezen u rezistenčních genů *tetM* a *tetQ*, které kódují proteiny ochraňující ribozom vytěsňováním antibiotika z jeho vazebného místa. V případě *tetM* se atenuace realizuje na transkripční úrovni, v případě *tetQ* na úrovni translační, avšak úplný a detailní mechanismus fungování těchto riboregulátorů není znám. *TetM* mRNA obsahuje ve svém 5' konci uORF kódující peptid dlouhý 28 aminokyselin. Zajímavé je, že na prvních devíti pozicích (MLCMPMVMH) tohoto peptidu nacházíme šest aminokyselin, jejichž příslušné AA-tRNA jsou v celkovém AA-tRNA poolu poměrně vzácné. Jedná se o methionin, cystein a histidin. Je možné, že tato nápadná zvláštnost může hrát roli v indukcii exprese *tetM*. U genu *tetQ* je pravděpodobné, že inducibilní exprese bude zajišťována odlišným mechanismem, neboť je tento gen předcházen uORF o délce pouhých tří aminokyselin (MRQ) (Su et al., 1992; Wang et al., 2005).

4.5 r5'UTR ELEMENT REAGUJÍCÍ NA PŘÍTOMNOST RIBOZOMÁLNÍHO PROTEINU

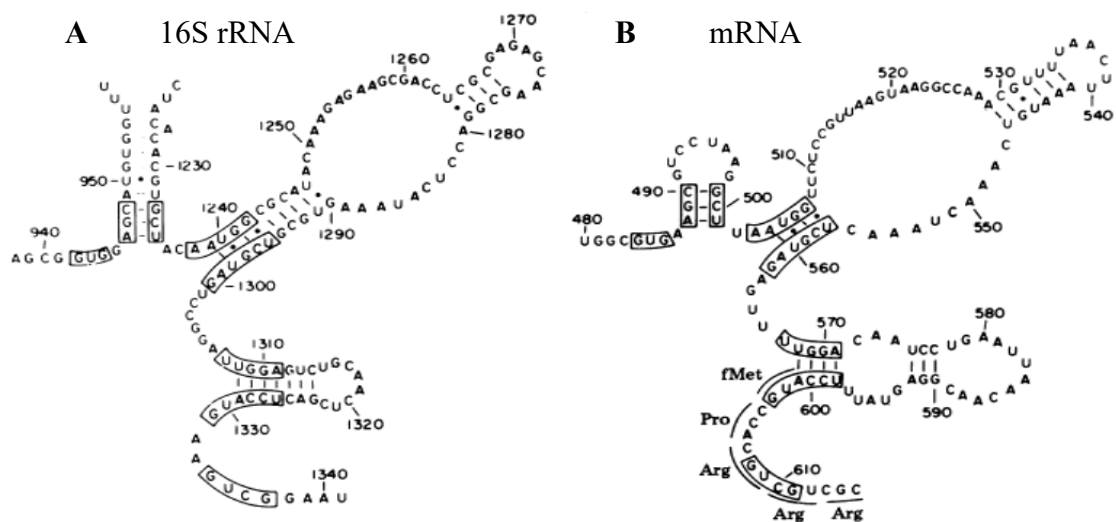
Dále existuje typ vnitřního regulačního elementu, který je schopný přímo vázat ribozomální protein – tzv. represorový r-protein a na základě této interakce tlumit genovou expresi. Tento typ riboregulátoru se vyskytuje u mRNA kódující právě ribozomální proteiny a zajišťuje zpětnovazebnou kontrolu jejich syntézy (Nomura et al., 1980).

Vedoucí oblast mRNA molekuly v tomto případě mimikuje tvarové uspořádání příslušné části rRNA (Obr. 8), na kterou se ribozomální protein primárně váže. mRNA tak vytváří alternativní vazebné místo pro tento protein, které ale v porovnání s rRNA vykazuje nižší afinitu. Výsledkem je, že rRNA a mRNA mezi sebou do určité míry (preferenčně se tvoří interakce s rRNA) soutěží o vazbu r-proteinu. Pokud se v buňce vyskytuje nadbytečné množství volného represorového ribozomálního proteinu, zvýší se pravděpodobnost, že se protein bude vázat i na mRNA, což vede k zeslabení produkce tohoto r-proteinu a obvykle také ke zeslabení produkce dalších proteinů, které jsou kódované na společné polycistronní mRNA. Tímto způsobem dojde ke srovnání množství jednotlivých stavebních bloků ribozomu (rRNA a r-proteinů kódovaných jinou částí genomu). Regulace probíhá typicky na translační úrovni, ale popsána byla i atenuace transkripční, která navíc vyžaduje přítomnost dalšího proteinového faktoru (viz dále) (Draper, 1989; Naville and Gautheret, 2009; Nomura et al., 1980).

Mechanismus fungování tohoto r5'UTR elementu se od předchozích typů riboregulátorů liší, protože exprese příslušných proteinů není modulována prostřednictvím změny sekundární struktury,

kerou by vyvolala vázaná molekula. V případě tohoto regulačního elementu dochází k represi obvykle zakrytím ribozom-vazebného místa, které způsobí samotný r-protein, nikoli komplementární sekvence, která je součástí mRNA regulační oblasti. Tento případ translační atenuace byl mezi prvními popsán u *Escherichia coli* r-proteinu S7 malé ribozomální podjednotky (Nomura et al., 1980).

Gen kódující ribozomální protein S7 je součástí operonu *str*, který nese geny pro r-proteiny S12 a S7 a pro elongační faktory EF-G a EF-Tu (Post and Nomura, 1980). Na základě porovnání sekvencí části mRNA a části rRNA, které jsou zodpovědné za vazbu r-proteinu, bylo zjištěno, že se u obou těchto molekul vyskytují čtyři motivy o pěti až šesti nukleotidech, a navíc několik dalších kratších úseků, které mají zcela identickou sekvenci (Obr. 8 – vyznačeny rámečkem). Navíc sekundární struktura obou těchto oblastí se nápadně podobá a zmíněné konzervované motivy jsou v ní lokalizované na shodných pozicích. Na základě této srovnávací analýzy byl tedy zjištěn základní motiv vyžadovaný r-proteinem S7 pro rozpoznání vazebného místa. Tato sekundární struktura je u mRNA méně stabilní než u rRNA, což zde může být důvodem, proč se r-protein preferenčně váže na rRNA. Pokud se ale množství r-proteinu zvýší neúměrně k ostatním ribozomálním složkám, frekvence vazby na mRNA se zvýší, dojde k zakrytí místa, kde začíná translace S7 proteinu, a následně k potlačení další exprese tohoto genu. Ve většině případů navázání represorového r-proteinu vyvolá represi většího počtu genů, které jsou součástí daného operonu, nicméně u *str* operonu bylo pozorováno, že represorový protein S7 inhibuje pouze svoji vlastní syntézu, zatímco ostatní geny (pro S12, EF-G a EF-Tu) téměř neovlivňuje (Nomura et al., 1980; Tinoco et al., 1973).



