

Agata Frątczak

**Izoenergetyczne mikromacierze RNA jako narzędzie
do badania biologicznie funkcjonalnych RNA**

Rozprawa doktorska

Promotor pracy:
Prof. dr hab. Ryszard Kierzek

Pracę wykonano
w Instytucie Chemii Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu
w Pracowni Chemii RNA

Poznań 2010

*Panu Profesorowi Ryszardowi Kierzkowi
serdecznie dziękuję
za umożliwienie mi wykonywania interesujących eksperymentów,
okazaną pomoc oraz niezwykłą cierpliwość i wyrozumiałość.*

*Wszystkim Współpracownikom z Pracowni Chemii RNA
dziękuję za wszelką pomoc i niepowtarzalną atmosferę pracy.*

I. CEL PRACY.....	6
II. CZĘŚĆ LITERATUROWA.....	7
1. Mapowanie mikromacierzowe - nowa metoda badania struktury drugorzędowej i oddziaływań RNA	7
1.1. Wprowadzenie	7
1.2. Idea mapowania mikromacierzowego	11
1.3. Mikromacierze nieizoenergetyczne	13
1.4. Mikromacierze izoenergetyczne	15
1.5. Podstawy termodynamiczne projektowania macierzy izoenergetycznych	18
1.6. Zastosowanie izoenergetycznych mikromacierzy do badania struktury drugorzędowej RNA.....	23
2. Bakteryjne niekodujące RNA	24
2.1. Wprowadzenie	24
2.2. SRNA o pełnej komplementarności	25
2.2.1. Antysensowe RNA kodowane w plazmidach	25
2.2.2. SRNA kodowane przez bakteriofagi i transpozony	26
2.2.3. Antysensowe RNA kodowane przez chromosom	27
2.3. SRNA o niepełnej komplementarności wiążące białko Hfq.....	29
2.3.1. Struktura i funkcje biologiczne pełnione przez białko Hfq.....	35
2.4. SRNA modyfikujące aktywność białek	39
2.5. Dwufunkcyjne RNA	41
III. WYNIKI I DYSKUSJA	44
1. Wykorzystanie metody izoenergetycznych mikromacierzy (mapowania mikromacierzowego) do badania struktury drugorzędowej DsrA RNA i jego oddziaływań z innymi biomolekułami.	44
1.1. Wprowadzenie	44
1.2. Analiza struktur DsrA RNA wygenerowanych przez program komputerowy, służących do przewidywania struktury drugorzędowej RNA	45
1.3. Otrzymywanie DsrA RNA	47
1.4. Przygotowanie mikromacierzy dedykowanych badaniu struktury DsrA RNA	49
1.5. Mapowanie mikromacierzowe DsrA RNA.....	52
1.5.1. Analiza struktury drugorzędowej DsrA RNA za pomocą izoenergetycznych mikromacierzy	52
1.5.2. Mikromacierzowe mapowanie modelowego fragmentu odpowiadającego rejonowi II DsrA RNA.....	58
1.5.3. Mikromacierzowe mapowanie DsrA RNA z przyłączonym modyfikowanym oligonukleotydem62	
1.5.4. Mikromacierzowe mapowanie modelowej spinki III DsrA RNA.....	66
1.6. Mapowanie chemiczne struktury drugorzędowej DsrA RNA.	69
1.6.1. Projektowanie i testowanie modyfikowanego startera DNA/LNA.....	69
1.6.2. Mapowanie chemiczne DsrA RNA.....	71
1.7. Badanie struktury i oddziaływań DsrA RNA w kompleksie z białkiem Hfq	74
1.7.1. Ekspresja i oczyszczanie białka Hfq.....	74
1.7.2. Badanie tworzenia kompleksów DsrA RNA/Hfq	76
1.7.3. Mapowanie mikromacierzowe kompleksów DsrA RNA/Hfq	77
1.8. Mapowanie mikromacierzowe dwóch oddziałujących ze sobą RNA (kompleksy RNA/RNA).....	84
1.9. Mapowanie mikromacierzowe kompleksów trójskładnikowych RNA/RNA/białko.....	92
2. Wykorzystanie metody izoenergetycznych mikromacierzy (mapowania mikromacierzowego) do badania struktury drugorzędowej OxyS RNA i jego oddziaływań z innymi biomolekułami	98
2.1. Wprowadzenie	98
2.2. Analiza struktur OxyS RNA wygenerowanych przez program komputerowy, służących do przewidywania struktury drugorzędowej RNA	99
2.3. Otrzymywanie OxyS RNA	102
2.4. Przygotowanie mikromacierzy dedykowanych badaniu struktury OxyS RNA.....	103

2.5. Mapowanie mikromacierzowe OxyS RNA	106
2.5.1. Analiza struktury drugorzędowej OxyS RNA z wykorzystaniem izoenergetycznych mikromacierzy	106
2.5.2. Mikromacierzowe mapowanie modelowego rejonu środkowego OxyS RNA	108
2.5.3. Mikromacierzowe mapowanie kompleksu OxyS RNA z modyfikowanymi oligonukleotydami	109
2.5.4. Mapowanie mikromacierzowe modelowej spinki III OxyS RNA	119
2.6. Mapowanie chemiczne struktury drugorzędowej OxyS RNA.....	122
2.6.1. Projektowanie i testowanie modyfikowanego startera DNA/LNA.....	122
2.6.2. Mapowanie chemiczne OxyS RNA	124
2.7. Badanie struktury i oddziaływań OxyS RNA w kompleksie z białkiem Hfq	126
2.7.1. Badanie tworzenia kompleksów OxyS RNA/Hfq.....	126
2.7.2. Mapowanie mikromacierzowe kompleksów OxyS RNA/Hfq.....	127
2.8. Próby mapowania mikromacierzowego kompleksów OxyS RNA/fragment mRNA	134
2.8.1. Próby mapowania mikromacierzowego kompleksów OxyS RNA/fragment <i>fhfA</i> mRNA.....	134
2.8.2. Próby mapowania mikromacierzowego kompleksów OxyS RNA/fragment <i>rpoS</i> mRNA.....	142
IV. PODSUMOWANIE.....	145
V. MATERIAŁY I METODY.....	149
1. Materiały	149
1.1. Odczynniki	149
1.2. Enzymy.....	150
1.3. Plazmidy	150
1.4. Akcesoria dodatkowe	150
1.5. Izotopy promieniotwórcze	150
1.6. Gotowe zestawy do badań biochemicznych	150
1.7. Szczepy bakteryjne	150
1.8. Wzorce długości kwasów nukleinowych.....	151
1.9. Oligonukleotydy	151
1.10. Roztwory i bufory.....	154
1.11. Pożywki	158
1.12. Żele	159
1.13. Ważniejsza aparatura	160
2. Metody.....	161
2.1. Synteza chemiczna oligonukleotydów.....	161
2.2. Odblokowywanie i oczyszczanie modyfikowanych oligonukleotydów zawierających C6-aminoheksylowy łącznik na końcu 5', stosowanych jako sondy na mikromacierzy.	161
2.3. Odblokowywanie i oczyszczanie modyfikowanych oligorybonukleotydów.....	162
2.4. Odblokowywanie i oczyszczanie oligorybonukleotydów.....	162
2.5. Odblokowywanie i oczyszczanie oligodezoksyrybonukleotydów oraz oligodezoksyrybonukleotydów zawierających w niektórych pozycjach nukleotydy typu LNA	163
2.6. Znakowanie końca 5' kwasów nukleinowych izotopem ³² P.....	163
2.7. Elektroforeza DNA w żelach agarozowych.....	164
2.8. Elektroforeza kwasów nukleinowych w żelach poliakrylamidowych w warunkach denaturujących.	164
2.9. Elektroforeza kwasów nukleinowych, kompleksów kwasów nukleinowych oraz kompleksów kwasów nukleinowych z białkiem w żelach poliakrylamidowych w warunkach niedenaturujących.	165
2.10. Elektroforeza białek w żelach poliakrylamidowych w obecności SDS	165
2.11. Elucja kwasów nukleinowych z żelu poliakrylamidowego	166
2.12. Strącanie kwasów nukleinowych po elucji z żelu poliakrylamidowego.....	166
2.13. Oczyszczanie kwasów nukleinowych metodą fenol-chloroform.....	166
2.14. Otrzymywanie matryc do transkrypcji <i>in vitro</i>	167
2.15. Transkrypcja <i>in vitro</i>	170
2.16. Nadekspresja i oczyszczanie białka Hfq w komórkach bakteryjnych	171
2.17. Analiza homogenności RNA w różnych buforach w żelach poliakrylamidowych w warunkach niedenaturujących	172
2.18. Analiza kompleksów RNA/Hfq w żelach poliakrylamidowych w warunkach niedenaturujących... ..	173
2.19. Analiza kompleksów RNA/RNA oraz RNA/RNA/białko w żelach poliakrylamidowych w warunkach niedenaturujących.....	173
2.20. Analiza kompleksów modyfikowany oligonukleotyd/Hfq w żelach poliakrylamidowych w warunkach niedenaturujących.....	174

2.21. Analiza tworzenia kompleksów OxyS RNA i DsrA RNA ze starterami DNA oraz DNA-LNA w żelach poliakrylamidowych w warunkach niedenaturujących	175
2.22. Chemiczne mapowanie struktury drugorzędowej DsrA RNA i OxyS RNA	175
2.23. Pomiary trwałości termodynamicznej z użyciem metody topnienia UV (ang. <i>UV melting</i>)	177
2.24. Przygotowanie płytek mikromacierzowych.....	177
2.25. Hybrydyzacja na mikromacierzy	178
2.26. Analiza komputerowa wyników mikromacierzowych	179
2.27. Odzyskiwanie zużytych mikromacierzy	180
VI. BIBLIOGRAFIA.....	181

I. CEL PRACY

Od kiedy odkryto regulatorową rolę RNA w prawidłowym funkcjonowaniu komórek, cząsteczki te cieszą się bardzo dużym zainteresowaniem badaczy. Ponadto, zwłaszcza w ostatnich latach, stały się ważnym obiektem badań ze względu na możliwości wykorzystywania RNA zarówno, jako narzędzi jak i celu działań terapeutycznych w zwalczaniu wielu chorób o podłożu genetycznym.

RNA jest cząsteczką, której struktura determinuje prawidłowe jej funkcjonowanie. Cecha ta oraz wyjątkowo szybkie tempo w jakim przybywa informacji o kolejnych nowo odkrytych RNA sprawia, że konieczne jest szukanie nowych, precyzyjnych i szybkich metod badania ich struktury. W pracowni Chemii RNA opracowano nowatorską metodę badania struktury drugorzędowej RNA za pomocą izoenergetycznych mikromacierzy (metoda mapowania mikromacierzowego).

Celem niniejszej pracy była optymalizacja metody mapowania mikromacierzowego RNA oraz poszerzenie możliwości tej metody na badanie struktury i oddziaływań wieloskładnikowych kompleksów RNA i białek. Równolegle, badania te były nakierowane na uzyskanie nowych informacji o wybranych regulatorowych RNA, szczególnie z wykorzystaniem do tego celu mapowania mikromacierzowego.

Jako modelowe do badań wybrano dwa regulatorowe RNA z *Escherichia coli*, a mianowicie DsrA RNA oraz OxyS RNA. Cząsteczki te zostały wybrane ze względu na optymalną do planowanych badań długość (około 100 nukleotydów) oraz ich zdolność do oddziaływania z innymi RNA oraz białkiem Hfq. Co równie ważne, dla obu regulatorowych RNA istnieją doniesienia literaturowe dotyczące ich struktury. W przypadku optymalizacji nowatorskiej metody badań daje to możliwość porównania i weryfikacji wyników otrzymanych przez innych badaczy, za pomocą standardowych metod, z wynikami otrzymanymi za pomocą nowatorskiej metody mapowania mikromacierzowego.

W toku badań opisanych w pracy doktorskiej wykorzystywano mikromacierze izoenergetyczne do zbadania struktury drugorzędowej OxyS RNA i DsrA RNA. Analizowano również użyteczność nowej metody do badania struktury obu RNA w kompleksie z białkiem opiekuńczym Hfq oraz w kompleksie z fragmentami docelowych mRNA (*rpoS* mRNA oraz *fhlA* mRNA). Testowano też kompleksy trójskładnikowe zawierające regulatorowy RNA, fragment mRNA oraz białko Hfq.

II. CZĘŚĆ LITERATUROWA

Ze względu na charakter i cel prowadzonych badań eksperymentalnych, w części literaturowej rozprawy doktorskiej przedstawiono dwa odrębne zagadnienia.

W pierwszym omówiono idee metody mapowania mikromacierzowego, uzasadnienie potrzeby stworzenia takiej metody badania struktury drugorzędowej RNA oraz podstawy termodynamiczne, którymi kierowano się w czasie tworzenia izoenergetycznej biblioteki sond oligonukleotydowych.

Ponieważ do badań wybrano dwa małe regulatorowe RNA z *E. coli*: OxyS RNA i DsrA RNA, dlatego też w drugiej części tego rozdziału scharakteryzowano bakteryjne niekodujące RNA (sRNA). Starano się omawiać poszczególne grupy przede wszystkim na przykładach pochodzących z *E. coli*. Podczas omawiania grupy sRNA o niepełnej komplementarności wiążących białko Hfq szczególną uwagę zwrócono na opisanie biologicznej funkcji OxyS RNA oraz DsrA RNA jak również białka Hfq.

1. Mapowanie mikromacierzowe - nowa metoda badania struktury drugorzędowej i oddziaływań RNA

1.1. Wprowadzenie

Od ponad 20 lat zainteresowanie RNA wzrasta szczególnie intensywnie. Odkrywane są coraz to nowe role tej niezwykle wszechstronnej funkcjonalnie oraz konformacyjnie dynamicznej cząsteczki. Jest ona zdolna do oddziaływania z wieloma biomolekułami w zróżnicowany, a jednocześnie wysoce specyficzny sposób (1). Odkrycie ponad 30 lat temu katalitycznej roli RNA zmieniło myślenie zarówno o dotychczasowych funkcjach RNA, jak i ewolucji systemów biologicznych (2, 3). Zastosowanie oligorybonukleotydów i rybozymów do regulacji procesów biologicznych uczyniło RNA niezwykle potężnym narzędziem terapeutycznym umożliwiającym inhibicję specyficznych funkcji docelowego RNA. Jedną z ważniejszych ról RNA, na którą zwrócona jest szczególna uwaga badaczy wydaje się być posttranskrypcyjna regulacja ekspresji genów. Odkrycie małych regulatorowych, niekodujących białek RNA (sRNA), skupiło uwagę wielu naukowców pracujących zarówno na organizmach prokariotycznych, jak i eukariotycznych.

Różnorodność aktywności biologicznej cząsteczek RNA jest przypisywana ich właściwościom strukturalnym. W przeciwieństwie do DNA, cząsteczka RNA może

przybierać bardzo różnorodne i złożone struktury drugo- i trzeciorzędowe. Struktury te dodatkowo mogą ulegać dynamicznym zmianom konformacyjnym po przyłączeniu różnych ligandów, bądź dzięki obecności kationów metali i poliamin biogennych, zmian temperatury czy wartości pH. Do głównych motywów tworzących strukturę drugorzędową RNA należą, poza rejonami dwuniciowych helis, rejony jednoniciowe, struktury spinkowe, wybrzuszenia jedno- lub kilku nukleotydowe, symetryczne i asymetryczne wewnętrzne pętle, pętle wieloramienne. Do bardziej złożonych struktur trzeciorzędowych RNA, powstających poprzez oddziaływania drugorzędowych motywów strukturalnych, zaliczyć można pseudowęzły, platformy typu A czy oddziaływania typu pętla-pętla tworzące tzw. *kissing hairpins* (4).

Na trwałość struktury RNA, zbudowanej z licznych motywów strukturalnych, mają wpływ oddziaływania wodorowe, warstwowe, elektrostatyczne oraz hydrofobowe. W RNA wiązania wodorowe mogą powstawać nie tylko pomiędzy parami zasad A i U oraz G i C, tworząc tzw. klasyczne wiązania Watsona-Cricka, ale także w innych kombinacjach z utworzeniem nieklasycznych par zasad. Te ostatnie nazywane są pojedynczymi niesparowaniami (ang. *mismatches*) i stabilizowane są poprzez wiązania wodorowe. Najczęściej spotykanymi pojedynczymi niesparowaniami są G-U, G-A, U-U, G-G i C-A. W RNA bardzo często występują, dwa sąsiadujące bezpośrednio ze sobą tego typu niesparowania, nazywane są one wówczas tandemowymi niesparowaniami (ang. *tandem mismatches*) (5).

Chcąc zrozumieć funkcjonalną różnorodność oraz mechanizmy działania RNA, jak również móc wpływać na funkcje biologiczne tej cząsteczki, konieczne jest poznanie jej struktury. Aktywność biologiczna RNA bardzo często wiąże się z oddziaływaniami z innymi biomolekułami, takimi jak docelowe RNA czy białka. Z tego powodu badanie struktury kompleksów RNA z białkami czy innymi kwasami nukleinowymi jest niezwykle istotne. Wiedza o strukturze drugorzędowej RNA jest konieczna do prowadzenia badań nowoodkrytych cząsteczek RNA i określenia ich funkcji biologicznych.

Istnieje kilka metod badania struktury drugorzędowej RNA. Jedną z nich jest metoda filogenetyczna, która opiera się na założeniu, że RNA mające podobne funkcje biologiczne mają podobną strukturę drugorzędową. Analiza filogenetyczna polega na porównywaniu sekwencji homologicznych cząsteczek RNA i tworzeniu wspólnego dla nich schematu oddziaływań drugorzędowych. Niestety zdarza się, że struktury przewidziane na podstawie podobieństwa sekwencji różnią się znacznie od struktur natywnych. Wynika to z faktu, że w

analizie nie bierze się po uwagę oddziaływań innych niż Watsona–Cricka oraz wielu elementów strukturalnych wpływających na trwałość termodynamiczną RNA (6).

Innym podejściem do badania struktury RNA jest metoda termodynamiczna, w której w oparciu o parametry termodynamiczne przewidywana jest struktura drugorzędowa RNA o najniższej energii swobodnej. Zakłada się, że taka struktura RNA jest najtrwalsza i najbardziej zbliżona do natywnej. Metoda ta została wykorzystana do stworzenia takich programów komputerowych jak Mfold czy RNAstructure służących do przewidywania struktury drugorzędowej RNA na podstawie znajomości ich sekwencji. Za pomocą metody termodynamicznej przewidzieć można tylko strukturę drugorzędową RNA, a poprawność przewidywania fragmentów dwuniciowych wynosi przeciętnie 75-80%. Metoda ta jest szczególnie użyteczna, gdy wspiera się ją wynikami pochodzącymi z eksperymentalnych metod badania struktury RNA (7, 8).

Istnieje też spore spektrum metod biochemicznych umożliwiających badania struktury RNA, jak również ich kompleksów z białkami. Jedną grupę stanowią metody mapowania enzymatycznego, w których wykorzystuje się zdolność do specyficznej strukturalnie lub sekwencyjnie hydrolizy wiązań fosfodiestrowych przez endonukleazy. Dużą niedogodnością tej metody jest rozmiar enzymów, który może przyczyniać się do zaburzenia struktury, szczególnie trzeciorzędowej, badanego RNA. Część z nukleolitycznych enzymów do prawidłowego działania wymaga zastosowania specyficznych warunków buforowych. Wówczas udział określonych kationów, może znacznie ograniczyć przydatność takich enzymów w badaniach natywnej struktury RNA. Wśród enzymów nie wykazujących specyficzności sekwencyjnej i hydrolizujących wiązania fosfodiestrowe po dowolnych nukleotydach w rejonach jednoniciowych wymienić można nukleazę S1 oraz Mung Bean, które do aktywności enzymatycznej wymagają kationów dwuwartościowych. Nukleaza S1 wymaga dodatkowo kwaśnego środowiska do hydrolizy, natomiast Mung Bean jest aktywna w pH fizjologicznym. RNaza T2 wykazuje taką samą specyficzność, jak dwie wcześniej omówione, a do działania nie wymaga kationów dwuwartościowych. Do nukleaz wykazujących specyficzność sekwencyjną w rejonach jednoniciowych należą natomiast RNazy T1, U2 oraz A. Hydrolizują one wiązanie fosfodiestrowe odpowiednio po guanozynie, adenozyne oraz nukleotydzie pirymidynowym. Przy czym RNaza T1 wykazuje wysoką specyficzność wobec adenozyne w warunkach kwaśnych, natomiast w fizjologicznym pH może hydrolizować łańcuch RNA po guanozynie. Specyficzność wobec rejonów dwuniciowych wykazuje RNaza V1, która rozpoznaje nawet krótkie zawierające 4-5 par zasad rejonu, jak również fragmenty helikalne wchodzących w skład pseudowęzłów. RNaza

V1 może również hydrolizować rejony jednoniciowe, jeżeli są one zaangażowane w oddziaływania warstwowe (9-11).

Kolejną grupę metod badania struktury RNA stanowi mapowanie chemiczne, w którym wykorzystuje się zdolność określonych związków chemicznych do specyficznego modyfikowania określonych miejsc we fragmentach jednoniciowych RNA. Część z tych odczynników może być stosowana także do mapowania struktury RNA znajdującej się wewnątrz komórek. W przypadku badania struktury kompleksów RNA/białko należy pamiętać, że reagenty użyte do mapowania RNA często reagują również z resztami aminokwasowymi. Specyficzne związki chemiczne mogą modyfikować określone zasady azotowe, jeden z nich meto-p-toluenosiarczan 1-cykloheksylo-3-(2-morfolinoetylo)-karbodiimid (CMCT) modyfikuje G w pozycji N1 oraz U w pozycji N3. Inny z reagentów β -etoksy- α -ketobutyrylaldehyd (ketoksal) modyfikuje również G, ale w pozycjach N1 i N2. Natomiast siarczan dimetylu (DMS) metyluje najefektywniej atom N7 w G oraz N1 w A i N3 w C (9, 11). Ostatnio bardzo często stosowany jest bezwodnik kwasu N-metyloizotoidowego (NMIA), który reaguje z grupą 2'-hydroksylową rybozy, występującej w rejonie jednoniciowym RNA. Reagent ten jest stosowany w metodzie SHAPE opracowanej kilka lat temu przez K. Weeksa (12). Miejsca modyfikacji w RNA podlegają detekcji poprzez przeprowadzenie reakcji odwrotnej transkrypcji, w czasie, której odwrotna transkryptaza przerywa syntezę łańcucha DNA po napotkaniu modyfikowanego nukleotydu. Jeszcze innym reagentem jest etylnitrozomocznik (ENU) modyfikujący grupy fosforanowe, które w następnym etapie, w warunkach alkalicznych, prowadzą do hydrolizy sąsiadujących wiązań diestrowych. Kolejnym reagentem jest rodnik hydroksylowy modyfikujący pierścień rybozy. Ostatnie dwa reagenty są bardzo często używane do mapowania kompleksów RNA z białkiem (13). Jony ołowiu są też użytecznym narzędziem do badania struktury RNA. W tym przypadku, związanie jonów ołowiu do rejonów jednoniciowych lub rejonów wykazujących niską stabilność termodynamiczną skutkuje hydrolizą sąsiadujących wiązań fosfodiestrowych (14).

Inną techniką wykorzystującą hydrolityczne właściwość jonów dwuwartościowych jest tzw. *in-line probing*. Metoda polega na zależnej od struktury RNA, jego spontanicznej hydrolizie w obecności jonów dwuwartościowych i opiera się na założeniu, że rejony RNA o trwałej strukturze są mniej podatne na hydrolizę. Metodę *in-line probing* z powodzeniem stosuje się do analizy zmian strukturalnych zachodzących w ryboprzełącznikach po związaniu odpowiedniego liganda. Inną metodą dającą możliwość określenia miejsc oddziaływania RNA z białkiem jest analiza „minimalnego wiązania”, w której RNA poddaje się częściowej

hydrolizie, a następnie inkubuje z odpowiednim białkiem. Umożliwia to odnalezienie minimalnej sekwencji w RNA niezbędnej do wiązania białka. Kolejna metoda polega na przeprowadzeniu reakcji odwrotnej transkrypcji, w czasie, której w miejscu osłoniętym przez białko następuje zatrzymanie syntezy DNA (13).

Strukturę RNA lub kompleksów tworzonych przez tą cząsteczkę z innymi molekułami można też badać na poziomie atomowym, stosując takie metody biofizyczne jak krystalografia czy spektroskopia NMR (15). Rozwiązywanie struktury za pomocą tych technik jest jednak procesem wyjątkowo czasochłonnym. O tym, że metody te nie należą do najprostszych i najpowszechniejszych może świadczyć fakt, że za pomocą spektroskopii NMR udaje się rozwiązać tylko strukturę niewielkich fragmentów cząsteczek RNA. Jeśli chodzi o badania krystalograficzne to w ostatnim czasie rozwiązywane są struktury krystaliczne coraz większych kompleksów rybonukleoproteinowych. Przykładem może być podjednostka rybosomalna 70S w kompleksie z mRNA i tRNA (16).

Opisane metody eksperymentalne, choć bez wątplenia dają wiele cennych informacji o strukturze, bywają niezwykle pracochłonne i czasochłonne, niejednokrotnie stwarzając też wiele problemów. Obecnie, kiedy przybywa metod, zarówno komputerowych jak i eksperymentalnych, umożliwiających identyfikowanie nowych RNA o nieznannej strukturze i funkcji niezbędne jest poszukiwanie nowych metod pozwalających szybciej i dokładniej określać struktury drugorzędowe RNA i ich kompleksów z innymi biomolekułami. Taką możliwość stwarza metoda mapowania mikromacierzowego, która została zaprojektowana i stworzona w Pracowni Chemii RNA Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN we współpracy z profesorem Douglasem H. Turnerem z Department of Chemistry, University of Rochester, USA.

1.2. Idea mapowania mikromacierzowego

Mikromacierze, czyli miniaturowe układy składające się z zestawów specyficznych sond oligonukleotydowych, są narzędziem wykorzystywanym w wielu dziedzinach biologii i medycyny. Techniki mikromacierzy DNA umożliwiające prowadzenie kompleksowych badań całych genomów cieszą się coraz większą popularnością. Metody te wykorzystywane są m.in. do badania profilu ekspresji genów, identyfikacji nowych genów, badania alternatywnego składania mRNA czy oddziaływań RNA z białkami.

Zupełnie nowym podejściem wykorzystującym technikę mikromacierzy jest metoda badania struktury i oddziaływań cząsteczek RNA za pomocą izoenergetycznych

mikromacierzy RNA. Nowością metody, poza jej przeznaczeniem, jest również wykorzystanie jako sond krótkich modyfikowanych oligonukleotydów RNA. Ich obecność zwiększa trwałość termodynamiczną dupleksów hybrydacyjnych powstałych poprzez oddziaływanie sondy zlokalizowanej na mikromacierzy z jednoniciowym fragmentem badanego RNA. Pewien typ mikromacierzy, wykorzystanych do badania struktury RNA, został przedstawiony przez zespół E. Southerna pod koniec lat '90. Otrzymywali oni mikromacierze zawierającą szereg sond, o długości od jeden do kilkunastu lub kilkudziesięciu nukleotydów (17-21). Ponieważ były to mikromacierze oparte o sondy DNA, trwałość termodynamiczna dupleksów hybrydacyjnych była stosunkowo niska. Użyteczność tak utworzonych mikromacierzy do badań strukturalnych była więc bardzo ograniczona. Zatem idea ta, jakkolwiek interesująca, wymagała odmiennego podejścia do tego problemu. Zaproponowane przez naszą grupę mapowanie mikromacierzowe oparte jest o ogólną wiedzę o strukturze drugorzędowej RNA i termodynamice tworzonych podczas hybrydacji dupleksów hybrydacyjnych.

