

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Matěj Jureček

RNA-přepínače jako nástroje regulace genové exprese

Riboswitches as tools for gene expression regulation

Bakalářská práce

Školitel: doc. RNDr. Petr Folk CSc.

Praha, 2020

Prohlášení:

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

V Praze, 4.6. 2020

..... Matěj Jureček

Poděkování:

Tímto bych rád poděkoval mému školiteli, panu doc. RNDr. Petru Folkovi CSc. za jeho nesmírnou pečlivost, pracovitost, zodpovědnost a náruživost ve vedení mé bakalářské práce. Bez něho by má práce měla nepochybně řádově nižší kvalitu. Dále bych chtěl poděkovat mé milé snoubence za podporu a všechno, co pro mě dělá. A také velmi děkuji Bohu, neboť bez Něj by nic jako RNA-přepínače nikdy nebylo.

Abstract

Riboswitches are segments of pre-mRNAs and mRNAs, present in their UTRs or introns, which are able to bind small molecules (usually a metabolite, ion or nucleotide) and in response „switch“ between two conformations, which can affect the downstream gene expression process. In most cases, at least in bacteria, the mRNA which the riboswitch regulates encodes a component of the metabolism of the riboswitch-binding ligand. Contrary to other mechanisms of gene expression regulation, riboswitches do not require the participation of a protein. They may represent a way for the hypothetical early forms of life to regulate their genes. Riboswitches are abundant in bacteria and there is only a handful in eukaryotes. The scope of the study of riboswitches is ever more increasing and today it could very well be an independent branch of molecular biology.

Key words: riboswitch, aptamer, expression platform, gene expression, regulation, mRNA, TPP

Abstrakt

RNA-přepínače jsou segmenty na 5' UTR nebo v intronech mRNA nebo pre-mRNA, které jsou schopné samy o sobě vázat malou molekulu (většinou metabolit, nukleotid nebo ion) a jako odpověď „přepínat“ mezi dvěma konformacemi, které mohou ovlivnit genovou expresi. Ve většině případů u bakterií mRNA kterou RNA-přepínač reguluje kóduje složku metabolismu ligandu vázajícího se na RNA-přepínač. Na rozdíl od jiných mechanismů regulace genové exprese RNA-přepínače nevyžadují pro regulaci přítomnost proteinů. RNA-přepínače mohou také představovat způsob, jakým hypotetické primitivní formy života regulovaly svou genovou expresi. RNA-přepínače jsou hojné u bakterií a jen málo se jich vyskytuje u eukaryot. Jejich studium se neustále zintenzivňuje a rozšiřuje a dnes by mohly RNA-přepínače lehce představovat samostatné odvětví molekulární biologie.

Klíčová slova: RNA-přepínač, aptamer, expresní platforma, genová exprese, regulace, mRNA, TPP

Seznam zkratek a termínů

AdoCbl	Adenosyl kobalamin
ADP	Adenosindifosfát
ATP	Adenosintrifosfát
BrA	Branch point A - Adenin na sestřihovém místě
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	Dvojvláknová DNA
FMN	Flavin mononukleotid
GFP	Zelený fluorescenční protein
GlcN6P	Glukosamin-6-fosfát
HMP	4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidin
miRNA	Mikro RNA
mRNA	Mediátorová/messenger RNA
NTP	N-trifosfát
PCR	Polymerázová řetězová reakce
Poly-U	Sekvence několika po sobě jdoucích uracilů v RNA
RBS	Místo pro navázání ribozomu (R ibosome B inding S ite)
Rho	ρ helikasa
Riboswitch	RNA-přepínač
RNA	Ribonukleová kyselina
RNAPolII	RNA polymeráza II
rRNA	Ribosomální RNA
siRNA	Malá interferující RNA
snRNA	Malá jaderná RNA
TEC	Transkripční elongační komplex
ThiC	Gen pro fosfomethylpyrimidin syntázu
TPP	Thiamin pyrofosfát
tRNA	Transferová/přenášející RNA
UTR	Nepřekládaná oblast na molekule mRNA
ZTP	5-amino-4-imidazol carboxamidribosid 5'-trifostát

Obsah

1	Úvod	1
1.1	Základní schéma a struktura RNA přepínačů	1
1.2	Druhy RNA-přepínačů.....	4
2	RNA aptamery.....	4
2.1	Struktura aptamerů a mechanismus vazby ligandu: RNA-přepínač pro TPP	5
3	Aptamery ovlivňují expresní platformy.....	9
3.1	Helix P1.....	9
3.1.1	Helix P1: RNA-přepínač pro lysin.....	11
3.2	RNA-přepínač T-box	13
3.3	Termosenzitivní RNA: RNAT	14
3.4	Kinetika RNA-přepínačů	15
4	Expresní platformy a způsoby regulace exprese pomocí RNA-přepínačů.....	17
4.1	Regulace na úrovni transkripce	17
4.1.1	Vnitřní terminace	17
4.1.2	Terminace transkripce pomocí Rho-faktoru	19
4.2	Regulace na úrovni translace	19
4.3	Regulace na úrovni sestřihu	20
4.4	Regulace na úrovni degradace: ribozymy	21
4.5	Duální regulace.....	24
5	RNA-přepínače v eukaryotech.....	24
5.1	Houby	25
5.2	Rostliny	27
5.3	Ostatní eukaryotické říše.....	27
6	Využití RNA-přepínačů.....	29
7	RNA-přepínače a RNA svět	30
8	Závěr	31
9	Seznam literatury	32

1 Úvod

Rád bych nejprve uvedl tuto práci o RNA-přepínačích krátkým úvodem do jejich historie. Po několika neúspěšných pokusech na bakteriích (Ravnum a Andersson, 2001) bylo v roce 2002 dokázáno, že některé vitamínové deriváty, konkrétně thiaminpyrofosfát (TPP) (Mironov a kol., 2002), flavinmononukleotid (FMN) (Nahvi a kol., 2002) a adenosylkobalamin (AdoCbl) (Winkler a kol., 2002) se navazují na své vlastní mRNA a to potom vede ke změně konformace jiné části mRNA, která následně nějakým způsobem ovlivňuje expresi genu. Všechny tyto pokusy byly prováděny na bakteriálních kulturách. Protože tyto specifické mRNA vykazovaly dva stavy, které byly závislé jen na přítomnosti nebo nepřítomnosti ligandu a které se daly mezi těmito stavy ligandem „přepínat“, vedlo to k představě jakéhosi ribonukleového přepínače. Odtud potom pochází sám název těchto segmentů na molekulách pre-mRNA a mRNA – *riboswitch*, neboli RNA-přepínač (termín RNA-přepínač budu v této práci používat ve významu „riboswitch“). Od doby jejich objevu, tedy po dobu sedmnácti let, se našly další skupiny RNA-přepínačů, které ovlivňují nejen expresi enzymů pro tvorbu vitamínových derivátů, aminokyselin, nukleotidů a organických kyselin, ale které i například skrze regulaci exprese iontových kanálů a pump kontrolují koncentraci iontů v buňce. RNA-přepínače se také objevily, kromě dalších skupin bakterií, u některých archeí a eukaryot – hub, rostlin a řas (Nudler, 2013). Od doby objevu výše zmíněných RNA-přepínačů se jejich počet zněkolikanásobil a dnes je jich u bakterií známo více než čtyřicet (McCown a kol., 2017). RNA-přepínače se dnes ukazují jako způsob regulace genové exprese, pro kterou není třeba žádný regulační protein ani jiná další navazující struktura, ale regulační funkci zastane terciární struktura v samotné mRNA. Cílem této práce bude podat souhrnný přehled toho, co RNA-přepínače jsou, jakou mají strukturu, kde se vyskytují a na jakém mechanismu fungují, a to se zaměřením na přepínače eukaryotické. Nevyhne se nicméně příkladům z bakterií, neboť značná část výzkumu byla a je prováděna právě na této doméně našeho rozmanitého pozemského života.

1.1 Základní schéma a struktura RNA přepínačů

Jako RNA-přepínač se označuje část pre-mRNA nebo mRNA, která je sama o sobě, bez zprostředkování proteinem, schopna vázat malou molekulu. Tato molekula může být metabolit, nukleotid nebo ion. Navázání probíhá většinou mechanismem indukovaného přizpůsobení (induced fit) (Ottink a kol., 2007; Suddala a kol., 2015). V důsledku vazby se mění konformace molekuly RNA, což má za následek regulaci exprese genu. RNA přepínače se vyskytují přednostně v 5' UTR mRNA a pre-mRNA, nicméně u zelených rostlin byly objeveny i uprostřed mRNA nebo na jejich 3' konci (Bocobza a Aharoni, 2008). Molekuly mRNA, které váží malé molekuly u bakterií patří mezi ty, které v sobě obsahují informaci pro syntézu nějakého klíčového faktoru pro produkci nebo odbourání té samé látky, která se na přepínač

váže. Například vitamin B₁₂ se váže na mRNA kódující klíčové enzymy pro metabolismus kobalaminu (Vitreschak a kol., 2003), fluoridový anion pomocí RNA-přepínače aktivuje u bakterií a některých archeí (Gupta a Swati, 2019) dráhu pro transport fluoridových iontů ven z buňky (Baker a kol., 2012) atd.

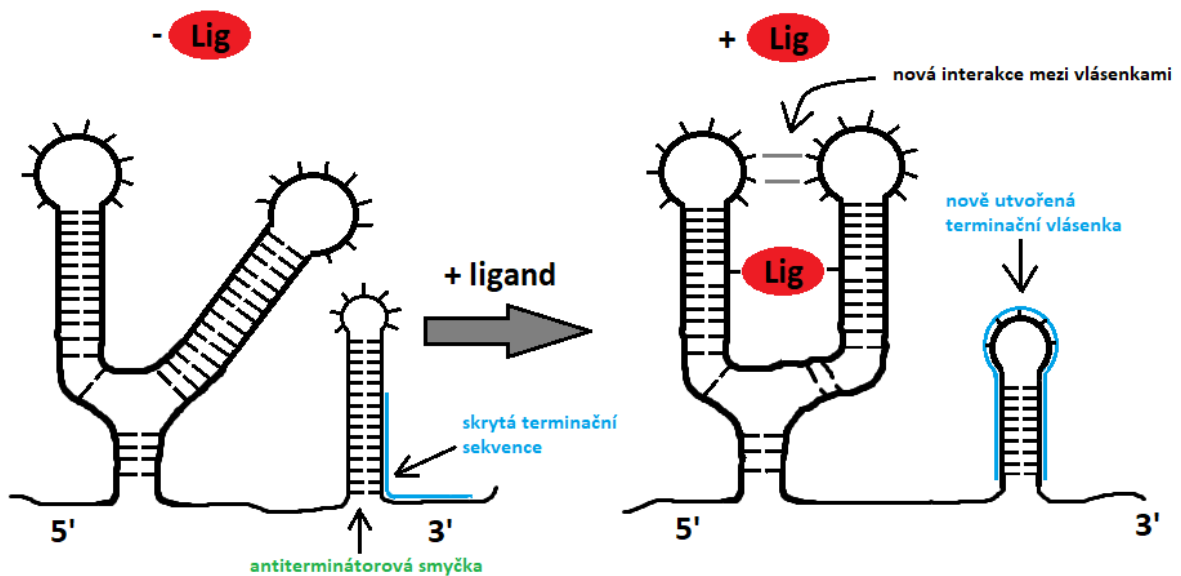
V rámci užívané definice je RNA-přepínač tvořen dvěma doménami: aptamerem a expresní platformou. Aptamer je ta část mRNA/pre-mRNA, která váže ligand a je většinou oproti expresní platformě blíže 5' konci molekuly. Většinou je mezi těmito dvěma doménami překryv; viz základní schéma (obr. 1).



Obrázek 1: Základní schéma umístění a překryvu domén RNA-přepínače na molekule mRNA. Černá linka značí molekulu mRNA.

Expresní platformy jsou části molekuly, které reagují na konformační změnu aptamerů. Jejich reakce je klíčová, neboť právě expresní platformy jsou prostředníkem mezi vazbou ligandu a regulací exprese. Dnes ještě nejsou plně známy všechny mechanismy, jak platformy exprese regulují, nicméně rozšířené je schéma tvoření terminátorové/antiterminátorové vlásenky směrem ke 3' konci od aptameru, která buď dovoluje, nebo naopak terminuje transkripci v přítomnosti ligandu - viz obr. 2 (Hennelly a kol., 2013). RNA-přepínač může také zabraňovat nasednutí ribosomu, tedy může exprese regulovat na

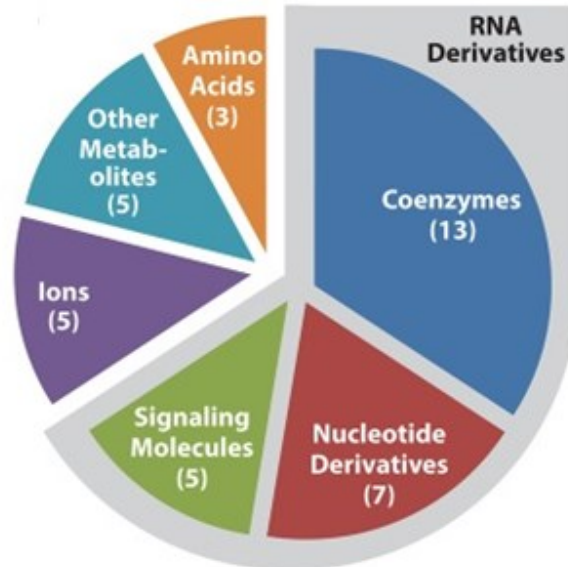
úrovni translace, kdy se nasednutí ribosomu zabrání jen v přítomnosti ligandu (Ogawa, 2011). Další způsob regulace exprese u eukaryot je skrze ovlivnění sestřihu (např. Kubodera a kol., 2003).



Obrázek 2: Sekundární struktura RNA-přepínače v nepřítomnosti a přítomnosti ligandu. Přítomnost ligandu způsobuje vytvoření vlásenky terminující transkripci, čímž inhibuje expresi příslušného genu. Samozřejmě může být situace obrácená, tedy že přítomnost ligandu naopak strukturu terminační vlásenky rozruší a vytvoří se *vlásenka* antiterminační. Tím může RNA přepínač zprostředkovat jak negativní, tak i pozitivní zpětnou vazbu. Modrá linka značí sekvenci potenciální terminátorové vlásenky.

1.2 Druhy RNA-přepínačů

První objevené RNA-přepínače jsou již zmíněné RNA-přepínače pro FMN, TPP a AdoCbl. Od té doby bylo objeveno mnoho dalších druhů. Jejich diverzitu mapuje schéma na Obr. 3.