Obr. 8: Srovnání rRNA a mRNA vazebných míst represorového r-proteinu S7. Homologické sekvence jsou vyznačeny rámečkem. (A) Model sekundární struktury vazebného místa S7 proteinu na ribozomální 16S rRNA. (B) Model sekundární struktury vazebného místa S7 proteinu na mRNA. ORF proteinu S7 začíná na pozici 601. (Nomura et al., 1980) - upraveno

Druhým popsáním regulačním mechanismem r5'UTR elementu vázajícího r-protein je atenuace na transkripční úrovni. Tento typ genové kontroly byl popsán u operonu S10, který kóduje jedenáct ribozomálních proteinů, z nichž jeden, L4, funguje jako represorový r-protein. V případě akumulace

volného L4 proteinu dochází za přítomnosti přídatného proteinového faktoru k eliminaci tvorby polycistronního transkriptu a tedy ke snížení úrovně exprese všech jedenácti proteinů (Zengel and Lindahl, 1992; Zengel et al., 1980). Bylo ukázáno, že průběh transkripční atenuace zahrnuje čtyři kroky: (I) spontánní zastavení RNA polymerasy v oblasti atenuátoru; (II) stabilizaci komplexu obecným transkripčním terminačním/antiterminačním faktorem NusA; (III) super stabilizaci komplexu represorovým r-proteinem L4 a nakonec (IV) předčasné ukončení transkripce a rozpad celého komplexu (Zengel and Lindahl, 1996). Tímto způsobem vzniká transkript o délce zhruba 140 nukleotidů atenuovaný 30 bází před iniciačním kodonem prvního genu daného operonu, kterým je S10 (Lindahl et al., 1983). L4 ale kromě výše popsané transkripční atenuace zajišťuje také atenuaci translační. Vlivem zvýšeného množství L4 je utlumena translace prvních čtyř genů operonu, S10, L3, L4 a L23 (Yates and Nomura, 1980).

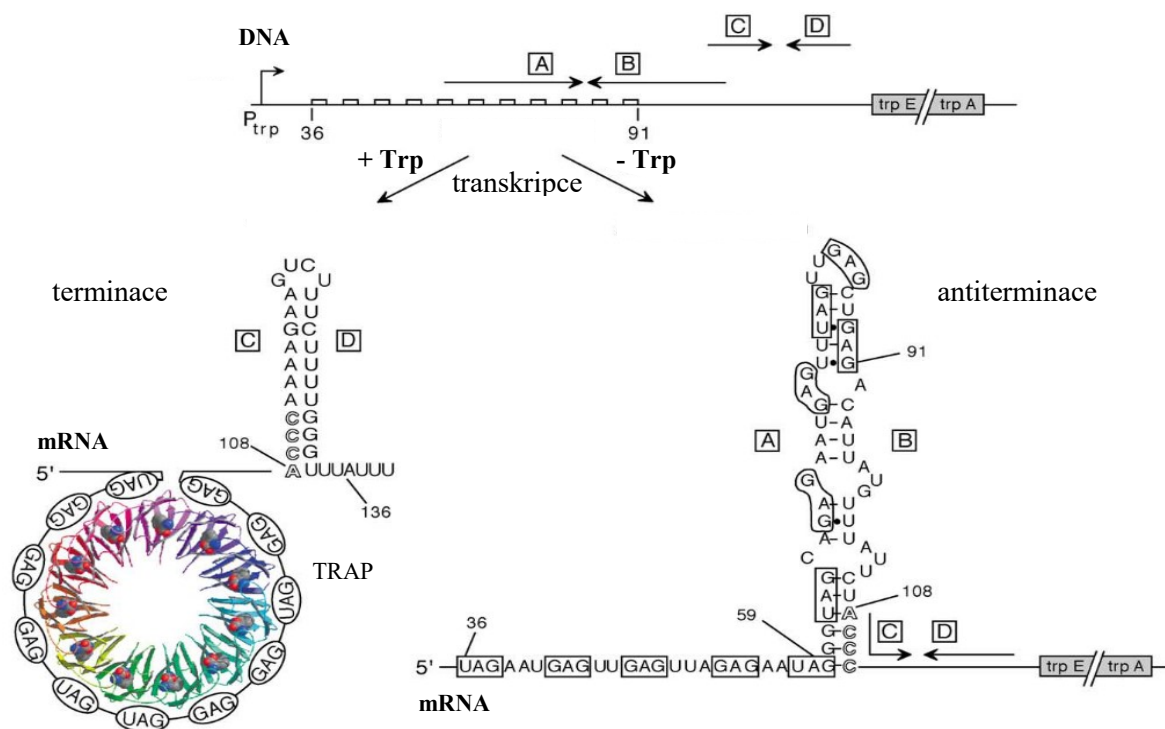
4.6 r5'UTR ELEMENT REAGUJÍCÍ NA PŘÍTOMNOST TERMINÁTOROVÉHO/ANTITERMINÁTOROVÉHO PROTEINU

Poslední z řady vnitřních regulačních RNA elementů je r5'UTR element vázající specifický regulační protein, který na transkripční úrovni inhibuje, nebo naopak umožňuje tvorbu downstream kódovaného genového produktu. Tento RNA-vazebný protein nazýváme terminátorový, nebo antiterminátorový v závislosti na efektu, který vyvolává. Tímto efektem může být jednak tvorba terminační vlásenky, která předčasně ukončuje transkripci, a jednak tvorba antiterminační vlásenky, která naopak umožňuje RNA polymerase nasyntetizovat kompletní transkript. Míra exprese genu v tomto případě nezávisí pouze na koncentraci daného regulačního proteinu, ale také na jeho aktivačním statusu – protein může být posttranslačně modifikován nebo může vázat různé ligandy, a v takovém případě se na mRNA váže pouze v aktivované podobě (Henkin, 1996; Naville and Gautheret, 2009).

Typickým příkladem genu, jehož syntéza je regulována pomocí regulačního proteinu vázajícího se na vedoucí oblast mRNA, je *trp* operon *Bacillus subtilis* (viz Obr. 9). Tento riboregulátor zajišťuje inducibilní expresi genů tryptofanové biosyntézy, obdobně jako výše zmiňovaný regulační element typu leader peptid u *Escherichia coli* a T-box u *Staphylococcus aureus* (Gutierrez-Preciado et al., 2005; Yanofsky, 2004).