W strukturze drugorzędowej dowolnej cząsteczki RNA można wyróżnić rejony dwuniciowe oraz jednoniciowe (pętle struktur spinkowych, wybrzuszenia, terminalne niesparowane końce). Idea badań z wykorzystaniem mikromacierzy opiera się na oddziaływaniach oligonukleotydowych sond znajdujących się na mikromacierzy z dostępnymi jednoniciowymi i komplementarnymi rejonami w badanym RNA. Rejony dwuniciowe nie mogą oddziaływać z sondami oligonukleotydowymi, ponieważ są już zaangażowane w oddziaływania wodorowe (Rysunek 1). Ponieważ badany RNA zostaje przed hybrydacją wyznakowany radioaktywnie lub fluorescencyjnie, możliwa jest więc łatwa detekcja powstałych dupleksów hybrydacyjnych. Otrzymane podczas hybrydacji informacje o jednoniciowych rejonach w badanym RNA zostają następnie wykorzystane (w formie tzw. ograniczników, ang. *constraints*) do udokładniania przewidywanej struktury drugorzędowej z użyciem programów komputerowych takich jak Mfold lub RNAstructure. Wprowadzone do tych programów ograniczniki procesu fałdowania struktury drugorzędowej RNA powodują, że generowane są jedynie struktury drugorzędowe o najniższej energii swobodnej (ΔG°_{37}), które równocześnie są zgodne z danymi eksperymentalnymi.

Ponieważ mapowanie mikromacierzowe służy określeniu struktury drugorzędowej RNA istotnym jest, aby podczas hybrydacji badanego RNA na mikromacierzy nie następowało zaburzenie jego natywnej struktury. Analiza struktur drugorzędowych wielu RNA pokazuje, że fragmenty jednoniciowe są krótkie, przeciętnie 4-6 nukleotydowe. Należy jednak pamiętać, że nawet we fragmentach jednoniciowych mamy do czynienia z słabymi,

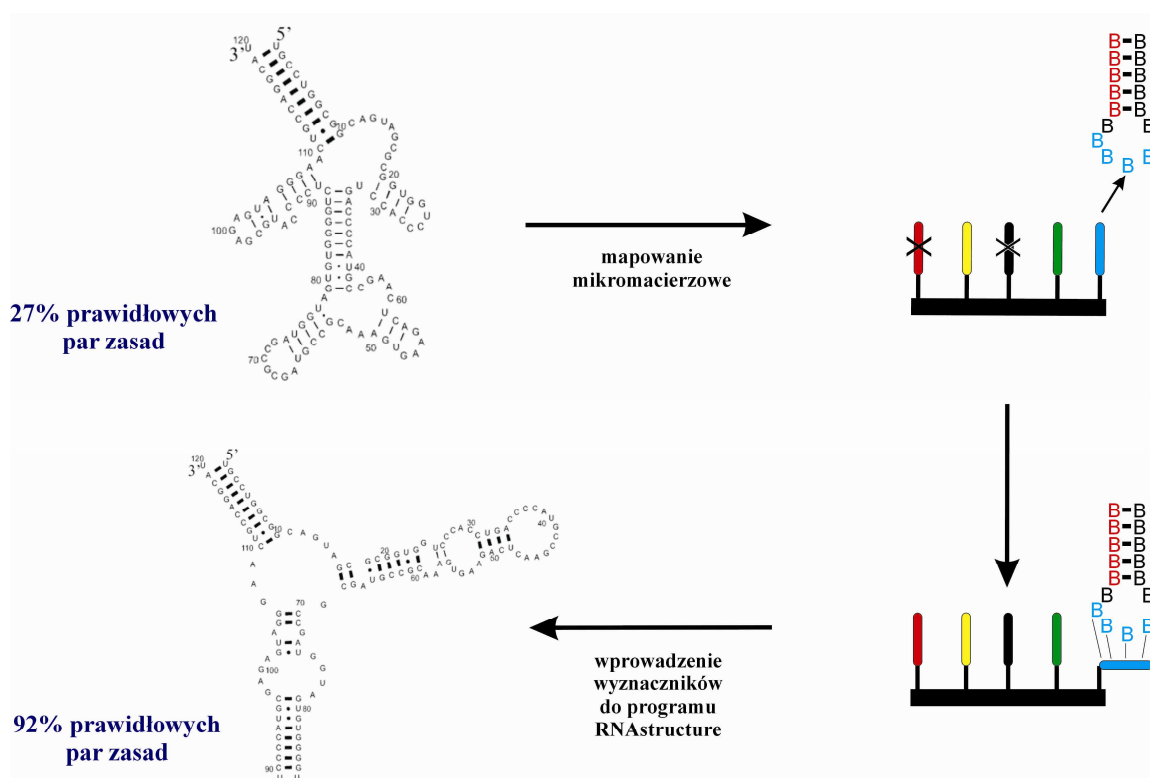
niekanonicznymi oddziaływaniami zasad czy ich udziałem w oddziaływaniach trzeciorzędowych (4). Fakt, że fragmenty jednoniciowe w RNA są krótkie oraz wymóg, że oddziaływanie sondy oligonukleotydowej i jednoniciowego fragmentu nie powinno zaburzać natywnej struktury badanego RNA sprawiło, że do mapowania mikromacierzowego użyto krótkich, 5-7 nukleotydowych sond hybrydizacyjnych. Prowadzi to do pewnych trudności, gdyż skracanie długości sond oligonukleotydowych zmniejsza trwałość termodynamiczną tworzonych dupleksów hybrydizacyjnych. Należało więc zastosować takie modyfikowane nukleotydy, które po wprowadzeniu do sond oligonukleotydowych zwiększałyby trwałość termodynamiczną dupleksów hybrydizacyjnych a jednocześnie nie wpływały na selektywność procesu hybrydizacji.

1.3. Mikromacierze nieizoenergetyczne

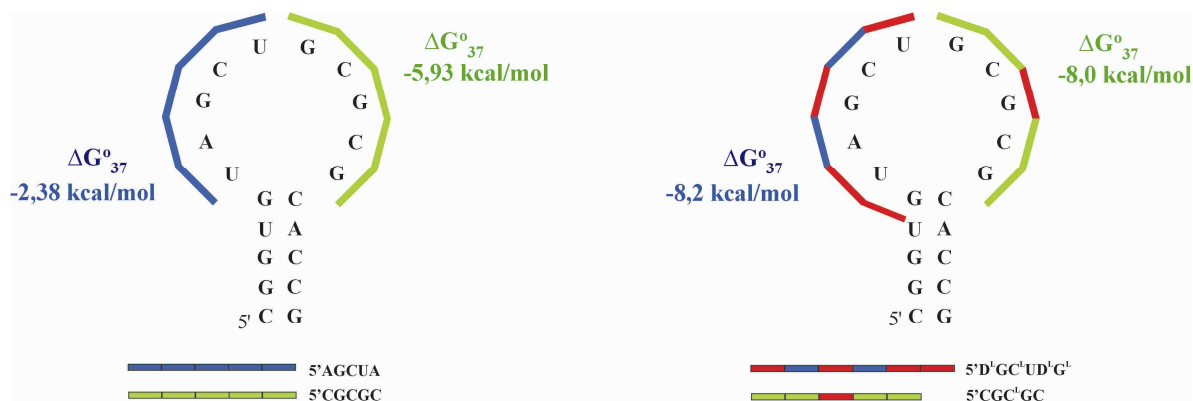
Na pierwszych etapach badania struktury RNA za pomocą mikromacierzy użyto sond 2'-O-metylo-heptanukleotydowych (22). Mikromacierze te zostały nazwane nieizoenergetycznymi, w przeciwieństwie do wprowadzonych później i wykorzystanych w badaniach przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej mikromacierzy izoenergetycznych. Użycie 2'-O-metylowanych sond zwiększyło trwałość termodynamiczną tworzonych dupleksów hybrydizacyjnych w stosunku do sond RNA czy DNA o 0,1-0,3 kcal/mol w przeliczeniu na każdy 2'-O-metylowy nukleotyd w sondzie (23). Ponadto, jako dodatkowy atut 2'-O-metylowanych sond należy wymienić łatwiejszą i tańszą ich chemiczną syntezę oraz zwiększoną stabilność chemiczną i enzymatyczną (24, 25).

Jako cząsteczkę modelową do tych badań wybrano 5S rRNA z *E. coli*, którego struktura była zaproponowana na podstawie badań NMR (26), krystalograficznych (27) oraz porównań filogenetycznych (28). Jednakże struktura drugorzędowa tej cząsteczki generowana przez Mfold (8) i RNAstructure (29) wykazywała tylko 27% par zasad zgodnych z strukturą filogenetyczną. Mapowanie struktury 5S rRNA za pomocą nieizoenergetycznych mikromacierzy dostarczyło informacji, które pozwoliły zaproponować strukturę drugorzędową zawierającą 92% par zasad zgodnych ze strukturą filogenetyczną (Rysunek 1). Ponadto pokazano, że za pomocą mapowania mikromacierzowego możliwe jest określenie struktury konformerów A i B 5S rRNA oraz odróżnienie ich od siebie (22). Przeprowadzone badania wykazały zalety i użyteczność nowej metody, ale również pozwoliły dostrzec jej wady wynikające z różnej trwałości termodynamicznej tworzonych dupleksów hybrydizacyjnych. Dla tej samej długości dupleksów hybrydizacyjnych ich trwałość

termodynamiczna zależy od sekwencji oligonukleotydów. Zostało to zilustrowane na poglądowej spince RNA przedstawionej z lewej strony rysunku 2. Wiadomo, że dupлексы zawierające pary G-C są znacznie trwalsze termodynamicznie od bogatych w pary A-U. Na rysunku 2 pokazano, że fragment pętli bogaty w adenozyne i urydyny tworzy przykładowy dupлекс hybrydacyjny z 2'-O-metylowaną sondą o energii swobodnej (ΔG°_{37}) równej -2,38 kcal/mol. Natomiast fragment pętli bogaty w cytydyny i guanozyny tworzy z komplementarną sondą znacznie stabilniejszy dupлекс, o wartości energii swobodnej wynoszącej -5,93 kcal/mol. Sondy oligonukleotydowe mogą tworzyć dupлексы z obydwoma pętlami, jednakże dupлекс bogaty w pary A-U nie jest na tyle trwały termodynamicznie, żeby jego detekcja była możliwa. Utrudnia to znacznie interpretację wyników mapowania mikromacierzowego, gdyż o detekcji miejsca hybrydacji sondy decyduje nie tylko obecność komplementarnego jednoniciowego fragmentu w badanym RNA, ale również sekwencja dupлексов hybrydacyjnych (w domyśle ich trwałość termodynamiczna).



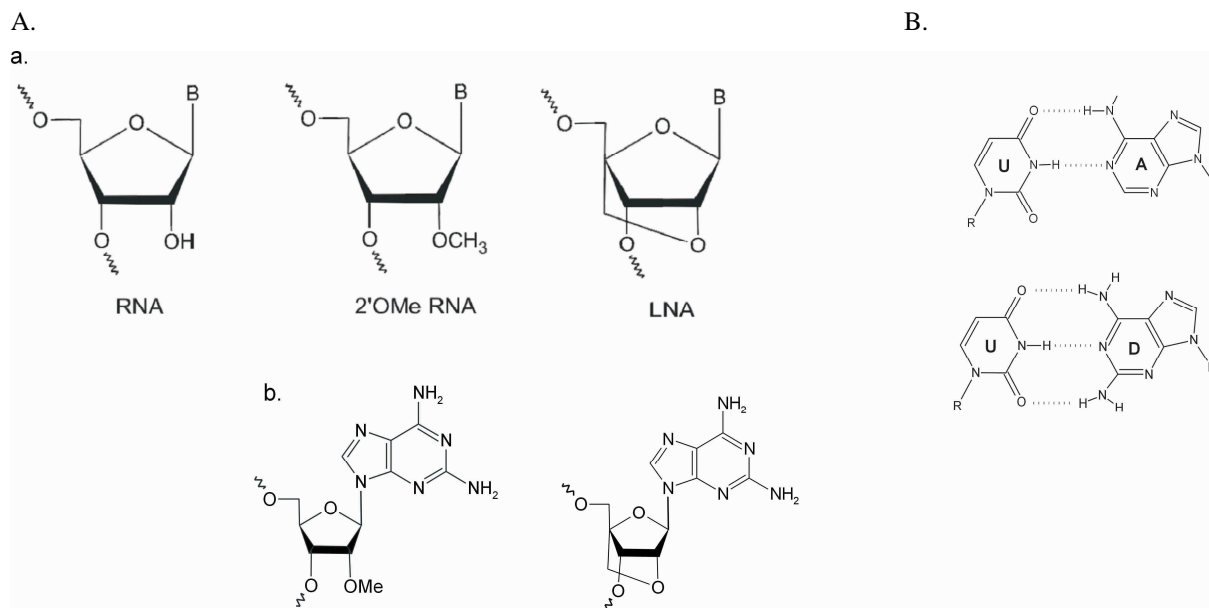
Rysunek 1. Prawa część rysunku pokazuje idee mapowania mikromacierzowego. Tylko rejonny dostępne, jednoniciowe mogą wiązać się z sondą na mikromacierzy. Mapowanie przy użyciu mikromacierzy nieizoenergetycznych pozwoliło wygenerować strukturę 5S rRNA z *E. coli*, wykazującą 92% zgodnych par zasad ze strukturą filogenetyczną (22). Wiązania pomiędzy poprawnymi parami zasad oznaczono pogrubioną linią.



Rysunek 2. Model oddziaływania sond zlokalizowanych na mikromacierzy z przykładową spinką RNA. Spinka po lewej obrazuje oddziaływanie z sondami nieizoenergetycznymi, natomiast spinka po prawej z sondami izoenergetycznymi zawierającymi LNA modyfikowane nukleotydy (nukleotydy o usztywnionej konformacji rybozy, ang. *Locked Nucleic Acids*). Wprowadzenie modyfikacji powoduje zwiększenie i ujednocnienie trwałości termodynamicznej tworzonych dupleksów hybrydyzacyjnych. Ich detekcja jest zależna jedynie od dostępności w badanym RNA fragmentów jednoniciowych, a nie od sekwencji dupleksów hybrydyzacyjnych.

1.4. Mikromacierze izoenergetyczne

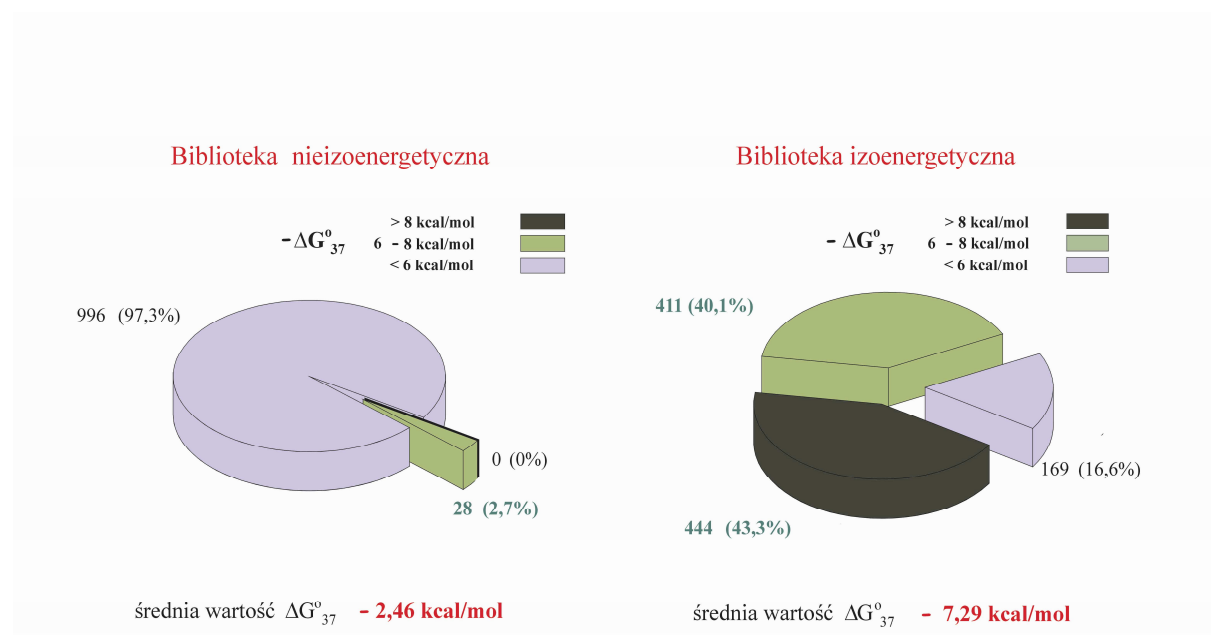
Z powodu różnej trwałości termodynamicznej dupleksów hybrydyzacyjnych koniecznym stało się zaprojektowanie nowego typu mikromacierzy, a mianowicie mikromacierzy izoenergetycznych. Zbudowane są one sond, które tworzą dupлексы hybrydyzacyjne o zbliżonej (teoretycznie równej) wartości energii swobodnej (a więc izoenergetyczne), niezależnie od sekwencji. Dla osiągnięcia takich efektów należało użyć modyfikowane nukleotydy, które zwiększyłyby trwałość termodynamiczną dupleksów hybrydyzacyjnych. Choć istnieje wiele możliwości modyfikowania nukleotydów tylko część z modyfikacji zwiększa trwałość termodynamiczną zawierających je dupлексы. Do stworzenia izoenergetycznych sond zostały wykorzystane nukleotydy LNA (ang. *Locked Nucleic Acids*), 2'-O-metylo-2,6-diaminopurynorybozyd oraz LNA-2,6-diaminopurynorybozyd. Ich strukturę przedstawiono na rysunku 3. Nukleotydy typu LNA powstają dzięki wprowadzeniu mostka metylenowego pomiędzy atomami O2' i C4' pierścienia rybozy, co powoduje ich usztywnienie w konformacji C3'-endo. Jak dotąd LNA są najsilniej stabilizującymi modyfikacjami, jakie zostały opisane w literaturze (30-35). W przypadku 2'-O-metylo-2,6-diaminopurynorybozydu użytego zamiast adenozy, zwiększoną trwałość dupлексы uzyskuje się dzięki obecności dodatkowego wiązania wodorowego utworzonego podczas oddziaływania z komplementarną urydyną (36, 37) (Rysunek 3). Łatwo można wywnioskować, iż zastosowanie LNA-2,6-diaminopurynorybozydu będzie prowadzić do dodatkowej stabilizacji, wynikającej zarówno z obecności dodatkowego wiązania wodorowego, jak i mostka metylenowego prowadzącego do powstania nukleotydu typu LNA.



Rysunek 3. (A) (a) Struktura rybozy w RNA oraz w modyfikowanych nukleotydach, (b) struktura 2'-O-metylo-2,6-diaminopurynorybozydu oraz LNA-2,6-diaminopurynorybozydu (B) pokazano wiązania wodorowe typu W-C pomiędzy adenozyną i urydyną oraz wiązania wodorowe pomiędzy 2,6-diaminopurynorybozydem (D) a urydyną .

Badania modelowe wykazały, że aby była możliwa detekcja dupleksów hybrydacyjnych, wartość ich energii swobodnej (ΔG°_{37}) musi być równa lub korzystniejsza niż -6 kcal/mol. Wprowadzenie w określonych pozycjach sond oligonukleotydowych wyżej wymienionych modyfikacji, zwiększyło na tyle trwałość dupleksów, że pozwoliło na skrócenie długości sond do pentanukleotydów. Jest to niezwykle istotne, gdyż pulę wszystkich możliwych pentanukleotydów stanowią 1024 oligonukleotydy. Jest to realna do zsyntetyzowania liczba oligonukleotydów, umożliwiającą utworzenie biblioteki izoenergetycznych sond, w przeciwieństwie do 4096 czy 16384 sond w przypadku gdyby tworzyły ją odpowiednio heksanukleotydy czy heptanukleotydy. Dla niektórych sond, zwłaszcza tych bogatych w reszty urydyny, na końcu 3' dodano LNA guanozynę (G^L), która poprzez niekanoniczne oddziaływania wzmacnia dodatkowo trwałość dupleksów bez zaburzenia selektywności pentanukleotydowego fragmentu sondy (38). Na omawianym już wcześniej rysunku 2, z prawej strony pokazana jest modelowa spinka, do której hybrydują sondy izoenergetyczne z wprowadzonymi w określone pozycje modyfikacjami. Jak pokazano, trwałość termodynamiczna (ΔG°_{37}) takich dupleksów jest znacznie korzystniejsza niż w przypadku sond nieizoenergetycznych, a dodatkowo bardzo do siebie zbliżona, równa odpowiednio -8,2 i -8,0 kcal/mol. W konsekwencji o detekcji takiego duplesu hybrydacyjnego decyduje tylko obecność jednoniciowego i komplementarnego rejonu w badanym RNA a nie jego sekwencja, jak to było w przypadku sond nieizoenergetycznych. Wprowadzenie LNA nukleotydów do

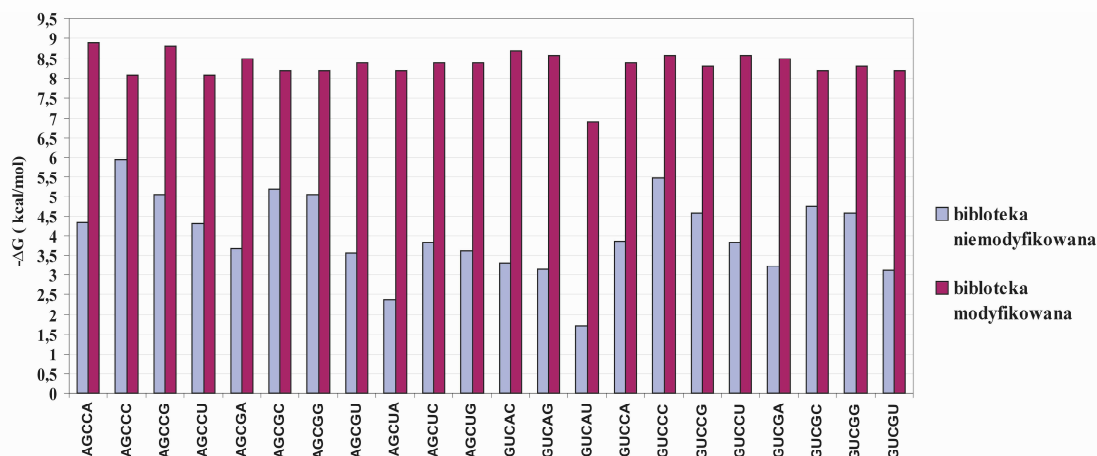
sond spowodowało, iż wartość energii swobodnej dupleksów hybrydacyjnych równą lub korzystniejszą niż -6 kcal/mol uzyskało dla 855 z 1024 możliwych izoenergetycznych sond oligonukleotydowych. Zostały one chemicznie zsyntetyzowane w naszej pracowni i stanowią bibliotekę, która może być wykorzystana do mikromacierzowego badania struktury drugorzędowej dowolnego RNA. Statystyka bibliotek nieizoenergetycznych i izoenergetycznych została przedstawiona na rysunku 4. Pokazuje ona, że w przypadku biblioteki nieizoenergetycznej możliwe byłoby otrzymanie tylko 28 (2,7%) pentamerowych sond, które tworzyłyby na tyle trwałe dupлексы hybrydacyjne, aby można było je wykryć. W przypadku biblioteki izoenergetycznej takich sond jest 855, co stanowi 83,4%. W tabeli 1 pokazano fragment zsyntetyzowanej w naszej pracowni biblioteki wraz z zyskiem energetycznym uzyskanym dzięki wprowadzonym modyfikacjom. Natomiast wykres na rysunku 5 obrazuje porównanie energie swobodnych nieizoenergetycznej i izoenergetycznej biblioteki pentanukleotydów. W przypadku biblioteki izoenergetycznej energie swobodne dupлексы są korzystniejsze i niemalże wyrównane.



Rysunek 4. Rozkład trwałości termodynamicznej dupлексы tworzonych przez sondy pentamerowe należące do biblioteki nieizoenergetycznej oraz izoenergetycznej. W przypadku biblioteki nieizoenergetycznej tylko 2,7% stanowią sondy mogące tworzyć dupлексы o trwałości wystarczającej do detekcji. W bibliotece izoenergetycznej ilość ta wzrasta do 83,4%

Tabela 1. Fragment izoenergetycznej biblioteki nukleotyduowej, podano zysk energetyczny uzyskany po wprowadzeniu modyfikacji oraz zaznaczono modyfikowane reszty 2'-O-metylowane (czarne), LNA (czerwone) i dodatkową LNA G (niebieskie).

sonda	sekwencja	ΔG°_{37}	dodatkowa $\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ z modyfikacji	ΔG°_{37} modyfikowanego dupleksu	modyfikowana sonda
149	AGCCA	-4.34	0.8, 1.4, 1.0, 1.4	-8.9	AGCCDG
150	AGCCC	-5.94	0.8, 1.4	-8.1	AGCCC
151	AGCCG	-5.04	0.8, 1.6, 1.4	-8.8	AGCCGG
152	AGCCU	-4.31	0.8, 1.6, 1.4	-8.1	AGCCUG
153	AGCGA	-3.68	1.0, 1.9, 1.9	-8.5	DGCGDG
154	AGCGC	-5.20	2.0, 1.0	-8.2	AGCGC
155	AGCGG	-5.04	2.0, 1.2	-8.2	AGCGG
156	AGCGU	-3.57	1.0, 1.6, 0.8, 1.4	-8.4	DGCGUG
157	AGCUA	-2.38	1.0, 1.5, 1.9, 1.4	-8.2	DGCUUG
158	AGCUC	-3.85	0.5, 1.5, 1.2, 1.4	-8.4	DGCUCG
159	AGCUG	-3.61	0.5, 1.5, 1.4, 1.4	-8.4	DGCUGG
722	GUCAC	-3.31	1.2, 1.0, 1.8, 1.4	-8.7	GUCDCG
723	GUCAG	-3.15	1.2, 1.0, 1.8, 1.4	-8.6	GUCDGG
724	GUCAU	-1.72	0.4, 1.2, 1.0, 1.2, 1.4	-6.9	GUCDUG
725	GUCCA	-3.88	2.1, 1.0, 1.4	-8.4	GUCDCG
726	GUCCC	-5.48	2.1, 1.0	-8.6	GUCCC
727	GUCCG	-4.58	0.4, 2.1, 1.2	-8.3	GUCCG
728	GUCCU	-3.85	2.1, 1.2, 1.4	-8.6	GUCCUG
729	GUCGA	-3.22	2.1, 1.8, 1.4	-8.5	GUCGDG
730	GUCGC	-4.74	0.4, 2.1, 1.0	-8.2	GUCGC
731	GUCGG	-4.58	0.4, 2.1, 1.2	-8.3	GUCGG
732	GUCGU	-3.11	0.4, 2.1, 1.2, 1.4	-8.2	GUCGUG



Rysunek 5. Różnice w energii swobodnej przykładowych dupleksów hybrydacyjnych utworzonych przez nieizoenergetyczne (niebieskie słupki) i izoenergetyczne (fioletowe słupki) sondy oligonukleotyduowe.