Obrázek 3: Rodiny RNA-přepínačů. Podstatnou část ligandů tvoří metabolity, ionty a nukleotidy (McCown a kol., 2017)

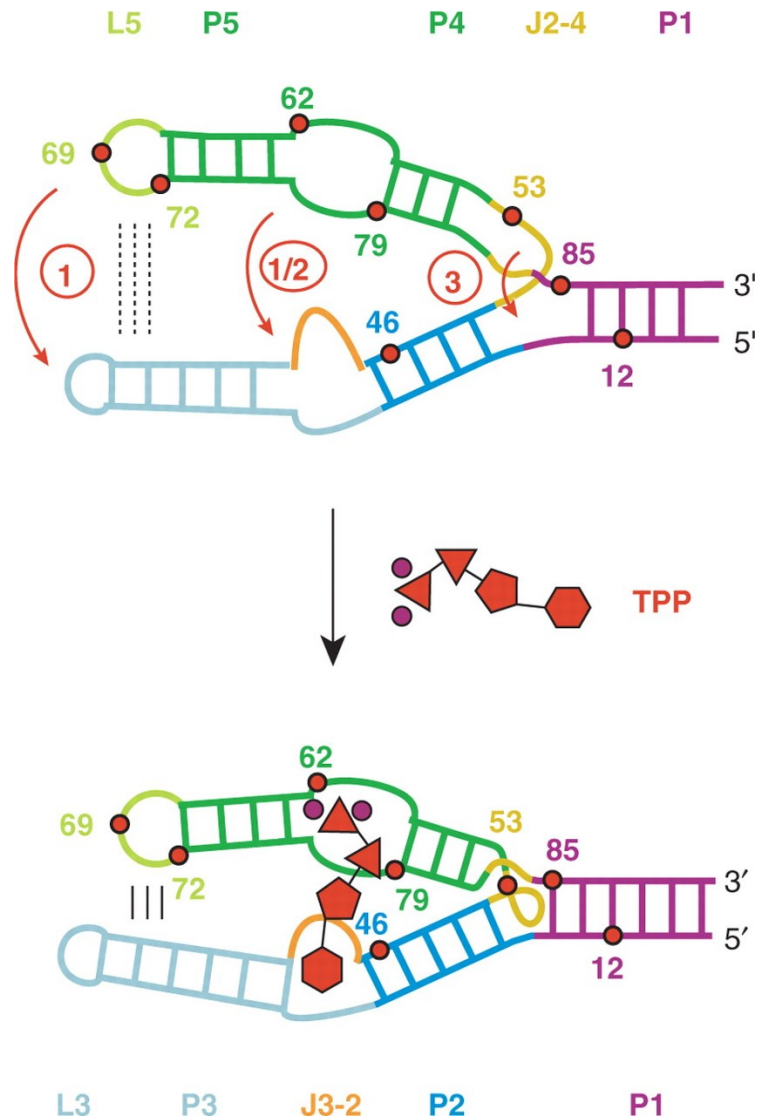
- **Koenzymy** (AdoCbl, kobalamin, TPP, FMN, S-adenosylmethionin, tetrahydrofolát, S-adenosylhomocystein)
- **Nukleotidy a jejich deriváty** (adenin, guanin, prequenosin-1, 2'-deoxyguanosin, 5-amino-4-imidazol carboxamidribosid 5'-trifostát (ZTP))
- **Signální molekuly** (cyklický di-AMP, cyklický di-GMP, cyklický AMP-GMP,
- **Ionty** (Mg^{2+} , Mn^{2+} , F^- , Ni^{2+}/Co^{2+})
- **Aminokyseliny** (lysin, glycin, glutamin)
- **jiné, blíže nezařazené metabolity** (glukosamin-6-fosfát, azaaromatika, guanidin).

2 RNA aptamery

Viděli jsme, že RNA-přepínač je molekula RNA, která je schopna vázat malou molekulu a změnit konformaci. Ta jeho část, která ligand váže, se nazývá aptamer - ze složení latinského *aptus* (vejít se) a řeckého *μέρος* (oblast). Zde si ukážeme strukturu těchto domén a také způsob, jak ligand váží a jak mění konformaci. Příkladem nám bude přepínač pro thiaminpyrofosfát (TPP), neboť je nejenže jedním z nejlépe prostudovaných, ale také se vyskytuje ve všech třech doménách života (Li a Breaker, 2013), čímž se přiblížíme „eukaryotickému“ zaměření této práce.

2.1 Struktura aptamerů a mechanismus vazby ligandu: RNA-přepínač pro TPP

Ligand se u většiny aptamerů váže přímo na báze RNA. Kromě těchto interakcí je molekula ligandu v aptameru orientována prostřednictvím molekul vody nebo různými ionty (většinou Mg^{2+}). Tak je to i v případě RNA-přepínače pro TPP, který se v odborné literatuře označuje také jako „THI-box“. V popisu aptameru budu vycházet z jeho terciární struktury, zjištěné krystalograficky (Edwards a Ferré-D'Amaré,

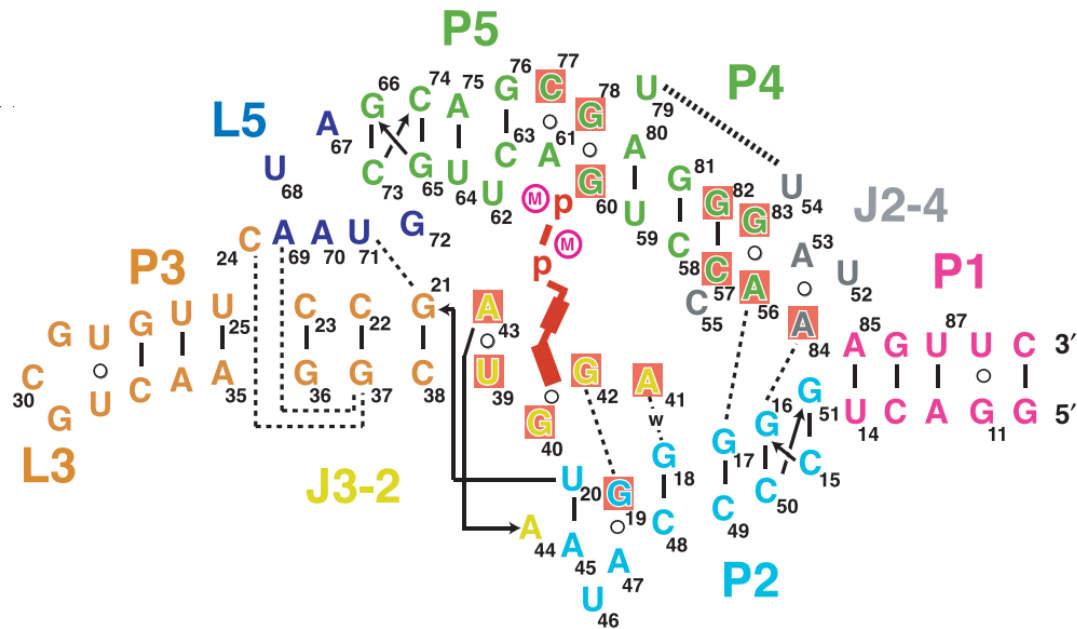


Obrázek 4: Schéma struktury aptameru pro TPP a jeho konformační změna při navázání TPP.

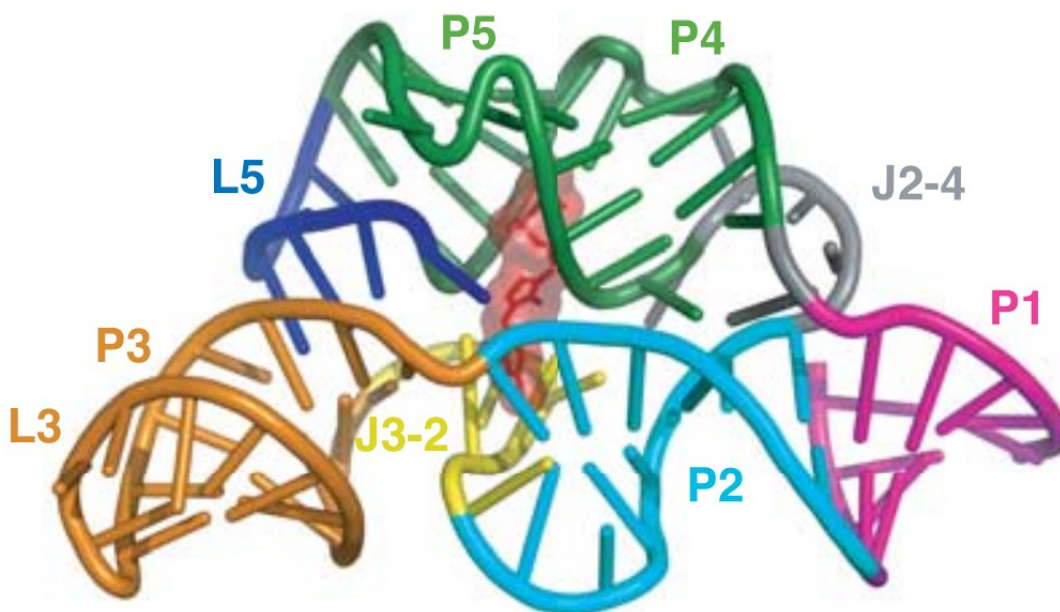
Barevně jsou odlišeny různé domény aptameru s odpovídajícím označením na horním a dolním okraji obrázku. Červenými kolečky a čísly jsou označena místa na aptameru pro ukázkou změny postavení jednotlivých bází v rámci molekuly aptameru po navázání ligandu. TPP je červeně: trojúhelníky značí fosfátové skupiny, pětiúhelník značí thiazol a šestiúhelník představuje pyrimidin. Fialová kolečka značí Mg^{2+} ionty. Červené šipky představují změnu konformace, tedy přiblížení daných domén ve směru šipek (Lang a kol., 2007).

2006; Haller a kol., 2013; Serganov a kol., 2006). Schéma jeho sekundární struktury ukazuje, že jej tvoří v podstatě dvě vlásenky RNA, které mezi sebou tvoří vazebné místo pro molekulu TPP (viz obr 4 (Lang a kol., 2007)).

Detailnější schéma ukazuje obr. 5 (Serganov a kol., 2006).



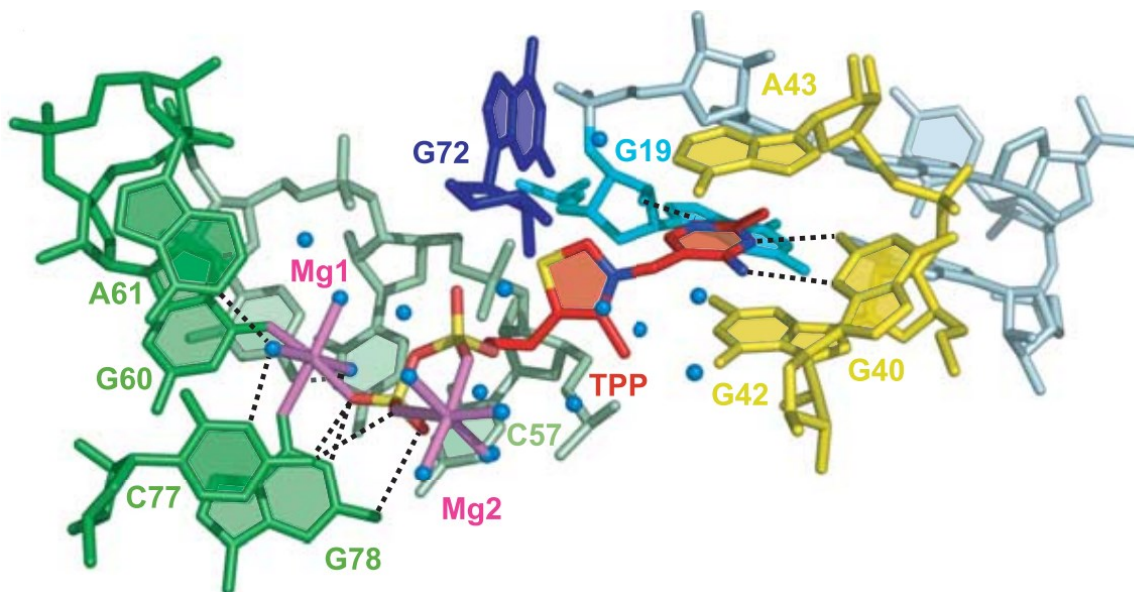
Obrázek 4: Podrobné schéma terciární struktury aptameru pro TPP s navázaným TPP. Uprostřed opět v červeném provedení molekula TPP. Fialové zakroužkované "M" reprezentují ionty Mg^{2+} , tečkované linie reprezentují vodíkové můstky mezi bázemi při zaujetí terciární struktury. Tlustá přerušovaná linka mezi U79 a U54 reprezentuje patrovou interakci, červeně podbarvené báze jsou konzervované v 97 % sekvencí. Jednotlivá různě barevná písmena reprezentují domény a motivy v molekule RNA-přepínače. P – paired, označuje párující sekvenci, L – loop označuje smyčku na konci vlásenky, J – joined, označuje ty části aptameru, kde se báze přímo podílejí na interakci s ligandem (Serganov a kol., 2006).



Obrázek 5: 3D model terciární struktury aptameru pro TPP na základě Xray/NMR. Uprostřed je červenou barvou znázorněna molekula TPP. Jednotlivá různě barevná písmena a části modelu reprezentují domény a motivy v molekule RNA-přepínače. P – paired, označuje párující sekvenci, L – loop označuje smyčku na konci vlásenky, J – joined, označuje ty části aptameru, kde se báze přímo podílejí na interakci s ligandem (Serganov a kol., 2006).

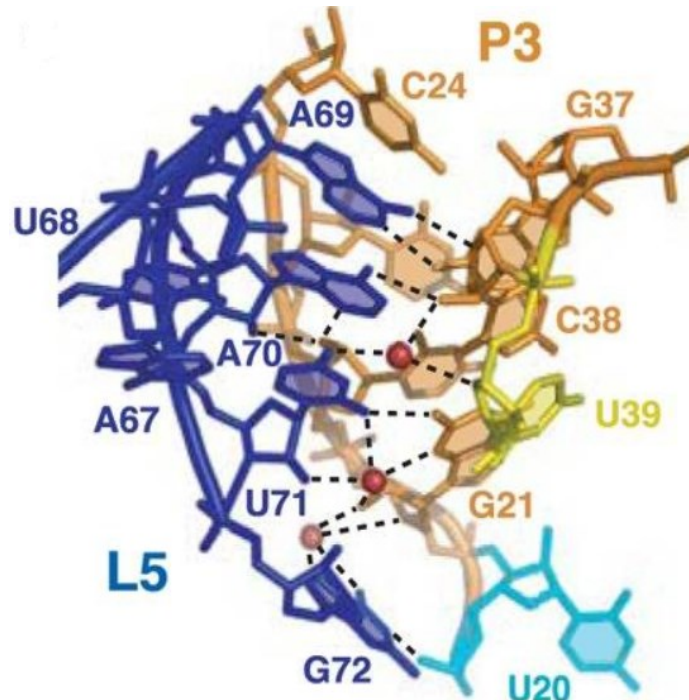
Domény J3-2 a P3 a P4 jsou významné, neboť se oproti ostatním podílejí velkým dílem na vazbě TPP. Doména J3-2 je pro vazbu nejvýznamnější, neboť, jak je částečně vidět na obrázku č. 6, se do ní interkaluje 4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidin (HMP) z molekuly TPP. HMP se interkaluje mezi guanin na pozici 42 a adenin na pozici 43 molekuly RNA. Zároveň tvoří vodíkové můstky s G40 a G19. Heterocyklus HMP je tak obemknut bázemi, které interagují i samy se sebou, a tak celou strukturu domény J3-2 dále stabilizují. Mezi tyto interakce patří předně sama kovalentní vazba mezi U39-G40-A41-G42-A43. U39 a A43 potom tvoří Watson-Crick interakci. Dále jsou ve hře i patrové interakce (interakce a vzájemná stabilizace oblaků molekulárních π - π orbitalů nad a pod aromatickými cykly), kdy v jednom sloupci jsou postupně A41, G42, HMP, A43 a U21. Fosfátové skupiny TPP a jejich záporné náboje jsou stabilizovány dvěma hořečnatými ionty, které interagují s U59, G60, G61, C74, A75, C77, G78 a A80, což jsou báze v doménách P4-5, tedy ve vedlejší vlásence. Vidíme, že molekula TPP se rozprostírá napříč dvěma vlásenkami, jak už jsme viděli v základním schématu. Podrobnější schéma je

na Obr. 7. Vidíme v něm jak interakci heterocyklu HMP, tak i interakce zprostředkované ionty Mg^{2+} , stejně jako pozici molekul vody v centru aptameru:



Obrázek 6: Navázání molekuly TPP v aptameru. Červeně je TPP, žlutě, zeleně, tmavě, bleděmodře a šedivě jsou konkrétní domény RNA-přepínače s jeho bázemi a fialově jsou ionty Mg^{2+} . Přerušované čáry značí vodíkové interakce, modré kuličky jsou molekuly vody. Písmena a čísla označují konkrétní báze na tom daném místě molekuly RNA, kromě Mg_2 , což je označení iontu hořčíku (Serganov a kol., 2006).