V případě *trp* operonu *Bacillus subtilis* tedy o zformování terminační, resp. antiterminační vlásenky rozhoduje regulační protein, který je kódovaný konstitutivně exprimovaným genem *mtrB* nacházejícím se v jiném lokusu než *trp* operon. Tento sekvenčně-specifický RNA-vazebný protein se nazývá TRAP (*trp* RNA-vazebný atenuační protein) a funguje jako tryptofanem aktivovaný terminátorový protein – v aktivované podobě (s navázanými volnými L-tryptofany) vyvolává tvorbu terminační vlásenky a způsobuje předčasné ukončení syntézy polycistronní mRNA. V případě, že k vazbě atenuačního proteinu na mRNA nedochází, RNA polymerasa vyrobí kompletní transkript a geny kódující enzymy biosyntetické dráhy tryptofanu jsou exprimovány (Gollnick, 1994).

TRAP je homopolymer, který se skládá z jedenácti monomerů tvořících symetrickou strukturu označovanou jako β -kotouč (β -wheel, někdy též doughnut-like struktura). Pro vznik aktivované formy je nutné, aby tento protein vázal celkem jedenáct L-tryptofanů, které jsou prostřednictvím několika vodíkových můstků a dalších typů ne vazebných interakcí kotveny do hydrofobních kapes tvořených vždy dvěma přilehlými podjednotkami proteinového komplexu (Antson et al., 1995). TRAP protein se v aktivovaném stavu váže přes vodíkové můstky do vedoucí oblasti mRNA, konkrétně do segmentu obsahujícího jedenáct tripletů G/UAG oddělených sekvenčně variabilními úseky o dvou až třech nukleotidech (Babitzke et al., 1994, 1996). Specificitu vazby v tomto případě zajišťují báze na druhé a třetí pozici uvedeného tripletu, kterými jsou bez výjimky adenin a guanin (Antson et al., 1999; Chen et al., 1999).



Obr. 9: Transkripční atenuace *trp* operonu *Bacillus subtilis*. Písmena **A**, **B**, **C** a **D** označují komplementární úseky, které tvoří terminační, resp. antiterminační vlásenku. Čísla označují pozici báze vzhledem ke startu transkripce. Zvýrazněny jsou nukleotidy v pozicích 108-111, které jsou součástí jak terminační, tak antiterminační vlásenky. Pokud je v prostředí přítomen volný tryptofan, dochází k jeho vazbě na TRAP protein, který se tak stává aktivní. Aktivovaný TRAP se váže do vedoucí oblasti mRNA bohaté na tripletu UAG a GAG a vyvolává tvorbu terminační vlásenky (párují úseky C a D). Genový produkt se v tomto případě netvoří. V nepřítomnosti volného tryptofanu nedochází k navázání TRAP proteinu do mRNA a formuje se antiterminační vlásenka (párují úseky A a B), která umožní expresi enzymů biosynetické dráhy pro tryptofan. (Gollnick and Babitzke, 2002) - upraveno

r5'UTR element vázající regulační protein typu antiterminátorového byl nalezen mj. u *Bacillus amyloliquefaciens* v operonu *dfn*, který nese geny pro biosyntézu antibiotika diffididinu. Úlohu antiterminátorového proteinu zde plní protein s názvem LoAP (paralog transkripčního regulatorového proteinu NusG), který se váže do vedoucí oblasti nascentní mRNA, a brání tak tvorbě terminační vlásenky, která by předčasně ukončila syntézu příslušné mRNA. Kromě toho bylo ukázáno, že LoAP

má schopnost rozrušovat i vnitřní terminační vlásenky uprostřed operonu, čímž zajišťuje tvorbu kompletního transkriptu (Goodson et al., 2017).

5 ZÁVĚR

Regulace genové exprese zprostředkovaná vnitřními regulačními RNA elementy je mezi bakteriemi značně rozšířená. Tento způsob genové kontroly můžeme najít např. u genů kódujících produkty, které jsou pro buňku esenciální (účastní se klíčových buněčných procesů), ale zároveň jejich syntéza znamená pro buňku energetickou zátěž. Dále ji pozorujeme u tzv. luxusních genů kódujících produkty, jejichž přítomnost není pro bakterii rostoucí v nestresových podmínkách nezbytná, ale které jí mohou přinášet určitou výhodu do konkurenčního boje s dalšími organismy. Mezi tento typ genů patří mj. i rezistenční geny kódující proteiny, které svou činností zajišťují bakterii odolnost vůči antibiotikům, zároveň ale nezdarma vyvolávají pokles fitness. Cílená regulace exprese je tedy odpovědí buňky na negativní efekty, které jsou s produkcí některých proteinů spojené.

Genová regulace zajištěná specializovanými RNA molekulami, které ať už přímo či nepřímo detekují určitý signál, vykazuje oproti regulaci pomocí proteinů několik nezanedbatelných výhod. Odpověď na signál se v případě regulace vnitřními r5'UTR elementy projevuje prakticky ihned, neboť tento regulátor je součástí regulované molekuly. Další výhodou je i značná jednoduchost a úspornost tohoto typu regulace, která ve většině případů nevyžaduje další pomocné proteinové faktory.

Studiu genové exprese obecně je v současnosti věnována nemalá pozornost. Primárním cílem je samozřejmě komplexní pochopení mechanismů, které určují, za jakých podmínek bude k expresi určitého genu docházet, a kdy naopak bude tvorba daného genového produktu inhibována. Tyto znalosti mohou být dále aplikovány například při navrhování nových látek, které by s těmito regulačními mechanismy interferovaly a mohly tak být potenciálně využity jako antibiotika nové generace. Právě nutnost vyvíjet stále nová alternativní antibiotika vyplývá ze současné situace, kdy vlivem silného nadužívání různých antimikrobiálních látek dochází k velmi rychlému šíření rezistenčních genů.

Existuje hned několik představ, jak konkrétně by regulační nekódující RNA molekuly mohly být využity jako cílová místa pro působení antimikrobiálních látek. Narušením jejich funkce by mohlo dojít k deregulaci jistých klíčových genů, což by mohlo vést ke smrti buňky, příp. k inhibici jejího růstu. Dále by takové látky mohly být využity pro navození trvalé represe rezistenčních genů, která by vedla k opětovnému vzniku senzitivity bakterie k původnímu antibiotiku. V současnosti podobnou látku s klinickým využitím nemáme, určitě ale právě tato strategie je jedna z možných cest, jak antibiotickou rezistenci obejít.