1.5. Podstawy termodynamiczne projektowania macierzy izoenergetycznych

Wprowadzenie modyfikowanej reszty nukleotyduowej do dupleksu wpływa na jego trwałość termodynamiczną. Efekt ten jest bardzo złożony i zależy od wielu nie dających się dokładnie przewidzieć czynników. Z tego powodu zaprojektowanie i przygotowanie izoenergetycznej biblioteki pentamerowych sond poprzedzone było szczegółowymi badaniami termodynamicznymi odpowiednich modelowych dupleksów. W pierwszej

kolejności zbadano wpływ modyfikowanych reszt nukleotydowych na trwałość termodynamiczną dupleksów 2'-O-MeRNA/RNA (zapis 2'-O-MeRNA/RNA oznacza, że jedną nic dupleksu stanowią 2'-O-metylowane oligorybonukleotydy a drugą oligorybonukleotydy) w zależności od ich położenia i sąsiedztwa w dupleksie. Badania te wykazały, że największą stabilizację dupleksu uzyskuje się wprowadzając reszty nukleotydów LNA oraz 2'-O-metylo-2,6-diaminopurynorybozyd (D^M) czy LNA-2,6-diaminopurynorybozyd (D^L) w pozycję środkową dupleksu 2'-OMeRNA/RNA. Zmiana energii swobodnej (ΔG_{37}^0) wynosiła wtedy od -0,4 do -2,5 kcal/mol, w zależności od charakteru modyfikowanego nukleotydu oraz par zasad z nim sąsiadujących. Średnio wprowadzenie pojedynczego nukleotydu LNA zwiększało trwałość termodynamiczną dupleksu o 1,5 kcal/mol. Najmniejszą stabilizację, wynoszącą od 0,3 do 0,6 kcal/mol, średnio 0,5 kcal/mol, uzyskuje się wprowadzając modyfikowany nukleotyd w pozycję 5'-końcową dupleksu. Natomiast wprowadzenie modyfikowanego nukleotydu w pozycję 3'-końcową wywołuje efekt bardzo zależny od rodzaju wprowadzonej modyfikacji. W przypadku gdy jest to A^L , C^L lub G^L średnio uzyskuje się zwiększenie trwałości termodynamicznej dupleksu o około 1,2 kcal/mol. Wprowadzenie w to położenie U^L lub D^M stabilizuje już tylko o odpowiednio 0,1 i 0,4 kcal/mol. Wpływ poszczególnych modyfikowanych nukleotydów na trwałość termodynamiczną dupleksów zestawiono w tabeli 2 (39, 40). Kolejnym krokiem było porównanie zgodność przewidywanych i określonych eksperymentalnie wartości energii swobodnej dupleksów zawierających więcej niż jeden nukleotyd LNA. Stwierdzono, że zgodność ta wynosi powyżej 95%, a efekty termodynamiczne spowodowane wprowadzeniem modyfikowanego nukleotydu są addytywne. Eksperymenty te prowadzone były na dużej grupie modelowych dupleksów 2'-OMeRNA/RNA. Badano wpływ na trwałość termodynamiczną dupleksów nukleotydów typu LNA oraz D^M umieszczonych w różnych pozycjach dupleksu (39, 40). Zbadano także, jaki wpływ na wielkość efektu stabilizującego mają nukleotydy sąsiadujące bezpośrednio z nukleotydem LNA. Tak obszerne badania modelowych dupleksów umożliwiły obliczenie wszystkich parametrów termodynamicznych modelu najbliższego sąsiedztwa, co w rezultacie pozwala z ponad 95% dokładnością obliczyć trwałość termodynamiczną dowolnego dupleksu 2'-O-MeRNA/RNA, zawierającego dowolny nukleotyd typu LNA lub D^M . Bardzo istotne w prawidłowej interpretacji wyników pochodzących z hybrydyzacji do izoenergetycznych mikromacierzy jest odróżnienie dupleksów w pełni komplementarnych od takich, które zawierają niesparowania. W tym celu zbadano również wpływ pojedynczych niesparowań utworzonych z udziałem nukleotydów LNA i nukleotydu D^M na trwałość termodynamiczną dupleksów 2'-O-MeRNA/RNA.

Badania wykazały, że niesparowania destabilizują dupлексы o 1,6 do 7,0 kcal/mol, w zależności od typu niesparowania i jego położenia w dupлексы. Największą destabilizację trwałości obserwuje się, gdy niesparowanie znajduje się w części środkowej dupлексы (Tabela 3), w pozycjach terminalnych efekt destabilizacji jest niewielki (39, 40). Jak wcześniej wspomniano w przypadku szeregu sond zdecydowano się na wprowadzenie dodatkowej reszty G^L na ich końcu 3'. Decyzję tą poprzedziły również badania, które doprowadziły do wniosków, iż większy i bardziej wyrównany wpływ na trwałość termodynamiczną dupлексы ma umieszczenie takiej reszty na końcu 3' niż na końcu 5'. Zwiększenie trwałości wynosi wówczas -3,4 kcal/mol, gdy G^L oddziałuje z C oraz -1,5 kcal/mol dla G^L parującego się z A, G lub U. Ponadto, obecność 3'-terminalnej G^L zwiększa selektywność parowania z komplementarnym oligonukleotydem Obecność w pozycji 3'-terminalnej G^L może w określonych sytuacjach prowadzić do niejednoznacznych wyników dlatego też wymaga ostrożnej analizy, zwłaszcza gdy paruje się cytydyną, a równocześnie inne niesparowanie znajduje się w pozycji wewnętrznej dupлексы. Chcąc w przyszłości uzyskać uniwersalny poziom zwiększenia stabilności termodynamicznej dupлексы hybrydacyjnego w późniejszych badaniach z powodzeniem użyto interkalacyjnego pseudonukleotydu (IPN ang. *Intercalating Pseudo-Nucleotide*) w pozycji 3'-terminalnej sondy. W tym przypadku uzyskano równe, wynoszące 2,3 kcal/mol zwiększenie stabilności termodynamicznej dupлексы hybrydacyjnego, niezależnie od natury nukleotydu w przeciwnym łańcuchu (38).

Tabela 2. Wpływ na trwałość termodynamiczną dupлексы 2'-OMeRNA/RNA zawierających modyfikowane nukleotydy typu LNA, w zależności od rodzaju modyfikacji i jej położenia w dupлексы.

rodzaj modyfikacji	$\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ (kcal/mol)		
	modyfikacja w pozycji 5'-końcowej	modyfikacja w części środkowej	modyfikacja w pozycji 3'-końcowej
D ^M	0,5	0,4-1,1	0,4
D ^L	1,0	2,0-2,5	1,4
U ^L	0,5	1,0-1,4	0,1
C ^L	0,4	1,4-2,4	1,0
G ^L	0,3	0,8-2,1	1,3
A ^L	0,6	1,0-1,4	1,4

Tabela 3. Wpływ niesparowań z udziałem modyfikowanych nukleotydów typu LNA występujących w środkowej części dupletu 2'-OMeRNA/RNA.

→ w 2'-OMeRNA	A ^L	C ^L	G ^L	U ^L	D ^L	D ^M
↓ w RNA	ΔΔG ^o ₃₇ (kcal/mol)					
A	3,07	6,67	5,62-5,77	0	4,36-5,91	2,67-4,78
C	3,20-3,40	7,10	0	2,84-4,04	2,99-3,03	1,57-2,25
G	2,25-4,21	0	4,97	2,20	4,07-5,74	3,54-4,14
U	0	4,82-7,13	3,04-3,23	4,89	0	0

W oparciu o uzyskane, z licznych eksperymentów termodynamicznych, dane sformułowano równanie pozwalające obliczyć trwałość dowolnego dupletu LNA-2'-OMeRNA/RNA:

$$\Delta G^o_{37} (\text{LNA modyfikowany oligonukleotyd/RNA}) = \Delta G^o_{37} (2'\text{-OMeRNA/RNA}) - 0,53n_{5'tL} - 1,28n_{iAL/UL} - 1,34n_{iDL} - 1,58n_{iGL/CL} - 1,23n_{3'tAL/CL/GL/DL} - 0,14n_{3'tUL} - 1,50n_{\text{add.3'GLmismatch}}$$

gdzie: ΔG^o_{37} (2'-OMeRNA/RNA) oznacza zmianę energii swobodnej w 37°C dla dupletu nie zawierającego nukleotydów LNA; $n_{5'tL}$ oznacza liczbę 5'-terminalnych nukleotydów LNA (0 lub 1); $n_{iAL/UL}$, n_{iDL} oraz $n_{iGL/CL}$ oznaczają liczbę wewnętrznych nukleotydów LNA odpowiednio w parach A-U, D-U i G-C; $n_{3'tAL/CL/GL/DL}$ i $n_{3'tUL}$ oznaczają liczbę 3'-terminalnych LNA nukleotydów (0 lub 1), które odpowiednio nie są lub są nukleotydami U^L; $n_{\text{add.3'GLmismatch}}$ oznacza liczbę (0 lub 1) dodatkowych 3'-terminalnych G^L w niesparowaniach G-A, G-G i G-U (41).

Natomiast zmianę energii swobodnej dla dupletów 2'-OMeRNA/RNA oblicza się według równania:

$$\Delta G^o_{37} (2'\text{-OMeRNA/RNA}) = \Delta G^o_{\text{init}} + \sum n_j \Delta G^o_j(\text{NN}) + m_{\text{term-AU}} \Delta G^o_{\text{term-AU}}$$

gdzie: ΔG^o_{init} oznacza zmianę energii swobodnej inicjacji; $\sum n_j \Delta G^o_j(\text{NN})$ oznacza sumę energii swobodnych parametrów najbliższego sąsiedztwa występujących w danym duplesie uwzględniając ich ilość (n_j) i rodzaj ($\Delta G^o_j(\text{NN})$); $m_{\text{term-AU}}$ oznacza liczbę terminalnych par A-U; $\Delta G^o_{\text{term-AU}}$ oznacza zmianę energii swobodnej dla terminalnej pary A-U (39). Parametry termodynamiczne modelu najbliższego sąsiedztwa dla dupletów 2'-OMeRNA/RNA podano w tabeli 4.

Tabela 4. Parametry termodynamiczne modelu najbliższego sąsiedztwa dla dupleksów 2'-OMeRNA/RNA w 0,1 M NaCl, pH 7 (42).

parametry	$\Delta G^{\circ}_{37}(\text{kcal/mol})$	$\Delta H^{\circ}_{37}(\text{kcal/mol})$	$\Delta S^{\circ}(\text{eu})$	występowanie*
m(5'-AA)/r(3'-UU)	-0.60±0.11	-9.16±2.24	-27.6±7.20	18
m(5'-AU)/r(3'-UA)	-0.83±0.12	-6.39±2.44	-17.9±7.80	17
m(5'-UU)/r(3'-AA)	-0.94±0.10	-5.67±2.09	-15.3±6.70	19
m(5'-AD)/r(3'-UU)	-0.97±0.30	-7.45±6.07	-20.9±19.4	2
m(5'-UA)/r(3'-AU)	-1.13±0.14	-5.26±2.83	-13.3±9.00	27
m(5'-DA)/r(3'-UU)	-1.28±0.27	-11.25±5.46	-32.1±17.4	4
m(5'-UD)/r(3'-AU)	-1.55±0.31	-3.05±6.19	-4.8±19.8	5
m(5'-AC)/r(3'-UG)	-1.59±0.15	-6.14±3.02	-14.7±9.70	85
m(5'-DU)/r(3'-UA)	-1.72±0.41	-10.73±8.22	-29.1±26.3	1
m(5'-AG)/4(3'-UC)	-1.75±0.14	-12.46±2.79	-34.5±8.90	17
m(5'-DC)/r(3'-UG)	-1.84±0.25	-8.95±4.98	-22.9±15.9	7
m(5'-CA)/r(3'-GU)	-1.87±0.14	-4.82±2.90	-9.5±9.30	74
m(5'-UC)/r(3'-AG)	-1.88±0.15	-9.61±3.04	-24.9±9.70	21
m(5'-UG)/r(3'-AC)	-1.94±0.15	-12.68±3.06	-34.6±9.80	19
m(5'-CD)/r(3'-GU)	-1.99±0.25	-4.03±5.03	-6.6±16.1	4
m(5'-GA)/r(3'-CU)	-2.08±0.16	-5.37±3.31	-10.6±10.6	15
m(5'-CU)/r(3'-GA)	-2.16±0.14	-9.69±2.92	-24.3±9.30	41
m(5'-GU)/r(3'-CA)	-2.18±0.15	-7.15±2.94	-16.0±9.40	16
m(5'-DG)/r(3'-UC)	-2.29±0.42	-17.84±8.27	-50.1±26.4	1
m(5'-CG)/r(3'-GC)	-2.35±0.15	-9.79±2.97	-24.0±9.50	25
m(5'-GD)/r(3'-CU)	-2.42±0.32	-7.98±6.52	-17.9±20.8	2
m(5'-CC)/r(3'-GG)	-2.81±0.09	-9.80±1.82	-22.5±5.80	45
m(5'-GG)/r(3'-CC)	-2.85±0.16	-10.29±3.21	-24.0±10.3	19
m(5'-GC)/r(3'-CG)	-2.98±0.17	-10.01±3.40	-22.7±10.9	24
Inicjacja	3.31±0.51	-12.57±10.36	-51.2±33.1	84
Terminalna AU	0.27±0.07	3.01±1.49	8.8±4.80	120

*-występowanie oznacza ile razy dany parametr występował w puli oligonukleotydów poddanych obliczeniom.

Pewną niedogodnością mikromacierzy zbudowanych z krótkich sond jest możliwość wystąpienia tej samej sekwencji w badanym RNA więcej niż jeden raz. Jednak niewątpliwą, korzystną cechą izoenergetycznych krótkich, bo pentamerowych sond jest ich zwiększona selektywność. Mianowicie, obecność pojedynczego niesparowania w krótkim duplesie hybrydacyjnym wprowadza względnie większe zmiany w jego trwałości termodynamicznej niż przypadku, gdy dupleks utworzony jest przez długą sondę oligonukleotydową. Ponadto cała pentanukleotydowa biblioteka jest na tyle mała, że umożliwia przygotowanie mikromacierzy uniwersalnych, czyli zawierających wszystkie sondy, które następnie mogą być wykorzystane do badania struktury dowolnego RNA.

Mikromacierze przygotowywane są na aminosilanizowanych płytkach mikroskopowych pokrytych 2% agarozą. Grupy aldehydowe reagują z modyfikowaną płytką, co zwiększa przyczepność agarozy do szkła. Dzięki agarozie uzyskuje się trójwymiarową powierzchnię mikromacierzy. Agarozę aktywowaną jest nadjodanem sodu, co umożliwia kowalencyjne związanie sondy, która na końcu 5' posiada C6-aminoheksylowy łącznik (43).

1.6. Zastosowanie izoenergetycznych mikromacierzy do badania struktury drugorzędowej RNA

Badania z wykorzystaniem izoenergetycznych mikromacierzy poprzedzono pracami, w wyniku, których uzyskano drogą syntezy chemicznej a następnie oczyszczono całą, liczącą 855 sond bibliotekę izoenergetyczną. Dzięki temu możliwe jest wykorzystanie izoenergetycznych mikromacierzy do zbadania struktury dowolnego RNA.

Równoległe z badaniami prowadzonymi w ramach niniejszej pracy, izoenergetyczne mikromacierze zbudowane z sond pochodzących z pentaoligonukleotydowej biblioteki zostały użyte do zbadania struktury R2 5'RNA z *Bombyx mori* (R2Bm 5'RNA). Ten 323 nukleotydowy, niedawno odkryty, regulatorowy RNA wpływa na zmianę funkcji białka R2 podczas retrotranspozycji. Ustalano, że R2Bm 5'RNA decyduje o wiązaniu DNA przez białko R2 poniżej miejsca insercji retrotranspozonu i odpowiednio usytułowuje białko R2 do cięcia jednej z nici DNA. W procesie retrotranspozycji, dwie cząsteczki białka R2 rozpoznają odpowiednio miejsce powyżej i poniżej insercji transpozonu w genomie. Białko R2 związane powyżej miejsca insercji wiąże koniec 3' R2 RNA i nacina dolną nić DNA. Uwolniony koniec 3'-hydroksylowy DNA służy, jako starter w syntezie nici (-) DNA R2. Natomiast białko R2 związane poniżej miejsca insercji wiąże koniec 5' R2 RNA, trawi górną nić DNA, a domena polimerazowa przeprowadza syntezę nici (+) DNA retrotranspozonu. Dla R2 3'RNA ustalono strukturę drugorzędową oraz stwierdzono, że jest ona konserwatywna wśród spokrewnionych organizmów (44). Mimo określenia ważnej funkcji biologicznej R2Bm 5'RNA jego struktura nie była znana (45). Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że mapowanie mikromacierzowe daje rezultaty o wysokiej zgodności z mapowaniem chemicznym i pozwoliły zaproponować strukturę drugorzędową tego RNA (41). W dalszych badaniach na podstawie mapowania mikromacierzowego oraz mapowania chemicznego i porównania sekwencji zaproponowano struktury drugorzędowe dla czterech kolejnych R2 5'RNA pochodzących z blisko spokrewnionych organizmów: *Samia cynthia*, *Coscinoera hercules*, *Callosamia promethea* oraz *Saturnia pyri*. Ponadto porównując pierwszo- i drugorzędowe struktury wszystkich pięciu R2 5'RNA zaobserwowano konserwatywne strukturalnie rejony. Zaobserwowano, że jeśli w rejonie konserwatywnym występuje mutacja to jest ona kompensowana mutacją w przeciwległej nici tak, aby zachowane było parowanie zasad i struktura konserwatywnego elementu (46).

W Pracowni Chemii RNA wykazano również użyteczność izoenergetycznych mikromacierzy do wykrywania subtelných różnic w strukturze i dostępności dla sond różnych tRNA. Do badań wybrano dwie pary tRNA: tRNA^{Phe} z *Saccharomyces cerevisiae* oraz jego

niemodyfikowany transkrypt, jak również inicjatorowy tRNA^{Met} oraz elongacyjny tRNA^{Met} z *Lupinus Luteus*. Dla obu badanych par wykazano różnice w dostępności dla izoenergetycznych sond. W przypadku tRNA^{Phe} mikromacierze pozwoliły zaobserwować wpływ modyfikacji na jego pofałdowanie w porównaniu z transkrypcją. W przypadku tRNA^{Met} również zaobserwowano istotne różnice pomiędzy cząsteczką inicjatorową a elongacyjną (47, 48).

Metoda mapowania mikromacierzowego może mieć znacznie szersze zastosowanie niż tylko badanie struktury cząsteczki RNA. Wstępne badania wykazują, że może być użyteczna do badania struktury kompleksów RNA z innymi biomolekułami takimi jak białka, antybiotyki, różnego typu metabolity czy inne cząsteczki RNA. Pierwsze tego typu eksperymenty zostały przeprowadzone w ramach niniejszej pracy doktorskiej.

2. Bakteryjne niekodujące RNA

2.1. Wprowadzenie

W celu adaptacji do zmieniających się warunków środowiska organizmy bakteryjne potrzebują mechanizmów zapewniających dynamiczne zmiany ekspresji genów. Transkrypcyjna kontrola ekspresji genów odpowiedzialnych za funkcje fizjologiczne zachodzi z udziałem białek wiążących DNA w odpowiedzi na wewnątrz- lub zewnątrzkomórkowe bodźce była i długo była uważana za jedyną drogę aktywacji lub represji bakteryjnych genów. Jednakże obecnie wiadomo, że niezwykle istotną drogą regulacji ekspresji bakteryjnych genów jest posttranskrypcyjna kontrola poziomu mRNA zachodząca z udziałem regulatorowych RNA (49). Odkrycie tych wielofunkcyjnych cząsteczek okazało się kluczem do wyjaśnienia licznych regulatorowych efektów, które wcześniej były niezrozumiałe.

Cząsteczki RNA pełniące u bakterii role regulatorowe często nazywane są małymi RNA (ang. *small RNA*) (sRNA) ze względu na ich wielkość, która zwykle waha się pomiędzy 50 i 500 nukleotydów, a najczęściej wynosi około 100 nukleotydów. Często też nazywane są niekodującymi RNA (ang. *noncoding RNA*) (ncRNA), co jest powszechna nazwą używaną dla regulatorowych RNA z komórek eukariotycznych (50).

Dotychczas najwięcej wiadomo o sRNA z *E. coli*, jednak ze wzrostem zainteresowania tą grupą cząsteczek, coraz więcej jest identyfikowanych także u innych

bakterii. Obecnie u *E. coli* oraz *Salmonella* znanych jest około stu sRNA, jednakże przewidywanych kandydatów u różnych bakterii jest około tysiąca (51, 52). Różnorodność sekwencyjna i strukturalna oraz relatywnie mała liczba dobrze poznanych sRNA powoduje, że badania tej grupą cząsteczek są trudne. Ostatnio, w dobie metod bazujących na analizie bioinformatycznej i mikromacierzach genomowych oraz szybkim sekwencjonowaniu kwasów nukleinowych, uwaga badaczy zaczyna skupiać się na wyszukiwaniu potencjalnych sRNA i sprawdzaniu ich wpływu na funkcjonowanie komórki. Badania struktury, bez których nie jest możliwe szczegółowe poznanie mechanizm działania zaczynają być odsuwane na dalszy plan.

sRNA zwykle kodowane są jako oddzielne jednostki transkrypcyjne i ulegają ekspresji w określonej fazie wzrostu, pod wpływem czynników stresowych czy w czasie wirulencji. Większość dotychczas poznanych sRNA moduluje ekspresję genów poprzez bezpośrednie parowanie z docelowym mRNA, jednakże jest też grupa sRNA modulujących aktywność białek (49).

Pierwszymi odkrytymi sRNA były, działające w układzie *cis*, antysensowe RNA, które kontrolują replikację lub stabilność bakteryjnych plazmidów. Nieco później odkryto, że również w genomie *E. coli* kodowane są sRNA będące członkami tej rodziny cząsteczek. Wiele z nich okazało się być regulatorami ekspresji toksycznych białek (50).

2.2. SRNA o pełnej komplementarności

2.2.1. Antysensowe RNA kodowane w plazmidach

Większość regulatorowych RNA jest kodowana w układzie *cis*, czyli nici DNA przeciwnej do docelowego mRNA, w związku z tym jest do niego w pełni komplementarna i działa poprzez bezpośrednie parowanie się z nim. Tego typu oddziaływanie może powodować różnorodne konsekwencje, których końcowym efektem bardzo często jest zaburzenie replikacji.

Jednym z przykładów jest RNA I o długości 108 nukleotydów, kodowane przez plazmid ColE1. RNA I uniemożliwia poprawne dojrzewanie startera RNA II, niezbędnego w procesie replikacji plazmidu (53). Przykładem innego mechanizmu działania jest CopA. Jest to regulatorowe RNA, o długości 90 nukleotydów, kodowane przez plazmid R1. Blokują one miejsce wiązania rybosomu do mRNA, którego produktem jest białko RepA biorące udział w inicjacji replikacji (54). Natomiast oddziaływanie pomiędzy RNA I i 146 nukleotydowym

RNA II plazmidu pT181 oraz mRNA kodującego RepC (inicjator replikacji), stabilizuje taką strukturę *repC* mRNA, która prowadzi do terminacji jego translacji (55, 56).

Chociaż sRNA są zdolne do komplementarnego parowania się z mRNA na stosunkowo długich odcinkach, jednak pełne parowanie zwykle nie jest wymagane do regulacji. Najistotniejsze jest początkowe oddziaływanie pomiędzy sekwencjami komplementarnych pętli parujących się cząsteczek z utworzeniem struktury zwanej „*kissing complex*” (54). Badania *in vitro* wykazały, iż oddziaływania te mogą zachodzić bez udziału dodatkowych czynników, jednakże białka kodowane zarówno w plazmidach, jak i w chromosomie zostały zidentyfikowane jako czynniki promujące oraz stabilizujące tego typu dupleksy (57, 58). Tak powstałe dupleksy zazwyczaj podlegają degradacji z udziałem RNazy III, endorybonukleazy specyficznej wobec dwuniciowych RNA (59, 60). W skutek czego regulacja poprzez sRNA jest procesem nieodwracalnym.

Antysensowe RNA są syntetyzowane konstytutywnie, jednakże są to cząsteczki niestabilne, dlatego ich poziom jest ściśle powiązany z liczbą kopii plazmidu. Kiedy liczba kopii plazmidu zmniejsza się wtedy również poziom sRNA się zmniejsza. To z kolei prowadzi do zwiększenia syntezy białek inicjujących replikację oraz starterów, w konsekwencji liczba kopii plazmidu znów rośnie (50).

Inną grupę sRNA kodowanych przez plazmidy stanowią te, które powodują represję ekspresji białek toksycznych dla komórki. Najlepiej scharakteryzowanym antytoksycznym RNA jest Sok RNA kodowany przez plazmid R1. Ten sRNA powoduje represję translacji *hok* mRNA. Analogicznie jak w omówionych wcześniej przypadkach, Sok RNA jest cząsteczką niestabilną i szybko ulega degradacji. Kiedy plazmidu R1 zbraknie w komórce, brak jest również Sok RNA. Z tego powodu bardziej stabilne *hok* mRNA zaczyna ulegać translacji i powstające toksyczne białko Hok jest akumulowane w komórce prowadząc do jej śmierci (61).

2.2.2. SRNA kodowane przez bakteriofagi i transpozony

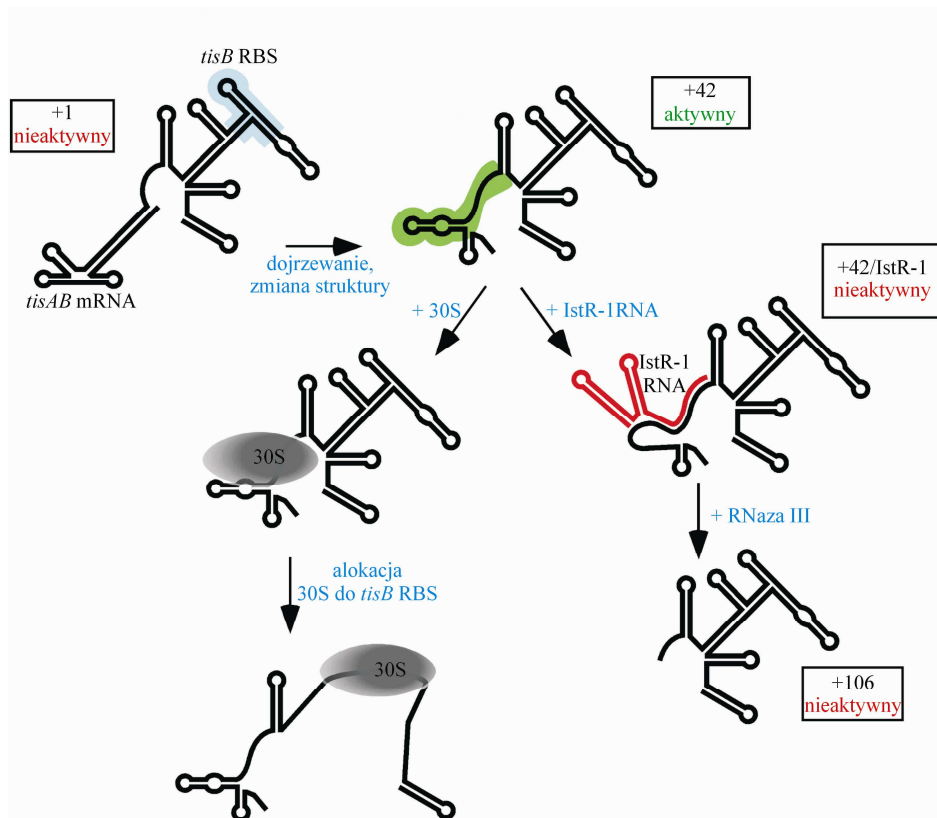
Bakteriofagi również kodują sRNA w układzie *cis*, działają one podobnie jak plazmidowe sRNA i wpływają na wiele procesów biologicznych takich jak przełączanie pomiędzy cyklem lizogennym a litycznym (50). Przykładem może być CI RNA faga P4 modulujące terminację transkrypcji (62) czy OOP RNA faga lambda, który oddziałując z *cII* mRNA umożliwia degradację tego mRNA przez RNazę III (63).