Konformaci aptameru s přítomným TPP dále stabilizuje interakce loop-loop (smýčka-smýčka) mezi doménami L5 a P3 (obr. 8). Tato interakce je zprostředkována jak vodíkovými můstky (mezi A69 a C38; A70 a C38; G72 a U20), tak přítomností tří iontů K^+ , které tvoří solné můstky mezi bázemi A70 a C37 + U39; U71 a G21; G72 a G21. Ty jsou v obr. 5 znázorněny jako spojeny červenými kuličkami K^+ iontů v doménách L5 a P3. Viz obr. 8:



Obrázek 7: Interakce loop-loop aptameru pro TPP. Jednotlivá tučná různě barevná písmena reprezentují domény a motivy v molekule RNA-přepínače. P – paired, označuje párující sekvenci, L – loop označuje smýčku na konci vlásenky. Menší barevná písmena a číslice označují bázi na dané pozici v molekule RNA. Červené kuličky jsou zde ionty K^+ (Serganov a kol., 2006).

3 Aptamery ovlivňují expresní platformy

Už výše jsme si načrtli možný způsob toho, jak vlastně vazba ligandu zprostředkuje regulační odpověď RNA-přepínačem. Jednalo se o přechod mezi dvěma konformacemi expresní platformy, která zaujímal formy terminátorové a antiterminátorové smyčky. Otázka po přesném mechanismu funkce expresních platforem různých RNA-přepínačů je dnes intenzivně studována.

3.1 Helix P1

Práce Abou-ela a spolupracovníků (Aboul-ela a kol., 2015) poukázala na strukturní podobnosti mezi známými RNA-přepínači (přepínači pro FMN, TPP, SAM, puriny aj.). Jedná se zejména o helix, který se vytváří mezi 3' a 5' koncem aptameru (helix P1, viz obr. 5). Helix P1 je tvořen jen několika páry bází, nicméně se zdá, že je v daných přepínačích klíčový pro zprostředkování komunikace mezi aptamerem a expresní platformou. Kromě přepínačů pro TPP a FMN se helix P1 v mnoha případech přímo nějak

účastní navázání ligandu a změny konformace celé molekuly RNA. Tak je tomu například u RNA-přepínačů pro puriny, SAM I a III, SAH, nebo lysin. U zmíněných přepínačů navázání ligandu vždy indukuje vytvoření helixu P1, který je významný pro stabilitu komplexu aptamer-ligand. Je důležité zmínit, že 3' vlákno helixu P1 u uvedených přepínačů (tab. 1) vždy zasahuje do oblasti expresní platformy, což zároveň vysvětluje přenos signálu z aptameru skrze molekulu RNA (Whitford a kol., 2009). Důležitost helixu P1 spočívá rovněž v tom, že se mnohdy přímo podílí na vazbě ligandu (Nozinovic a kol., 2014), například SAH, SAM-III, purinů nebo lysinu. Zde představovaný aptamer pro TPP je v tomto případě jedinou výjimkou, neboť u něj se helix P1 na vazbě TPP přímo nepodílí. Helix P1 je také důležitý v tom, že jeho vytvoření je obvykle limitujícím krokem pro sbalení celého RNA-přepínače.

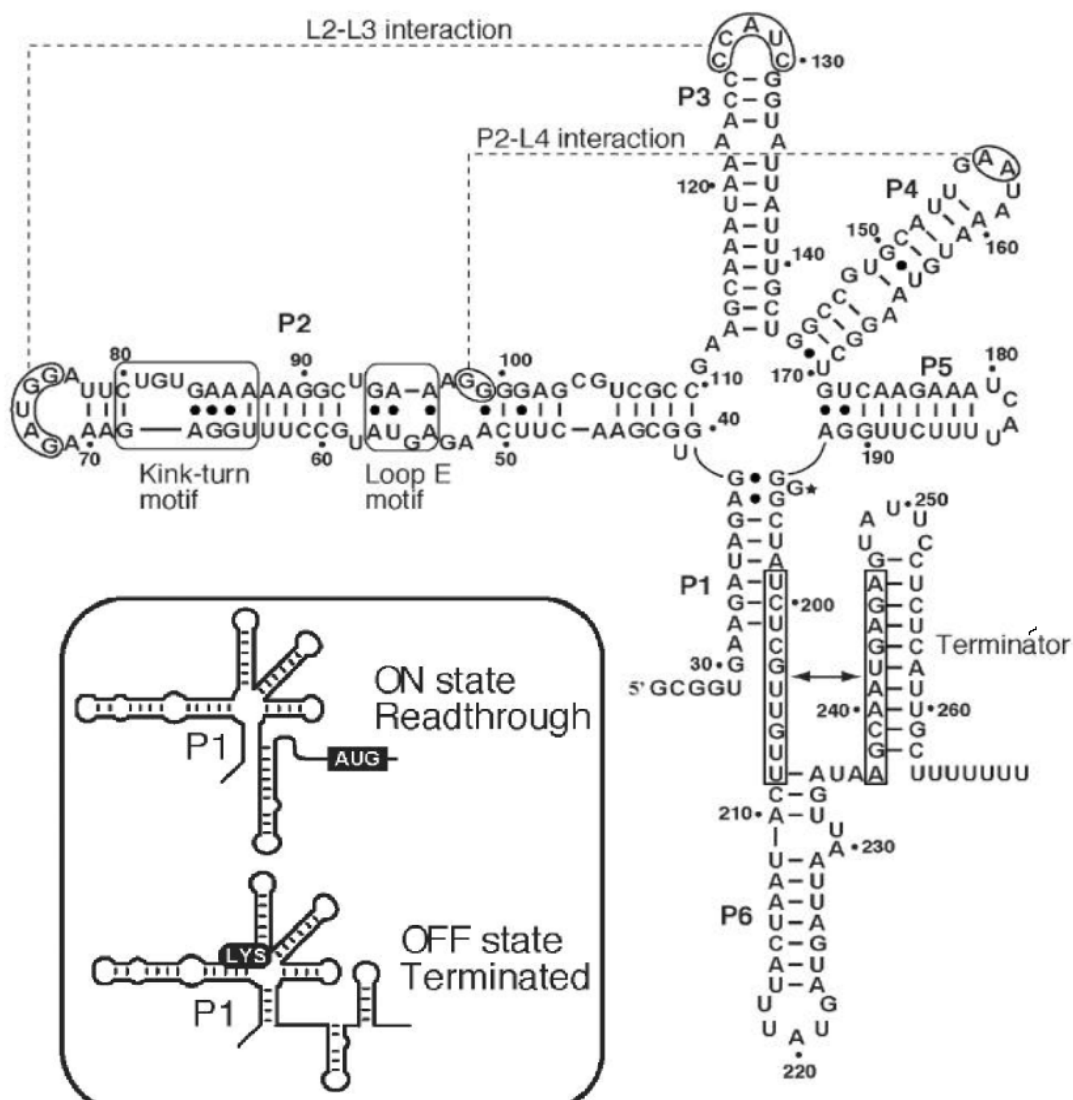
Přepínač pro:	Segment navázání
Lys	P1 , P2, P3, P4, J2/3
FMN	J6/1, J1/2, J2,3, J4/5, J2/3, J5/6, J3/4
SAM-III	P1 , J1/2, J2/4
SAH	J1/2, J4/2
Guanin / Adenin	P1 , J3/1, J1/2, J2/3
c-di-GMP	P1 , J1/2, J3/1, P2, J2/3

Tab. 1 Příklady možných způsobů vazby ligandu na aptamer. Druhý sloupec pak ukazuje struktury mRNA, které se přímo podílejí na vazbě ligandu. P – párované nukleodity (helix), J – joined (napojení), segmenty s vazbou na ligand. (Aboul-ela a kol., 2015).

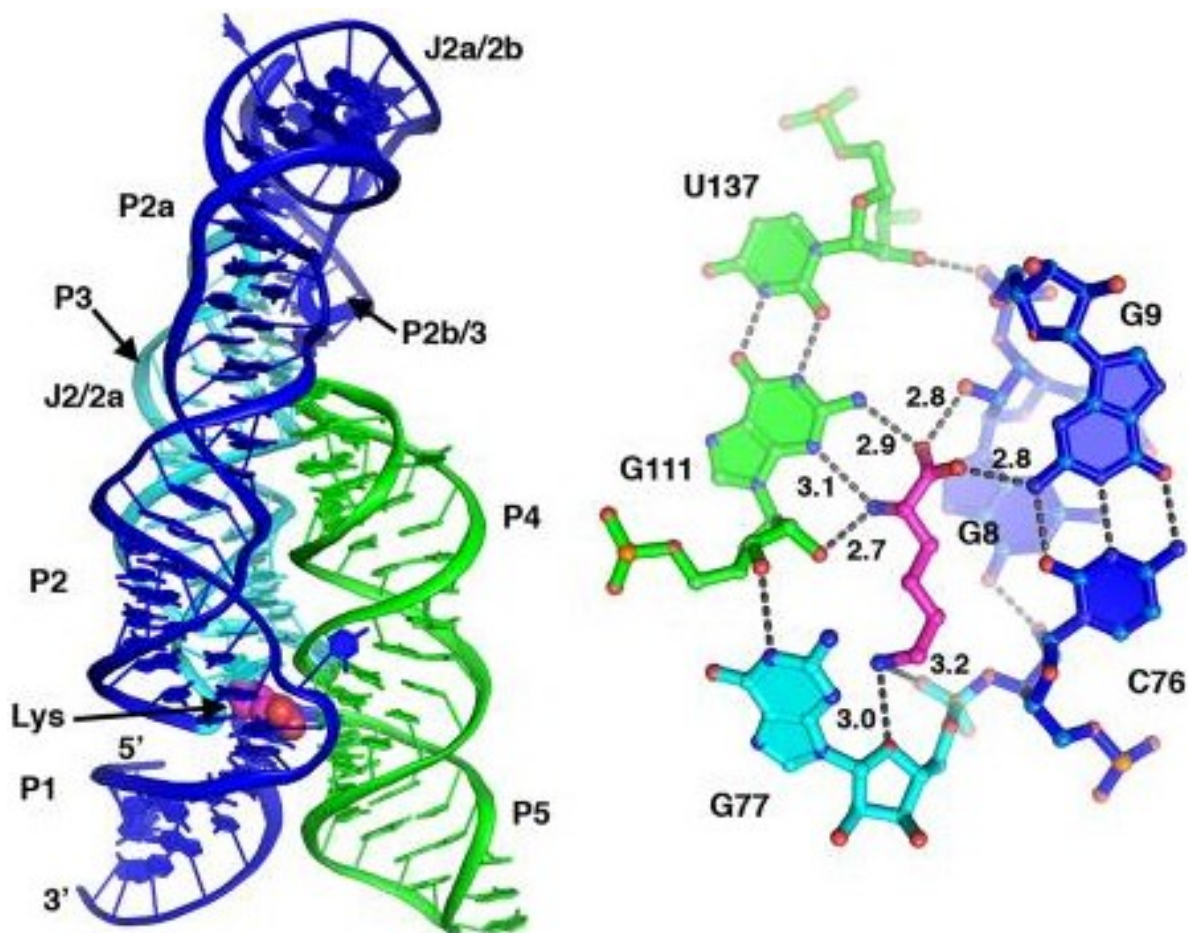
Pro příklad účasti helixu P1 na vazbě ligandu a bližší znázornění účasti helixu P1 v expresní platformě jsem vybral RNA-přepínač pro lysin.

3.1.1 Helix P1: RNA-přepínač pro lysin

RNA-přepínač pro lysin tvoří pět vlásenek, přičemž na vazbě ligandu se podílejí helixy P1, P2, P3 a P4 (obr. 9). V helixu P1 se na vazbě lysinu podílejí G8 a G9. Tyto báze váží lysin pomocí vodíkových můstků mezi jeho karboxylovou skupinou a aminoskupinou guaninu G9 a OH-skupinou na ribóze guanosinu G8. (Garst a kol., 2008). Obr. 9 ukazuje, jak 3' oblast na helixu P1 zasahuje do expresní platformy. Expresní platforma pak v případě navázání lysinu brání přístupu ribosomu, což zamezuje iniciaci translace (Blouin a kol., 2011)



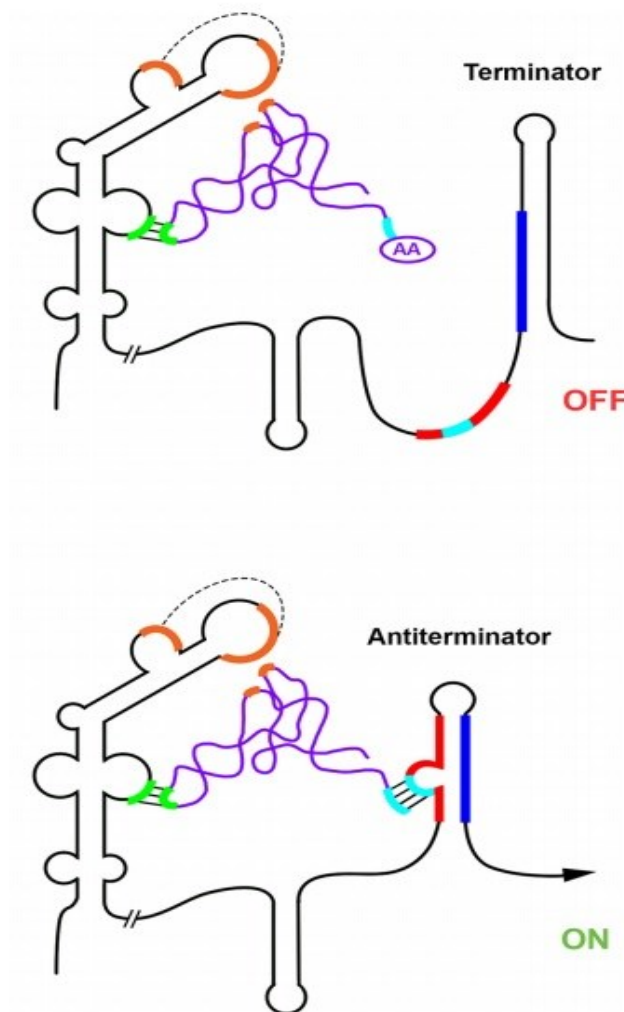
Obrázek 8: Sekundární struktura RNA-přepínače pro lysin. Vlevo dole je znázorněn rozdíl ve strukturách bez přítomného lysinu a s ním. Je přímo znázorněna interakce helixu P1 s expresní platformou, která v přítomnosti lysinu zaujímá konformaci „vypnuto“. Velké schéma nahoře a vpravo potom ukazuje detailnější pohled na párování v RNA-přepínači. V helixu P1 jsou šipkou znázorněny dvě sekvence, které se na sebe v nepřítomnosti lysinu váží a tvoří tak antiterminátorovou vlásenku, která dovoluje expresi skrze obnažení AUG místa, kde začíná translace. (Blouin a kol., 2011)



Obrázek 10: Krystalograficky zjištěná struktura RNA-přepínače pro lysin. Vlevo je celý aptamer a vpravo způsob navázání lysinu (růžově) na báze v RNA-přepínači. Modrou barvou jsou označeny helixy P1 a P2, bleděmodrou je označen helix P3 a helixy P4 a P5 jsou označeny světlezelenou. V levém znázornění je lysin červeně. Vpravo jsou přerušovanou čarou znázorněny vodíkové interakce mezi molekulami. U interakcí mezi bázemi a lysinem jsou potom vyznačeny vzdálenosti vodíkových můstků (v Ångströmech) (Garst a kol., 2008).