6 POUŽITÁ LITERATURA

- Abduljalil, J.M.** (2018). Bacterial riboswitches and RNA thermometers: Nature and contributions to pathogenesis. *Non-Coding RNA Res.* *3*, 54–63.
- Andersson, D.I., and Hughes, D.** (2010). Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat. Rev. Microbiol.* *8*, 260–271.
- Antson, A.A., Otridge, J., Brzozowski, A.M., Dodson, E.J., Dodson, G.G., Wilson, K.S., Smith, T.M., Yang, M., Kurecki, T., and Gollnick, P.** (1995). The structure of trp RNA-binding attenuation protein. *Nature* *374*, 693–700.
- Antson, A.A., Dodson, E.J., Dodson, G., Greaves, R.B., Chen, X., and Gollnick, P.** (1999). Structure of the trp RNA-binding attenuation protein, TRAP, bound to RNA. *Nature* *401*, 235–242.
- Arenz, S., Meydan, S., Starosta, A.L., Berninghausen, O., Beckmann, R., Vázquez-Laslop, N., and Wilson, D.N.** (2014a). Drug sensing by the ribosome induces translational arrest via active site perturbation. *Mol. Cell* *56*, 446–452.
- Arenz, S., Ramu, H., Gupta, P., Berninghausen, O., Beckmann, R., Vázquez-Laslop, N., Mankin, A.S., and Wilson, D.N.** (2014b). Molecular basis for erythromycin-dependent ribosome stalling during translation of the ErmBL leader peptide. *Nat. Commun.* *5*, 3501.
- Babitzke, P., Stults, J.T., Shire, S.J., and Yanofsky, C.** (1994). TRAP, the trp RNA-binding attenuation protein of *Bacillus subtilis*, is a multisubunit complex that appears to recognize G/UAG repeats in the trpEDCFBA and trpG transcripts. *J. Biol. Chem.* *269*, 16597–16604.
- Babitzke, P., Yealy, J., and Campanelli, D.** (1996). Interaction of the trp RNA-binding attenuation protein (TRAP) of *Bacillus subtilis* with RNA: effects of the number of GAG repeats, the nucleotides separating adjacent repeats, and RNA secondary structure. *J. Bacteriol.* *178*, 5159–5163.
- Barrick, J.E., and Breaker, R.R.** (2007). The distributions, mechanisms, and structures of metabolite-binding riboswitches. *Genome Biol.* *8*, R239.
- Bastet, L., Dubé, A., Massé, E., and Lafontaine, D.A.** (2011). New insights into riboswitch regulation mechanisms. *Mol. Microbiol.* *80*, 1148–1154.
- Bhullar, K., Waglechner, N., Pawlowski, A., Koteva, K., Banks, E.D., Johnston, M.D., Barton, H.A., and Wright, G.D.** (2012). Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLoS One* *7*, e34953.
- Bischoff, L., Berninghausen, O., and Beckmann, R.** (2014). Molecular basis for the ribosome functioning as an L-tryptophan sensor. *Cell Rep.* *9*, 469–475.
- Blount, K.F., and Breaker, R.R.** (2006). Riboswitches as antibacterial drug targets. *Nat. Biotechnol.* *24*, 1558–1564.
- Bugg, T.D.H., Wright, G.D., Dutka-Malen, S., Arthur, M., Courvalin, P., and Walsh, C.T.** (1991). Molecular basis for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147: biosynthesis of a depsipeptide peptidoglycan precursor by vancomycin resistance proteins VanH and VanA. *Biochemistry* *30*, 10408–10415.
- Centers for Disease Control and Prevention, O. of I.D.** (2013). Antibiotic resistance threats in the United States.
- Chancey, S.T., Zähler, D., and Stephens, D.S.** (2012). Acquired inducible antimicrobial resistance in Gram-positive bacteria. *Future Microbiol.* *7*, 959–978.
- Chen, D., and Murchie, A.I.H.** (2014). An aminoglycoside sensing riboswitch controls the expression of aminoglycoside resistance acetyltransferase and adenyltransferases. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul.*

Mech. 1839, 951–958.

Chen, X., Antson, A.A., Yang, M., Li, P., Baumann, C., Dodson, E.J., Dodson, G.G., and Gollnick, P. (1999). Regulatory features of the *trp* operon and the crystal structure of the *trp* RNA-binding attenuation protein from *Bacillus stearothermophilus*. *J. Mol. Biol.* 289, 1003–1016.

Chesneau, O., Ligeret, H., Hosan-Aghaie, N., Morvan, A., and Dassa, E. (2005). Molecular analysis of resistance to streptogramin A compounds conferred by the *Vga* proteins of staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 973–980.

Chowdhury, S., Maris, C., Allain, F.H.-T., and Narberhaus, F. (2006). Molecular basis for temperature sensing by an RNA thermometer. *EMBO J.* 25, 2487–2497.

Colameco, S., and Elliot, M.A. (2017). Non-coding RNAs as antibiotic targets. *Biochem. Pharmacol.* 133, 29–42.

Dar, D., and Sorek, R. (2017). Regulation of antibiotic-resistance by non-coding RNAs in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 36, 111–117.

Dar, D., Shamir, M., Mellin, J.R., Koutero, M., Stern-Ginossar, N., Cossart, P., and Sorek, R. (2016). Term-seq reveals abundant ribo-regulation of antibiotics resistance in bacteria. *Science* 352, aad9822.

Depardieu, F., Podglajen, I., Leclercq, R., Collatz, E., and Courvalin, P. (2007). Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 79–114.

Dersch, P., Khan, M.A., Mühlen, S., and Görke, B. (2017). Roles of regulatory RNAs for antibiotic resistance in bacteria and their potential value as novel drug targets. *Front. Microbiol.* 8, 803.

Draper, D.E. (1989). How do proteins recognize specific RNA sites? New clues from autogenously regulated ribosomal proteins. *Trends Biochem. Sci.* 14, 335–338.

Dunkle, J.A., Xiong, L., Mankin, A.S., and Cate, J.H.D. (2010). Structures of the *Escherichia coli* ribosome with antibiotics bound near the peptidyl transferase center explain spectra of drug action. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 17152–17157.

Falconi, M., Colonna, B., Prosseda, G., Micheli, G., Gualerzi, C.O., Gastra, W., and Uhlin, B. (1998). Thermoregulation of *Shigella* and *Escherichia coli* EIEC pathogenicity. A temperature-dependent structural transition of DNA modulates accessibility of *virF* promoter to transcriptional repressor H-NS. *EMBO J.* 17, 7033–7043.

Felden, B., and Cattoir, V. (2018). Bacterial Adaptation to Antibiotics through Regulatory RNAs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62, AAC.02503-17.