Kodowane w układzie *cis* antysensowe RNA zostały również zidentyfikowane dla dwóch transpozonów pochodzących z *E. coli* IS10 i IS30. Oddziałują one z *tnp* mRNA,

kodującym transpozazę, tym samym blokując translację i w przypadku IS10 prowadząc do degradacji *tnp* mRNA. Skutkuje to ograniczeniem transpozycji oraz ilości kopii transpozonów w genomie (64-66).

2.2.3. Antysensowe RNA kodowane przez chromosom

Jednym z przykładów sRNA kontrolujących syntezę potencjalnie toksycznych białek jest JstR-1 RNA, który ma taki sam koniec 3' co inny, zlokalizowany w tym samym locus sRNA, a mianowicie IstR-2. IstR-1 kontroluje ekspresję TisB kodowanego przez bicistronowy *tisAB* mRNA. IstR-1 podlega ekspresji konstytutywnie, podczas gdy zarówno IstR-2, jak i *tisAB* mRNA są indukowane w czasie odpowiedzi SOS, uruchamianej po pojawieniu się uszkodzeń w DNA. Wysoki poziom TisB jest toksyczny dla komórki, a IstR-1 ma zdolność inhibicji tej toksyczności. Współzawodnicząc z podjednostką rybosomalną 30S, oddziałuje on na odcinku 21 nukleotydów z rejonem wewnątrz *tisAB* mRNA. Ta interakcja umożliwia rozpoznanie kompleksu przez RNazę III i przecięcie go, co skutkuje uniemożliwieniem translacji *tisAB* mRNA (67). Istnieje model proponujący, że pełnej długości *tisAB* mRNA nie jest aktywne, dopiero endonuklolytyczne przecięcie tej cząsteczki powoduje zmiany w jej strukturze umożliwiające związanie IstR-1 lub podjednostki rybosomalnej w miejscu nazywanym przejściowym miejscem wiązania (związanie w tym miejscu jest warunkiem alokacji podjednostki 30S do właściwego miejsca inicjacji translacji). Zostało to przedstawione schematycznie na rysunku 6. Model działania IstR-1 zakłada, że sRNA zapobiega przypadkowej syntezie TisB w czasie normalnego wzrostu komórki, natomiast w czasie odpowiedzi SOS poziom IstR-1 maleje przy równoczesnym wzroście poziomu *tisAB* mRNA. Proponuje się, że ograniczona ekspresja białka TisB, zachodząca po uszkodzeniu DNA prowadzi do spowolnienia wzrostu i prawdopodobnie umożliwia komórce uniknięcie zniszczenia (68).



Rysunek 6. Model regulacji aktywności *tisAB* mRNA przez IstR-1 sRNA (68).

Podobną rolę może odgrywać inny sRNA nazwany RyjC. Ten sRNA również ulega ekspresji konstytutywnie i jest kodowane na nici komplementarnej do *yjiW*, genu o nieznannej funkcji, indukowanego również w odpowiedzi SOS. RyjC RNA jest całkowicie komplementarny do końca 5' oraz pierwszych 6 nukleotydów otwartej ramki odczytu *yjiW*. Dotychczasowe dane sugerują, że wysoki poziom białka YjiW jest toksyczny, co wskazuje, że również w tym przypadku ograniczona represja przez sRNA może mieć kluczowe znaczenie dla przetrwania komórki (69).

W przypadku tego typu mechanizmów wiele jeszcze pozostało do wyjaśnienia, jak choćby to, *jaka jest normalna funkcja toksycznych białek; pod wpływem, jakich czynników ulegają one ekspresji, czy działanie sRNA może zostać wyłączone oraz czy w tych oddziaływaniach biorą udział jakiegokolwiek dodatkowe czynniki białkowe?*

2.3. sRNA o niepełnej komplementarności wiążące białko Hfq

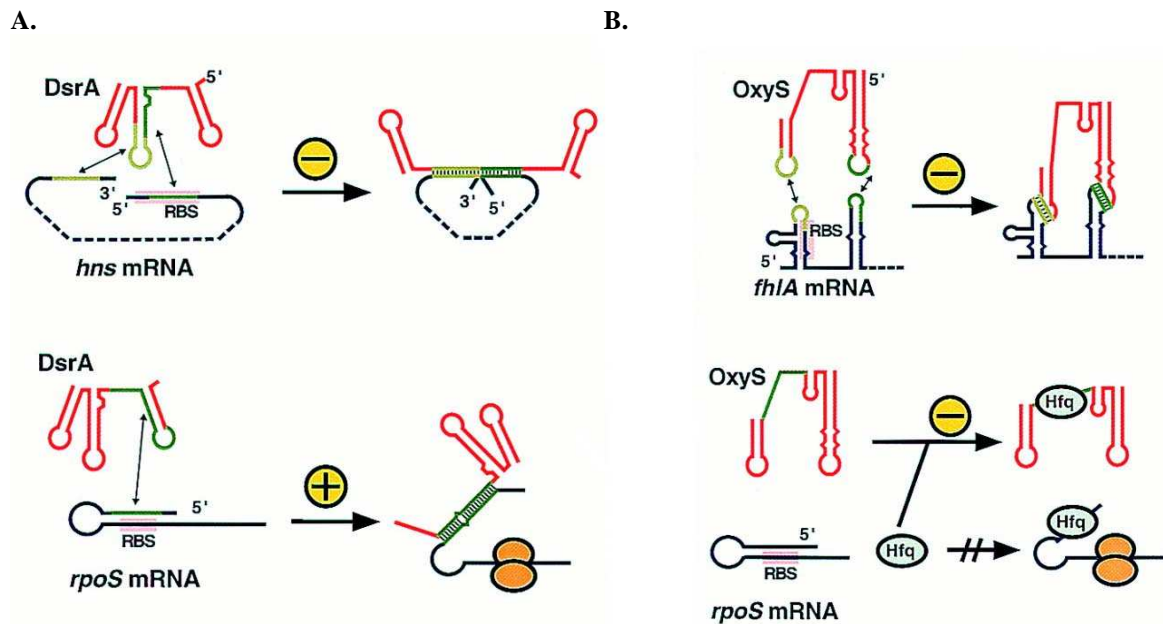
Jest to największa i najlepiej scharakteryzowana grupa sRNA, w której skład wchodzi około jedna trzecia wszystkich poznanych sRNA u *E. coli*. Wszystkie sRNA należące do tej grupy są kodowane w układzie *trans*, czyli w odrębnym locus w stosunku do docelowego mRNA i działają poprzez nie całkowicie komplementarne parowanie. Oddziaływania te prowadzą do zmiany stabilności i/lub translacji mRNA. Choć w badaniach *in vitro* wykazano oddziaływanie między sRNA a mRNA bez udziału białek, ta grupa cząsteczek w większości przypadków do efektywnego działania *in vivo* wymaga obecności białka opiekuńczego (ang. *chaperon*) Hfq (50). Białko to ze względu na swoją istotną rolę w regulacji ekspresji genów z udziałem sRNA zostało omówione szczegółowo w dalszej części rozdziału. Efekty wpływu sRNA na docelowe mRNA są różnorodne. W niektórych przypadkach sRNA są pozytywnymi regulatorami translacji. Wówczas rola sRNA polega zwykle na stabilizacji mRNA lub zwiększeniu wydajności translacji poprzez indukcję zmiany struktury mRNA. Zwykle jednak parowanie sRNA z mRNA ma negatywny wpływ na translację, prowadząc do jej inhibicji lub degradacji mRNA (70). Tego typu mechanizm można porównać do mechanizmu działania microRNA w komórkach eukariotycznych (71). Jednakże tutaj wydaje się, że RNaza E, główny składnik multienzymatycznego kompleksu nazywanego degradosomem, jest enzymem przede wszystkim odpowiedzialnym za degradację mRNA i sRNA (72, 73). Istnieją jednak doniesienia, że w przypadku niektórych sRNA oraz ich docelowych mRNA to jednak RNaza III pełni funkcje nukleolityczne (67). Dla niektórych sRNA znany jest tylko jeden docelowy mRNA, inne z kolei mają zdolność modulowania aktywności wielu różnych mRNA. W tego typu złożonych układach regulacji często też jedno mRNA może być pod kontrolą kilku różnych sRNA. *Jak to jest możliwe?* Wydaje się, że w tego typu oddziaływaniach niezwykle istotną rolę odgrywa nie tylko skład nukleotydowy, ale również struktura parujących się ze sobą kwasów nukleinowych. Jednakże na tym polu pozostało jeszcze wiele do zrobienia, gdyż struktura drugorzędowa obu molekuł - sRNA i jego docelowego mRNA - znana jest tylko w kilku przypadkach. Znajomość struktury byłaby niezwykle pomocna w zrozumieniu mechanizmów regulacji zachodzących z udziałem sRNA, dla wyjaśnienia co jest niezbędne do odnalezienia docelowego mRNA w komórce, czy choćby co decyduje o parowaniu się obu cząsteczek.

Pierwszym odkrytym sRNA działającym u *E. coli* w układzie *trans* jest 93 nukleotydowy MicF RNA. Od 25 lat, kiedy został odkryty, *ompF* mRNA wciąż uważany jest za jego jedyny docelowy mRNA. MicF blokuje translację białka OmpF, które jest jedną z dwóch głównych poryn znajdujących się w błonie komórkowej *E. coli* (74, 75). Synteza MicF

RNA aktywowana jest pod wpływem wielu różnorodnych czynników środowiskowych takich jak stres oksydacyjny (na drodze z udziałem SoxS), podwyższona temperatura (z udziałem nieznanego regulatora) czy ekspozycja na czynniki toksyczne (np. za pośrednictwem MarA) (76-79). Natomiast negatywnym modulatorem ekspresji tego sRNA jest dwustopniowa regulacja z udziałem EnvZ, kinazy błonowej, która jest aktywowana pod wpływem zmian osmotycznych środowiska. Aktywna kinaza fosforyluje białko regulatorowe OmpR, które z kolei kontroluje syntezę poryn na poziomie transkrypcyjnym (80, 81). Próba ustalenia fizjologicznej roli MicF nie jest łatwa zważywszy na fakt, że ekspresja poryn jest intensywnie regulowana na poziomie transkrypcyjnym. Sugeruje się, że w pewnych warunkach regulacja posttranskrypcyjna z udziałem sRNA jest konieczna do wzmocnienia efektu regulacji na poziomie transkrypcyjnym (50). Nie potwierdzono, że obecność Hfq jest wymagana do prawidłowego funkcjonowania MicF RNA, jednakże wykazano, że to sRNA koimmunoprecypituje z Hfq (82).

Jednym z najintensywniej badanych sRNA jest 87 nukleotydowy DsrA RNA z *E. coli*. Jest też jednym z pierwszych, dla którego zaobserwowano, że może oddziaływać z więcej niż jednym mRNA. Gen kodujący DsrA zlokalizowany jest w rejonie międzygenowym (IGR) pomiędzy *yodD* i *yedP* (83). DsrA RNA jest syntetyzowany pod wpływem niskiej temperatury wynoszącej 25°C, w tej temperaturze wykazuje też znacznie wyższą stabilność w porównaniu do 37 i 42°C (84). Sugeruje się, że jego niezależnym od temperatury inhibitorem jest białko LeuO (85).

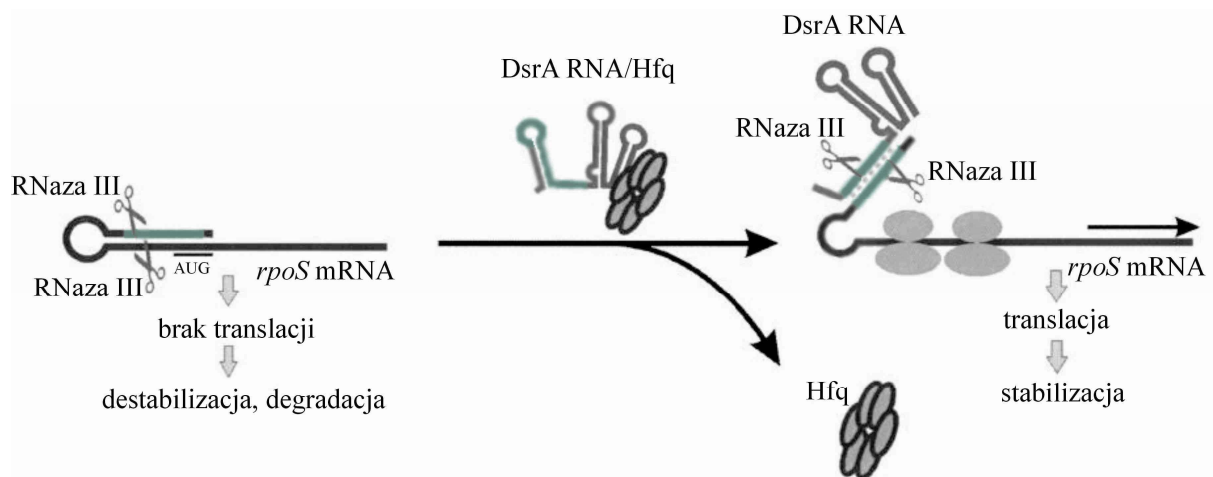
Jednym z jego docelowych mRNA jest *hns* mRNA (83). DsrA reguluje m. in. aktywację tworzenia otoczki bakteryjnej poprzez represję syntezy białka HN-S. HN-S jest to białko nazywane histonopodobnym (ang. *histone-like*) zasocjowanie z nukleoidem. HN-S pełni rolę globalnego wyciszacza ekspresji genów, wśród których znajdują się geny odpowiedzialne za tworzenie otoczki i produkcję polisacharydów (86). Postuluje się, że DsrA wiąże się dwoma oddalonymi od siebie fragmentami *hns* mRNA tak, że tworzy się kuliście zawinięta struktura tego mRNA. Pierwszy z fragmentów zlokalizowany jest przy końcu 5', niedaleko kodonu start, w miejscu wiązania rybosomy (RBS), przez co prawdopodobnie związanie w tym rejonie DsrA uniemożliwia przyłączenie rybosomu i syntezę białka HN-S. Natomiast drugi fragment znajduje się przy końcu 3', w pobliżu kodonu stop. Mechanizm regulacji przedstawiono schematycznie na rysunku 7A. Jednakże ten model oddziaływania wymaga jeszcze weryfikacji (87).



Rysunek 7. Schemat proponowanego mechanizmu regulacji docelowych mRNA przez (A) DsrA oraz (B) OxyS RNA.

Poza funkcją represora translacji, DsrA RNA pełni również funkcję aktywatora ekspresji innego mRNA. Pod pozytywną kontrolą tego małego RNA znajduje się *rpoS* mRNA, które u enterobakterii koduje główny stresowy czynnik sigma, a mianowicie sigma s. Sigma s stanowi alternatywną podjednostkę polimerazy RNA odpowiedzialną za rozpoznawanie promotorów genów aktywowanych w czasie stresu i w stacjonarnej fazie wzrostu (88). *W jaki sposób antysensowy RNA może pozytywnie regulować poziom translacji?* W przypadku nieobecności DsrA długi 5'UTR *rpoS* mRNA, fałduje się w taki sposób, że tworzy strukturę drugorzędową, która inhibuje wiązanie się rybosomu do RBS. DsrA parując się z rejonem położonym około 100 nukleotydów powyżej RBS powoduje „otwarcie” struktury tak, że RBS staje się dostępne (Rysunek 7A). Rejon wzajemnego parowania obu cząsteczek został zweryfikowany zarówno przez mapowanie, jak i mutagenezę obu DsrA RNA oraz rejonu liderowego *rpoS* mRNA (89, 90). Choć w warunkach *in vitro* oba RNA mogą się ze sobą parować bez udziału dodatkowych czynników, to jednak dla obydwu potwierdzono zdolność wiązania z Hfq oraz zaproponowano rejony biorące udział w oddziaływaniu. Ponadto, zaobserwowano możliwość tworzenia trójskładnikowego kompleksu. Badania pokazują, że białko Hfq również tutaj odgrywa istotną pomocniczą rolę, znacznie ułatwiającą oddziaływanie (89, 91). Zaobserwowano również, że związanie DsrA do rejonu liderowego nie tylko umożliwia związanie rybosomu, ale także tworzy nowe miejsce cięcia dla RNazy III. Gdy brak jest DsrA wówczas RNaza III może przecinać transkrypt w

rejonie dwuniciowym, którego jedna nić obejmuje rejon inicjacji translacji, a drugą stanowi miejsce oddziaływania z DsrA RNA. Hydroliza w tym rejonie najprawdopodobniej skutkuje degradacją mRNA. W wyniku powstania kompleksu DsrA/*rpoS* pierwsze miejsce cięcia przestaje istnieć. Powstaje nowe zlokalizowane w rejonie parowania się obu cząsteczek. Hydroliza powstałego kompleksu zapobiega m.in. ponownemu wykorzystaniu DsrA do aktywacji nowej cząsteczki mRNA, a także prowadzi do stabilizacji *rpoS* mRNA podlegajacemu translacji (92). Schematycznie przedstawia to rysunek 8.



Rysunek 8. Model posttranskrypcyjnej regulacji translacji *rpoS* mRNA z udziałem RNazy III, białka Hfq oraz DsrA sRNA (92).

Badania pokazują, że w oddziaływaniu z *hns* mRNA i *rpoS* mRNA zaangażowane są dwa niezależne rejony DsrA RNA. W oddziaływaniu z *rpoS* mRNA biorą udział nukleotydy zlokalizowane w rejonie od 9 do 32, tworzące pierwszą spinkę, podczas gdy z *hns* mRNA oddziałują nukleotydy zlokalizowane we fragmencie od 31 do 54 (87, 89). Tłumaczy to, w jaki sposób jedno sRNA może kontrolować ekspresję dwóch różnych mRNA a także świadczy o tym, że DsrA jest dynamiczną cząsteczką zmieniającą swoją strukturę podczas oddziaływania z docelowymi mRNA. Na podstawie komplementarności sekwencyjnej zaproponowano, iż DsrA może również być regulatorem ekspresji następujących mRNA: *argR*, *ilvIH* oraz *rbsD*. Przy czym sposób parowania się z *argR* oraz *ilvIH* mógłby wyglądać podobnie jak w przypadku *hns* mRNA (87, 93).

Kontrola poziomu translacji *rpoS* mRNA, jest ciekawym przykładem działania sRNA, gdyż to mRNA znajduje się pod kontrolą również innych regulatorowych RNA. Działają one zarówno, tak jak DsrA, czyli aktywując translację, ale są również takie, które powodują inhibicję ekspresji mRNA. Liczące 106 nukleotydów RprA sRNA, chociaż różni się długością

oraz składem nukleotydowym, tak jak DsrA stymuluje translację sigma s. Ekspresja RprA rośnie podczas stresu osmotycznego. RprA paruje się z *rpoS* mRNA w tym samym rejonie co DsrA, w związku z czym mechanizmu jego działania jest zbliżony do mechanizmu działania DsrA i również wymaga obecności Hfq. Przyłączenie RprA do *rpoS* mRNA skutkuje udostępnieniem RBS i rozpoczęciem translacji (94-96).

Negatywnym regulatorem ekspresji *rpoS* mRNA jest z kolei OxyS RNA, indukowany poprzez czynnik transkrypcyjny OxyR w odpowiedzi na stres oksydacyjny. Ten 109 nukleotydowy, stabilny oraz licznie występujący w komórce sRNA najprawdopodobniej reguluje ekspresją około 40 genów u *E. coli* oraz działa jako czynnik przeciwmutacyjny chroniący DNA przed uszkodzeniem. OxyS może działać zarówno jako regulator inhibujący, jak i aktywujący ekspresję docelowych mRNA (97). Szczegółowy mechanizm represji syntezy sigma s przez OxyS oraz ewentualne rejony oddziaływania pomiędzy OxyS a *rpoS* nie zostały jak dotąd opisane w literaturze. Wiadomo, że *in vivo* wraz ze wzrostem ekspresji OxyS maleje ilość sigma s oraz w mechanizm tej regulacji zaangażowane jest białko Hfq. Jedną z hipotez zakłada, że inhibicja ta zachodzi na skutek współzawodnictwa o białko Hfq. Pojawiający się OxyS wyłapuje całą dostępną pulę Hfq, uniemożliwiając związanie się białka z rejonem liderowym *rpoS* mRNA, które to z kolei miałyby ułatwić związanie rybosomu do tego mRNA (Rysunek 7B) (98). Dowiedziono, że do represji *rpoS* mRNA przez OxyS niezbędny jest fragment pomiędzy 63 a 109 nukleotydem sRNA (99); inne badania wskazują właśnie ten rejon jako miejsce wiązania Hfq (98). Postuluje się, że represja syntezy sigma s przez OxyS zachodzi, aby zapobiec powstaniu nadmiernej liczby regulatorów transkrypcyjnych. Dla genów *katG* czy *gorA* zaobserwowano, że ich ekspresja jest regulowana zarówno przez OxyR i sigma s. OxyR jest aktywowany przez nadtlenek wodoru w czasie logarytmicznej fazy wzrostu, kiedy to sigma s jest zbędny, wtedy OxyS inhibuje jego powstawanie. Natomiast w stacjonarnej fazie wzrostu OxyR nie jest aktywowany przez pojawiający się nadtlenek wodoru; w wyniku czego nie powstaje też OxyS. Wtedy sigma s indukuje ekspresję genów takich jak *katG* i *gorA* niezbędnych dla przetrwania przez komórkę stresu oksydacyjnego (97).

Innym mRNA podlegającym represji przez OxyS RNA jest *fhlA* mRNA, kodujący białko FhlA, które jest aktywatorem transkrypcji. Badania przeprowadzone z użyciem sekwencji zawierającej część 5'UTRu oraz fragment sekwencji kodującej *fhlA* mRNA wykazały, że zarówno we fragmencie mRNA jak i w obrębie OxyS występują po dwa niezależne rejony biorące udział w parowaniu się tych cząsteczek. Parowania te zachodzą pomiędzy pętlami spinek obu cząsteczek tworząc tzw. *kissing complex* (Rysunek 7B). W

mRNA jeden z tych fragmentów znajduje się w 5'UTR, w rejonie wiązania rybosomu i tworzy heptanukleotydyowy kompleks z pętlą wchodzącą w skład 3'-końcowej spinki OxyS RNA. Natomiast drugi rejon oddalony jest od pierwszego o 41 nukleotydów i znajduje się w obrębie sekwencji kodującej. Jego nonanukleotydyowy fragment paruje z nukleotydami pętli apikalnej będącej częścią 5'-końcowej spinki OxyS RNA. Takie oddziaływanie pomiędzy czterema pętlami inhibuje translację, uniemożliwiając związanie podjednostki rybosomalnej 30S do mRNA i stworzenie kompleksu inicjatorowego (99, 100). Tak, jak w przypadku represji *rpoS* mRNA również tutaj rejon w okolicy 70-tego nukleotydu OxyS jest niezbędny do prawidłowej inhibicji, co pozwala sądzić, iż w obydwu przypadkach jest to miejsce wiązania Hfq. Zaobserwowano, że białko to pełni rolę opiekuńczą zwiększając trwałość oraz ułatwiając oddziaływanie z obydwoma docelowymi mRNA (101). *Jaka zatem jest fizjologiczna rola represji fhla mRNA przez OxyS?* Fh1A jest aktywatorem genów biorących udział w syntezie kompleksu hydrogenolazy mrówczanowej. Być może inhibicja syntezy Fh1A jest niezbędna do przetrwania w czasie stresu oksydacyjnego, ponieważ kompleks hydrogenolazy mrówczanowej, który jest syntetyzowany w warunkach beztlenowych zawiera metale jako kofaktory, które mogłyby okazać się szkodliwe w czasie stresu oksydacyjnego (99).

Analizy z wykorzystaniem metod komputerowych, genomowych mikromacierzy a także badania zdolności oddziaływania z Hfq oraz wpływu na poziom ekspresji sigma s, pozwoliły zidentyfikować kolejne sRNA mogące być potencjalnymi regulatorami translacji *rpoS* mRNA (102). Należy pamiętać, iż ekspresja sigma s jest regulowana nie tylko przez sRNA, ale i wiele białek w odpowiedzi na różnorodne sygnały. Ta niezwykle złożona regulacja odbywa się zarówno na poziomie transkrypcyjnym i translacyjnym, jak i związana jest z wpływem na stabilność oraz degradację tej alternatywnej podjednostki polimerazy RNA. Interesujące jest to, iż jednym z modulatorów biorących udział w tej regulacji jest białko HN-S, które jednocześnie wpływa na represję translacji *rpoS* oraz destabilizację białka sigma s. Jedną z możliwości działania HN-S zakłada, że najprawdopodobniej oddziałuje ono z którymś z licznych inhibitorów białka RssB. Rolą ufosforylowanej formy białka RssB jest wiązanie się z RpoS, co umożliwia ATP zależnej protezie ClpXP degradację tej podjednostki polimerazy (103-105).

Innym intrygującym przykładem cząsteczek należących do tej najliczniejszej grupy małych RNA są, kodowane jeden za drugim i niemalże identyczne, OmrA i OmrB sRNA. Ich funkcją jest inhibicja translacji grupy spokrewnionych mRNA kodujących białka zewnętrznej błony takie jak: proteaza OmpT czy kanały błonowe CirA, FecA oraz FepA. W procesy

regulacji z ich udziałem zaangażowane jest białko Hfq oraz RNaza E. Ich ekspresja indukowana jest przez dwuskładnikowy system zawierający kinazę EnvZ i czynnik wiążący DNA OmpR, w czasie podwyższenia osmozy lub zadziałania innego czynnika stresowego wpływającego na zewnętrzną błonę. Podobieństwo pomiędzy blisko 80 nukleotydowym OmrA/B u *E. coli* jest najwyższe na ich końcach. Przy czym 20 nukleotydów na końcach 5' jest całkowicie identyczne i to właśnie te regiony są istotne w oddziaływaniach z mRNA. Analizy bioinformatyczne z wykorzystaniem rejonu 5'-końcowego OmrA/B pozwoliły odkryć, że cząsteczki te podlegają autoregulacji ograniczającej ich ilość, która odbywa się poprzez regulację ekspresji *ompR* mRNA (106, 107).