3.2 RNA-přepínač T-box

Pěkný příklad mechanismu ovlivňování expresních platform je vidět u nezvyklého RNA-přepínače, zvaného „T-box“ (Kreuzer a Henkin, 2018). Tento RNA-přepínač váže molekulu tRNA a rozlišuje, je-li tRNA nabitá nebo ne, tedy jestli má na svém 3' konci navázanou aminokyselinu. RNA-přepínač rozeznává některé specifické úseky na tRNA, mezi nimiž je i antikodonová sekvence. Stejně jako



Obrázek 91: Schéma struktury a mechanismu RNA-přepínače T-box. Fialově je vyznačena molekula tRNA, (AA) značí aminokyselinu připojenou k tRNA, černě molekula mRNA, zeleně sekvence antikodonu a "kodonu" na RNA-přepínači. Oranžově jsou další kontakty mezi mRNA a tRNA, tyrkysově kontakt sekvencí 3' konce tRNA a antiterminátorumodře a červeně pozice daného úseku na terminátorové/antiterminátorové smyčce. Tento úsek je pro lepší znázornění změny konformace po navázání 3' konce tRNA na antiterminátorovou sekvenci (Kreuzer a Henkin, 2018).

v případě nasedání tRNA na mRNA v E-místě ribosomu je právě antikodon důležitým rozeznávacím znakem mezi jednotlivými tRNA. Další místo navázání tRNA je na jejím 3' konci. Volným 3' koncem se tRNA váže do oblasti, která souvisí s antiterminátorovou smyčkou. Vazba stabilizuje tvorbu této smyčky. Je-li tedy tRNA nabitá, tato vazba je blokována a vytvoří se alternativní konformace - terminátorová smyčka. Je charakteristické, že mRNA T-boxů v bakteriích obsahují operony pro aminoacyl-tRNA synthasy. Signálem pro regulaci tedy není koncentrace tRNA nebo odpovídající aminokyseliny, ale přímo hladina aminoacyl-tRNA. Je znám například T-box z *Bacillus subtilis*, regulující pomocí tvorby terminátorové smyčky expresi operonu *GLYQS*. Tento operon je zodpovědný za syntézu glycyl-tRNA synthasy (Caserta a kol., 2015). RNA-přepínače typu T-box regulují nejen geny pro syntézu aminoacyl tRNA, ale vyskytují se i v jiných genech, které nějak souvisejí s metabolismem aminokyselin.

3.3 Termosenzitivní RNA: RNAT

Termosenzitivní RNA regulují expresi na základě konformačních změn vyvolaných teplotou prostředí, proto se pro tyto elementy vžil název RNA teploměry (RNAT). RNAT jsou relativně přesné; dokáží reagovat na změny teploty kolem 1 °C (Kortmann a Narberhaus, 2012). Kortmann a Neberhaus rozděluje RNAT na dvě skupiny. Na tzv. *zipy* (anglicky „zippers“) a *přepínače* („switches“). U zipů teplota způsobuje postupné tání a rozvolňování („rozepínání“ na způsob zipu) struktur RNA, což při vyšší teplotě (větším „rozepnutí“ zipu) způsobuje částečné, nebo úplné rozvolnění. Zipy tedy mohou aktivovat expresi ve vyšší teplotě a inhibovat ji v teplotě nižší. Oproti tomu pak stojí termosenzitivní RNA-přepínače. To jsou molekuly, které mají různé struktury v různých teplotách. Pro jednu teplotu pak odpovídá jedna struktura, pro druhou teplotu struktura druhá, tyto dva stavy potom mohou mít odlišný dopad na expresi. RNAT byly objeveny nejdříve u bakterie *Yersinia pestis*, kde RNAT element kontroluje expresi genu *LCRF*. U tohoto RNAT se se snížením teploty vytvořila vlásenka, která zabránila ribosomu v nasednutí na sekvenci Shine-Dalgarno (místo na mRNA tvořené bázemi 5'AGGA3'), což inhibovalo následnou translaci. Po zvýšení teploty se párování v mRNA změnilo a ribozom mohl nasedat (Hoe a Goguen, 1993). Podobný případ je u bakterie *Listeria monocytogenes*, kde RNAT reguluje gen *PRF_a*, který se účastní tvorby virulenčních faktorů. Pokud je bakterie v prostředí s teplotou nižší než 37 °C, translace je částečně inhibována tvorbou struktury RNA, která nedovoluje nasednutí ribozomu. Po změně teploty na 37 °C ale ihned nastává translace kvůli rozvolnění vlásenky bránící sekvenci Shine-Dalgarno, což dovolí nasednutí ribosomu na mRNA a následnou translaci (Johansson a kol., 2002). RNAT v patogenních bakteriích tak představují elegantní způsob aktivace tvorby virulenčních faktorů pouhou změnou vnějšího prostředí.

3.4 Kinetika RNA-přepínačů

Existují dva způsoby regulace pomocí RNA-přepínačů ve vztahu k času. Jeden je kotranskripční, kdy se regulace provádí už během transkripce, a druhý je post-transkripční, u kterého regulace probíhá na již nasyntetizované mRNA nebo pre-mRNA. RNA-přepínače kotranskripční jsou v podstatě synonymní s transkripčními RNA-přepínači, do post-transkripčních patří translační nebo sestřihové RNA-přepínače.

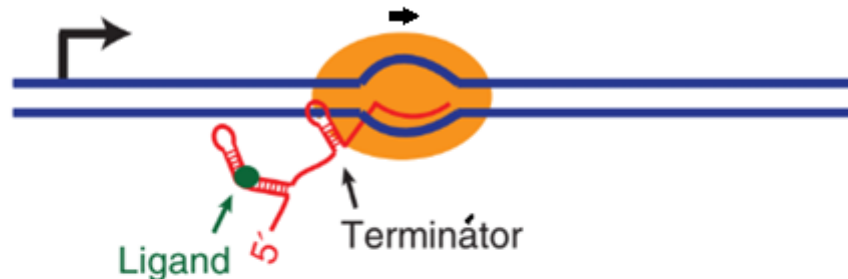
U transkripčních RNA-přepínačů se dá mluvit o kinetickém systému, kdy je funkčnost RNA-přepínače do jisté míry závislá na kinetických a kinetiku ovlivňujících faktorech v buňce. U skupiny post-translačních RNA-přepínačů nezáleží tak výrazně na kinetice, jako spíše na afinitě ligandu („síla“ jeho navázání na aptamer), jeho koncentraci v prostředí nebo na reversibilitě konformace, neboť jsou většinou zcela nasyntetizovány dříve, než se na ně stačí ribosom nebo spliceosom plně navázat.

Při transkripci je výrazně snížena (i když ne úplně znemožněna) možnost reversibility ustanovení konformace RNA-přepínače a záleží na rychlosti navázání ligandu, což je dáno tím, že struktura nascentní mRNA je předem určena konformací dříve nasyntetizovaných úseků RNA. Toto je důležité si uvědomit, neboť struktury nascentní mRNA vznikají postupně a pozdější se odvíjí od předchozí. Proto u kotranskripčních RNA-přepínačů můžeme mluvit o částečné ireversibilitě, tedy nevratnosti změny konformace molekuly RNA-přepínače, přičemž vazba ligandu už předem určuje osud celé molekuly, neboť ligand mění konformaci dříve nasyntetizovaných úseků mRNA. Pro přiblížení: při transkripci se v přítomnosti ligandu nejprve nasyntetizuje jedna struktura v aptamerové oblasti (tedy na 5' konci, který je v transkripci syntetizován jako první), ta naváže již během transkripce ligand a tím znemožní možné odlišné párování této oblasti s jinou, později syntetizovanou oblastí v rámci RNA-přepínače. V nepřítomnosti ligandu by potom párování bylo díky odlišné konformaci aptameru jiné a vedlo by to také k odlišné konformaci celé molekuly mRNA nebo pre-mRNA. Reversibilita a ireversibilita je klíčový faktor pro kinetiku kotranskripčních RNA-přepínačů. Kdyby bylo ustanovení konformace RNA při transkripci výrazněji reversibilnějším jevem, mohlo by to vést ke zpětné změně konformace i v přítomnosti ligandu a RNA-přepínač by tak nefungoval jako dobrý indikátor přítomnosti ligandu v prostředí.

Transkripce je děj v čase, a proto je vztah mezi rychlostí RNA polymeras a rychlostí navázání ligandu důležitý pro správné sbalení celého RNA-přepínače. Kdyby byla RNA polymerasa příliš rychlá, ligand by se na dříve syntetizovaný aptamer RNA-přepínače nestačil navázat, což by vždy vedlo k vytvoření struktury RNA-přepínače „bez ligandu“ a to by fakticky anulovalo funkci RNA-přepínače (Wickiser a kol., 2005). Pro správné fungování transkripčních RNA-přepínačů je tak důležitý například druh RNA polymerasy a její procesivita, charakter okolní DNA, koncentrace dostupných NTP a ostatní chemické

nebo fyzikální faktory ovlivňující rychlost transkripce. Přílišná rychlost transkripce může například způsobit, že se v expresní platformě sice vytvoří terminátorová vlásenka, ale RNA polymeráza je již příliš daleko a terminátorová vlásenka k ní již nedosáhne. Proto nesmí pro správnou funkčnost RNA-přepínače být transkripce příliš rychlá (viz obr. 12; Abou-ela a kol. 2015).

Pomalejší transkripce - terminace probíhá



Rychlejší transkripce - terminace neprobíhá



Obrázek 12: Rozdíl v terminaci transkripce u pomalejší a rychlejší RNA polymerázy v přítomnosti ligandu. Nahoře případ s pomalejší polymerázou, kdy se terminační vlásenka stačí vytvořit, což terminuje transkripci.

Dole případ s rychlou RNA polymerázou. Zde je transkripce příliš rychlá a terminátorová vlásenka vznikne příliš pozdě. Převzato z (Abou-ela a kol. 2015) a upraveno.

Rychlost transkripce je také důležitá pro citlivost aptameru pro ligand, protože čím pomalejší RNA polymerasa je, tím více času má ligand na navázání se na aptamer a tím je RNA-přepínač citlivější pro nižší koncentrace ligandu v buňce, což se odvíjí od delšího intervalu mezi syntézou aptameru a expresní platformy. Aptamer má delší dobu na navázání ligandu, zatímco expresní platforma ještě není vytvořena, zatímco po ustanovení konformace expresní platformy je již rozhodnuto o osudu exprimované mRNA a na vazbě ligandu už většinou nezáleží. Záleží tedy také na hodnotě disociační konstanty (K_D) RNA-přepínače. Příkladem aptameru s nízkou hodnotou K_D (vysokou citlivostí pro ligand) je již zmiňovaný aptamer pro TPP: experimentálně bylo prokázáno, že aptamery RNA-přepínače pro TPP jsou responsivní pro pikomolární koncentrace ligandu v buňce, což může za určitých podmínek znamenat jedinou molekulu ligandu na celou buňku. Příkladem jsou aptamery vázající TPP z *Bacillus anthracis*, které jsou schopny účinně vázat ligand a reagovat na jeho v přítomnost v koncentracích až 210 pM až 850 pM podle typu aptameru (Breaker, 2012; Welz a Breaker, 2007). Změna K_D , například v rámci evoluce nebo uměle vytvářených RNA-přepínačů, se nicméně může využívat, aby byl RNA-

přepínač responzivní pro dostatečnou koncentraci ligandu. Expresní platformy a způsoby regulace exprese pomocí RNA-přepínačů

RNA-přepínače využívají různé způsoby regulace exprese. Vazba ligandu způsobuje konformační změnu skrze změny Watson-Crickovského párování mezi bázemi na molekule mRNA a ta potom vyústí v expozici expresní platformy. Následující kapitola bude pojednávat o mechanismech regulace exprese pomocí expresních platforem.