Fleming, A. (1929). On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br. J. Exp. Pathol.* 10, 226.

Foucault, M.-L., Courvalin, P., and Grillot-Courvalin, C. (2009). Fitness cost of VanA-type vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 2354–2359.

Galián, C., Manon, F., Dezi, M., Torres, C., Ebel, C., Lévy, D., and Jault, J.-M. (2011). Optimized purification of a heterodimeric ABC transporter in a highly stable form amenable to 2-D crystallization. *PLoS One* 6, e19677.

Garst, A.D., Edwards, A.L., and Batey, R.T. (2011). Riboswitches: structures and mechanisms. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, a003533.

Gollnick, P. (1994). Regulation of the *Bacillus subtilis* *trp* operon by an RNA-binding protein. *Mol. Microbiol.* 11, 991–997.

- Gollnick, P., and Babitzke, P.** (2002). Transcription attenuation. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* *1577*, 240–250.
- Gong, F., and Yanofsky, C.** (2002). Instruction of translating ribosome by nascent peptide. *Science* *297*, 1864–1867.
- Goodson, J.R., Klupt, S., Zhang, C., Straight, P., and Winkler, W.C.** (2017). LoaP is a broadly conserved antiterminator protein that regulates antibiotic gene clusters in *Bacillus amyloqueliquefaciens*. *Nat. Microbiol.* *2017* 25 2, 17003.
- Green, N.J., Grundy, F.J., and Henkin, T.M.** (2010). The T box mechanism: tRNA as a regulatory molecule. *FEBS Lett.* *584*, 318–324.
- Grigg, J.C., Chen, Y., Grundy, F.J., Henkin, T.M., Pollack, L., and Ke, A.** (2013). T box RNA decodes both the information content and geometry of tRNA to affect gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 7240–7245.
- Grundy, F.J., and Henkin, T.M.** (1993). tRNA as a positive regulator of transcription antitermination in *B. subtilis*. *Cell* *74*, 475–482.
- Grundy, F.J., and Henkin, T.M.** (2006). From ribosome to riboswitch: control of gene expression in bacteria by RNA structural rearrangements. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *41*, 329–338.
- Grundy, F.J., Rollins, S.M., and Henkin, T.M.** (1994). Interaction between the acceptor end of tRNA and the T box stimulates antitermination in the *Bacillus subtilis* *tyrS* gene: a new role for the discriminator base. *J. Bacteriol.* *176*, 4518–4526.
- Grundy, F.J., Winkler, W.C., and Henkin, T.M.** (2002). tRNA-mediated transcription antitermination in vitro: codon-anticodon pairing independent of the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 11121–11126.
- Gryczan, T.J., Grandi, G., Hahn, J., Grandi, R., and Dubnau, D.** (1980). Conformational alteration of mRNA structure and the posttranscriptional regulation of erythromycin-induced drug resistance. *Nucleic Acids Res.* *8*, 6081–6097.
- Gupta, P., Sothiselvam, S., Vázquez-Laslop, N., and Mankin, A.S.** (2013). Deregulation of translation due to post-transcriptional modification of rRNA explains why *erm* genes are inducible. *Nat. Commun.* *4*, 1984.
- Gupta, P., Liu, B., Klepacki, D., Gupta, V., Schulten, K., Mankin, A.S., and Vázquez-Laslop, N.** (2016). Nascent peptide assists the ribosome in recognizing chemically distinct small molecules. *Nat. Chem. Biol.* *12*, 153–158.
- Gutierrez-Preciado, A., Jensen, R.A., Yanofsky, C., and Merino, E.** (2005). New insights into regulation of the tryptophan biosynthetic operon in Gram-positive bacteria. *Trends Genet.* *21*, 432–436.
- Gutiérrez-Preciado, A., Henkin, T.M., Grundy, F.J., Yanofsky, C., and Merino, E.** (2009). Biochemical features and functional implications of the RNA-based T-box regulatory mechanism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *73*, 36–61.
- He, W., Zhang, X., Zhang, J., Jia, X., Zhang, J., Sun, W., Jiang, H., Chen, D., and Murchie, A.I.** (2013). Riboswitch control of induction of aminoglycoside resistance acetyl and adenylyl-transferases. *RNA Biol.* *10*, 1266–1273.
- Henkin, T.M.** (1996). Control of transcription termination in prokaryotes. *Annu. Rev. Genet.* *30*, 35–57.
- Henkin, T.M.** (2000). Transcription termination control in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* *3*, 149–153.
- Henkin, T.M.** (2008). Riboswitch RNAs: using RNA to sense cellular metabolism. *Genes Dev.* *22*, 3383–3390.

- Henkin, T.M., Glass, B.L., and Grundy, F.J.** (1992). Analysis of the *Bacillus subtilis* *tyrS* gene: conservation of a regulatory sequence in multiple tRNA synthetase genes. *J. Bacteriol.* *174*, 1299–1306.
- Hoe, N.P., and Goguen, J.D.** (1993). Temperature sensing in *Yersinia pestis*: translation of the LcrF activator protein is thermally regulated. *J. Bacteriol.* *175*, 7901–7909.
- Hopkins, F.G., and Cole, S.W.** (1903). A contribution to the chemistry of proteids: Part II. The constitution of tryptophane, and the action of bacteria upon it. *J. Physiol.* *29*, 451.
- Horinouchi, S., and Weisblum, B.** (1980). Posttranscriptional modification of mRNA conformation: mechanism that regulates erythromycin-induced resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *77*, 7079–7083.
- Hurme, R., and Rhen, M.** (1998). Temperature sensing in bacterial gene regulation - what it all boils down to. *Mol. Microbiol.* *30*, 1–6.
- Ignatov, D., and Johansson, J.** (2017). RNA-mediated signal perception in pathogenic bacteria. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* *8*, e1429.
- Ito, K., and Chiba, S.** (2013). Arrest Peptides: cis-acting modulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.* *82*, 171–202.
- Jackson, E.N., and Yanofsky, C.** (1973). The region between the operator and first structural gene of the tryptophan operon of *Escherichia coli* may have a regulatory function. *J. Mol. Biol.* *76*, 89–101.
- Jacob, F., and Monod, J.** (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* *3*, 318–356.
- Jia, X., Zhang, J., Sun, W., He, W., Jiang, H., Chen, D., and Murchie, A.I.H.** (2013). Riboswitch control of aminoglycoside antibiotic resistance. *Cell* *152*, 68–81.
- Johansson, J., and Cossart, P.** (2003). RNA-mediated control of virulence gene expression in bacterial pathogens. *Trends Microbiol.* *11*, 280–285.
- Johansson, M., Chen, J., Tsai, A., Kornberg, G., and Puglisi, J.D.** (2014). Sequence-dependent elongation dynamics on macrolide-bound ribosomes. *Cell Rep.* *7*, 1534–1546.
- Kannan, K., Vázquez-Laslop, N., and Mankin, A.S.** (2012). Selective protein synthesis by ribosomes with a drug-obstructed exit tunnel. *Cell* *151*, 508–520.
- Kehrenberg, C., and Schwarz, S.** (2004). *fexA*, a novel *Staphylococcus lentus* gene encoding resistance to florfenicol and chloramphenicol. *Antimicrob. Agents Chemother.* *48*, 615–618.
- Klein, D.J., Schmeing, T.M., Moore, P.B., and Steitz, T.A.** (2001). The kink-turn: a new RNA secondary structure motif. *EMBO J.* *20*, 4214–4221.
- Klinkert, B., and Narberhaus, F.** (2009). Microbial thermosensors. *Cell. Mol. Life Sci.* *66*, 2661–2676.
- Kreuzer, K.D., and Henkin, T.M.** (2018). The T-Box Riboswitch: tRNA as an Effector to Modulate Gene Regulation. *Microbiol. Spectr.* *6*.
- Lander, E.S.** (2016). The heroes of CRISPR. *Cell* *164*, 18–28.
- Leclercq, R.** (2002). Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: Nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin. Infect. Dis.* *34*, 482–492.
- Leclercq, R., and Courvalin, P.** (1991). Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. *Antimicrob. Agents Chemother.* *35*, 1267–1272.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V.** (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* *75*, 843–854.