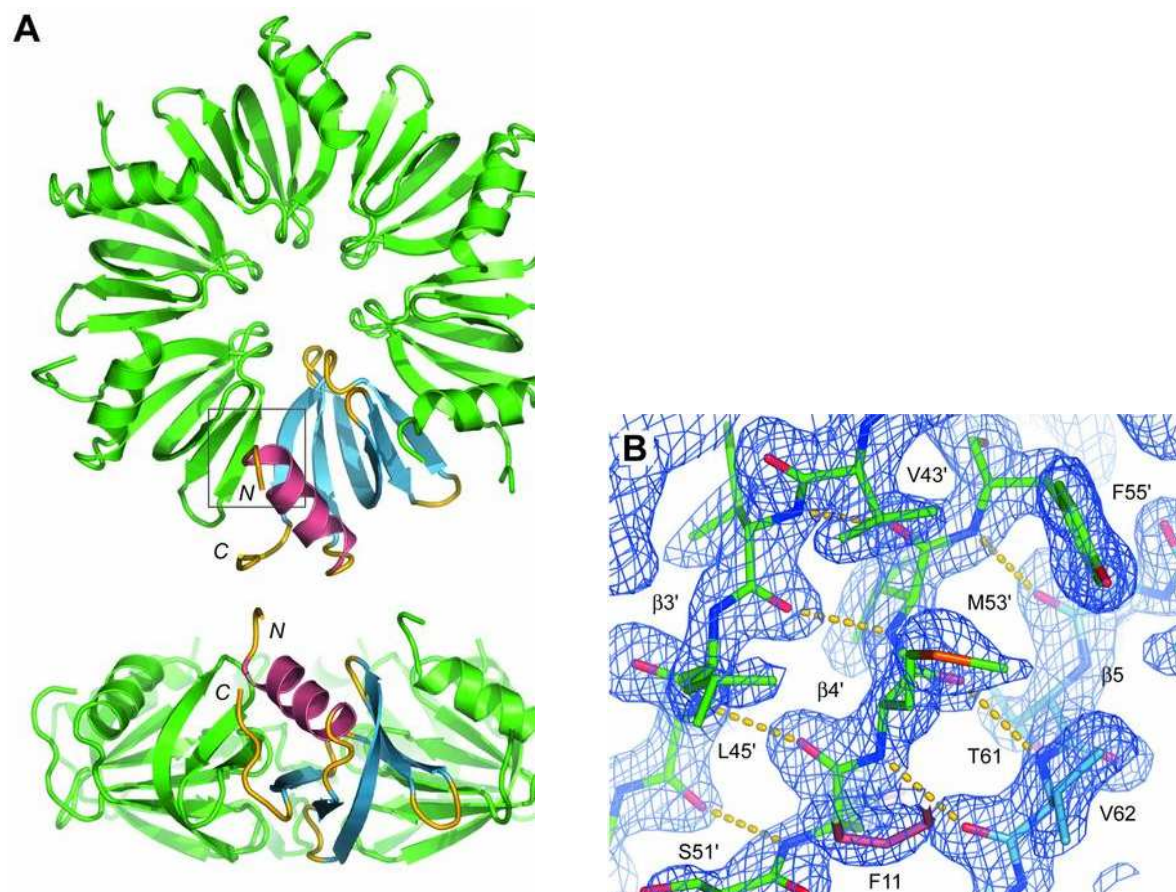
Bardzo zagadkowe pozostaje pytanie, *dlaczego bakterie wykorzystują dwa spokrewnione sRNA do kontroli transkrypcji tych samych docelowych mRNA. Być może ekspresja dwóch sRNA jest gwarancją niezawodnej regulacji?*

2.3.1. Struktura i funkcje biologiczne pełnione przez białko Hfq

Białko Hfq z *E. coli* (ang. *host factor required for phage Q β RNA replication*) zwane też HF-1 (ang. *host factor 1*) zostało zidentyfikowane pod koniec lat 60-tych, jako endogenne bakteryjne białko, które wraz z rybosomalnym białkiem S1 bierze udział w replikacji RNA bakteriofaga Q β . U *E. coli* białko to zawiera 102 reszty aminokwasowe, a jego masa wynosi 11,2 kDa (108-110). Analizy filogenetyczne pokazały, że ortologi Hfq występują w połowie sekwencjonowanych gram-dodatnich oraz gram-ujemnych bakterii, przy czym część z nich koduje więcej niż jeden gen *hfq* (111, 112). Białka należące do rodziny Hfq są termostabilne, ich aktywną formą jest homoheksamer, a wielkość monomeru waha się pomiędzy 70 a 110 resztami aminokwasowymi. U *E. coli* białko występuje w liczbie około 10 tysięcy heksamerów na komórkę. Z tego 80-90% zidentyfikowano we frakcji cytoplazmatycznej zasocjowane z rybosomami (113). Badania wskazują, że białko to wiąże RNA wykazując preferencje do sekwencji poli(A) oraz fragmentów jednoniciowych bogatych w reszty adenozyiny i urydyny zwykle otoczonych z końca 5' lub 3' fragmentem heliakalnym, jednakże nie wykazując specyficzności sekwencyjnej (101, 114-116). Pozostała część Hfq występuje w formie zasocjowanej z nukleoidem (117, 118). Badania komórek pozbawionych genu kodującego *hfq* pokazały plejotropowy wpływ tego białka na funkcjonowanie komórki. Hfq jest regulatorem pełniącym bardzo zróżnicowane funkcje w komórce, zdolnym do oddziaływania z różnymi cząsteczkami, a konsekwencją jego niedoboru jest zmiana profilu ekspresji wielu białek (119).

Jak dotąd nie udało się rozwiązać struktury krystalicznej białka Hfq o wysokiej rozdzielczości. Opublikowano struktury pochodzące z trzech organizmów bakteryjnych: z *Staphylococcus aureus* (120), z *E. coli* (forma skrócona zawierająca reszty aminokwasów od 1 do 72) (121) oraz *Pseudomonas aeruginosa* (122), a także jedyną strukturę kompleksu Hfq/RNA. Jest to struktura Hfq *S. aureus* ze związanym heptaoligonukleotydem AU₅G (120). A także jedną strukturę kompleksu Hfq (forma skrócona)/poliA₁₅ z *E. coli* (123). Hfq zaliczono do rodziny białek Sm i Sm-podobnych (ang. *Sm-like*). Białka te zidentyfikowano u eukariotów oraz archeonów. Biorą one udział w dojrzewaniu oraz degradacji mRNA. Charakteryzują się dwoma wysoce konserwatywnymi rejonami zwanymi Sm1 i Sm2 oddzielonymi od siebie regionem o zmiennej długości i sekwencji (124-127). Chociaż białka Hfq nie wykazują homologii sekwencyjnej w obrębie motywu Sm2 (mają jednak inny rejon bogaty w reszty hydrofobowe, który może być jego odpowiednikiem) zostały zaliczone do tej rodziny ze względu na homologię w rejonie Sm1, preferencje w wiązaniu sekwencji bogatych w A i U oraz podobieństwo strukturalne. Podobieństwo to polega na tworzeniu homoheksamerycznego pierścienia o wymiarach podobnych do heksametrycznych i heptametrycznych pierścieni tworzonych przez białka Sm i Sm-podobne (101, 111, 114).

Homoheksameryczny pierścień Hfq *E. coli* ma średnicę ok. 70Å i grubość 28Å (101, 121). Zbadane struktury monomerów Hfq, podobnie jak białka Sm, zbudowane są z N-końcowej helisy α , po której następuje pięć harmonijek β . W skład motywu Sm1 wchodzi trzy pierwsze harmonijki β , podczas gdy motyw Sm2 tworzą czwarta i piąta. Tworzenie heksameru inicjowane jest przez oddziaływania pomiędzy resztami aminokwasowymi wchodzącymi w skład harmonijki β_4 jednej podjednostki a resztami aminokwasowymi wchodzącymi w skład harmonijki β_5 sąsiedniej podjednostki. Helisa α ułożona jest od strony zwanej dystalną (121). Strukturę heksameru przedstawiono na rysunku 9.



Rysunek 9. (A) Struktura białka Hfq z *E. coli*. Kolorem niebieskim zaznaczono harmonijki β wchodzące w skład monomeru, a różowym N-końcową helisę α . (B) Schemat oddziaływań wodorowych pomiędzy aminokwasami wchodzącymi w skład sąsiednich podjednostek (121).

Badania krystalograficzne kompleksu Hfq z heptyrybonukleotydem z *S. aureus* pokazały, że wiąże się on do białka od strony proksymalnej, układając się kółkiem wokół szczeliny pierścienia (120). Badania mutantów punktowych Hfq z *E. coli* wykazały, że białko to posiada zdolność wiązania RNA na obydwu powierzchniach: dystalnej oraz proksymalnej, nazywanej też powierzchnią L4, jednakże specyfika wiązania na tych powierzchniach jest różna. Jedno z regulatorowych RNA, a mianowicie DsrA RNA, zgodnie z wcześniejszymi badaniami dla *S. aureus*, wiązane jest najprawdopodobniej do wewnętrznej krawędzi pierścienia, w której znajduje się sześć potencjalnych miejsc wiązania nukleotydów oraz do reszt aminokwasowych R16 i F39 zlokalizowanych na powierzchni proksymalnej. Poli(A) oddziałuje z powierzchnią dystalną, a w oddziaływania te zaangażowane są m. in. reszty Y25, I30 oraz K31 (90, 123, 128). Powierzchnia dystalna może być także zaangażowana w wiązania sekwencji poli(A) w DNA, jak również odgrywać rolę w replikacji RNA bakteriofaga Q β (129). Analizy mutacyjne sugerują, że mRNA mogą oddziaływać z obydwoma powierzchniami jednocześnie (90). Badania z wykorzystaniem mutantu

pozbawionego 37 C-końcowych reszt aminokwasowych wskazują jednak na rolę końca C Hfq w oddziaływaniu z mRNA. Sugerują ten konformacyjnie labilny rejon jako trzecią powierzchnię oddziaływania, specyficzną dla mRNA (130). Charakter oddziaływania Hfq z różnymi RNA wydaje się być dużo bardziej skomplikowany, gdyż na przykład dla RprA RNA odkryto, że w oddziaływaniu z tym sRNA bierze udział zarówno powierzchnia proksymalna jak i dystalna. W związku z tym, w przeciwieństwie do eksperymentów z DsrA RNA, dodanie do kompleksu RprA/Hfq oligonukleotydu poli(A) nie skutkuje powstaniem trójskładnikowego kompleksu tylko wyparciem RprA RNA z kompleksu (96). Hfq poprzez oddziaływanie z RNA bierze udział w regulacji ekspresji wielu genów. Jednak, jaka jest dokładna rola Hfq w oddziaływaniach pomiędzy sRNA i mRNA nie jest do końca zrozumiałe. Jeden z modeli zakłada, że Hfq pełni rolę stymulatora zwiększającego lokalne stężenie obu RNA ułatwiającego zbliżenie i umożliwiającego oddziaływanie sRNA z docelowym mRNA. Zjawisko to zaobserwowano dla kompleksu OxyS/*fhlA* mRNA czy Spot42/*galK* mRNA (101, 114). Inne badania pokazują, że Hfq wiążąc się z mRNA powoduje zmianę jego struktury i wyeksponowanie nukleotydów niezbędnych do oddziaływania z sRNA. Tak jest w przypadku *sodB* mRNA, który jest celem działania RyhB sRNA (115). Istnieją także badania, które sugerują, że związanie Hfq może nieznacznie wpływać na zmianę struktury sRNA (101). Inne obserwacje pokazują też, że związanie Hfq do wielu sRNA takich, jak DsrA czy RyhB zapewnia im ochronę przed trawieniem RNazą E. Ochrona ta wynika z faktu wiązania się Hfq w miejscach rozpoznawanych przez RNazę E, tak więc związanie Hfq uniemożliwia nukleazie dostęp do miejsca cięcia (131).

Poza rolą w regulacji translacji z udziałem sRNA Hfq pełni też inne role w komórce. Jedną z nich jest modulacja degradacji niektórych mRNA. Wykazano, że Hfq wiąże się do ogona poli(A) oraz rejonu bogatego w U w obrębie *rpsO* mRNA, które koduje białko rybosomalne S15. Hfq stymuluje poliadenylację *rpsO* mRNA przez PAP I, a zarazem paradoksalnie chroni je przed enzymami zaangażowanymi w degradację mRNA, takimi jak: PNPaza, RNaza II czy RNaza E (132-135).

Hfq posiada również zdolność autoregulacji na poziomie translacyjnym poprzez wiązanie się do *hfq* mRNA. Skutkuje to inhibicją tworzenia się kompleksu inicjatorowego i uniemożliwia rozpoczęcie translacji (136).

Wykazano również oddziaływanie Hfq z różnymi tRNA i jego udział w biogenezie tej cząsteczki. Badania wskazują, że Hfq wiążąc się z tRNA stymuluje aktywność nukleotydylotransferazy dodającej sekwencję CCA do końca 3' tego RNA (137). Inne badania pokazują wiązanie Hfq w dwóch niezależnych rejonach tRNA - trzonie pętli TΨC

oraz trzonie pętli D sugerując, że Hfq jest niezbędne dla poprawnej modyfikacji tRNA (138). Interesujące, że rejony te wykazują niską konserwatywność sekwencyjną pomiędzy różnymi tRNA i nie są jednoniciowymi fragmentami bogatymi w A i U. Ponadto w oddziaływaniach z nimi bierze udział powierzchnia proksymalna, czyli ta sama co w przypadku oddziaływań z sRNA. Sugeruje to, że w oddziaływaniach pomiędzy Hfq a różnymi RNA najistotniejszą rolę odgrywa struktura przestrzenna obu biomolekuł.

Ponadto poza oddziaływaniem z kwasami nukleinowymi Hfq może wiązać się różnymi białkami. W niektórych przypadkach są to bezpośrednie oddziaływania, natomiast w innych Hfq występuje, jako składnik dużego rybonukleoproteinowego kompleksu. W związku z rolą Hfq w dodawaniu ogona poli(A) do mRNA sugeruje się, że w tym procesie Hfq nie tylko oddziałuje z mRNA, ale również z PAP I (139). Wykazano również bezpośrednie oddziaływanie Hfq z C-kończącym fragmentem RNazy E i jego rolę w inicjowanej przez SgrS oraz RyhB sRNA, degradacji docelowych mRNA z udziałem tego enzymu (140).

Interesującą jest obserwacja *in vitro*, pokazująca, że Hfq może tworzyć helikalne włókna. Każde włókno zbudowane jest z 36 podjednostek Hfq tworząc heksamer zbudowany z homoheksamerów Hfq (141). Tworzenie się włókien, aczkolwiek inaczej zbudowanych, zaobserwowano wcześniej dla pochodzących z archeonów białek Sm-podobnych (142). W przypadku Hfq tworzenie się włókien zaobserwowano w wyższym niż fizjologiczne pH oraz niższych warunkach jonowych. Funkcja tych struktur nie została jeszcze poznana (141).

Inną niewyjaśnioną funkcją białko Hfq jest jego aktywność ATPazowa. Jak dotąd dowiedziono, że związanie ATP do kompleksu Hfq/RNA skutkuje jego destabilizacją. Mogłoby to sugerować rolę ATP w zmianach strukturalnych RNA zachodzącym w obecności Hfq. Analizy mutacyjne wskazują Y25 zlokalizowaną na powierzchni proksymalnej białka jako resztę aminokwasową istotną w oddziaływaniu z ATP oraz hydrolizie tej cząsteczki (143).

2.4. SRNA modyfikujące aktywność białek

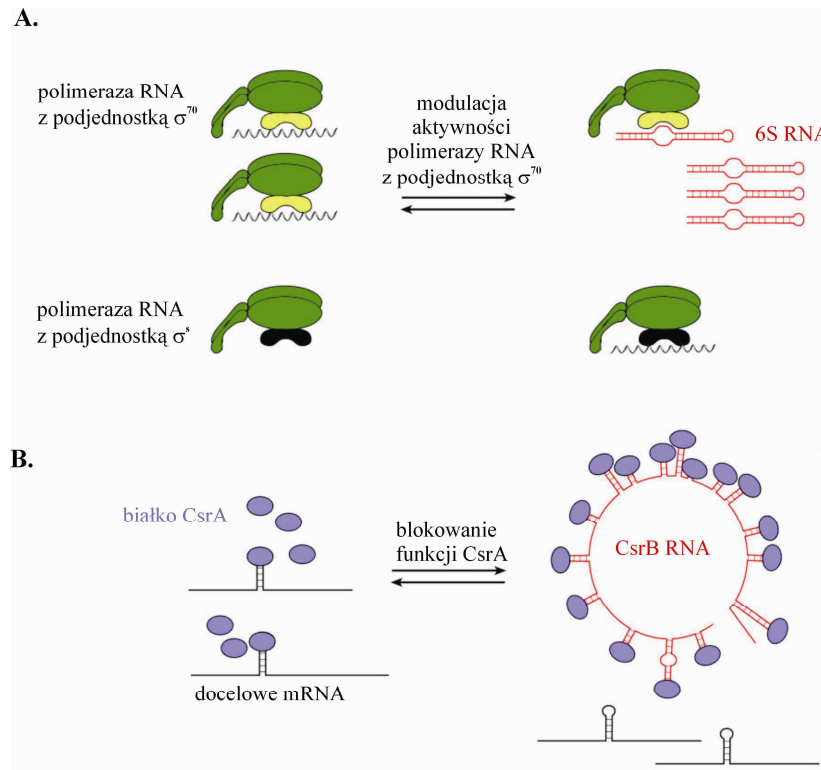
Mniejszą, lecz dość dobrze scharakteryzowaną, klasę regulatorowych RNA stanowią cząsteczki mające zdolność modulacji aktywności białek. U *E. coli* jak dotąd znane są tylko dwa przykłady tak działających sRNA.

Pierwszym z nich jest 6S RNA, który inhibuje aktywność polimerazy RNA zawierającej wegetatywny czynnik sigma - sigma 70 zwany też RpoD (144). Jest to główny czynnik sigma odpowiedzialny za rozpoznawanie większości promotorów (145). Tak jak zostało to omówione wcześniej, DsrA, RpoA, OxyS oraz prawdopodobnie jeszcze inne sRNA

poprzez parowanie z mRNA *rpoS* odpowiedzialne są za modulowanie poziomu podjednostki sigma s polimerazy RNA. Podjednostka ta jest niezbędna do rozpoznawania promotorów niektórych genów, które muszą ulec transkrypcji w czasie stacjonarnej fazy wzrostu oraz w warunkach stresowych. Działanie 6S RNA polega natomiast na bezpośrednim oddziaływaniu z podjednostką sigma 70, a tym samym inhibowaniu polimerazy RNA zawierającej tą właśnie podjednostkę (146). Ten mechanizm działania ułatwia polimerazie RNA, zawierającej podjednostkę sigma s (lub inne alternatywne podjednostki), rozpoznawanie i inicjowanie transkrypcji z odpowiednich promotorów. 6S RNA został zidentyfikowany pod koniec lat 60-tych ubiegłego wieku jako licznie występujące, stabilne RNA (147), a jego funkcja pozostawała długo nieznana. RNA podlega dojrzewaniu z dłuższego transkryptu, który koduje 6S RNA oraz białko YgfA o nieznannej funkcji. Poziom 6S RNA wzrasta, kiedy komórka wchodzi w stacjonarną fazę wzrostu. Początkowo 6S RNA jest dwuniciowy z centralnie zlokalizowanym jednoniciowym obustronnym wybrzuszeniem, które jest istotne dla zdolności wiązania się z polimerazą. Na podstawie struktury 6S RNA przypominającej otwarty promotor proponuje się, że blokuje ono funkcję podjednostki sigma 70 na zasadzie konkurencji z promotorem w DNA (148), mechanizm ten schematycznie przedstawiono na rysunku 10. Dowiedziono również, że polimeraza RNA może wykorzystywać 6S RNA, jako matrycę do syntezy RNA (pRNA). Taka synteza destabilizuje kompleks 6S/polimeraza prowadząc z kolei do uwolnienia pRNA/6S RNA (149, 150).

Drugim przykładem cząsteczek należących do tej rodziny sRNA są CsrB (151) oraz jego analog CsrC (152). Wiążą się one z CsrA, białkiem wiążącym mRNA, uniemożliwiając mu oddziaływanie z substratami. CsrA jest posttranskrypcyjnym regulatorem, który wiąże specyficzne sekwencje zlokalizowane w rejonie 5'UTR swoich docelowych mRNA. U *E. coli* białko to reguluje translację wielu genów związanych z metabolizmem węgla oraz powstawaniem biofilmu, tworzącego zwartą trójwymiarową kolonię bakterii. CsrA może wpływać na zmianę stabilności mRNA lub translację zarówno w sposób negatywny, jak i pozytywny (153). CsrB RNA zbudowany z 360 nukleotydów i CsrC RNA zawierający 245 nukleotydy, choć różnią się długością, mają podobną podstawową strukturę drugorzędową. Oba zbudowane są z powtórzonych spinek zawierających rejony konserwatywne. Sekwencje te są takie same jak rozpoznawane przez białko CsrA w docelowych mRNA. Dzięki temu, że CsrB zawiera aż 18 wspomnianych rejonów a CsrC 9, podczas gdy w UTR mRNA jest ich od jednego do zaledwie kilku, oba sRNA bardzo skutecznie „wyłapują” CsrA blokując jego funkcje (151, 152, 154). Szczegółowa rola i mechanizm działania tych sRNA nie są do końca poznane. Proponowany mechanizm działania CsrB przedstawiono schematycznie na rysunku

10. Wiadomo, że CsrA moduluje ekspresję wielu różnych genów, a CsrB i CsrC RNA są antagonistami tych procesów. Różnorodne badania pokazują, że ekspresja białka CsrA, jak i powstawanie CsrB i CsrC RNA podlegają złożonej regulacji.



Rysunek 10. Mechanizm regulacji aktywności białek przez 6S oraz CsrB sRNA (50).

W przypadku sRNA działających poprzez parowanie się z docelowym mRNA ich homologi znaleźć można tylko u blisko spokrewnionych bakterii, natomiast homologi 6S RNA i CsrB/CsrC RNA zidentyfikowano u wielu różnych zarówno gram-dodatnich i gram-ujemnych bakterii (144, 155).

2.5. Dwufunkcyjne RNA

Ciekawym przypadkiem opisanym u gram-pozytywnych bakterii są dwufunkcyjne RNA. Kodują one małe białko jednocześnie działając jako regulatorowe RNA. Jednym z takich RNA jest RNA III zidentyfikowany u *S. aureus*. Jest to jedno z najdłuższych znanych regulatorowych RNA, zbudowane z 514 nukleotydów w skład, którego wchodzi 14 spinek. RNA III jest dwufunkcyjną cząsteczką kodującą na końcu 5' białko δ -hemolizynę oraz niezależnie od tej funkcji działającą również jako niekodujące regulatorowe RNA. Pod jego kontrolą znajduje się kilka mRNA biorących udział w kontroli wirulencji; reguluje ekspresję

kilku białek powierzchniowych takich, jak białko powierzchniowe A, aktywuje ekspresję toksyn wydzielanych na zewnątrz komórki takich jak α -hemolizyna (156). Różne fragmenty RNA III biorą udział w regulacji różnych docelowych cząsteczek. Dla przykładu, koniec 3' jest niezbędny do represji *spa* mRNA kodującego białko A (157, 158), a koniec 5' bierze udział w aktywacji ekspresji *hla* mRNA kodującego α -hemolizynę (159).

Tego typu RNA pełniące jednocześnie rolę mRNA oraz regulatorowych RNA działających w układzie *trans* nie zostały jak dotąd znalezione u *E. coli* ani też u żadnych innych gram-negatywnych bakterii.

Podsumowując, nasuwa się pytanie *dlaczego to właśnie RNA odgrywają tak istotną rolę jako cząsteczki regulatorowe w czasie działania na komórkę czynnika stresowego?* Bardzo sensowna wydaje się być hipoteza zakładająca, że to niski nakład energii oraz krótki czas potrzebny do syntezy małych RNA, w porównaniu z syntezą białek, czynią z nich idealne regulatory niezbędne do natychmiastowej odpowiedzi na zmieniające się warunki środowiska. Również mniejsza stabilność RNA w porównaniu ze białkami wydaje się być bardziej pożądana w sytuacji, gdy regulator ma działać przejściowo i powinien szybko ulegać degradacji. Ogromnym atutem jest też niezwykle plastyczność strukturalna RNA umożliwiającą oddziaływanie pojedynczemu, małemu, regulatorowemu RNA z różnymi docelowymi cząsteczkami.

Nie należy oczywiście zapominać, że poza omówionymi tutaj sRNA bakterie kodują jeszcze wiele innych RNA pełniących regulatorowe funkcje. Ogromną grupę stanowią te, które są częścią 5' lub 3' rejonów nieulegających translacji w mRNA. Działają one w układzie *cis*, na cząsteczkę w obrębie, której się znajdują poprzez zmianę swojej struktury. Gdy zmiana struktury następuje pod wpływem temperatury nazywane są one termosensorymi (160), a gdy zmiana następuje poprzez związanie niskocząsteczkowego efektora, wówczas nazywane są ryboprzełącznikami (ang. *riboswitches*) (161). Wśród innych ważnych regulatorów znajdują się także strukturalne oraz enzymatyczne RNA takie, jak wysoce konserwatywne RNA RNazy P, który to enzym zaangażowany jest w dojrzewanie tRNA i rRNA (162). Innym jest 4,5S RNA zaangażowany w mechanizm sekrecji białek (163). Niezwykle ważnym sRNA, będącym „kontrolerem jakości” w czasie translacji jest tmRNA. Umożliwia on dokończenie wadliwej transkrypcji w procesie trans-translacji, czego efektem jest naznaczenie niefunkcjonalnego białka specyficznym jedenastoaminokwasowym fragmentem, który kieruje je do degradacji przez proteazy (164, 165). Ponieważ w niniejszym opracowaniu skupiono się na potranskrypcyjnych regulatorowych RNA, które wpływają na

inhibicję lub aktywację docelowych RNA oraz białek, poprzez bezpośrednie parowanie się z nimi, wszystkie pozostałe regulatorowe RNA, choć niezwykle istotne dla prawidłowego funkcjonowania komórki bakteryjnej, ze względu na zupełnie inny charakter regulacji oraz mechanizmy działania nie zostały tutaj opisane.

III. WYNIKI I DYSKUSJA

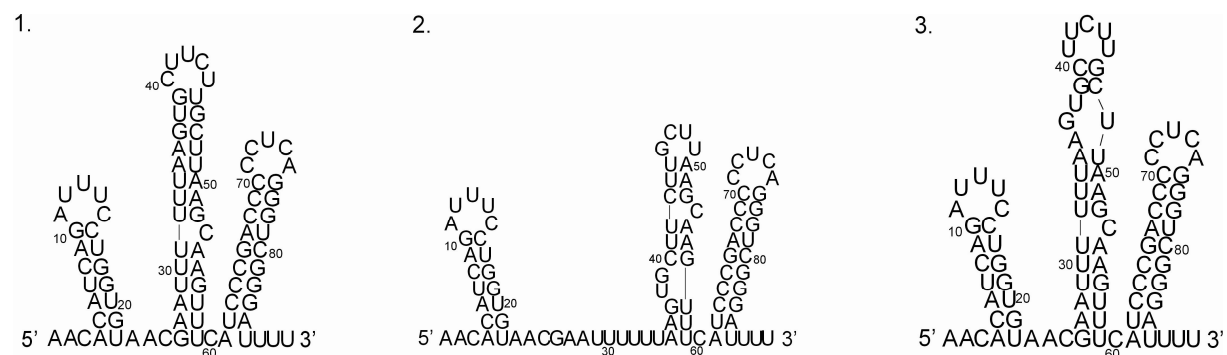
1. Wykorzystanie metody izoenergetycznych mikromacierzy (mapowania mikromacierzowego) do badania struktury drugorzędowej DsrA RNA i jego oddziaływań z innymi biomolekułami.

1.1. Wprowadzenie

DsrA RNA z *E. coli* jest jednym z intensywniej badanych, pod względem zarówno struktury jak i funkcji, małych bakteryjnych (88 reszt nukleotydowych) niekodujących RNA. Do tej pory zaproponowano w literaturze trzy różniące się między sobą modele struktury drugorzędowej tej cząsteczki (Rysunek 11). Czyni to z DsrA RNA szczególnie dobry model do badań mapowania mikromacierzowego, gdyż stwarza możliwość uzyskania nowych informacji dotyczących struktury tej cząsteczki i jednoczesnego porównania ich z wynikami uzyskanymi przez innych badaczy.