3.5 Regulace na úrovni transkripce

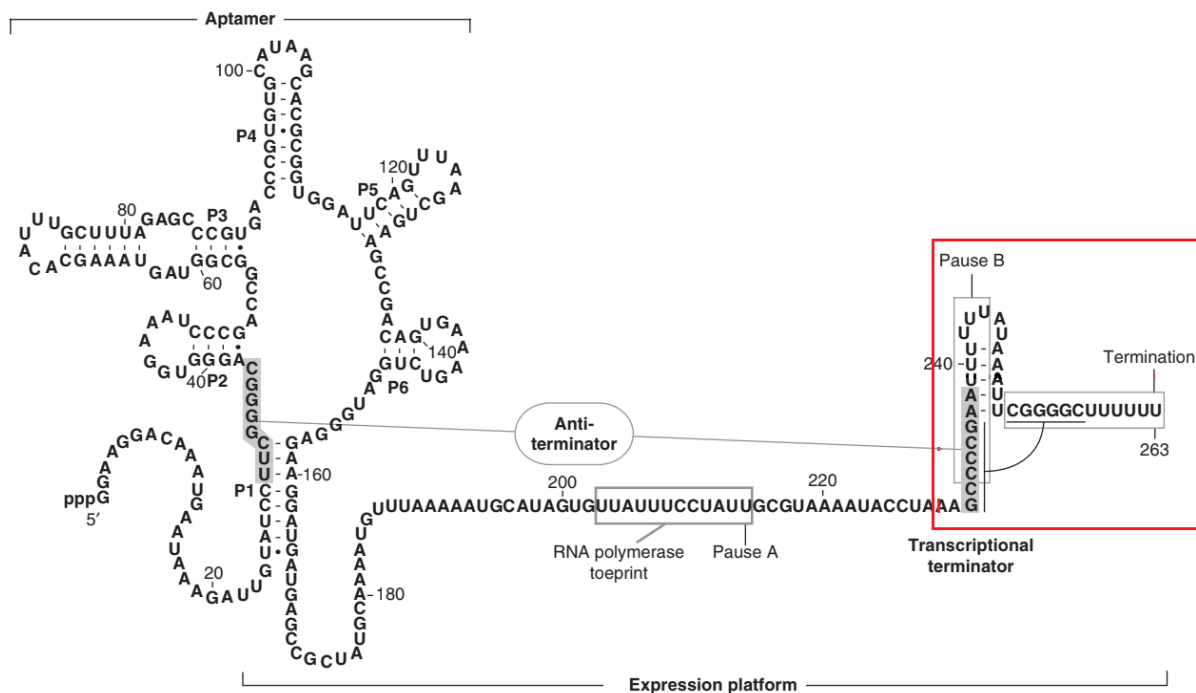
Prvním objeveným způsobem regulace exprese genů pomocí RNA-přepínačů je regulace na úrovni transkripce; hned v prvních pracích zabývající se RNA-přepínači výzkumníci nastínili mechanismus jejich účinku (Winkler a kol., 2002). Bylo ukázáno, že se po navázání ligandu na aptamer tvoří terminatorová či antiterminátorová smyčka, která ihned způsobuje terminaci transkripce (Mironov a kol., 2002; Rodionov a kol., 2002). Terminaci transkripce rozdělujeme na tzv. *vnitřní* (přeloženo z anglického *intrinsic*) a *Rho-zprostředkovanou*. V prvním případě terminuje RNA-přepínač transkripci takzvaně „sám o sobě“, kdežto v případě druhém mRNA rekrutuje RNA-dependentní helicázu Rho.

3.5.1 Vnitřní terminace

Vnitřní terminace transkripce je jeden z nejrozšířenějších způsobů regulace exprese RNA-přepínači. Je to terminace transkripce pomocí tvorby RNA struktur, které jsou schopny „samy o sobě“ transkripci ukončit. V průběhu transkripce vytváří nascentní RNA vlásenku v sousedství RNA polymerasy, jejíž formace způsobí terminaci transkripce. Tato vlásenka, která se vyskytuje na konci operonů u bakterií a je tvořena silnými G-C páry, je v 3' směru následována sekvencí několika uridinů (viz obr. 13) (Breaker, 2012). Tvorba vlásenky bohaté na G-C páry způsobí destabilizaci transkripčního elongačního komplexu (komplexu DNA, RNA a RNAPolIII; TEC) a jeho následnou disociaci. Vlásenka se utvoří v momentu, kdy RNA polymeráza syntetizuje v terminačním místě na DNA, které je bohaté na A-T páry. Vzniknuvší segment RNA má vazbu na DNA templát slabší, to díky slabší interakci U-A. Interakce U-A je totiž tvořena jen dvěma vodíkovými můstky, zatímco interakce G-C třemi, vlákna s mnoha U-A páry je proto také lépe rozvolnitelná. Klíčové pro úspěšné provedení terminace je právě syntéza bází uracilů, neboť RNAPolIII v sekvencích, kde syntetizuje mnoho uracilů za sebou „prokluzuje“ na nepřítis členitým templátovém vláknu s dlouhou sekvencí adeninů, vrací se a zastavuje se. Tím se získává čas pro utvoření vlásenky bohaté na G-C páry. Poly-U sekvence také pomůže vyvázání RNA z TEC. (Gusarov a Nudler, 1999). Samotný mechanismus, jakým G-C bohatá vlásenka destabilizuje TEC je stále nevyřešený. Nicméně existují dva modely, které tuto otázku mohou zodpovědět. Jeden model říká, že tvorba vlásenky „trhne“ RNAPolIII dopředu, takže se nascentní mRNA v jejím katalytickém místě už

nenachází ve správné pozici. Protože už nemůže dále syntetizovat, destabilizuje a uvolní se z DNA (Santangelo a Roberts, 2004). Druhý, tzv. alosterický model, pracuje s představou, že vlásenka bohatá na G-C vazby se vytvoří velmi blízko u kanálu RNAPolIII, ze kterého vychází nascentní mRNA, načež vlásenka stimuluje konformační změny v samotné RNAPolIII. To potom vede k terminaci transkripce (Epshtein a kol., 2007).

Úloha RNA-přepínačů v tomto mechanismu terminace je potom nasnadě. Protože se aptamerová oblast RNA-přepínače nachází na 5' konci molekuly mRNA a terminační místo na 3' konci, může se ligand na aptamer navázat kdykoliv před syntézou terminační sekvence. Přítomnost nebo nepřítomnost navázaného ligandu potom dovoluje nebo naopak nedovoluje vytvoření vlásenky bohaté na G-C páry. To potom může vést k terminaci.



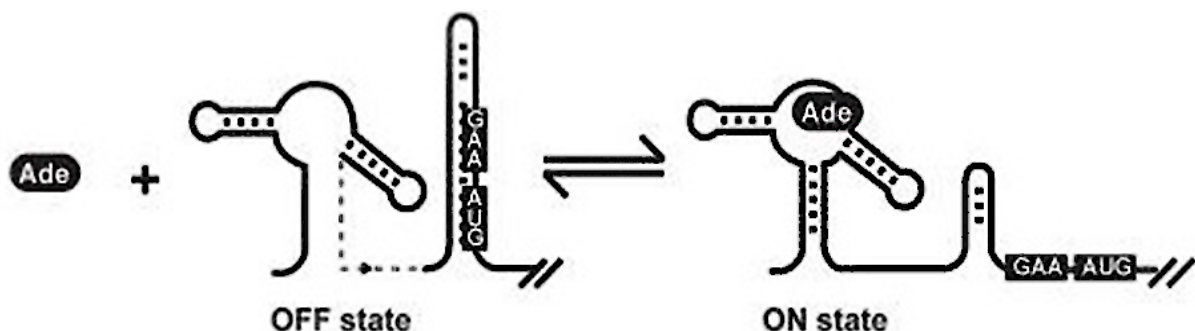
Obrázek 13: RNA-přepínač pro FMN u genu *RIBd* bakterie *Bacillus subtilis*. Vpravo je červeným obdélníkem vyznačena oblast pro potenciální párování pro vlásenku bohatou na G-C. Na obrázku nepárující; oblasti tvořící terminační vlásenku jsou propojeny obloučkem. Na konci RNA-přepínače jsou vidět dvě poly-U místa: jedno, označeno jako „pause B“, druhé, označené jako „termination“.
(Breaker a kol. 2012)

3.5.2 Terminace transkripce pomocí Rho-faktoru

Molekula mRNA genu *MGTa* („magnesium transporter ATPase“), zodpovědného u *Salmonella enterica* za syntézu přenašeče pro Mg^{2+} ionty, obsahuje v 5' oblasti RNA-přepínač s aptamerem. Tento aptamer váže Mg^{2+} iont, po jehož navázání se exponuje expresní platforma bohatá na cytosin, což je oblast specifická pro navázání Rho-faktoru (Hollands a kol., 2012). Rho-faktor je hexamerní ATPasa se dvěma vazebnými místy s polootevřenou strukturou ve tvaru písmene C. Jedno vazebné místo slouží k rozpoznání cílové mRNA, druhé je potom nutné pro samotný pohyb na mRNA. Rho helikasu si lze představit jako kleště, které objímají mRNA, přičemž obě její vazebná místa směřují dovnitř, do středu sevření, kde se v momentu navázání nachází právě mRNA (Skordalakes a Berger, 2003). Rho helikasa se pomocí hydrolýzy ATP pohybuje od 5' ke 3' konci molekuly, tedy směrem k RNAPolIII, kterou po kontaktu s ní disociuje od DNA - tím se terminuje transkripce. Rychlost transkripce je nicméně větší než rychlost pohybu helikasy, což představuje problém: Rho helikasa by nestačila RNAPolIII „dohonit“. Proto je i v tomto příkladě směrem ke 3' konci od sekvence RNA-přepínače místo se specifickým složením bází (což je u genů využívajících regulaci transkripce pomocí rho-faktoru běžné). V tomto specifickém místě RNAPolIII prokluzuje a vytvoří tak čas pro rho helikasu, aby RNAPolIII dostihla a stačila transkripci ukončit. Prokluzování RNAPolIII se děje kolem cytosinu na pozici 220, což je také v odborné literatuře označeno jako rho-dependentní terminační místo pro gen *MGTa*. Podobný příklad jako u *Salmonella* nacházíme také u *Escherichia coli* v genu *RIBb*, kde je přítomen RNA-přepínač pro FMN (Hollands a kol., 2012).

3.6 Regulace na úrovni translace

RNA-přepínače pro adenin/guanin se liší u *Bacillus subtilis* a *Vibrio vulnificus*. *Bacillus subtilis* využívá navázání ligandu pro tvorbu vlásenky, která terminuje transkripci. Je to tedy tzv. transkripční RNA-přepínač. U *Vibrio vulnificus* tento RNA-přepínač reguluje translaci. To znamená, že RNA-přepínač po



Obrázek 14: Schématické zobrazení změny konformace translačního add RNA-přepínače u *Vibrio vulnificus*. Pozorujeme zde přidání ligandu k aptameru (nalevo) a následnou změnu konformace oddělovače. Po navázání ligandu (napravo) se odkryje sekvence Shine-Dalgarno (GAA) a start-kodón (AUG) a může dojít k translaci (Lemay a kol., 2011).

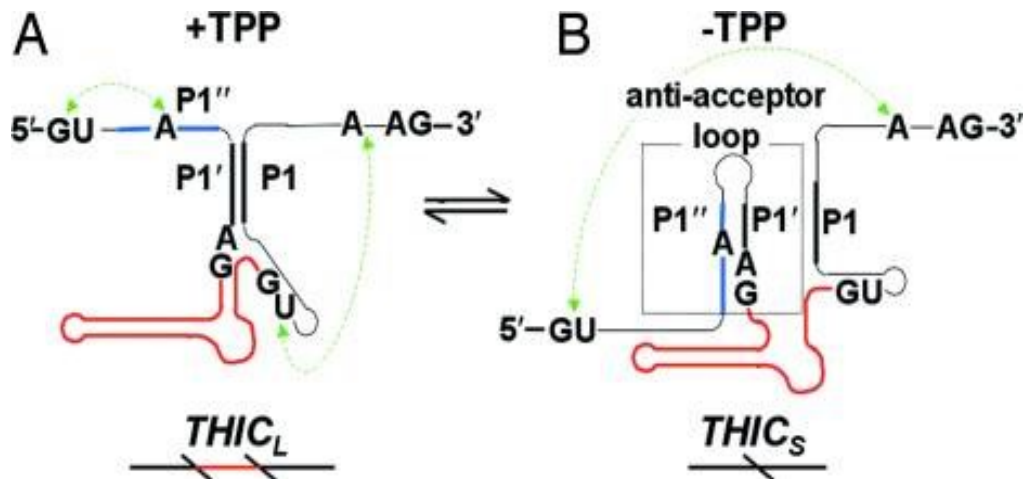
navázání ligandu zaujme konformaci, která skryje nebo odkryje sekvenci Shine-Dalgarno nebo start-kodón AUG. U *Vibrio vulnificus* se vyskytuje RNA-přepínač, který funguje právě skrze zakrytí Shine-Dalgarno sekvence a start-kodónu (Lemay a kol., 2011) (obr. 14). Pokud není přítomen ligand, sekvence pro navázání ribosomu jsou součástí vlásenky, která se nazývá sekvestrátor. To potom způsobí sníženou afinitu ribosomu k takto sbalené mRNA a exprese genu je snížena. Nutno podotknout, což platí i pro jiné případy, že regulace nikdy není „zapnuto/vypnuto“. RNA-přepínače mají spíše roli v modulaci koncentrací exprimovaných proteinů a navozují změny od jednotek do několika desítek procent. To, že RNA-přepínače nemusí regulovat expresi se stoprocentní účinností je vidět právě u *ADD* genu, kde se ribosom může – byť se sníženou afinitou – stále navázat na mRNA i v nepřítomnosti ligandu.

3.7 Regulace na úrovni sestřihu

Sestřih zahrnuje vystřížení části pre-mRNA buď pomocí složité molekulární mašinerie, která se nazývá spliceosom (u eukaryot), anebo jinými způsoby, například autokatalýzou. Vystřížené části se říká intron, zatímco část pre-mRNA, která je ponechána, se nazývá exon. Intron je potom většinou degradován, přestože se v poslední době ukazuje, že vystřížené introny nemusí být hned degradovány a mohou v organismech plnit role spojené s regulací růstu (Morgan a kol., 2019). Ukázalo se, že u eukaryot se jediný doposud známý eukaryotický RNA-přepínač pro TPP vyskytuje právě v intronové části pre-mRNA (Kubodera a kol., 2003) a že hlavní způsob regulace exprese pomocí RNA-přepínačů v eukaryotech je právě skrze sestřih. Kupříkladu ve vláknité houbě *Neurospora crassa* byl objeven způsob regulace exprese skrze RNA-přepínače spojené se sestřihem u tří genů: *CyPBP37*, *NMT1* a *NCU01977.1*. První dva exprimují geny spojené s metabolismem TPP, funkce třetího je doposud neznámá. RNA-přepínač u těchto genů brání v interakci spliceosomu s adeninem ve větvicím místě (tzv. „branch point A“ nebo BrA) v intronu. Pokud je TPP přítomen, aptamer zaujme konformaci, kterou brání odhalení adeninu ve větvicím místě a nedojde tak k sestřihu (Cheah a kol., 2007). Tento sestřihový RNA-přepínač tedy funguje jako negativní regulátor.