- Lindahl, L., Archer, R., and Zengel, J.M.** (1983). Transcription of the s10 ribosomal protein operon is regulated by an attenuator in the leader. *Cell* 33, 241–248.
- Liu, L.-C., Grundy, F.J., and Henkin, T.M.** (2015). Non-Conserved Residues in *Clostridium acetobutylicum* tRNA(Ala) Contribute to tRNA Tuning for Efficient Antitermination of the alaS T Box Riboswitch. *Life* (Basel, Switzerland) 5, 1567–1582.
- Lovett, P.S.** (1990). Translational attenuation as the regulator of inducible cat genes. *J. Bacteriol.* 172, 1–6.
- Lovett, P.S.** (1996). Translation attenuation regulation of chloramphenicol resistance in bacteria - a review. *Gene* 179, 157–162.
- Mak, S., Xu, Y., and Nodwell, J.R.** (2014). The expression of antibiotic resistance genes in antibiotic-producing bacteria. *Mol. Microbiol.* 93, 391–402.
- Mandal, M., and Breaker, R.R.** (2004). Gene regulation by riboswitches. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 451–463.
- Mandal, M., Boese, B., Barrick, J.E., Winkler, W.C., and Breaker, R.R.** (2003). Riboswitches control fundamental biochemical pathways in *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Cell* 113, 577–586.
- Mandin, P., Toledo-Arana, A., Fouquier d'Hérouel, A., and Repoila, F.** (2013). RNA-mediated control of bacterial gene expression: Role of regulatory non-coding RNAs. In *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*, (Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA), pp. 1–36.
- Marks, J., Kannan, K., Roncase, E.J., Klepacki, D., Kefi, A., Orelle, C., Vázquez-Laslop, N., and Mankin, A.S.** (2016). Context-specific inhibition of translation by ribosomal antibiotics targeting the peptidyl transferase center. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 12150–12155.
- Martínez, J.L.** (2008). Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science* 321, 365–367.
- Maurelli, A.T.** (1989). Temperature regulation of virulence genes in pathogenic bacteria: a general strategy for human pathogens? *Microb. Pathog.* 7, 1–10.
- Mayford, M., and Weisblum, B.** (1989). ermC leader peptide: Amino acid sequence critical for induction by translational attenuation. *J. Mol. Biol.* 206, 69–79.
- Mayford, M., and Weisblum, B.** (1990). The ermC leader peptide: amino acid alterations leading to differential efficiency of induction by macrolide-lincosamide-streptogramin B antibiotics. *J. Bacteriol.* 172, 3772–3779.
- McCown, P.J., Corbino, K.A., Stav, S., Sherlock, M.E., and Breaker, R.R.** (2017). Riboswitch diversity and distribution. *RNA* 23, 995–1011.
- Mehdizadeh Aghdam, E., Hejazi, M.S., and Barzegar, A.** (2016). Riboswitches: From living biosensors to novel targets of antibiotics. *Gene* 592, 244–259.
- Melnyk, A.H., Wong, A., and Kassen, R.** (2015). The fitness costs of antibiotic resistance mutations. *Evol. Appl.* 8, 273–283.
- Min, Y.-H., Kwon, A.-R., Yoon, E.-J., Shim, M.-J., and Choi, E.-C.** (2008). Translational attenuation and mRNA stabilization as mechanisms of erm(B) induction by erythromycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 1782–1789.
- Morosini, M.I., Ayala, J.A., Baquero, F., Martínez, J.L., and Blázquez, J.** (2000). Biological cost of AmpC production for *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 3137–3143.
- Munita, J.M., and Arias, C.A.** (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol. Spectr.* 4.