Pierwszy model struktury DsrA RNA został zaproponowany wyłącznie na podstawie analiz bioinformatycznych opartych o właściwości termodynamiczne pofałdowania RNA (83). Drugi natomiast na podstawie mapowania enzymatycznego z wykorzystaniem rybonukleaz T1, S1 i V1 (87). Trzeci z modeli struktury drugorzędowej DsrA RNA zaproponowano analizując, poza wynikami trawienia rybonukleazami S1 i V1, również cięcia z wykorzystaniem RNazy H oraz DNAzymów (166). We wszystkich trzech modelach na strukturę DsrA RNA składają się trzy rejony strukturalne (I-III), z których pierwszy i trzeci to stabilne struktury typu spinki do włosów, nazywane w dalszej części rejonem I i III. Dyskusyjny pozostaje rejon środkowy, zlokalizowany pomiędzy 23 a 60 resztą nukleotydową, zwany dalej rejonem II. Z jego sekwencji nukleotydowej wnioskować można, że rejon ten jest termodynamicznie najmniej stabilny. Być może ten fragment DsrA RNA jest na tyle termodynamicznie labilny, że występuje w postaci różnych konformerów w zależności od warunków prowadzonej analizy jego struktury, co mogłoby tłumaczyć różnice w proponowanych modelach jego pofałdowania. Struktury spinkowe rejonu I i III są termodynamicznie bardzo stabilne. Program RNAstructure 4.6 podaje wartości energii swobodnej (ΔG°_{37}) równe -7,0 i -18,6 kcal/mol odpowiednio dla spinki I i III. Dla spinki II proponowanej przez Sledejski wartość energii swobodnej generowana przez RNAstructure

4,6 wynosi $-5,2$ kcal/mol. Natomiast spinka II proponowana przez Lease i Belfort miałaby destabilizujący wpływ na strukturę, gdyż wartość jej energii swobodnej jest dodatnia i równa $2,8$ kcal/mol. Zaproponowana przez Rolle struktura spinki II ma stabilność termodynamiczną równą $-2,3$ kcal/mol. Wartości energii swobodnej dla całej cząsteczki DsrA RNA obliczone przez program RNAstructure 4.6 wynoszą $-33,5$, $-25,8$ oraz $-30,5$ kcal/mol odpowiednio dla struktur proponowanych przez Sledejski, Lease i Belfort oraz Rolle (Rysunek 11).



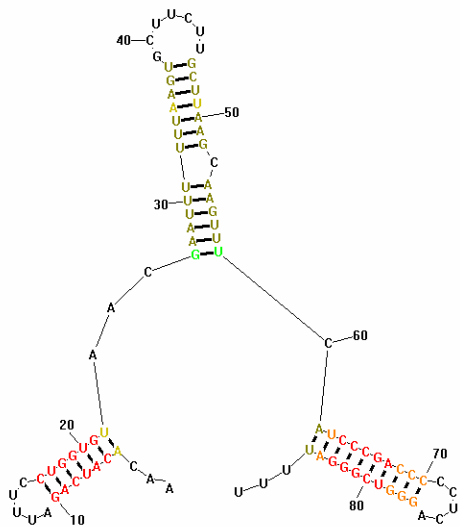
Rysunek 11. Struktura DsrA RNA zaproponowana przez (1) Sledejski (1995), (2) Lease i Belfort (2000) i (3) Rolle (2006).

1.2 Analiza struktur DsrA RNA wygenerowanych przez program komputerowy, służących do przewidywania struktury drugorzędowej RNA

Przed rozpoczęciem badań struktury DsrA RNA sprawdzono, jakie struktury drugorzędowe generuje dla niej program RNAstructure 4.6 służący do przewidywania struktur drugorzędowych RNA na podstawie parametrów termodynamicznych (8). Wygenerowano możliwe sposoby pofałdowania DsrA RNA (struktury suboptymalne) w przedziale 20% różnicy najniższej energii swobodnej oraz dla „*window size*” równego 1, co oznacza, że suboptymalne struktury mogą się różnić od siebie przesunięciami nukleotydów zaledwie o jedna resztę. Otrzymano osiem struktur DsrA RNA w obrębie, których - jak można było to przewidzieć - różnice dotyczyły rejonu środkowego (rejon II) zlokalizowanego pomiędzy dwoma stabilnymi spinkami I i III. Tylko w przypadku struktury o najniższej wartości energii swobodnej (Rysunek 12A), która jednocześnie jest zgodna ze strukturą proponowaną przez Sledejski, prawdopodobieństwo wystąpienia określonych par zasad w tym rejonie jest stosunkowo wysokie i wynosi pomiędzy 80 a 95%. W pozostałych proponowanych strukturach (Rysunek 12B-H) prawdopodobieństwo wystąpienia poszczególnych par zasad w tym rejonie wynosi mniej niż 50%, co potwierdzałyby przypuszczenie, że ewentualne powstające struktury w tym rejonie są mało stabilne.

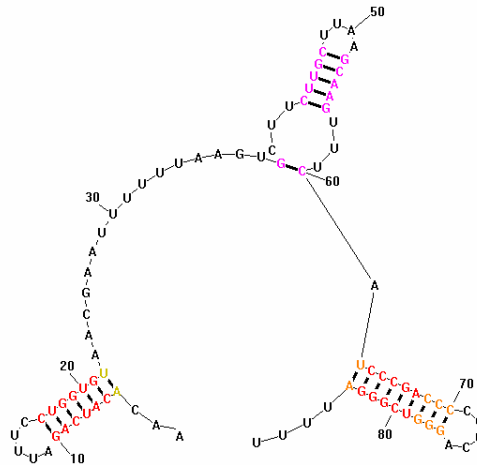
Jednocześnie żadna z wygenerowanych struktur nie jest zgodna z którąś z dwóch zaproponowanych na podstawie danych eksperymentalnych. Przykład ten pokazuje, iż analizy *in silico*, choć przydatne, bywają niewystarczające do zaproponowania struktury i niezbędne jest wsparcie ich metodami eksperymentalnymi. Przypadek struktury DsrA RNA jest o tyle intrygujący, że choć cząsteczka ta jest niezwykle intensywnie badana, zarówno pod względem struktury jak i funkcji i stosunkowo dużo już o niej wiadomo, dane eksperymentalne dotyczące jej struktury drugorzędowej, pochodzące z różnych grup badawczych są niejednoznaczne.

A.



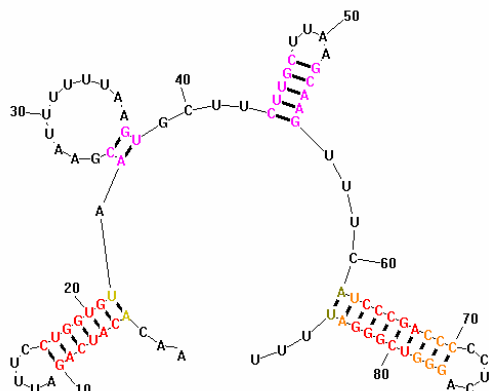
$$\Delta G^{\circ}_{37} = -33,5 \text{ kcal/mol}$$

B.



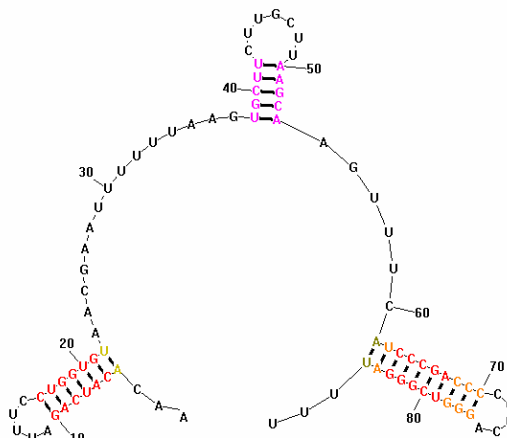
$$\Delta G^{\circ}_{37} = -31,4 \text{ kcal/mol}$$

C.



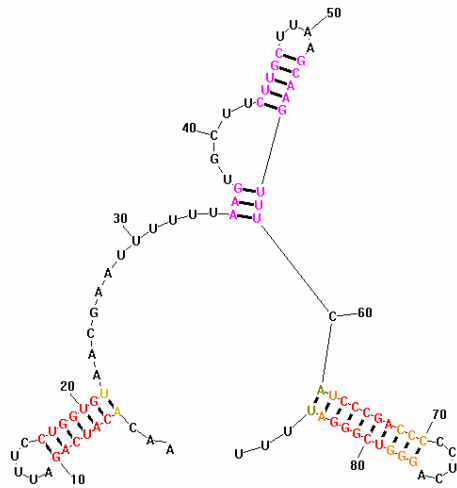
$$\Delta G^{\circ}_{37} = -31,1 \text{ kcal/mol}$$

D.



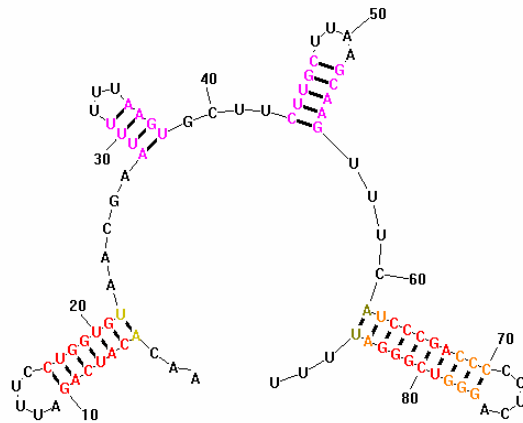
$$\Delta G^{\circ}_{37} = -29,4 \text{ kcal/mol}$$

E.



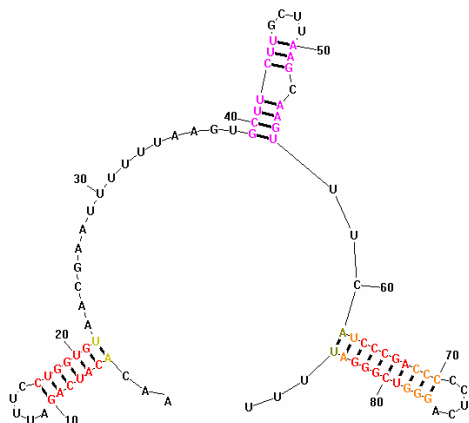
$$\Delta G_{37}^{\circ} = -29,2 \text{ kcal/mol}$$

F.



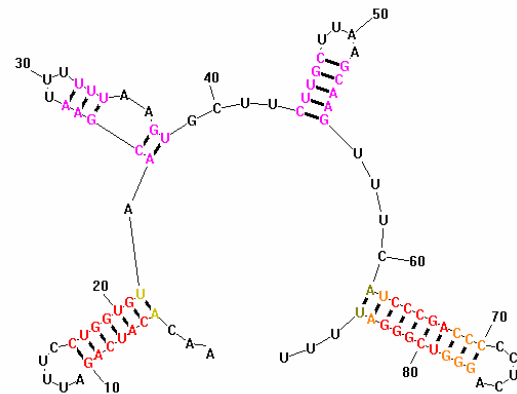
$$\Delta G_{37}^{\circ} = -28,8 \text{ kcal/mol}$$

G.



$$\Delta G_{37}^{\circ} = -28,4 \text{ kcal/mol}$$

H.



$$\Delta G_{37}^{\circ} = -28,4 \text{ kcal/mol}$$

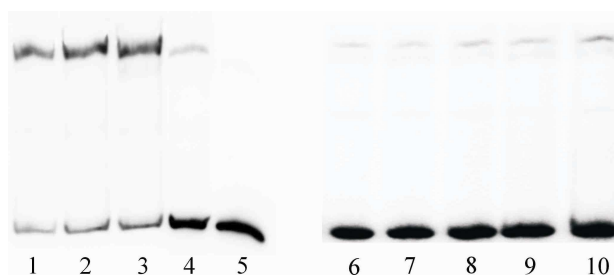
Rysunek 12. Struktury DsrA RNA wygenerowane przez program RNAStructure 4.6 wraz z wartościami energii swobodnej. Kolorami zaznaczono prawdopodobieństwo tworzenia się par zasad i tak odpowiednio: czerwonym <99%;100%>, pomarańczowym <95%;99%>, żółtozielonym <90%;95%>, oliwkowozielonym <80%;90%>, jasno zielonym <70%;80%>, jasno niebieskim <60%;70%>, granatowym <50%;60%>, różowym <0%;50%>.

1.3. Otrzymywanie DsrA RNA

Cząsteczkę DsrA RNA wykorzystywaną do badań struktury drugorzędowej otrzymywano metodą transkrypcji *in vitro*. W celu otrzymania matrycy DNA niezbędnych do transkrypcji zaprojektowano i zsyntetyzowano 2 oligomery DNA - DsrA1 i DsrA2 - zgodnie z procedurami opisanymi w rozdziale Materiały i Metody. Oligonukleotydy były tak zaprojektowane, aby otrzymane matrycowe DNA zawierało od końca 5' promotor dla polimerazy T7 oraz dodatkowe dwie reszty guanozynowe, w celu zwiększenia wydajności transkrypcji. Oligomery były komplementarne do siebie na odcinku 23 nukleotydów w

rejonie końców 3'. Równomolowe ilości oligomerów poddawano hybrydyzacji a następnie reakcji PCR, w której następowało „wypełnianie” brakujących fragmentów nici. Otrzymane DNA oczyszczano i poddawano reakcji transkrypcji *in vitro*, po uprzednim sprawdzeniu jego składu nukleotydowego poprzez sekwencjonowanie. Powstałe RNA oczyszczano metodą elektroforezy w warunkach denaturujących. Przed przystąpieniem do eksperymentów DsrA RNA znakowano na końcu 5' izotopem ^{32}P .

Przed przystąpieniem do mapowania mikromacierzowego przetestowano warunki denaturacji i renaturacji DsrA RNA w różnych buforach, aby uzyskać homogeny strukturalnie preparat. Było to szczególnie istotne biorąc pod uwagę możliwość istnienia różnych konformerów (zwłaszcza w rejonie II) oraz tendencji DsrA RNA do dimeryzacji (89). Profil migracji cząsteczek analizowano na niedenaturujących żelach poliakrylamidowych (Rysunek 13).



Rysunek 13. Rozdział DsrA RNA w 10 mM Tris-HCl pH 7,5 w różnych stężeniach NaCl i MgCl_2 . Ścieżki 1-3: cząsteczka nie poddana denaturacji i renaturacji, ścieżki 4-10: przed rozdziałem przeprowadzono denaturację i renaturację 3 minuty 95°C , 20 minut 25°C . Stosowano w następujące bufora: **1** - 1 M NaCl, 0,2 mM MgCl_2 (bufor III), **2**-0,2 M NaCl, 4 mM MgCl_2 (bufor II), **3** i **4** - 1 M NaCl, 4 mM MgCl_2 (bufor I), **5** - 1 mM Na_2EDTA , **6** - 1 M NaCl, 0,2 mM MgCl_2 (bufor III), **7** - 0,2 M NaCl, 4 mM MgCl_2 (bufor II), **8**- 1 M NaCl, 4 mM MgCl_2 (bufor I) **9** - 0,2 M NaCl, 0,2 mM MgCl_2 (bufor IV) **10** - 1 M NaCl, 0,5 mM Na_2EDTA (bufor VIII). Analizę prowadzono na 6% żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących w 4°C .

Zaobserwowano, że warunki buforowe nie powodują zmian w migracji monomeru DsrA RNA. W dowolnie wybranym buforze do hybrydyzacji w obrazie elektroforetycznym obserwuje się prążki RNA zlokalizowane na tej samej wysokości. W celu obniżenia ilości dimerów w mieszaninie poniżej 10% konieczne jest przeprowadzenie fałdowania cząsteczki przed każdym eksperymentem, poprzez jej denaturację i renaturację w wybranym buforze hybrydyzacyjnym (Rysunek 13, ścieżki 4-10). W przypadku nie poddawania cząsteczki denaturacji i renaturacji zmniejszenie procentu dimerów można uzyskać używając buforu nie zawierającego jonów magnezu (bufor VII lub IX). Całkowite wykluczenie form dimerycznych możliwe jest w przypadku użycia buforu zawierającego tylko Tris-HCl oraz 1 mM EDTA (Rysunek 13, ścieżka 5), jednakże w takich warunkach buforowych przeprowadzenie eksperymentu hybrydyzacji na mikromacierzy nie jest możliwe.

1.4. Przygotowanie mikromacierzy dedykowanych badaniu struktury DsrA RNA

Chcąc przygotować mikromacierze konieczne do badania struktury DsrA RNA niezbędne było ustalenie sekwencji pentanukleotydów komplementarnych do DsrA RNA, z przesunięciem o jedną resztę nukleotydową („krok po kroku”). W tym celu skorzystano z funkcji *OligoWalk* dostępnej w programie RNAstructure, który wyselekcjonował 86 oligonukleotydów komplementarnych do DsrA RNA. W bibliotece sond, jaką dysponuje nasza pracownia znajduje się 855 z 1024 możliwych pentanukleotydów. Ilość dostępnych sond wynika z faktu, iż dla detekcji dupleksu hybrydacyjnego jego trwałość termodynamiczna (energia swobodna, ΔG_{37}°) musi być korzystniejsza niż -6 kcal/mol (E. Kierzek, dane nieopublikowane). Pomimo zastosowania modyfikowanych reszt nukleotydowych typu LNA oraz dodatkowej reszty LNA G na końcu 3', dla 169 pentamerów bogatych w reszty adenozyiny i urydyny nie udało się uzyskać trwałości termodynamicznej korzystniejszej niż -6 kcal/mol. W związku z tym sondy te nie zostały zsyntetyzowane i nie są dostępne w bibliotece. Część DsrA RNA zawiera fragmenty bogate w resztę urydyny, dlatego też z 86 wskazanych przez *OligoWalk*, dostępnych w bibliotece w postaci sond było tylko 66 oligonukleotydów. Z tych 66 dostępnych, dwie sondy (numer 14 i 37, Tabela 5) mają po dwa komplementarne miejsca w cząsteczce. Dla fragmentu cząsteczki DsrA RNA szczególnie bogatego w reszty urydyny, zlokalizowanego pomiędzy 28 a 36 resztą nukleotydową nie byłoby żadnej komplementarnej sondy. Fragment ten niefortunnie należy do rejonu II, będącego obiektem sporu oraz zaangażowanego w oddziaływanie z innymi molekułami. Biorąc pod uwagę powyższe fakty zdecydowano się na syntezę ośmiu dłuższych, heptamerowych sond, z których sześć „pokrywa” właśnie ten fragment DsrA RNA a dwie są komplementarnych do rejonów, gdzie brakowało dwóch sąsiadujących sond. Niewielkie wydłużenie sond do heptamerów pozwoliło uzyskać wartość energii swobodnej dupleksu około -10 kcal/mol, a zatem wystarczającą do jego detekcji podczas hybrydacji. Sekwencje wszystkich sond używanych do badania struktury cząsteczki DsrA RNA zestawiono w tabeli 5. Jako miejsce wiązania się sondy oznaczono resztę nukleotydową w DsrA RNA, na którą przypada środek penta- lub heptameru. W przypadku sond heksamerowych, które na końcu 3' zawierają dodatkowe LNA-G jako miejsce wiązania sondy również przyjęto środek fragmentu na który przypada komplementarny pentamer. Chcąc pozostać w zgodzie z numeracją występującą w literaturze numerację reszt nukleotydowych w DsrA RNA rozpoczęto od pierwszego A, co oznacza, że dwa dodatkowe G niezbędne do transkrypcji pominięto w numeracji. W tabeli 5 przedstawiono wartości energii swobodnej dupleksów niemodyfikowanych RNA/RNA przewidywane za pomocą

funkcji „*fold RNA bimolecular*” w programie RNAstructure 4.6, a także wartości energii swobodnej dupleksów modyfikowana sonda-RNA obliczone na podstawie parametrów najbliższego sąsiedztwa ustalonych w Pracowni Chemii RNA. Obliczenia prowadzono według wzoru podanego w rozdziale II.1.5 (Część Literaturowa).

Tabela 5. Zestawienie izoenergetycznych sond użytych do badań mikromacierzowych cząsteczki DsrA.

pozycja w DsrA	nazwa sondy	sekwencja penta- lub heptameru	sekwencja modyfikowanej sondy	nukleotyd parujący się z dodatkowym 3'G	przewidziane dG (kcal/mol) dla komplementarnego wiązania RNA-RNA	przewidziane dG (kcal/mol) dla wiązania modyfikowana sonda-RNA, 100 mM NaCl
1	758	GUUCC	GUUCCG	niespar. G	-4,7	-7,5
2	958	UGUUC	UGUUCG	G	-3,0	-7,9
3		GUGUU	brak		-2,8	
4	956	UGUGU	UGUGUG	A	-3,5	-7,8
5	239	AUGUG	DUGUGG	A	-2,9	-9,3
6	572	GAUGU	GDUGUG	C	-3,2	-11,0
7	911	UGAUG	UGDUGG	A	-3,1	-9,0
8	484	CUGAU	CUGDUG	C	-3,1	-10,7
9	889	UCUGA	UCUGDG	A	-3,9	-9,4
10	223	AUCUG	DUCUGG	U	-3,1	-9,2
11		AAUCU	brak		-1,4	
12	14	AAAUC	DDDUCG	A	-0,7	-7,9
13		GAAAU	brak		-0,7	
14	641	GGAAA	GGDDDG	A	-2,9	-9,6
15	161	AGGAA	DGGDDG	U	-3,6	-10,2
16	297	CAGGA	CDGGAG	U	-5,3	-10,1
17	331	CCAGG	CCDGG		-6,7	-9,2
18	83	ACCAG	DCDGG	C	-5,1	-12,6
19	277	CACCA	CDCCAG	C	-5,1	-11,1
20	70	ACACC	DCDCC		-5,2	-8,3
21	786	UACAC	UDCDCG	G	-3,2	-7,8
22		UUACA	brak		-1,4	
23	754	GUUAC	GUUDCG	U	-2,5	-7,7
24	24-7	UCGUUAC	UCGUUAC		-6,8	-10,6
25		UCGUU	brak		-2,8	
26	988	UUCGU	UUCGUG	A	-2,8	-7,3
27	247	AUUCG	DUUCGG	A	-2,2	-8,1
28	28-7	AAAUUCG	AADUUCG		-4,0	-9,3
29	29-7	AAAAUUC	DDDDUUC		-2,5	-9,7
30		AAAAU	brak		1,3	
31	31-7	AAAAAAU	DDDDDDU		-0,5	-9,7
32		AAAAA	brak		1,5	
33		UAAAA	brak		1,1	
34	34-7	CUUAAAA	CUUDDDD		-2,4	-9,8
35	35-7	ACUUAAA	DCUDDDD		-3,2	-10,4
36	36-7	CACUAAA	CDCUUDA		-4,9	-10,1
37		CACUU	brak		-2,7	
38	584	GCACU	GCDUG	A	-5,2	-8,4
39	146	AGCAC	AGCDCG	A	-5,2	-9,4
40	37	AAGCA	DDGCDG	G	-3,4	-10,3
41	522	GAAGC	GDAGCG	U	-4,7	-9,5
42	131	AGAAG	DGDDGG	G	-2,9	-9,6
43	33	AAGAA	DDGDDG	C	-1,2	-11,4
44	265	CAAGA	CDDGDG	U	-2,9	-9,5

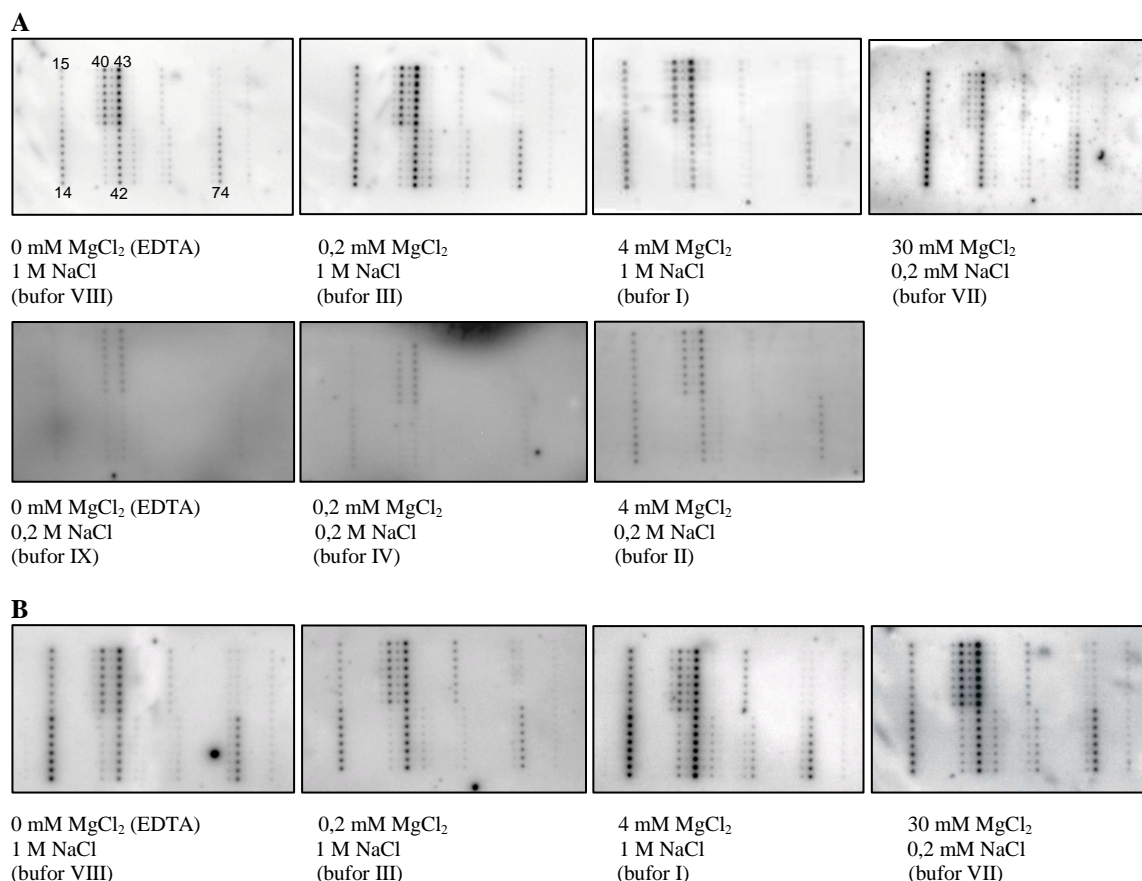
45	579	GCAAG	G C D D G G	U	-4,4	-9,9
46	145	AGCAA	D G C D D G	C	-3,4	-11,9
47	37	AAGCA	D D G C D G	U	-3,4	-10,3
48	778	UAAGC	U D D G C G	U	-3,1	-9,3
49	49-7	CUUAAGC	C U U A A G C		-6,6	-10,4
50		C U U A A	brak		-0,6	
51	637	GCUUA	G C U U D G	U	-3,1	-8,9
52	928	UGCUU	U G C U U G	U	-3,4	-7,9
53	1000	UUGCU	U U G C U G	A	-3,4	-7,9
54	506	CUUGC	C U U G C G	A	-4,4	-9,3
55		A C U U G			-2,7	
56	32	AACUU	D D C U U G	C	-1,0	-9,7
57	8	AAACU	D D D C U G	A	-1,0	-6,9
58	514	GAAAC	G D D D C G	A	-2,3	-8,1
59	897	UGAAA	U G D D D G	G	-1,2	-8,4
60	225	AUGAA	D U G D D G	U	-1,4	-9,1
61	569	GAUGA	G D U G D G	U	-3,4	-9,3
62	655	GGAUG	G G D U G G	U	-4,8	-9,7
63	676	GGGAU	G G G D U G	C	-5,5	-11,3
64	425	CGGGA	C G G G A		-6,8	-9,7
65	875	UCGGG	U C G G G		-6,8	-9,7
66	731	GUCGG	G U C G G		-6,2	-9,3
67	695	GGUCG	G G U C G G	C	-6,2	-13,2
68	686	GGGUC	G G G U C		-7,1	-9,3
69	684	GGGGU	G G G G U		-7,5	-10,3
70	683	GGGGG	G G G G G		-9,1	-9,3
71	171	AGGGG	A G G G G		-7,4	-9,9
72	555	GAGGG	G A G G G		-7,0	-9,0
73	907	UGAGG	U G D G G G	C	-5,3	-12,9
74	483	CUGAG	C U G D G G	C	-4,6	-12,2
75	377	CCUGA	C C U G D G	C	-5,3	-12,7
76	351	CCCUG	C C C U G		-6,7	-9,2
77	88	ACCCU	A C C C U G	C	-5,8	-12,1
78	534	GACCC	G A C C C		-7,1	-8,8
79	390	CGACC	C G D C C		-6,2	-9,2
80	354	CCGAC	C C G D C		-6,2	-9,0
81	345	CCCGA	C C C G A		-6,8	-9,3
82	855	UCCCG	U C C C G		-6,8	-9,6
83	214	AUCCC	A U C C C G	C	-5,5	-11,2
84	54	AAUCC	D D U C C G	G	-3,1	-9,0
85	14	AAAUC	D D D U C G	G	-0,7	-7,9
86		A A A A U	brak		1,3	

Czerwonym kolorem oznaczono reszty nukleotydowe typu LNA, czarnym 2'-O-metylowane a niebieskim dodatkową resztę LNA G. Literą D oznaczono 2,6-diaminopurynybozyd.