U řas *Chlamydomonas reinhardtii* k regulaci sestřihu pomocí RNA-přepínačů dochází u genů *THIC* a *THI4*, stejně jako u většiny rostlin. Gen *THIC* exprimuje enzym fosfomethylpyrimidin syntasasu, gen *THI4* thiamin-thiazol syntasasu. Pre-mRNA pro gen *THIC* může podléhat sestřihu dvěma způsoby. RNA přepínač pro gen *THIC* je v pre-mRNA umístěn v intronu, který je pro funkční protein třeba vystříhnout. Pokud je přítomen TPP, sestřih se může konat na dvou místech, které ohraničují aptamer. Zmíněná sestřihová místa jsou relativně krátká, a proto se po jejich vystřížení produkuje delší forma genu, která se nazývá *THIC_L* (*THIC-Long*). Tato forma v sobě má stále zahrnutý intron a exprimuje nefunkční protein, jako jsme to viděli u příkladu *Neurospora crassa*. Pokud je ale TPP nepřítomen, konformace pre-mRNA

způsobí zakrytí místa pro sestřih *THIC_L*. Zároveň odkryje sestřihová místa na okrajích celého intronu: G-U na 5' konci a BrA na 3' okrajích celého intronu, ve kterém se RNA-přepínač nachází. Nepřítomnost TPP tak způsobí vystřihnutí celého intronu i s RNA přepínačem a produkuje krátkou sestřiženou formu, nazývanou *THIC_S* (*THIC-Short*), která kóduje funkční fosfomethylpyrimidin synthasu (Croft a kol., 2007). Celý tento mechanismus u *Chlamydomonas reinhardtii* popisuje obr. 15:

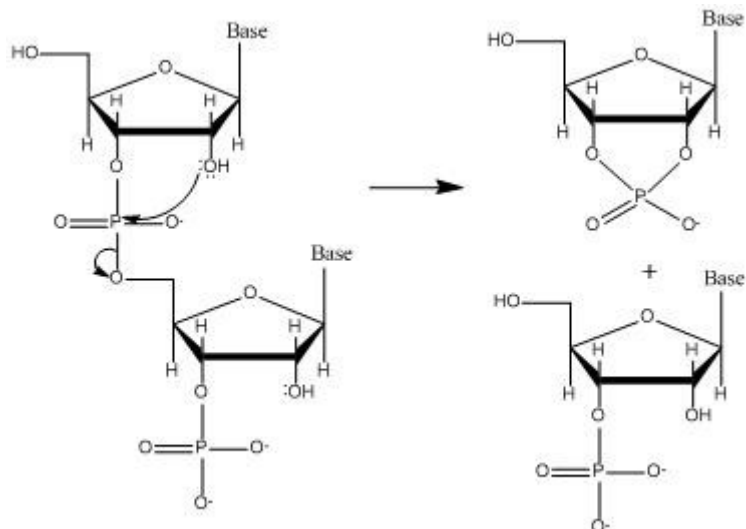


Obrázek 105: Dvě možnosti sestřihu pre-mRNA pro gen *THIC* v závislosti na přítomnosti (vlevo) nebo nepřítomnosti TPP (vpravo). Červeně je RNA-přepínač, zelenými šipkami značena interakce 5' sestřihového místa a BrA. (A) Pre-mRNA v přítomnosti TPP. Jsou odkryta dvě kratší místa, která jsou vystřihována. To dává vzniknout dlouhé formě mRNA, *THIC_L*. (B) Pre-mRNA v nepřítomnosti TPP. Zde je celý intron společně s RNA přepínačem vystřihován (Croft a kol., 2007).

3.8 Regulace na úrovni degradace: ribozymy

Objev ribozymů byl překvapující (Cech, 1989). V době jejich objevu sloužila RNA jen jako molekula uchováající nebo přenášející genetickou informaci. S objevem ribozymů ale molekula získala další „dimenzi“; výzkumníci zjistili, že RNA dokáže katalyzovat chemické reakce, podobně jako v organismech dominantní proteinové enzymy. Tak vznikl název ribozym, sloučením částí slov ,**ribonukleový**‘ a ,**enzym**‘. Tento objev způsobil ve své době senzaci, za objev byla udělena i Nobelova cena za chemii za rok 1989 (“List of Nobel laureates,” 2020). Pro nás jsou ribozymy taktéž zajímavé, protože katalytických schopností molekuly RNA využívají také některé RNA přepínače.

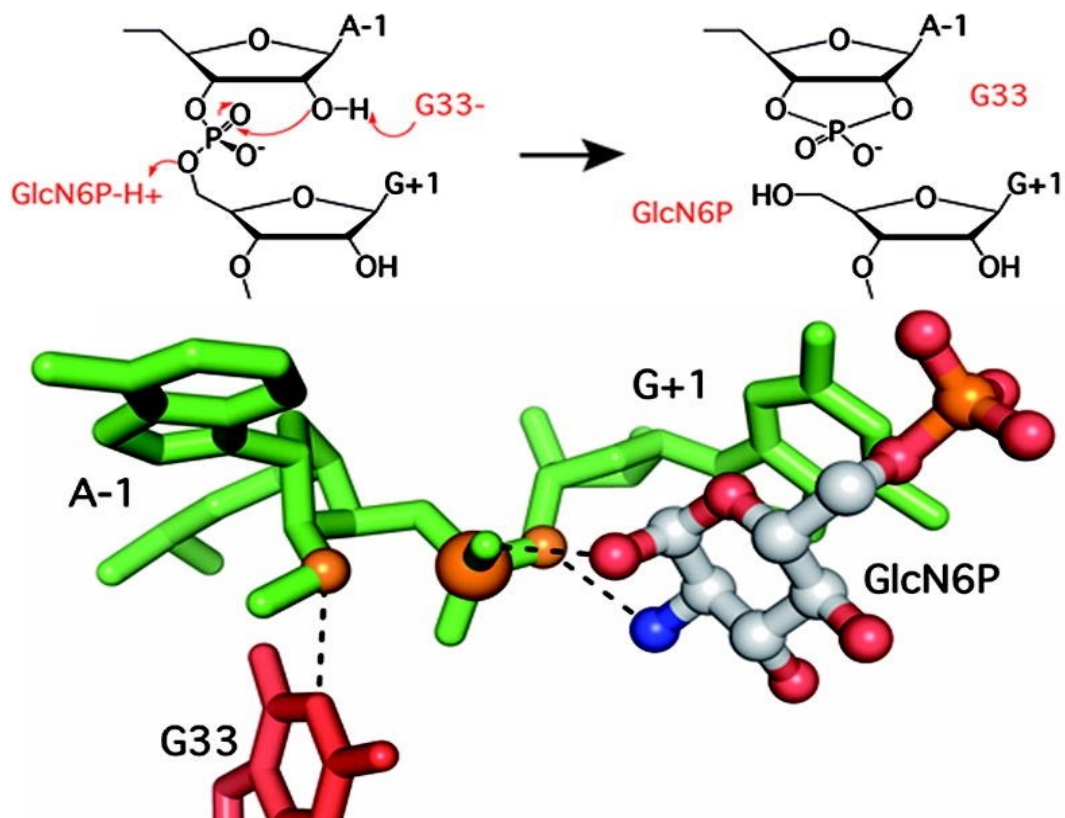
Ribozymy v nejširším slova smyslu jsou všechny molekuly RNA, které katalyzují reakce. Do kategorie ribozymů tak spadá například snRNA ze spliceosomu, rRNA, která katalyzuje transpeptidylaci v ribosomu nebo řada autokatalytických intronů tříd I a II (Walter a Engelke, 2002 tabulka č. 1.). V užším slova smyslu jsou ale ribozymy molekuly RNA, které mohou podstoupit autokatalýzu, tedy reakci, kdy



Obrázek 16: Transesterifikace uvnitř molekuly RNA (Tmlew 2008).

molekula RNA naštěpí sebe sama. Do této kategorie spadá například slavný „hammerhead“ ribozym, vlásenkový (hairpin) ribozym a některé viroidní a virusoidní elementy, stejně jako i RNA-přepínače probírané v této kapitole. Autokatalytické ribozymy pomocí 2'-3' transesterifikace na molekule ribózy přeruší strukturu cukr-fosfátové kostry řetězce RNA a tím se rozštěpí. Reakce spočívá v nukleofilním ataku kyslíku na místě 2' na fosfát navázaný na poloze 3' ribózy (nebo na jiný fosfát v okolí), což vede k narušení cukr-fosfátové kostry a vytvoření cyklického fosfátu (obr 16, zdroj: (Tmlew, 2008). Výjimečnost autokatalytických ribozymů spočívá v tom, že tuto transesterifikaci pomocí specifické konformace provedou vždy na specifickém místě v RNA řetězci (Walter a Engelke, 2002). Ribozymy ale nemusí být jen autokatalytické, mohou mimo jiné katalyzovat například i rozštěpení jiných RNA řetězců.

Jak již bylo řečeno, existují i ribozymové RNA-přepínače. V mRNA pro enzym GlcN6P synthasu u *Bacillus anthracis* se nachází přepínač, který váže glukosamin-6-fosfát (GlcN6P). GlcN6P synthasa katalyzuje reakci, při níž fruktosa-6-fosfát a glutamin vytvoří GlcN6P. Ukázalo se, že tento „přepínač“ není přepínačem v pravém slova smyslu, protože po navázání ligandu nemění svou konformaci, tedy „nepřepíná“, ale po navázání ligandu dojde k autokatalýze a následné degradaci mRNA. (Cochrane a kol., 2007). Ligand sám je tak spíše jakýmsi kofaktorem, jehož přítomnost usnadňuje autokatalýzu. K transesterifikační reakci a rozštěpení mRNA tak dojde jen díky samotné přítomnosti GlcN6P. Detaily reakce ukazuje obr. 17 (Cochrane a kol., 2007).



Obrázek 17:

Nahoře: Transesterifikační reakce a následné rozštěpení řetězce RNA pomocí GlcN6P v ribozymu genu *GLNS*.

Dole: Počítačový 3D model aktivního místa v molekule mRNA s navázaným GlcN6P. Zeleně a červeně je RNA. Velká oranžová kulička na RNA je fosfor. Malé oranžové kuličky na RNA jsou atomy kyslíku. Na GlcN6P je bílé uhlík, červeně kyslík, oranžově fosfor, modře dusík (Cochrane a kol., 2007).

3.9 Duální regulace

U *Escherichia coli* byl nalezen způsob duální regulace na základě RNA-přepínačů (Caron a kol., 2012), který se vyskytuje u genu *LYSC*. RNA-přepínač pro *LYSC* u *Bacillus subtilis* je transkripční, u *Escherichia coli* je ale přepínačem translačním. Gen produkuje enzym aspartokinasu, která přenáší fosfátovou skupinu z ATP na L-aspartát. Produktem této reakce je potom ADP a 4-fosfo-L-aspartát, což je druhý meziprodukt metabolické dráhy pro L-lysin a mimo jiné také jeden z meziproduktů tvorby L-threoninu. Po transaminační reakci, kdy je oxalacetát konvertován na aspartát, je fosforylace aspartátu druhou reakcí této dráhy (Bassalo a kol., 2018). Regulace této reakce je zprostředkována RNA-přepínačem, přítomným na mRNA pro enzym aspartokinasu. V přítomnosti lysinu, který se na mRNA naváže, se vytvoří sekvestrátor a ten zabráni přístupu ribosomu do místa pro nasednutí ribosomu („ribosome binding site“ – RBS), enzym tedy není v přítomnosti lysinu z mRNA translatován do proteinu. Mechanismus inhibice translace je ale jen jeden způsob regulace genu *LYSC*.

Druhý způsob je regulace pomocí degradace mRNA. mRNA pro *LYSC* má oproti všem ostatním mRNA velmi krátkou životnost. Ta je způsobena tím, že je-li na přepínači na mRNA genu *LYSC* navázán lysin, změní se konformace přepínače, což zpřístupní segment pro nasednutí a aktivaci RNasy E, enzym degradující RNA. V přítomnosti lysinu je tak mRNA degradována RNasou E a tím dochází k negativní zpětné vazbě, stejně jako v případě regulace translační (Caron a kol., 2012). Vztah těchto dvou regulačních mechanismů je tedy podobný logickému hradlu NOR, kdy ani jeden vstupní logický člen nemůže být pozitivní, aby byl výsledek logické operace pozitivní. Jeden vstup je zde představován inhibicí translace, druhý potom degradací mRNA. Výsledkem logické operace je exprese genu. Je-li tedy alespoň jeden z mechanismů regulace genu *LYSC* aktivní (tedy buď inhibující translaci nebo degradační), k expresi nedojde. Naopak nemůže být aktivní ani jeden, aby k expresi došlo – tím se zajistí větší účinnost RNA-přepínače.

4 RNA-přepínače v eukaryotech

Jediný dosud popsáný „kanonický“ RNA-přepínač v eukaryotech je přepínač pro TPP, což bylo také důvodem pro zvolení popisu jeho struktury v této práci. Oproti bakteriím, kde RNA-přepínače plní celou řadu funkcí se potom může zdát, že v eukaryotech se jedná jen o velmi okrajový způsob regulace, nicméně se vyskytují v celé řadě organismů: od hub, kvasinky nevyjímaje, přes mořský fytoplankton až po rostlinnou říši. Kromě RNA-přepínačů *sensu stricto* pak v eukaryotech fungují RNA struktury, které mění konformace v závislosti na interakcích s proteiny či jinými RNA a které prostřednictvím těchto změn rovněž ovlivňují buněčné procesy.

4.1 Houby

Hlavní část výzkumu eukaryotických RNA-přepínačů se dnes provádí na houbách, především proto, že jsou oproti rostlinám a řasám snáze kultivovatelné. Houby, stejně jako ostatní eukaryota, mají RNA-přepínače pro TPP v genech pro jeho biosyntézu (geny *thi4* a *nmt1*) a také pro transport močoviny (Li a Breaker, 2013). Stejně jako u jiných eukaryot fungují houbové RNA-přepínače skrze sestřih. Mnohé byly objeveny u *Ascomycota*, nicméně několik málo jich bylo objeveno i *Oomycota* (Mukherjee a kol., 2018) - v kladogramu (obr. 18) vidíme přítomnost RNA-přepínačů pro TPP u různých tříd, rodů a druhů u *Ascomycota*. Je dobře vidět, že RNA-přepínače jsou oproti ostatním třídám jen velmi roztroušeně přítomné u kvasinek, jak u třídy *Saccharomycetes*, tak u *Schizosaccharomycetes*, mezi kterými jsou organismy, které jsou rozšířenými eukaryotickými modelovými organismy.

Gen *thi4* u hub kóduje thiamin-thiazol synthasu. Ta se podílí ve tvorbě thiazolu, látky, která je prekurzorem pro tvorbu thiaminu, který je potom fosforylován na TPP; v tomto případě se tedy jedná o přímou regulaci metabolismu. Thiamin thiazol synthasa syntetizuje adenosin difosfát 5-(2-hydroxyethyl)-4-methylthiazol-2-karboxylovou kyselinu (ADT), což je meziproduct, který v dalších reakcích vede ke thiazolu (Chatterjee a kol., 2007). Gen *nmt1* („no message in thiamine“) je další houbový gen, ve kterém se vyskytuje RNA-přepínač. Tento gen se také nazývá *THI3* a enzym který exprimuje má pravděpodobně funkci v syntéze dalších dvou prekurzorů pro thiamin: 2-methyl-4-amino-5-hydroxymethylpyrimidinu a thiamin monofosfátu (TMP) (Nishimura a kol., 1992; Rapala-Kozik a kol., 2007).



Obrázek 118: Distribuce RNA-přepínačů pro TPP v oddělení Ascomycota. Jednotlivé třídy jsou barevně odlišeny: žlutě jsou *pneumocystidomycetes*, zeleně *schizosaccharomycetes*, růžově *saccharomycetes*, fialově *sordariomycetes*, tmavě modře *leotiomycetes*, tyrkysově *eurotiomycetes* a bleděmodře *dothiomycetes*.