- Murina, V., Kasari, M., Hauryliuk, V., and Atkinson, G.C.** (2018). Antibiotic resistance ABCF proteins reset the peptidyl transferase centre of the ribosome to counter translational arrest. *Nucleic Acids Res.* *46*, 3753–3763.
- Murphy, E.** (1985). Nucleotide sequence of *ermA*, a macrolide-lincosamide-streptogramin B determinant in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* *162*, 633–640.
- Nakatogawa, H., and Ito, K.** (2001). Secretion monitor, SecM, undergoes self-translation arrest in the cytosol. *Mol. Cell* *7*, 185–192.
- Nakatogawa, H., and Ito, K.** (2002). The ribosomal exit tunnel functions as a discriminating gate. *Cell* *108*, 629–636.
- Naville, M., and Gautheret, D.** (2009). Transcription attenuation in bacteria: theme and variations. *Briefings Funct. Genomics Proteomics* *8*, 482–492.
- Nechooshtan, G., Elgrably-Weiss, M., Sheaffer, A., Westhof, E., and Altuvia, S.** (2009). A pH-responsive riboregulator. *Genes Dev.* *23*, 2650–2662.
- Nechooshtan, G., Elgrably-Weiss, M., and Altuvia, S.** (2014). Changes in transcriptional pausing modify the folding dynamics of the pH-responsive RNA element. *Nucleic Acids Res.* *42*, 622–630.
- Nomura, M., Yates, J.L., Dean, D., and Post, L.E.** (1980). Feedback regulation of ribosomal protein gene expression in *Escherichia coli*: structural homology of ribosomal RNA and ribosomal protein mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *77*, 7084–7088.
- Nudler, E., and Mironov, A.S.** (2004). The riboswitch control of bacterial metabolism. *Trends Biochem. Sci.* *29*, 11–17.
- O’Neill, J.** (2014). Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations.
- Ohki, R., Tateno, K., Takizawa, T., Aiso, T., and Murata, M.** (2005). Transcriptional termination control of a novel ABC transporter gene involved in antibiotic resistance in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* *187*, 5946–5954.
- Park, A.K., Kim, H., and Jin, H.J.** (2010). Phylogenetic analysis of rRNA methyltransferases, Erm and KsgA, as related to antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Lett.* *309*, no-no.
- Peselis, A., and Serganov, A.** (2014). Themes and variations in riboswitch structure and function. *Biochim. Biophys. Acta* *1839*, 908–918.
- Post, L.E., and Nomura, M.** (1980). DNA sequences from the *str* operon of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *255*, 4660–4666.
- Putzer, H., Gendron, N., and Grunberg-Manago, M.** (1992). Co-ordinate expression of the two threonyl-tRNA synthetase genes in *Bacillus subtilis*: control by transcriptional antitermination involving a conserved regulatory sequence. *EMBO J.* *11*, 3117–3127.
- Ramu, H., Mankin, A., and Vazquez-Laslop, N.** (2009). Programmed drug-dependent ribosome stalling. *Mol. Microbiol.* *71*, 811–824.
- Ramu, H., Vázquez-Laslop, N., Klepacki, D., Dai, Q., Piccirilli, J., Micura, R., and Mankin, A.S.** (2011). Nascent peptide in the ribosome exit tunnel affects functional properties of the A-site of the peptidyl transferase center. *Mol. Cell* *41*, 321–330.
- Reilman, E., Mars, R.A.T., van Dijl, J.M., and Denham, E.L.** (2014). The multidrug ABC transporter BmrC/BmrD of *Bacillus subtilis* is regulated via a ribosome-mediated transcriptional attenuation mechanism. *Nucleic Acids Res.* *42*, 11393–11407.

- Ren, A., Rajashankar, K.R., and Patel, D.J.** (2012). Fluoride ion encapsulation by Mg²⁺ ions and phosphates in a fluoride riboswitch. *Nature* *486*, 85–89.
- Rice, L.B.** (2008). Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: No ESKAPE. *J. Infect. Dis.* *197*, 1079–1081.
- Roberts, M.C., Sutcliffe, J., Courvalin, P., Jensen, L.B., Rood, J., and Seppala, H.** (1999). Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.* *43*, 2823–2830.
- Rollins, S.M., Grundy, F.J., and Henkin, T.M.** (1997). Analysis of cis-acting sequence and structural elements required for antitermination of the *Bacillus subtilis* tyrS gene. *Mol. Microbiol.* *25*, 411–421.
- Romby, P., and Charpentier, E.** (2010). An overview of RNAs with regulatory functions in gram-positive bacteria. *Cell. Mol. Life Sci.* *67*, 217–237.
- Ross, J.I., Eady, E.A., Cove, J.H., Cunliffe, W.J., Baumberg, S., and Wootton, J.C.** (1990). Inducible erythromycin resistance in staphylococci is encoded by a member of the ATP-binding transport super-gene family. *Mol. Microbiol.* *4*, 1207–1214.
- Roth, A., and Breaker, R.R.** (2013). Integron attI1 sites, not riboswitches, associate with antibiotic resistance genes. *Cell* *153*, 1417–1418.
- Sandler, P., and Weisblum, B.** (1988). Erythromycin-induced stabilization of ermA messenger RNA in *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* *203*, 905–915.
- Seliverstov, A. V., Putzer, H., Gelfand, M.S., and Lyubetsky, V.A.** (2005). Comparative analysis of RNA regulatory elements of amino acid metabolism genes in Actinobacteria. *BMC Microbiol.* *5*, 54.
- Serganov, A., Yuan, Y.-R., Pikovskaya, O., Polonskaia, A., Malinina, L., Phan, A.T., Hobartner, C., Micura, R., Breaker, R.R., and Patel, D.J.** (2004). Structural basis for discriminative regulation of gene expression by adenine- and guanine-sensing mRNAs. *Chem. Biol.* *11*, 1729–1741.
- Serganov, A., Polonskaia, A., Phan, A.T., Breaker, R.R., and Patel, D.J.** (2006). Structural basis for gene regulation by a thiamine pyrophosphate-sensing riboswitch. *Nature* *441*, 1167–1171.
- Serganov, A., Huang, L., and Patel, D.J.** (2008). Structural insights into amino acid binding and gene control by a lysine riboswitch. *Nature* *455*, 1263–1267.
- Sherwood, A. V., and Henkin, T.M.** (2016). Riboswitch-mediated gene regulation: Novel RNA architectures dictate gene expression responses. *Annu. Rev. Microbiol.* *70*, 361–374.
- Sherwood, A. V., Grundy, F.J., and Henkin, T.M.** (2015). T box riboswitches in Actinobacteria: translational regulation via novel tRNA interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 1113–1118.
- Singh, K. V., Malathum, K., and Murray, B.E.** (2001). Disruption of an *Enterococcus faecium* species-specific gene, a homologue of acquired macrolide resistance genes of staphylococci, is associated with an increase in macrolide susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* *45*, 263–266.
- Sothiselvam, S., Liu, B., Han, W., Ramu, H., Klepacki, D., Atkinson, G.C., Brauer, A., Remm, M., Tenson, T., Schulten, K., et al.** (2014). Macrolide antibiotics allosterically predispose the ribosome for translation arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 9804–9809.
- Spížek, J., Sigler, K., Řezanka, T., and Demain, A.** (2016). Biogenesis of antibiotics—viewing its history and glimpses of the future. *Folia Microbiol. (Praha)*. *61*, 347–358.
- Stokes, H.W., and Hall, R.M.** (1991). Sequence analysis of the inducible chloramphenicol resistance determinant in the Tn1696 integron suggests regulation by translational attenuation. *Plasmid* *26*, 10–19.