1.5. Mapowanie mikromacierzowe DsrA RNA

1.5.1. Analiza struktury drugorzędowej DsrA RNA za pomocą izoenergetycznych mikromacierzy

Wyniki elektroforezy w warunkach niedenaturujących pozwalały przypuszczać, że obrazy hybrydyzacji DsrA RNA do sond na mikromacierzy powinny być zbliżone do siebie we wszystkich warunkach buforowych. Zdecydowano się przeprowadzić hybrydyzacje w różnych warunkach buforowych, co jednocześnie miało na celu sprawdzenie, jaka jest generalna zasada używania buforów w eksperymentach hybrydyzacji. Bufory różniły się między sobą stężeniami chlorku magnezu, które wynosiło od 0 przez 0,2 i 4 do 30 mM oraz chlorku sodu którego stężenie wynosiło 0,2 lub 1 M. Hybrydyzacje prowadzono również w dwóch różnych temperaturach, w 4 i 22°C. Stosowano też różne czasy płukania mikromacierzy po hybrydyzacji wynoszące od 1 do 5 minut. Na rysunku 14 przedstawiono kilka przykładowych wyników hybrydyzacji.



Rysunek 14. Wybrane wyniki hybrydyzacji DsrA RNA w różnych buforach w temperaturze **(A)** 4°C oraz **(B)** 22°C, czas płukania 1 minuta. Macierz drukowana była w następującym układzie: 1 kolumna, 2 sondy w rzędzie, każda sonda po 8 powtórzeń.

Eksperymenty te potwierdziły założenia postawione po przeprowadzeniu elektroforezy w warunkach natywnych. W ich wyniku można stwierdzić, że warunki buforowe nie powodują wyraźnych zmian strukturalnych w cząsteczce. Zaobserwowano, że temperatura prowadzenia hybrydyzacji nie wpływa na wzór otrzymanych sygnałów. Najintensywniejsze są sygnały otrzymane podczas hybrydyzacji przeprowadzonej w buforze I, czyli posiadającym największą siłę jonową (zawiera 1 M NaCl i 4 mM MgCl₂). W zależności od użytego buforu intensywność wszystkich sygnałów hybrydyzacyjnych zmienia się w sposób proporcjonalny. Stwierdzono, że dla niższych stężeń jonów cały obraz hybrydyzacyjny jest mniej intensywny. Jeżeli jednak rozpatruje się osobno każdy eksperyment i porównuje ze sobą intensywności sygnałów pochodzące z jednej macierzy, wyniki hybrydyzacji przeprowadzonych w różnych buforach nie różnią się w sposób istotny między sobą. Jakkolwiek, w przypadku użycia buforów o stężeniu jonów poniżej pewnej wartości obserwuje się tylko te duplekisy hybrydyzacyjne, które w warunkach wyższych stężeń jonów występowały w postaci najintensywniejszych sygnałów. Nie można jednak do końca generalizować otrzymanych wyników. Generalna na pewno jest reguła, że im wyższa siła jonowa użytego buforu tym trwalsze duplekisy hybrydyzacyjne. Jednakże należy też pamiętać, że nie zawsze warunki buforowe nie będą miały wpływu na strukturę cząsteczki a zatem także na profil hybrydyzacji. Na przykładzie 5S rRNA z *E. coli* pokazano, że w zależności od warunków buforowych zmienia się struktura drugorzędowa cząsteczki a zatem i profil hybrydyzacji (22).

Na podstawie eksperymentów przeprowadzonych dla cząsteczki DsrA RNA stwierdzono jednak, że aby możliwa była detekcja dupleksu hybrydyzacyjnego niezbędne jest zachowanie pewnych warunków jonowych tzn., jeżeli zachowa się wysokie stężenie chlorku sodu równe 1 M, można całkowicie pominąć jony magnezu w buforze. Jeżeli jednak zmniejszy się stężenie chlorku sodu do 200 mM wówczas należy zachować co najmniej 4 mM stężenie jonów magnezu. Z tego powodu po przeprowadzeniu hybrydyzacji w buforze IV lub IX uzyskuje się średniej lub słabej intensywności duplekisy hybrydyzacyjne i to tylko z tymi z sondami, dla których w innych buforach duplekisy te dają najintensywniejsze sygnały (Rysunek 14). Jeśli chodzi o czasy przemywania mikromacierzy po hybrydyzacji zdecydowano się w dalszych eksperymentach pozostać przy 1 minucie, gdyż dłuższe płukanie nie zmieniało obrazu hybrydyzacji, a jedynie powodowało stopniowe odmywanie RNA od sond począwszy od tych, z którymi było ono związane najslabiej.

Wyniki przeprowadzonych eksperymentów mikromacierzowych dla DsrA RNA, otrzymane na podstawie wielu powtórzeń w różnych warunkach hybrydyzacyjnych,

uśredniono i zestawiono w tabeli 6 oraz zaznaczono na rysunku 15. Potwierdziły one wcześniejsze doniesienia literaturowe dotyczące obecności i struktury spinki rejonu I i III (83, 87, 166). Nie zaobserwowano tworzenia się dupleksów hybrydacyjnych w obrębie trzonów spinek I i III. Zaobserwowano silne wiązanie w pozycji 13 i 14 czyli w pętli spinki pierwszej, jak również w pozycji 74 pokazującej dostępność również pętli spinki III. Co do tych stabilnych elementów strukturalnych można stwierdzić, że metoda mapowania mikromacierzowego dostarczyła wyników zgodnych z założeniami tej metody. W rejonach dwuniciowych trzonów spinek brak hybrydacji z sondami, natomiast w rejonach jednoniciowych pętli obserwuje się tworzenie dupleksów hybrydacyjnych. W obrębie jednoniciowym pętli obserwuje się często wiązanie sondy do tylko jednej części pętli. Jest to związane ze strukturą pętli oraz jej sekwencją i zostało również zaobserwowane na modelowych strukturach spinkowych RNA (167). Miejsca hybrydacji w obrębie rejonu środkowego (rejon spinki II) nie przyniosły wyniku, który pozwoliłby na jednoznaczne rozstrzygnięcie sporu dotyczącego poprawności którejś ze struktur proponowanych w literaturze (83, 87, 166). Zaobserwowano silne wiązanie się sond w pozycjach 31, 36, 42, 43 oraz średniej intensywności w pozycjach 40 lub 47 DsrA RNA. W przypadku pozycji 40 i 47 pojawia się problem wynikający z tego, że wiąże się z nimi ta sama sonda (sonda 37), dlatego trudno jest jednoznacznie rozstrzygnąć, do której z nich, czy może do obydwu, wiąże się komplementarna sonda. Jeżeli poprawną strukturą DsrA RNA miałyby być najbardziej korzystna termodynamicznie, czyli zaproponowana przez Sledejski wówczas hybrydacja sond w pozycjach 42 i 43 pokazywałyby dostępność pętli apikalnej spinki II. Jakkolwiek, struktura Sledejski nie tłumaczy dostępność do hybrydacji pozycji 36, która w proponowanej strukturze 15-1 (Rysunek 15, struktura 1) zlokalizowana jest w rejonie dwuniciowym. Wiązanie w pozycji 31 DsrA RNA można wyjaśnić tym, że występuje ono na przeciwko wybrzuszenia jednostronnego, ale wówczas pozostaje pytanie: *dlaczego nie obserwuje się dostępności dla sondy w miejscu wybrzuszenia czyli w pozycji 53 ?* Próba dopasowania wyników mapowania mikromacierzowego do modelu DsrA RNA zaproponowanego przez Lease i Belfort (Rysunek 15-2) również nie da się całkiem wytłumaczyć. W modelu tym proponuje się występowanie rejonu jednoniciowego pomiędzy resztą nukleotydową 23 a 34, zatem rejon ten powinien być dostępny do hybrydacji. Niestety na całym tym odcinku obserwuje się hybrydację tylko w pozycji 31 DsrA RNA, zatem rodzi się wątpliwość czy rzeczywiście odcinek ten na całej długości nie jest zaangażowany w jakiegoś typu oddziaływania. Zastanawiająca pozostaje również pozycja 36, umieszczona w tym modelu w rejonie dwuniciowym. Model struktury drugorzędowej DsrA

RNA zaproponowany przez Rolle (Rysunek 15-3) różni się od modelu Lease i Belfort tylko apikalnym fragmentem spinki II. W modelu tym pozycje 42 i 43 pozostają w pętli apikalnej spinki II, a pozycja 31 występuje na przeciwko jednostronnemu wybrzuszeniu. Dostępna dla sond pozycja 36 proponowana jest tutaj w rejonie jednoniciowym. Jednakże zarówno nukleotydy w pozycji 40 jak i 47 zaangażowane są w oddziaływania typu Watson-Crick z komplementarną resztą nukleotydową.

Na podstawie uzyskanych wyników mapowania mikromacierzowego rozważano trzy kolejne możliwości pofałdowania się DsrA RNA. Pierwszą z nich obrazuje struktura 15-4. Uzyskano ją jako strukturę o najniższej wartości energii swobodnej (-31,4 kcal/mol) wprowadzając do programu RNAstructure 4.6 dane uzyskane z mapowania mikromacierzowego. Do programu wprowadzono je jako wyniki mapowania chemicznego, gdyż nie posiada on opcji mapowania mikromacierzowego. Ze względu na nowatorski charakter badania struktury RNA metodą mapowania mikromacierzowego żaden z programów komputerowych służących do przewidywania struktury drugorzędowej RNA w oparciu o cechy termodynamiczne RNA nie pozwala w sposób bezpośredni na wprowadzenie do niego tzw. ograniczeń (ang. *constraints*) uzyskanych podczas hybrydyzacji. Uzyskana struktura jest tą samą strukturą, która jest generowana jako druga w przypadku, gdy nie wprowadza się żadnych danych eksperymentalnych (Rysunek 12B). Zawiera ona spinki I i III przewidywane także dla struktur 15-1, 15-2 i 15-3. Struktura 15-4 jest w zasadzie zgodna z wynikami mapowania mikromacierzowego. Jedyne zastrzeżenia w stosunku do niej dotyczą braku większej ilości wiązań sond w rejonie jednoniciowy, pomiędzy 23 i 38 resztą nukleotydową. Ponieważ fragment ten jest bogaty w A i U, dlatego też zsyntetyzowano specjalnie dedykowane dłuższe sondy heptanukleotydowe. Mimo tego wiązania sond nie obserwowano. Najprostszym wytłumaczeniem takiego zjawiska byłoby uwikłanie się pewnych fragmentów tego rejonu w oddziaływania helikalne. Struktura DsrA RNA pokazana na rysunku 15-4 tworzenia się ich jednak nie przewiduje. Z punktu widzenia termodynamicznego proponowana struktura wydaje się być najbardziej korzystna. Wartość energii swobodnej spinki II wynosi -4,5 kcal/mol, zatem jest bardziej faworyzowana niż w przypadku dwóch struktur zaproponowanych wcześniej na podstawie danych eksperymentalnych (2,8 kcal/mol i -2,3 kcal/mol odpowiednio przez Lease i Belfort oraz przez Rolle). Najbardziej zgodna z wynikami mapowania mikromacierzowego wydaje się być struktura DsrA RNA oznaczona, jako 5 na rysunku 15. Struktura ta zawiera te same spinki I i III, których tworzenie proponowane jest przez wszystkie wcześniejsze modele tej cząsteczki (Rysunek 15, struktury 1-3). Natomiast, rejon II zbudowany jest z trzech fragmentów

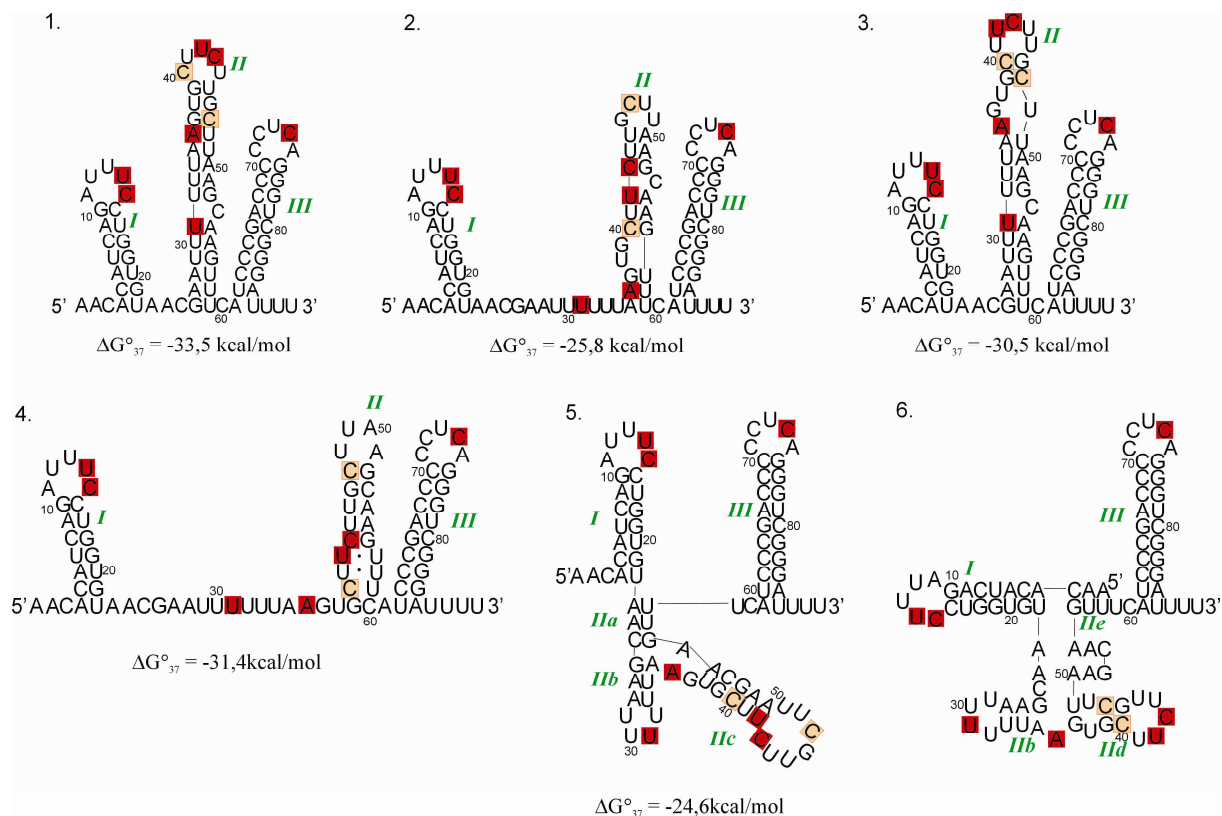
helikalnych oznaczonych IIa, IIb i IIc. Wartość energii swobodnej tej struktury przewidziana przez RNAstructure 4.6 wynosi -24,6 kcal/mol. Całkowicie odmienna jest tutaj budowa fragmentu środkowego (pomiędzy 23 i 58 resztą nukleotydową). Tworzą ją helisa IIa oraz dwie struktury spinkowe oznaczone jako IIb i IIc. Termodynamicznie nie są to bardzo trwałe fragmenty jednak ich trwałość może być zdecydowanie zwiększona poprzez współosiowe oddziaływania warstwowe (ang. *coaxial stacking*) pomiędzy helisami I i IIa oraz IIa i IIb. Badania modelowe przeprowadzone przez grupę Turnera wykazały, że współosiowe oddziaływania warstwowe, w zależności od sekwencji i orientacji sąsiadujących i oddziałujących par zasad, wzmacniają stabilizację (energię swobodną) RNA o 1-2 kcal/mol dla każdego z oddziaływań współosiowych (168). Dodatkowo, fragmenty helikalne IIa-c tworzą rodzaj trójramiennej pętli (ang. *multibranch loop*). Badania modelowych RNA wykazały, że tego typu motywy strukturalne zwiększają stabilność termodynamiczną (169). RNAstructure obliczając energię swobodną do proponowanego pofałdowania RNA nie uwzględnia tego typu oddziaływań. Rozważano także możliwość pofałdowania DsrA RNA, jak pokazuje to struktura 15-6 na rysunku 15. W strukturze tej spinki I i III są identyczne, jak na wszystkich dotychczas proponowanych modelach. Odmienny jest rejon środkowy, gdzie oprócz spinki IIb, tworzy się spinka IIc. Ponadto, sugeruje się oddziaływanie trzech reszt nukleotydowych z końca 5' (AAC) z fragmentem 56-58 (UUG) z powstaniem krótkiej helisy IIe. Również w tym przypadku istnieją podstawy strukturalne i termodynamiczne do współosiowych oddziaływań warstwowych spinki I i helisy IIe (być może także spinki III) oraz spinek IIb i IIc. Dość „luźny” strukturalnie rejon (fragment 23-25 oraz 50-55) jest szczególnie bogaty w reszty adenozyne i być może mógłby spełniać rolę platformy AA, która w obecności kationów metali mogłaby dodatkowo stabilizować strukturę DsrA RNA (170). Istnienie podobnych oddziaływań z udziałem fragmentów bogatych w reszty adenozyne obserwuje się w strukturze krystalicznej intronu grupy I z *Tetrahymena thermophila*. W tym przypadku fragment GAAA oddziałując z konserwatywną wewnętrzną pętlą poprzez międzycząsteczkowe oddziaływania warstwowe łączy dwie długie helisy rybozomu (171).

III. WYNIKI I DISKUSJA

Tabela 6. Uśrednione wyniki hybrydyzacji DsrA RNA

pozycja w DsrA	nazwa sondy	sekwencja penta- lub heptameru	sekwencja modyfikowanej sondy	nukleotyd parujący się z dodatkowym 3'G	przewidziane dG (kcal/mol) dla komplementarnego wiązania RNA-RNA	przewidziane dG (kcal/mol) dla wiązania modyfikowana sonda-RNA, 100 mM NaCl	uśrednione wyniki hybrydyzacji	alternatywne miejsce wiązania	przewidziane dG (kcal/mol) dla alternatywnego miejsca wiązania RNA-RNA	przewidziane dG (kcal/mol) dla alternatywnego miejsca wiązania modyfikowana sonda-RNA, 100 mM NaCl
14	641	GGAAA	GGDDG	A	-2,9	-9,6	s	42/43	-1,4	-4,0
15	161	AGGAA	DGGDDG	U	-3,6	-10,2	s	42/43	-4,4	-9,8
31	31-7	AAAAAAU	DDDDDU		-0,5	-9,7	s			
36	36-7	CACUUA	CDCUUA		-4,9	-10,1	s			
40	37	AAGCA	DDGCDG	G	-3,4	-10,3	m			
42	131	AGAAG	DGDDGG	G	-2,9	-9,6	s	13/14	-1,1	-3,3
43	33	AAGAA	DDGDDG	C	-1,2	-11,4	s	13/14	-0,6	-3,9
47	37	AAGCA	DDGCDG	U	-3,4	-10,3	m			
60	225	AUGAA	DUGDDG	U	-1,4	-9,1	w			
74	483	CUGAG	CUGDGG	C	-4,6	-12,2	m	41/42	-2,4	-4,8

Jako s, m i w zaznaczono sygnały hybrydyzacji odpowiednio o wysokiej, średniej i słabej intensywności. Jeżeli w alternatywnym miejscu wiązania wpisano dwie następujące po sobie pozycje oddzielone ukośnikiem oznacza to dwa środkowe nukleotydy, w przypadku gdy sonda może wiązać się parzystą liczbą reszt nukleotydowych.



Rysunek 15. Proponowane struktury DsrA RNA z zaznaczonymi miejscami hybrydyzacji (czerwone prostokąty). Kolorem pomarańczowym zaznaczono dwa możliwe miejsca hybrydyzacji dla sondy 37. Struktury DsrA RNA zaproponowane przez (1) Sledejski (1995), (2) Lease i Belfort (2000) i (3) Rolle (2006). Struktura (4) wygenerowana przez program RNAstructure 4.6 po wprowadzeniu danych z mapowania mikromacierzowego i cechuje się najniższą energią swobodną (struktura optymalna). Struktury (5) i (6) są strukturami suboptymalnymi wygenerowane przez RNAstructure na podstawie otrzymanych wyników hybrydyzacji oraz pewnych manualnych reorganizacji.

1.5.2. Mikromacierzowe mapowanie modelowego fragmentu odpowiadającego rejonowi II DsrA RNA

Kontrowersyjny rejon środkowy (rejon II) wydaje się być elementem o niskiej stabilności termodynamicznej, zatem interesujące było sprawdzenie jak przedstawia się profil mapowania mikromacierzowego tylko tego rejonu, bez otoczenia z obu stron stabilnymi strukturami spinkowymi I i III. W tym celu zsyntetyzowano chemicznie 38 nukleotydowy fragment RNA, odpowiadający rejonowi II (reszty nukleotydowe od 23 do 60). Otrzymane RNA wyznakowano na końcu 5' izotopem ^{32}P i przeprowadzono hybrydyzacje do mikromacierzy zaprojektowanej dla całej cząsteczki DsrA RNA. Hybrydyzacje przeprowadzano w buforach z 4 mM MgCl_2 i 1 M lub 200 mM NaCl (bufory I i II) oraz w buforze z 1 M NaCl i 0,5 mM Na_2EDTA (bufor VII). Modelowe RNA rozpuszczono w buforze do hybrydyzacji i poddawano denaturacji i denaturacji, identycznie jak w przypadku DsrA RNA pełnej długości, po czym przeprowadzano hybrydyzacje. Eksperymenty te

poprzedzono rozdziałem elektroforetycznym w 4°C w warunkach niedenaturujących we wszystkich trzech używanych buforach. Zaobserwowano, że rejon II DsrA RNA migrował w postaci pojedynczego homogennego prążka.

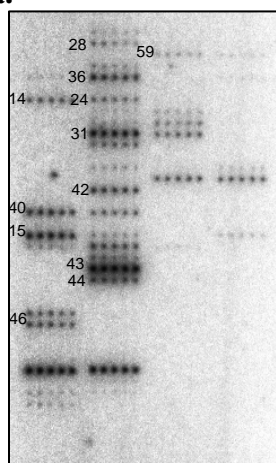
Na podstawie uzyskanych wyników hybrydyzacji można stwierdzić, że izolowany rejon II DsrA RNA jest bardziej dostępny do hybrydyzacji niż wówczas, gdy występuje on w cząsteczce o pełnej długości (Rysunek 16). W profilu hybrydyzacji, poza miejscami dostępnymi w cząsteczce pełnej długości, pojawiają się dodatkowe miejsca o średniej lub słabej intensywności w pozycjach 24, 28, 44, 46 i 59 oraz kilka dodatkowych miejsc o bardzo słabej intensywności. Ponadto pojawia się hybrydyzacja do sond 641 i 161 dedykowanych odpowiednio pozycjom 14 i 15. Badana cząsteczka rozpoczyna się od reszty nukleotydowej 23, a zatem obserwowane sygnały muszą pochodzić z hybrydyzacji sondy nie całkowicie komplementarnej. Sonda 641 (pozycja 14), z najniższą wartością energii swobodnej, nie w pełni komplementarnie, może hybrydyzować do pozycji 58/59 (Tabela 7). Tego typu oddziaływanie byłoby zgodne z obserwacją, iż pozycja ta w badanym fragmencie również jest dostępna dla sondy komplementarnej. Analogiczna sytuacja jest w przypadku sondy 161 (pozycja 15), gdzie najniższą wartość energii swobodnej dupletu hybrydyzacyjnego uzyskuje się dla pozycji 42/43, przy czym w modelowym RNA rejon ten jest nawet bardziej dostępny dla komplementarnych sond niż ma to miejsce w DsrA RNA o pełnej długości. Pojawienie się dodatkowych sygnałów w pozycjach 24 i 59 zapewne wynika z tego, że znajdują się one na końcach badanej cząsteczki a zatem w rejonach podatnych na otwieranie. W cząsteczce pełnej długości obie pozycje znajdowały się tuż obok stabilnych helis, co zapewne czyniło je niedostępnymi dla sond.

Wyniki hybrydyzacji wydzielonego fragmentu środkowego DsrA RNA w różnym stopniu korelują z strukturami oznaczonymi jako 4-6 na rysunku 15. Jeśli rozpatrywać strukturę 4 to dodatkowe miejsca wiązań mogą wynikać z jednoniciowego charakteru (pozycje 24 i 28) analizowanego fragmentu (Rysunek 16-4). Ponadto wiązanie się sondy do pozycji 59 to zapewne efekt bardzo słabego ustrukturalizowania 3'-terminalnego rejonu spinki II. Pojawienie się wiązań sond do pozycji 44 i 46, a zatem do fragmentu helikalnego następuje od strony 5' co jest zgodne z wiązaniem się sond do modelowych spinek zawierających trójnukleotydowe 5'- i 3'-niesparowane końce (167). Jeżeli spojrzeć się na lokalizację zmapowanych reszt nukleotydowych w strukturze 5 (Rysunek 16-5) zaproponowanej po mapowaniu mikromacierzowym DsrA o pełnej długości widać, że pojawienie się sygnału dla pozycji 24 i 59 mogłoby wynikać z faktu otwierania się helisy IIa, która w modelowym fragmencie stała się terminalną, dodatkowo zakończoną dwiema parami

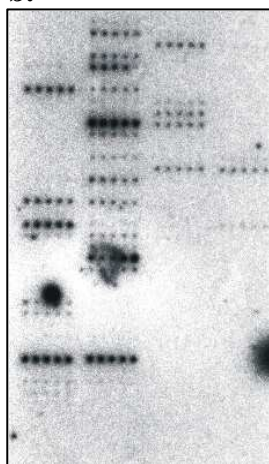
A-U, a zatem podatną na rozplatanie. Wiązanie pozostałych sond ma miejsce w pozycji terminalnej helisy IIb (pozycja 28) i oraz fragmencie jednoniciowym spinki IIc (pozycje 44 i 46). Hybrydyzacje w tych pozycjach wskazują na zwiększenie dostępności pętli IIb i IIc, co może sugerować, że w strukturze DsrA RNA o pełnej długości pętle te uwikłane są w oddziaływania wyższego rzędu (Rysunek 16). Praktycznie identyczne wyjaśnienie można użyć dla wytłumaczenia wiązania się sond do wydzielonego fragmentu środkowego, gdyby był on częścią struktury 6 (Rysunek 15-6).