U každého druhu je potom barevným kruhem nebo čtverečkem znázorněna přítomnost přepínače pro daný gen. Vyplněné piktogramy značí přítomnost jak genu, tak i RNA-přepínače, zatímco nevyplněné značí přítomnost genu a nepřítomnost přepínače. Pokud kolečko či čtvereček chybí, gen není v organismu přítomen. Karmínové kolečko značí RNA-přepínač pro gen *THI4*, zelené kolečko pro *NMT1* a černý čtvereček značí RNA-přepínače pro transportérové geny. Graf je převzat z (Mukherjee a kol, 2018)

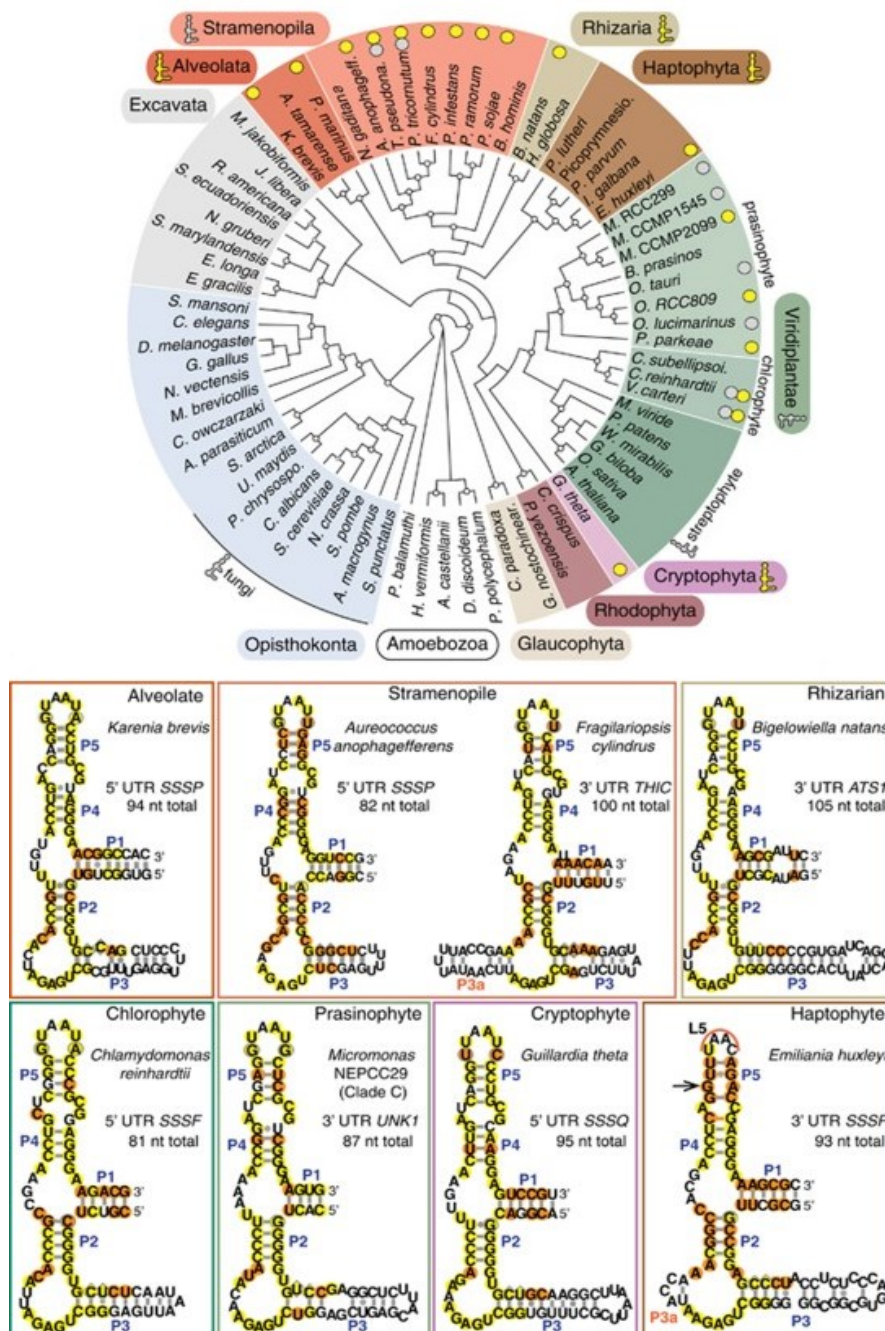
4.2 Rostliny

Hlavní část molekulárně biologického výzkumu na rostlinách se provádí na modelovém organismu *Arabidopsis thaliana*; i zde byl nalezen RNA-přepínač pro TPP. Nicméně se zdá, že RNA-přepínač pro TPP je u *Viridiplantae* široce rozšířen. Je u nich jak sekvenčně, strukturně, tak i funkčně konzervován. Na rozdíl od všech nám známých RNA-přepínačů, které se nacházejí v 5' UTR genu se RNA-přepínače u rostlin nacházejí primárně ve 3' UTR na mRNA. RNA-přepínač se u rostlin nachází hlavně v genu *THIC*. Sám přepínač se potom většinou nachází v druhém intronu (int2) od 5' konce tohoto genu. Stejně jako u ostatních eukaryotních RNA-přepínačů pro TPP je přepínač v genu *THIC* sestřihový. Regulační mechanismus funguje skrze alternativní sestřih, kdy různě sestřižené formy mRNA na základě navázání ligandu produkují v translaci buď funkční nebo nefunkční proteiny, což jsem nastínil v kapitole „Regulace na úrovni sestřihu“. Rostlinný přepínač v genu *THIC* funguje tak, že navázání TPP znamená správné vystřižení intronu int2; navázání TPP totiž způsobuje odkrytí 3' sestřihového místa na intronu, které je v nepřítomnosti TPP zakryto a nedovoluje tak správnému nasednutí spliceosomu. Pokud TPP není přítomen, sestřih sice stále probíhá, ale na jiném 3' sestřihovém místě (Bocobza a Aharoni, 2014).

4.3 Ostatní eukaryotické říše

Do této skupiny zahrnuji veškeré eukaryotické organismy s nalezenými RNA-přepínači, které nepatří do taxonu *Plantae* nebo *Fungi*, což jsou v tomto případě většinou organismy z taxonomické skupiny *Chromista*, tedy například *Stramenopila*, *Haptophyta*, *Cryptophyta* nebo *Alveolata*. U všech těchto skupin byly nalezeny RNA přepínače u genů nějak spojených s metabolismem TPP. U *Haptophyta* se vyskytují v jednom, zato ale ekologicky nejvýznamnějším organismu, kokolitce *Emiliana Huxleyi*. U *Alveolata* stojí za zmínku *Karenia brevis*, obrněnka, která se vyskytuje převážně v Mexickém zálivu. Produkují také pro tento rod specifické brevetoxiny, neurotoxiny, které u člověka vyvolávají nevolnost a zvracení. Dalším příkladem *Alveolata* je *Perkinsus marinus*, ekonomicky významný parazit ústřic. Dalším ekonomicky i historicky významným příkladem ze *Stramenopila* je potom *Phytophthora infestans*, neboli plíseň bramborová, která ve vlhkém prostředí napadá hospodářsky významné lilkovité plodiny, například rajčata nebo brambory (tato plíseň se dostala i do historie, neboť společně s vlhkým obdobím stála za tzv. Velkým hladomorem v Irsku (Gráda, 1992)). Tyto RNA-přepínače jsou buď přepínače pro TPP a mRNA na kterých se vyskytují potom nesou geny pro syntézu komponent dráhy pro syntézu thiaminu, nebo je funkce jejich produktu neznámá. Většinou je ale spojena s thiaminem. U *Stramenopila*, rozsivek, to je například gen *THIC*, ve kterém se nachází RNA-přepínače u rostlin.

Z velmi podobné struktury aptamerů vyplývá, že všechny aptamery v obr. 19 pravděpodobně váží TPP (McRose a kol., 2014).



Obrázek 19: Rozšíření RNA-přepínačů v eukaryotech. Nahoře je taxonomický strom, barvy v pozadí udávají jednotlivé říše. Šedé kolečko u jednotlivých druhů značí již známý přepínač, žluté kolečko značí přítomný přepínač s neznámou funkcí. Je vidět široké rozšíření hlavně u *Stramenopila*, *Alveolata* a *Viridiplantae*. Dole jsou potom sekundární struktury přepínačů z jednotlivých organismů. Vedle struktury je vždy zmíněn nadřazený taxon, dále rodové a druhové jméno, oblast výskytu přepínače na RNA, název genu a velikost přepínače v nukleotidech (nt). Nápadná je zde jejich strukturální podobnost (McRose a kol., 2014)

5 Využití RNA-přepínačů

Objev RNA-přepínačů otevřel nové pole studia; RNA-přepínače ukázaly na rozmanitost regulace genové exprese. Záhy po jejich objevení přicházeli lidé s návrhy umělých přepínačů, které v organismech mohou plnit nám doposud nepřístupné funkce. RNA-přepínače se staly atraktivním tématem v oblasti biotechnologií a biomedicíny. V medicíně se nepracuje přímo s umělými RNA-přepínači, ale protože se kanonické RNA-přepínače v eukaryotech vyskytují jen ve velmi omezené míře, jsou RNA-přepínače vhodné pro cílení antibiotiky; tyto látky negativně neovlivní hostitele (tedy člověka nebo jiného savce). Umělý ligand se naváže na přepínač, ten zaujme konformaci inhibující expresi genu, a to může mít pro patogen negativní následky. Následky nemusejí být nutně letální, protože přepínače nefungují se 100 % účinností. Výhledy do budoucna slibují také rostlinné RNA-přepínače, neboť jsou přítomny i u ekonomicky významných druhů, jako například u kukuřice *Zea mays* nebo u rýže *Oryza sativa*.

Dalšími velmi slibnými odvětvími pro využití RNA-přepínačů jsou biotechnologie a syntetická biologie. Protože RNA může vázat celou řadu ligandů, existují návrhy na přepínače, které by sloužily jako bioindikátory. Přepínačový bioindikátor funguje na základě navázání cíleného ligandu na RNA, což potom vede k aktivaci exprese indikátorového genu. To může být například GFP, který po excitaci modrým světlem (záření s vlnovou délkou 450 nm) emituje zelené světlo (vlnová délka 509 nm), které může být posléze detekováno.

Metoda, kterou se generují RNA molekuly schopné specificky vázat určitý ligand se nazývá SELEX (zkratka pro anglické **S**ystematic **E**volution of **L**igands by **E**Xponential enrichment). V této metodě se do směsi segmentů RNA, představující knihovnu o vysoké komplexitě, přidá cílová molekula nebo komplex molekul, přičemž se hledá ta specifická RNA, která se naváže na povrch této cílové molekuly. Následně se celá suspenze omyje od volných RNA a ideálně zůstanou ty RNA, které se navázaly na povrch cílové molekuly. Tyto RNA segmenty se následně amplifikují pomocí PCR, vznikuvší komplementární vlákno se degraduje a následně se celý proces několikrát opakuje, přičemž se při omytí pokaždé omyjí ty RNA, které se vážou s menší afinitou, až zbyde jen několik málo molekul, které se na cílovou molekulu váže nejsilněji; to jsou potom naši kandidáti na ideální hledaný aptamer.

Možností toho, co mohou přepínače vázat, je celá řada. Objevily se návrhy pro RNA-přepínače vážící proteiny fungující jako ribozymy, které mohou mít mnoho funkcí: například mohou kontrolovat hladiny ostatních druhů RNA pomocí jejich degradace (například tRNA nebo rRNA), nebo mohou regulovat koncentraci mRNA cílových genů, čímž mohou v buňce snížit koncentraci signálních proteinů (Ausländer a kol., 2014). Pro příklad uvádím regulaci buněčné proliferace T-lymfocytů. Výzkumníci vytvořili T-lymfocyty se specifickými ribozymovými přepínači, které jsou citlivé na přítomnost

substance, která se testovacímu subjektu podává. Pokud je přítomen lék, přepínač je inaktivován a buňky do prostředí produkují cytokiny (ve výzkumu cytokin IL-2). Cytokiny jsou malé signální proteiny, které mají v imunitním systému široké spektrum funkcí, cytokin IL-2 je pak protein produkováný některými bílými krvinkami a stimuluje množení T-lymfocytů, pokud ale lék přítomen není, ribozym degraduje mRNA pro IL-2 a to potom vede k apoptóze rychle se množících T-lymfocytů (Chen a kol., 2010). Výše uvedený přístup slibuje méně nákladné léčebné postupy v onkologii, neboť než aby cytokiny byly přidávány do organismu přímo, je jejich hladina kontrolována skrze regulaci jejich mRNA pomocí ribozymových RNA-přepínačů.

6 RNA-přepínače a RNA svět

Převažující představy dneška o vzniku života počítají s tzv. RNA světem. V tomto hypotetickém světě, kde figurují molekuly RNA coby sebereplikující se agenti, je pro tyto agenty také nutná nějaká primitivní forma regulace. Už od doby objevení RNA-přepínačů se hovořilo o posílení hypotézy RNA světa, neboť byl nalezen další klíčový molekulární mechanismus (tedy regulace exprese na základě přítomnosti ligandu), který je zprostředkovan pouze molekulou RNA. Hlavní impulz pro tvorbu této hypotézy je mj. kosmopolitní přítomnost RNA a klíčové role, které v organismech zastává. Model předpokládá spontánní tvorbu RNA nukleotidů a řetězců; tyto řetězce potom mohou zaujímat různé konformace s různými funkcemi.

Hypotéza RNA světa je představou o abiogenetickém vzniku života, která vznik života zařazuje do rozhraní eónů hadaika a archaika, přibližně před 3,8 – 4,2 miliardami let (Joyce, 1991). Hypotéza počítá s pravidelným střídáním teploty v prostředí. Navýšení teploty znamená rozvolnění molekuly RNA, kdy se na ní mohou Watson-Crickovským párováním navázat komplementární, v prostředí již přítomné nukleotidy. Nový komplementační řetězec se s opětovným navýšením teploty od templátu disociuje a tím se řetězce „množí“. Protože tento způsob replikace je vysoce nepřesný, je zde veliký potenciál pro mutagenézi, a proto i pro primitivní formu přirozeného výběru a evoluci. Jedním z argumentů proti této hypotéze může být otázka po spojování bází do řetězce po jejich navázání se na templát, nicméně již před vytvořením hypotézy RNA světa existoval model pro RNA-zprostředkovanou replikaci RNA (Cech, 1986). Další práce pak ukázaly, že lze v laboratorních podmínkách náhodnými mutacemi pomocí PCR vytvořit ribozym schopný na templátové RNA vytvářet komplementární RNA řetězec se spojenou cukr-fosfátovou kostrou (Horning a Joyce, 2016). Dalším problémem pro hypotézu RNA světa je sama stabilita molekuly RNA. RNA narozdíl od dvouřetězcové DNA může ve vodném prostředí hydrolyzovat (Lönnerberg, 2011) (obr. 14), což znamená omezenou stabilitu RNA v přírodě. RNA-přepínače tak či onak představují zajímavé obohacení této, dnes převažující, hypotézy o vzniku života.