- Storz, G., Vogel, J., and Wassarman, K.M.** (2011). Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers. *Mol. Cell* *43*, 880–891.
- Stougaard, P., Molin, S., and Nordström, K.** (1981). RNAs involved in copy-number control and incompatibility of plasmid R1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *78*, 6008–6012.
- Strauch, M.A., and Hoch, J.A.** (1993). Transition-state regulators: sentinels of *Bacillus subtilis* post-exponential gene expression. *Mol. Microbiol.* *7*, 337–342.
- Su, Y.A., He, P., and Clewell, D.B.** (1992). Characterization of the tet(M) determinant of Tn916: evidence for regulation by transcription attenuation. *Antimicrob. Agents Chemother.* *36*, 769–778.
- Sudarsan, N., Barrick, J.E., and Breaker, R.R.** (2003). Metabolite-binding RNA domains are present in the genes of eukaryotes. *RNA* *9*, 644–647.
- Sudarsan, N., Hammond, M.C., Block, K.F., Welz, R., Barrick, J.E., Roth, A., and Breaker, R.R.** (2006). Tandem riboswitch architectures exhibit complex gene control functions. *Science* (80-.). *314*, 300–304.
- Tenson, T., Lovmar, M., and Ehrenberg, M.** (2003). The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. *J. Mol. Biol.* *330*, 1005–1014.
- Thore, S., Leibundgut, M., and Ban, N.** (2006). Structure of the eukaryotic thiamine pyrophosphate riboswitch with its regulatory ligand. *Science* *312*, 1208–1211.
- Tinoco, I., Borer, P.N., Dengler, B., Levine, M.D., Uhlenbeck, O.C., Crothers, D.M., and Gralla, J.** (1973). Improved estimation of secondary structure in ribonucleic acids. *Nat. New Biol.* *246*, 40–41.
- Tomizawa, J., Itoh, T., Selzer, G., and Som, T.** (1981). Inhibition of ColE1 RNA primer formation by a plasmid-specified small RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *78*, 1421–1425.
- Torres, C., Galián, C., Freiberg, C., Fantino, J.-R., and Jault, J.-M.** (2009). The YheI/YheH heterodimer from *Bacillus subtilis* is a multidrug ABC transporter. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* *1788*, 615–622.
- Tu, D., Blaha, G., Moore, P.B., and Steitz, T.A.** (2005). Structures of MLSBK antibiotics bound to mutated large ribosomal subunits provide a structural explanation for resistance. *Cell* *121*, 257–270.
- Vázquez-Laslop, N., Thum, C., and Mankin, A.S.** (2008). Molecular mechanism of drug-dependent ribosome stalling. *Mol. Cell* *30*, 190–202.
- Vázquez-Laslop, N., Ramu, H., Klepacki, D., Kannan, K., and Mankin, A.S.** (2010). The key function of a conserved and modified rRNA residue in the ribosomal response to the nascent peptide. *EMBO J.* *29*, 3108–3117.
- Vázquez-Laslop, N., Ramu, H., and Mankin, A.** (2011). Nascent peptide-mediated ribosome stalling promoted by antibiotics. In *Ribosomes*, (Vienna: Springer Vienna), pp. 377–392.
- Vitreschak, A.G., Mironov, A.A., Lyubetsky, V.A., and Gelfand, M.S.** (2008). Comparative genomic analysis of T-box regulatory systems in bacteria. *RNA* *14*, 717–735.
- Wang, J., and Nikonowicz, E.P.** (2011). Solution structure of the K-turn and Specifier Loop domains from the *Bacillus subtilis* tyrS T-box leader RNA. *J. Mol. Biol.* *408*, 99–117.
- Wang, J., Henkin, T.M., and Nikonowicz, E.P.** (2010). NMR structure and dynamics of the Specifier Loop domain from the *Bacillus subtilis* tyrS T box leader RNA. *Nucleic Acids Res.* *38*, 3388–3398.
- Wang, Y., Rotman, E.R., Shoemaker, N.B., and Salyers, A.A.** (2005). Translational control of tetracycline resistance and conjugation in the *Bacteroides* conjugative transposon CTnDOT. *J. Bacteriol.* *187*, 2673–2680.
- Watanakunakorn, C.** (1976). Clindamycin therapy of staphylococcus aureus endocarditis: Clinical relapse

and development of resistance to clindamycin, lincomycin and erythromycin. *Am. J. Med.* 60, 419–425.

Waters, L.S., and Storz, G. (2009). Regulatory RNAs in bacteria. *Cell* 136, 615–628.

Weigand, J.E., Sanchez, M., Gunnesch, E.-B., Zeiher, S., Schroeder, R., and Suess, B. (2008). Screening for engineered neomycin riboswitches that control translation initiation. *RNA* 14, 89–97.

Weisblum, B. (1995a). Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 577–585.

Weisblum, B. (1995b). Insights into erythromycin action from studies of its activity as inducer of resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 797–805.

Winkler, W.C., and Breaker, R.R. (2003). Genetic Control by Metabolite-Binding Riboswitches. *ChemBioChem* 4, 1024–1032.

Winkler, W.C., and Breaker, R.R. (2005). Regulation of bacterial gene expression by riboswitches. *Annu. Rev. Microbiol.* 59, 487–517.

Winkler, W., Nahvi, A., and Breaker, R.R. (2002). Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature* 419, 952–956.

Winkler, W.C., Grundy, F.J., Murphy, B.A., and Henkin, T.M. (2001). The GA motif: an RNA element common to bacterial antitermination systems, rRNA, and eukaryotic RNAs. *RNA* 7, 1165–1172.

Yamanaka, K., Mitta, M., and Inouye, M. (1999). Mutation analysis of the 5' untranslated region of the cold shock *cspA* mRNA of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181, 6284–6291.

Yanofsky, C. (1981). Attenuation in the control of expression of bacterial operons. *Nature* 289, 751–758.

Yanofsky, C. (2004). The different roles of tryptophan transfer RNA in regulating *trp* operon expression in *E. coli* versus *B. subtilis*. *Trends Genet.* 20, 367–374.

Yates, J.L., and Nomura, M. (1980). *E. coli* ribosomal protein L4 is a feedback regulatory protein. *Cell* 21, 517–522.

Zengel, J.M., and Lindahl, L. (1992). Ribosomal protein L4 and transcription factor NusA have separable roles in mediating terminating of transcription within the leader of the S10 operon of *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 6, 2655–2662.

Zengel, J.M., and Lindahl, L. (1996). A hairpin structure upstream of the terminator hairpin required for ribosomal protein L4-mediated attenuation control of the S10 operon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178, 2383–2387.

Zengel, J.M., Mueckl, D., and Lindahl, L. (1980). Protein L4 of the *E. coli* ribosome regulates an eleven gene *r* protein operon. *Cell* 21, 523–535.

Zhang, J., and Ferré-D'Amaré, A.R. (2013). Cocystal structure of a T-box riboswitch Stem I domain in complex with its cognate tRNA. *Nature* 500, 363–366.