7 Závěr

RNA-přepínače jsou specifické úseky některých mRNA a pre-mRNA, které jsou schopny reagovat na prostředí. Většinou na přítomnost ligandu, ale také na teplotu, a to potom u nich vede ke změně konformace. Ta pak může mít zásadní vliv na regulaci genové exprese pomocí regulace transkripce, translace, sestřihu nebo jiných molekulárních mechanismů. Výzkum RNA-přepínačů je velmi slibným polem pro biologii jako takovou, biotechnologii a syntetickou biologii, protože se postupně zdokonalují způsoby toho, jak vytvářet umělé RNA-přepínače, které mohou být dalším nástrojem pro molekulárně genetický výzkum, anebo mohou mít využití i v medicíně.

8 Seznam literatury

- *Aboul-ela, F., Huang, W., Abd Elrahman, M., Boyapati, V., Li, P., 2015. Linking aptamer-ligand binding and expression platform folding in riboswitches: prospects for mechanistic modeling and design. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 6, 631–650. <https://doi.org/10.1002/wrna.1300>
- Ausländer, S., Stücheli, P., Rehm, C., Ausländer, D., Hartig, J.S., Fussenegger, M., 2014. A general design strategy for protein-responsive riboswitches in mammalian cells. *Nat. Methods* 11, 1154–1160. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3136>
- Baker, J.L., Sudarsan, N., Weinberg, Z., Roth, A., Stockbridge, R.B., Breaker, R.R., 2012. Widespread Genetic Switches and Toxicity Resistance Proteins for Fluoride. *Science* 335, 233–235. <https://doi.org/10.1126/science.1215063>
- Bassalo, M.C., Garst, A.D., Choudhury, A., Grau, W.C., Oh, E.J., Spindler, E., Lipscomb, T., Gill, R.T., 2018. Deep scanning lysine metabolism in *Escherichia coli*. *Mol. Syst. Biol.* 14. <https://doi.org/10.15252/msb.20188371>
- Blouin, S., Chinnappan, R., Lafontaine, D.A., 2011. Folding of the lysine riboswitch: importance of peripheral elements for transcriptional regulation. *Nucleic Acids Res.* 39, 3373–3387. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1247>
- *Bocobza, S.E., Aharoni, A., 2014. Small molecules that interact with RNA: riboswitch-based gene control and its involvement in metabolic regulation in plants and algae. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 79, 693–703. <https://doi.org/10.1111/tpj.12540>
- *Bocobza, S.E., Aharoni, A., 2008. Switching the light on plant riboswitches. *Trends Plant Sci.* 13, 526–533. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.07.004>
- *Breaker, R.R., 2012. Riboswitches and the RNA world. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003566>
- Caron, M.-P., Bastet, L., Lussier, A., Simoneau-Roy, M., Massé, E., Lafontaine, D.A., 2012. Dual-acting riboswitch control of translation initiation and mRNA decay. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, E3444–3453. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214024109>
- Caserta, E., Liu, L.-C., Grundy, F.J., Henkin, T.M., 2015. Codon-Anticodon Recognition in the *Bacillus subtilis* glyQS T Box Riboswitch. *J. Biol. Chem.* 290, 23336–23347. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.673236>
- Cech, T.R., 1989. RNA as an enzyme. *Biochem. Int.* 18, 7–14.
- Cech, T.R., 1986. A model for the RNA-catalyzed replication of RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 4360–4363.
- Chatterjee, A., Jurgenson, C.T., Schroeder, F.C., Ealick, S.E., Begley, T.P., 2007. Biosynthesis of the Thiamin Thiazole in Eukaryotes: The Conversion of NAD to an Advanced Intermediate. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 2914–2922. <https://doi.org/10.1021/ja067606t>
- *Cheah, M.T., Wachter, A., Sudarsan, N., Breaker, R.R., 2007. Control of alternative RNA splicing and gene expression by eukaryotic riboswitches. *Nature* 447, 497–500. <https://doi.org/10.1038/nature05769>
- Chen, Y.Y., Jensen, M.C., Smolke, C.D., 2010. Genetic control of mammalian T-cell proliferation with synthetic RNA regulatory systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 8531–8536. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001721107>
- Cochrane, J.C., Lipchock, S.V., Strobel, S.A., 2007. Structural investigation of the GImS ribozyme bound to its catalytic cofactor. *Chem. Biol.* 14, 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2006.12.005>
- Croft, M.T., Moulin, M., Webb, M.E., Smith, A.G., 2007. Thiamine biosynthesis in algae is regulated by riboswitches. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 20770–20775. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705786105>
- Edwards, T.E., Ferré-D'Amaré, A.R., 2006. Crystal Structures of the Thi-Box Riboswitch Bound to Thiamine Pyrophosphate Analogs Reveal Adaptive RNA-Small Molecule Recognition. *Structure* 14, 1459–1468. <https://doi.org/10.1016/j.str.2006.07.008>

- Epshtein, V., Cardinale, C.J., Ruckenstein, A.E., Borukhov, S., Nudler, E., 2007. An Allosteric Path to Transcription Termination. *Mol. Cell* 28, 991–1001. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.10.011>
- Garst, A.D., Héroux, A., Rambo, R.P., Batey, R.T., 2008. Crystal structure of the lysine riboswitch regulatory mRNA element. *J. Biol. Chem.* 283, 22347–22351. <https://doi.org/10.1074/jbc.C800120200>
- Gráda, C., 1992. Ireland's great famine. *Univ. Coll. Dublin Open Access Publ. Univ. Coll. Dublin.*
- Gupta, A., Swati, D., 2019. Riboswitches in Archaea. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 22, 135–149. <https://doi.org/10.2174/1386207322666190425143301>
- *Gusarov, I., Nudler, E., 1999. The Mechanism of Intrinsic Transcription Termination. *Mol. Cell* 3, 495–504. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80477-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80477-3)
- Haller, A., Altman, R.B., Soulière, M.F., Blanchard, S.C., Micura, R., 2013. Folding and ligand recognition of the TPP riboswitch aptamer at single-molecule resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 4188–4193. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218062110>
- Hennelly, S.P., Novikova, I.V., Sanbonmatsu, K.Y., 2013. The expression platform and the aptamer: cooperativity between Mg²⁺ and ligand in the SAM-I riboswitch. *Nucleic Acids Res.* 41, 1922–1935. <https://doi.org/10.1093/nar/gks978>
- Hoe, N.P., Goguen, J.D., 1993. Temperature sensing in *Yersinia pestis*: translation of the LcrF activator protein is thermally regulated. *J. Bacteriol.* 175, 7901–7909.
- Hollands, K., Proshkin, S., Sklyarova, S., Epshtein, V., Mironov, A., Nudler, E., Groisman, E.A., 2012. Riboswitch control of Rho-dependent transcription termination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 5376–5381. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112211109>
- Horning, D.P., Joyce, G.F., 2016. Amplification of RNA by an RNA polymerase ribozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 9786–9791. <https://doi.org/10.1073/pnas.1610103113>
- Johansson, J., Mandin, P., Renzoni, A., Chiaruttini, C., Springer, M., Cossart, P., 2002. An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Cell* 110, 551–561. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00905-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00905-4)
- Joyce, G.F., 1991. The rise and fall of the RNA world. *New Biol.* 3, 399–407.
- *Kortmann, J., Narberhaus, F., 2012. Bacterial RNA thermometers: molecular zippers and switches. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 255–265. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2730>
- *Kreuzer, K.D., Henkin, T.M., 2018. The T-Box Riboswitch: tRNA as an Effector to Modulate Gene Regulation. *Microbiol. Spectr.* 6. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.RWR-0028-2018>
- Kubodera, T., Watanabe, M., Yoshiuchi, K., Yamashita, N., Nishimura, A., Nakai, S., Gomi, K., Hanamoto, H., 2003. Thiamine-regulated gene expression of *Aspergillus oryzae* thiA requires splicing of the intron containing a riboswitch-like domain in the 5'-UTR. *FEBS Lett.* 555, 516–520. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01335-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01335-8)
- Lang, K., Rieder, R., Micura, R., 2007. Ligand-induced folding of the thiM TPP riboswitch investigated by a structure-based fluorescence spectroscopic approach. *Nucleic Acids Res.* 35, 5370–5378. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm580>
- Lemay, J.-F., Desnoyers, G., Blouin, S., Heppell, B., Bastet, L., St-Pierre, P., Massé, E., Lafontaine, D.A., 2011. Comparative Study between Transcriptionally- and Translationally-Acting Adenine Riboswitches Reveals Key Differences in Riboswitch Regulatory Mechanisms. *PLoS Genet.* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001278>
- Li, S., Breaker, R.R., 2013. Eukaryotic TPP riboswitch regulation of alternative splicing involving long-distance base pairing. *Nucleic Acids Res.* 41, 3022–3031. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt057>
- List of Nobel laureates, 2020. . Wikipedia.
- Lönnberg, H., 2011. Cleavage of RNA phosphodiester bonds by small molecular entities: a mechanistic insight. *Org. Biomol. Chem.* 9, 1687–1703. <https://doi.org/10.1039/C0OB00486C>
- McCown, P.J., Corbino, K.A., Stav, S., Sherlock, M.E., Breaker, R.R., 2017. Riboswitch diversity and distribution. *RNA* 23, 995–1011. <https://doi.org/10.1261/rna.061234.117>
- McRose, D., Guo, J., Monier, A., Sudek, S., Wilken, S., Yan, S., Mock, T., Archibald, J.M., Begley, T.P., Reyes-Prieto, A., Worden, A.Z., 2014. Alternatives to vitamin B1 uptake revealed with

- discovery of riboswitches in multiple marine eukaryotic lineages. *ISME J.* 8, 2517–2529. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.146>
- Mironov, A.S., Gusarov, I., Rafikov, R., Lopez, L.E., Shatalin, K., Kreneva, R.A., Perumov, D.A., Nudler, E., 2002. Sensing small molecules by nascent RNA: a mechanism to control transcription in bacteria. *Cell* 111, 747–756. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)01134-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01134-0)
- Morgan, J.T., Fink, G.R., Bartel, D.P., 2019. Excised linear introns regulate growth in yeast. *Nature* 565, 606–611. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0828-1>
- Mukherjee, S., Retwitzer, M.D., Barash, D., Sengupta, S., 2018. Phylogenomic and comparative analysis of the distribution and regulatory patterns of TPP riboswitches in fungi. *Sci. Rep.* 8, 5563. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23900-7>
- Nahvi, A., Sudarsan, N., Ebert, M.S., Zou, X., Brown, K.L., Breaker, R.R., 2002. Genetic control by a metabolite binding mRNA. *Chem. Biol.* 9, 1043. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(02\)00224-7](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(02)00224-7)
- Nishimura, H., Kawasaki, Y., Kaneko, Y., Nosaka, K., Iwashima, A., 1992. A positive regulatory gene, THI3, is required for thiamine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 174, 4701–4706.
- *Nozinovic, S., Reining, A., Kim, Y.-B., Noeske, J., Schlepckow, K., Wöhnert, J., Schwalbe, H., 2014. The importance of helix P1 stability for structural pre-organization and ligand binding affinity of the adenine riboswitch aptamer domain. *RNA Biol.* 11, 655–656. <https://doi.org/10.4161/rna.29439>
- *Nudler, E., 2013. A decade of riboswitches. *Cell* 152, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.024>
- Ogawa, A., 2011. Rational design of artificial riboswitches based on ligand-dependent modulation of internal ribosome entry in wheat germ extract and their applications as label-free biosensors. *RNA* 17, 478–488. <https://doi.org/10.1261/rna.2433111>
- Ottink, O.M., Rampersad, S.M., Tessari, M., Zaman, G.J.R., Heus, H.A., Wijmenga, S.S., 2007. Ligand-induced folding of the guanine-sensing riboswitch is controlled by a combined predetermined–induced fit mechanism. *RNA* 13, 2202–2212. <https://doi.org/10.1261/rna.635307>
- Rapala-Kozik, M., Olczak, M., Ostrowska, K., Starosta, A., Kozik, A., 2007. Molecular characterization of the thi3 gene involved in thiamine biosynthesis in *Zea mays*: cDNA sequence and enzymatic and structural properties of the recombinant bifunctional protein with 4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine (phosphate) kinase and thiamine monophosphate synthase activities. *Biochem. J.* 408, 149–159. <https://doi.org/10.1042/BJ20070677>
- Ravnum, S., Andersson, D.I., 2001. An adenosyl-cobalamin (coenzyme-B12)-repressed translational enhancer in the cob mRNA of *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* 39, 1585–1594. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02346.x>
- Rodionov, D.A., Vitreschak, A.G., Mironov, A.A., Gelfand, M.S., 2002. Comparative Genomics of Thiamin Biosynthesis in Prokaryotes NEW GENES AND REGULATORY MECHANISMS. *J. Biol. Chem.* 277, 48949–48959. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208965200>
- Santangelo, T.J., Roberts, J.W., 2004. Forward Translocation Is the Natural Pathway of RNA Release at an Intrinsic Terminator. *Mol. Cell* 14, 117–126. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(04\)00154-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(04)00154-6)
- Serganov, A., Polonskaia, A., Phan, A.T., Breaker, R.R., Patel, D.J., 2006. Structural basis for gene regulation by a thiamine pyrophosphate-sensing riboswitch. *Nature* 441, 1167–1171. <https://doi.org/10.1038/nature04740>
- Skordalakes, E., Berger, J.M., 2003. Structure of the Rho Transcription Terminator: Mechanism of mRNA Recognition and Helicase Loading. *Cell* 114, 135–146. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00512-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00512-9)
- Suddala, K.C., Wang, J., Hou, Q., Walter, N.G., 2015. Mg²⁺ Shifts Ligand-Mediated Folding of a Riboswitch from Induced-Fit to Conformational Selection. *J. Am. Chem. Soc.* 137, 14075–14083. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b09740>

- Tmlew, 2008. English: RNA instability due to the 2'-OH.
- Vitreschak, A.G., Rodionov, D.A., Mironov, A.A., G, M.S., 2003. Regulation of the vitamin B12 metabolism and transport in bacteria by a conserved RNA structural element. *RNA* 9, 1084–1097. <https://doi.org/10.1261/rna.5710303>
- *Walter, N.G., Engelke, D.R., 2002. Ribozymes: Catalytic RNAs that cut things, make things, and do odd and useful jobs. *Biol. Lond. Engl.* 49, 199–203.
- Welz, R., Breaker, R.R., 2007. Ligand binding and gene control characteristics of tandem riboswitches in *Bacillus anthracis*. *RNA N. Y. N* 13, 573–582. <https://doi.org/10.1261/rna.407707>
- Whitford, P.C., Schug, A., Saunders, J., Hennelly, S.P., Onuchic, J.N., Sanbonmatsu, K.Y., 2009. Nonlocal Helix Formation Is Key to Understanding S-Adenosylmethionine-1 Riboswitch Function. *Biophys. J.* 96, L7–L9. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2008.10.033>
- Wickiser, J.K., Winkler, W.C., Breaker, R.R., Crothers, D.M., 2005. The Speed of RNA Transcription and Metabolite Binding Kinetics Operate an FMN Riboswitch. *Mol. Cell* 18, 49–60. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.02.032>
- Winkler, W., Nahvi, A., Breaker, R.R., 2002. Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature* 419, 952–956. <https://doi.org/10.1038/nature01145>

[*] – rešeršní práce