A

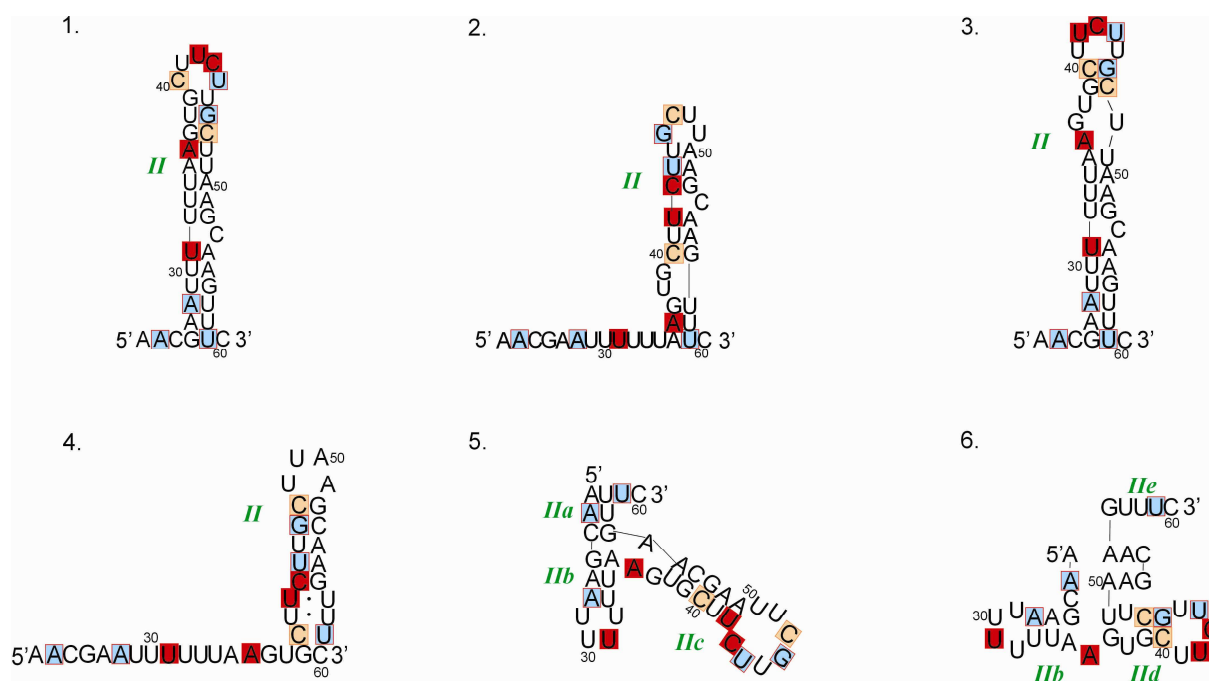
a.



b.



B



Rysunek 16. (A) Przykładowy wynik hybrydyzacji modelowego regionu II DsrA RNA (a) w buforze I i (b) w buforze VIII. Macierz drukowana w układzie: 4 kolumny, 4 sondy w rzędzie, każda sonda po 5 powtórzeniach. (B) Proponowane struktury modelowego regionu II DsrA RNA. Kolorem czerwonym i pomarańczowym zaznaczono miejsca hybrydyzacji, które były dostępne również w DsrA RNA o pełnej długości, kolorem niebieskim dodatkowo miejsca, które nie były dostępne w cząsteczce pełnej długości.

III. WYNIKI I Dyskusja

Tabela 7. Uśrednione wyniki hybrydyzacji modelowego fragmentu odpowiadającego rejonowi II DsrA RNA .

pozycja w DsrA	nazwa sondy	sekwencja penta- lub heptameru	sekwencja modyfikowanej sondy	nukleotyd parujący się z dodatkowym 3'G	przewidziane dG (kcal/mol) dla komplementarnego wiązania RNA-RNA	przewidziane dG (kcal/mol) dla wiązania modyfikowana sonda-RNA, 100 mM NaCl	uśrednione wyniki hybrydyzacji w buforze I	uśrednione wyniki hybrydyzacji w buforze VIII	uśrednione wyniki hybrydyzacji w buforze II	alternatywne miejsca wiązania	przewidziane dG (kcal/mol) dla alternatywnego miejsca wiązania RNA-RNA	przewidziane dG (kcal/mol) dla alternatywnego miejsca wiązania sonda-RNA, 100 mM NaCl
14	641	GGAAA	GGDDG	A	-2,9	-9,6	m	m	w	42/43 58 31/32	-1,4 -0,4 -0,2	-4,0 -6,2 -2,9
15	161	AGGAA	DGGDDG	U	-3,6	-10,2	s	s	m	42/43 58	-4,4 -0,1	-9,8 -4,6
24	24-7	UCGUUAC	UCGUUAC		-6,8	-10,6	m	m	w			
28	28-7	AAAUUCG	AADUUCG		-4,0	-9,3	w	m	w			
31	31-7	AAAAAAU	DDDDDU		-0,5	-9,7	s	s	m			
34	34-7	CUUAAAA	CUUDDDD		-2,4	-9,8	w	w	w			
35	35-7	ACUUAAA	DCUDDDD		-3,2	-10,4	w	w	w			
36	36-7	CACUUAA	CDCUUDA		-4,9	-10,1	m	m	m			
40	37	AAGCA	DDGCDG	G	-3,4	-10,3	m	m	m			
41	522	GAAGC	GDAGCG	U	-4,7	-9,5	w	w				
42	131	AGAAG	DGDDGG	G	-2,9	-9,6	m	m	m			
43	33	AAGAA	DDGDDG	C	-1,2	-11,4	s	s	s			
44	265	CAAGA	CDDGDG	U	-2,9	-9,5	m	m	m	59	-0,3	-1,5
46	145	AGCAA	DGCDDG	C	-3,4	-11,9	m	w	m			
47	37	AAGCA	DDGCDG	U	-3,4	-10,3	m	m	m			
48	778	UAAGC	UDDGCG	U	-3,1	-9,3	w					
58	514	GAAAC	GDDDCG	A	-2,3	-8,1	w	w				
59	897	UGAAA	UGDDDG	G	-1,2	-8,4	m	m	w			
83	214	AUCCC	AUCCCG	C	-5,5	-11,2	w	w				

Jako s, m i w zaznaczono sygnały hybrydyzacji odpowiednio o wysokiej, średniej i słabej intensywności. Kolorem zakreślono najbardziej prawdopodobne ewentualne alternatywne miejsca wiązania. Jeżeli w alternatywnym miejscu wiązania wpisano dwie następujące po sobie pozycje oddzielone ukośnikiem oznacza to dwa środkowe nukleotydy, w przypadku gdy sonda może wiązać się parzystą liczbą reszt nukleotydowych.

1.5.3. Mikromacierzowe mapowanie DsrA RNA z przyłączonym modyfikowanym oligonukleotydem

W celu dodatkowej weryfikacji struktury cząsteczki DsrA zaprojektowano oligonukleotyd d1 o sekwencji 5'GDDDCUUGCUUDDGC, komplementarny do cząsteczki DsrA RNA na odcinku od 46 do 60 nukleotydu. Związanie tego oligonukleotydu powinno spowodować zmiany w profilu hybrydyzacji, które być może dostarczyłyby informacji przemawiających za którąś z proponowanych struktur. Odcinek 46-60 jest bogaty w reszty A i U, zatem, aby zapewnić silniejsze wiązanie oligonukleotydu d1 do DsrA RNA został on zbudowany z 2'-O-metylowanych reszt nukleotydowych, reszty adenozyiny zastąpiono w nim resztami 2'-O-metylo-2,6-diaminopurynorybozydu a ponadto w trzech pozycjach umieszczono nukleotydy typu LNA (zaznaczone kolorem czerwonym). Dzięki tym modyfikacjom uzyskano trwałość termodynamiczną (energię swobodną) tworzonego dupleksu równą -27,9 kcal/mol, obliczoną według wzoru umieszczonego w rozdziale II.1.5. (Część Literaturowa) (41).

Hybrydyzację prowadzono w buforze z 1 M NaCl i 0,5 mM Na₂EDTA (bufor VII). Stosowano 50-krotny molowy nadmiar oligonukleotydu w stosunku do DsrA RNA. Stosowano dwa rodzaje procedur poprzedzających hybrydyzację. W pierwszej, RNA w buforze hybrydyzacyjnym poddawano denaturacji i renaturacji, po czym dodawano oligomer i inkubowano 20 minut w temperaturze pokojowej. W drugiej, w buforze hybrydyzacyjnym rozpuszczano RNA wraz z oligomerem i całą mieszaninę poddawano denaturacji i renaturacji. W obydwu podejściach uzyskiwano identyczny profil sygnałów na mikromacierzy. Świadczy to o zdolności wiązania się oligonukleotydu z DsrA RNA niezależnie od sposobu przygotowania RNA. Każdorazowo przeprowadzano hybrydyzację kontrolną traktowaną identycznie jak eksperyment właściwy, przy czym do mieszaniny reakcyjnej dodawano tylko DsrA RNA.

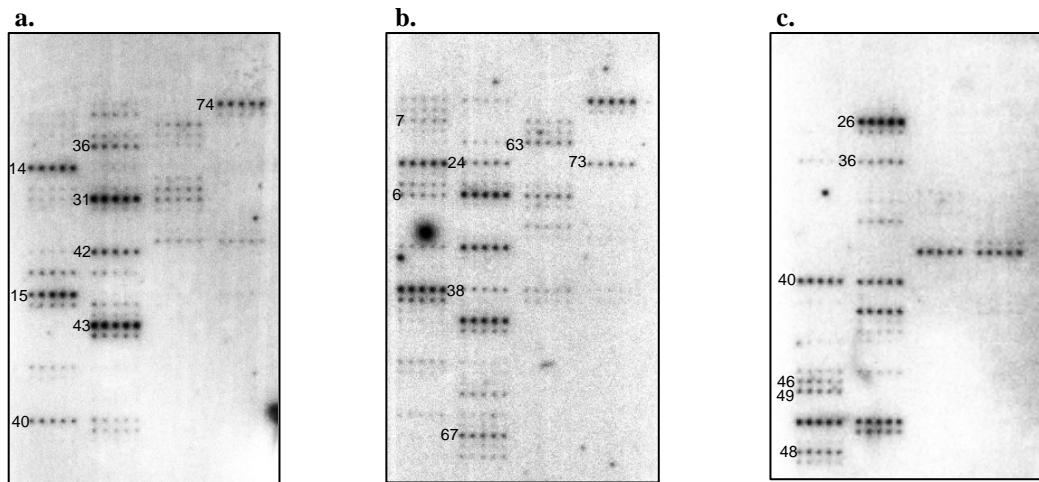
W związku z zagrożeniem błędnej interpretacji wyników hybrydyzacji, związanym z możliwością wiązania się, występującego w nadmiarze, oligonukleotydu d1 do sond na mikromacierzy przeprowadzono dodatkowy eksperyment kontrolny. W eksperymencie tym oligonukleotyd d1 wyznakowano izotopem ³²P na końcu 5' i poddano hybrydyzacji do mikromacierzy dedykowanej cząsteczce DsrA RNA. Taki eksperyment pozwolił wykluczyć błędną informację o braku sygnału podczas hybrydyzacji. Jeżeli po hybrydyzacji DsrA RNA ze związanym d1 (zwanym dalej kompleksem DsrA RNA/d1) obserwuje się brak sygnału może to być spowodowane tym, że przyłączenie oligonukleotydu zasłoniło jakiś fragment

cząsteczki lub spowodowało jej rearanżację strukturalną, ewentualnie, że wolne cząsteczki oligonukleotydu d1 związały się z sondą na mikromacierzy i przez to nie jest ona dostępna dla kompleksu DsrA RNA/d1. Ta ostatnia możliwość wydaje się być mało prawdopodobna, gdyż oligonukleotyd d1 w mieszaninie hybrydyzacyjnej występuje w stężeniu 0,3 μ M. Zważywszy jednak na fakt, że dokładne stężenie sond nie jest znane nie należy z góry odrzucać takiej możliwości podczas analizy wyników hybrydyzacji.

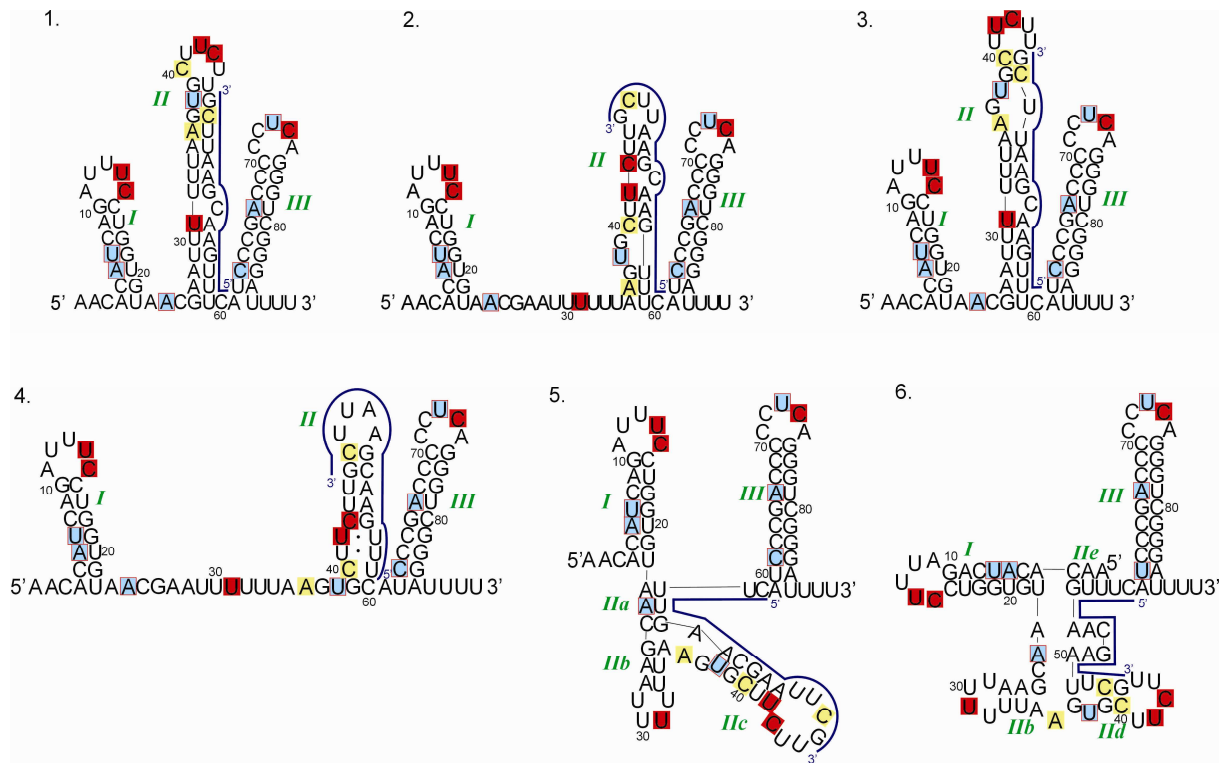
Po hybrydyzacji kompleksu DsrA RNA/d1 dodatkowo dostępne dla sond okazały się pozycje 24 i 38. Nie obserwuje się wiązania w pozycjach 36 i 40 lub 47. Brak wiązania w pozycji 40 lub 47 najprawdopodobniej wynika z zasłonięcia pozycji 47 przyłączonym oligonukleotydem d1. Ponadto, brak wiązania w pozycji 36 i ewentualnie 40 może wynikać z rearanżacji struktury cząsteczki po związaniu d1 lub można tłumaczyć go wysyceniem sond oligonukleotydem d1 w stanie wolnym, a tym samym nie dostępność ich dla kompleksu DsrA RNA/d1. Dość zaskakująca okazała się dostępność pozycji 6 i 7 w trzonie spinki I oraz pozycji 63 i 67 w trzonie spinki III. Dla sondy wiążącej się z pozycją 63 istnieje możliwość alternatywnego, nie w pełni komplementarnego wiązania w miejscu 6/7 (Tabela 8). Dla pozostałych sond wykluczono możliwość niespecyficznego oddziaływania, zatem wydaje się, że zasłonięcie rejonu 46-60 w jakiś sposób wpływa na częściowe otwarcie stabilnych trzonów spinek I i III. Bardziej dostępna staje się również pętla spinki III (dodatkowe wiązanie w pozycji 73). Rozpatrując strukturę 5 dostępne dla sond okazały się pozycje 24 i 38 co potwierdzałyby ich wcześniejsze występowanie w rejonach dwuniciowych IIa i IIc DsrA RNA. W kompleksie DsrA RNA/d1 pewne fragmenty będące poprzednio w helisach IIa i IIc DsrA RNA stały się jednonicowe, a zatem dostępne do hybrydyzacji z komplementarnymi sondami. Analogicznie w przypadku struktury 6 pojawienie się pozycji 24 i 38 wynikałoby z ich wcześniejszego uwikłania w oddziaływania z rejonem, który został zasłonięty przez d1. Niemniej jednak największe trudności w wytłumaczeniu, we wszystkich trzech przypadkach (struktury 4-6), budzi zanik wiązania się sond do pozycji 36, jak również pojawienie się nieoczekiwanych miejsc wiązania we fragmentach dwuniciowych spinek I i III. Można byłoby przypuszczać, że związanie oligonukleotydu d1 skutkuje w pierwszej kolejności rozpleceniem spinki II a dalej rearanżacją strukturalną pozostałej części DsrA RNA, być może łącznie nawet z spinkami I i III. Analiza pofałdowania się DsrA RNA, do którego związał się oligonukleotyd d1 za pomocą funkcji „*fold RNA bimolecular*” programu RNAstructure, pokazuje możliwość rearanżacji struktury pozostałych fragmentów DsrA RNA, łącznie z spinkami I i III. Program RNAstructure proponuje 20 struktur

suboptymalnych, których energia swobodna różni się od struktury optymalnej ($\Delta G^{\circ}_{37} = -50,4$ kcal/mol) maksymalnie o 4 kcal/mol.

A



B



Rysunek 17. (A) Wynik hybrydyzacji: (a) DsrA RNA (b) kompleksu DsrA RNA/d1 (c) oligonukleotydu d1. Macierz drukowana w układzie: 4 kolumny, 4 sondy w rzędzie, każda sonda po 5 powtórzeń. (B) Proponowane struktury DsrA RNA z zaznaczonymi miejscami hybrydyzacji dla kompleksu DsrA RNA/d1. Granatową linią przedstawiono schematycznie oligonukleotyd d1. Kolorem czerwonym zaznaczono miejsca hybrydyzacji dostępne jednocześnie w reakcji kontrolnej (DsrA RNA) oraz w reakcji z przyłączonym d1 (DsrA RNA/d1), kolorem niebieskim dodatkowe miejsca hybrydyzacji obserwowane tylko dla kompleksu (DsrA RNA/d1), a kolorem żółtym miejsca, które były dostępne w reakcji kontrolnej (DsrA RNA), a niedostępne w reakcji z kompleksem (DsrA RNA/d1).

III. WYNIKI I Dyskusja

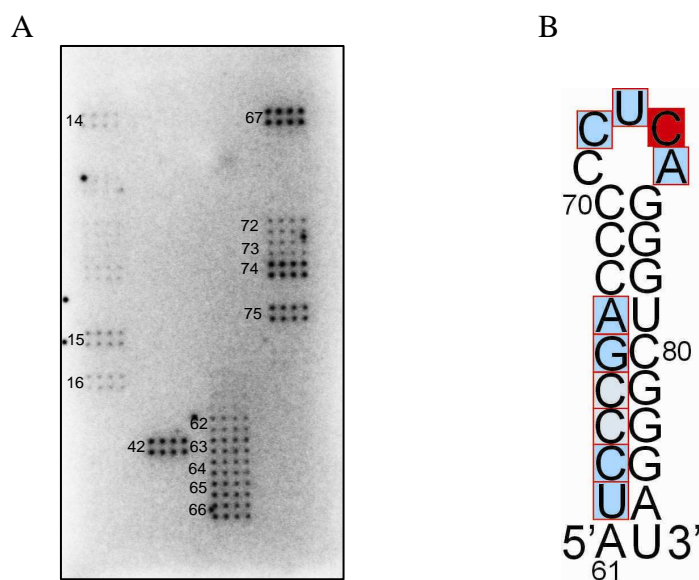
Tabela 8. Uśrednione wyniki hybrydyzacji kompleksu DsrA RNA/dI.

pozycja w DsrA	nazwa sondy	sekwencja penta- lub heptameru	sekwencja modyfikowanej sondy	nukleotyd parujący się z dodatkowym 3'G	przewidziane dG (kcal/mol) dla komplementarnego wiązania RNA-RNA	przewidziane dG (kcal/mol) dla wiązania modyfikowana sonda-RNA, 100 mM NaCl	wyniki hybrydyzacji dla DsrA (kontrola)	wyniki hybrydyzacji dla kompleksu DsrA/dI	wyniki hybrydyzacji dla dI (kontrola)	alternatywne miejsce wiązania	przewidziane dG (kcal/mol) dla alternatywnego miejsca wiązania RNA-RNA	przewidziane dG (kcal/mol) dla alternatywnego miejsca wiązania sonda-RNA, 100 mM NaCl
2	958	UGUUC	UGUUCG	G	-3,0	-7,9			w			
6	572	GAUGU	GDUGUG	C	-3,2	-11,0		m				
7	911	UGAUG	UGDUGG	A	-3,1	-9,0		m				
12	14	AAAUC	DDDUCG	A	-0,7	-7,9			w			
14	641	GGAAA	GGDDDG	A	-2,9	-9,6	s	s				
15	161	AGGAA	DGGDDG	U	-3,6	-10,2	s	s				
24	24-7	UCGUUAC	UCGUUAC		-6,8	-10,6		s		67	-0,8	-0,8
26	988	UUCGU	UUCGUG	A	-2,8	-7,3			s			
31	31-7	AAAAAAU	DDDDDU		-0,5	-9,7	s	s				
36	36-7	CACUUA	CDCUDA		-4,9	-10,1	m		m			
38	584	GCACU	GDCUG	A	-5,2	-8,4		m				
40	37	AAGCA	DDGCDG	G	-3,4	-10,3	m		s			
42	131	AGAAG	DGDDGG	G	-2,9	-9,6	s	s				
43	33	AAGAA	DDGDDG	C	-1,2	-11,4	s	s	w			
46	145	AGCAA	DGCDDG	C	-3,4	-11,9			m			
47	37	AAGCA	DDGCDG	U	-3,4	-10,3	m		s			
48	778	UAAGC	UDDGCG	U	-3,1	-9,3			m			
49	49-7	CUUAAGC	CUUAAGC		-6,6	-10,4			m			
51	637	GCUUA	GCUUDG	U	-3,1	-8,9			w			
60	225	AUGAA	DUGDDG	U	-1,4	-9,1	w	w				
63	676	GGGAU	GGGDUG	C	-5,5	-11,3		m		73 67	-2,7 -3,7	-1,8 -7,8
64	425	CGGGA	CGGGA		-6,8	-9,7		w				
67	695	GGUCG	GGUCGG	C	-6,2	-13,2		m				
73	907	UGAGG	UGDGGG	C	-5,3	-12,9		m				
74	483	CUGAG	CUGDGG	C	-4,6	-12,2	m	m				

Jako s, m i w zaznaczono sygnały hybrydyzacji odpowiednio o wysokiej, średniej i słabej intensywności.

1.5.4. Mikromacierzowe mapowanie modelowej spinki III DsrA RNA

W związku z nieoczekiwanym wynikiem eksperymentu hybrydyzacji kompleksu DsrA RNA/d1, w wyniku którego obserwowano częściową dostępność do hybrydyzacji stabilnego trzonu spinki III postanowiono przeprowadzić hybrydyzację do mikromacierzy dedykowanej DsrA RNA samej spinki III tej cząsteczki. Ponadto był to ciekawy eksperyment pozwalający sprawdzić jak zachowa się izolowany stabilny motyw strukturalny w czasie hybrydyzacji do mikromacierzy. W tym celu zsyntetyzowano chemicznie fragment RNA budujący tą spinkę; reszty nukleotydowe od 61 do 85. Otrzymane RNA wyznakowano na końcu 5' izotopem ^{32}P i przeprowadzono hybrydyzację do mikromacierzy zaprojektowanej dla DsrA RNA. Eksperymenty przeprowadzono w buforach z 4 mM MgCl_2 i 1 M lub 200 mM NaCl (bufor I i II). RNA rozpuszczono w buforze do hybrydyzacji i poddawano denaturacji i renaturacji identycznie jak w przypadku DsrA RNA o pełnej długości, po czym przeprowadzono hybrydyzację.



Rysunek 18. (A) Obraz hybrydyzacji spinki III do mikromacierzy dedykowanej DsrA RNA o pełnej długości. Macierz drukowana w układzie: 4 kolumny, 4 sondy w rzędzie, każda sonda po 8 powtórzeń. (B) Struktura spinki III DsrA RNA. Kolorem czerwonym zaznaczono miejsce hybrydyzacji występujące w tym motywie w cząsteczce DsrA RNA o pełnej długości, kolorem niebieskim zaznaczono dodatkowe miejsca dostępne w czasie hybrydyzacji tego motywu strukturalnego, jasnoniebieskim te dla, których występuje prawdopodobieństwo wiązania się w alternatywnym miejscu.

W wyniku przeprowadzonych eksperymentów otrzymano silne sygnały dla pozycji 63-67, 74 i 75 natomiast dla pozycji 62, 72 i 73 otrzymano sygnały o średniej intensywności (Tabela 9). Wynik ten pokazuje, że w izolowanej spince bardziej dostępna do hybrydyzacji stała się pętla, która w cząsteczce o pełnej długości z pewnością zaangażowana jest w oddziaływania wyższego rzędu. Trudno wytłumaczalne jest, dlaczego 5'-końcowy fragment

trzonu spinki okazał się być dostępny do hybrydyzacji. Dla niektórych pozycji w tym rejonie można znaleźć alternatywne miejsca wiązania w obrębie pętli, aczkolwiek o dość niskiej, wartości energii swobodnej. Dla sond komplementarnych do pozycji 62, 63, 66 i 67 nie znaleziono alternatywnych miejsc wiązania. Co ciekawe, jest to ten sam rejon, który stał się dostępny do hybrydyzacji w cząsteczce pełnej długości, gdy hybrydyzowano ją wraz z przyłączonym oligonukleotydem d1. Otrzymany wynik, jest dość trudny do wyjaśnienia. Wskazuje on, że rejon 46-60 wpływa w jakiś sposób stabilizująco na trzon spinki III. Wynik ten był o tyle zaskakujący, że metodą topnień UV, potwierdzono, że badany fragment tworzy stabilną strukturę spinkową (rozdział III.1.6.1). Interesujące jest, że Rolle i wsp. obserwowali na cząsteczce pełnej długości hydrolizę indukowaną rodnikiem hydroksylowym właśnie na odcinku pomiędzy 60 a 70 resztą nukleotydową (166). W czasie badań modelowych motywów strukturalnych za pomocą mikromacierzy zaobserwowano, że niesparowane końce 5' ułatwiają wiązanie się sond do końca 5' cząsteczki, efektu takiego nie zaobserwowano dla końca 3' (167). Podczas prób wyjaśnienia otrzymanego profilu hybrydyzacji brano również pod uwagę możliwość istnienia równowagi pomiędzy strukturą spinki a formą dupleksu zawierającego dwustronne wybrzuszenia. Jednak w oparciu o warunki prowadzenia hybrydyzacji, taka sytuacja wydaje się być mało prawdopodobna, dlatego też nie podjęto dalszych rozważań w tym kierunku.

Ciekawą obserwacją jest fakt, że zanotowano sygnały pochodzące od sond komplementarnych do pozycji 14, 15, 16 i 42 w DsrA RNA, a zatem nie komplementarnych do badanego motywu strukturalnego. Wobec powyższego ich pojawienie się wynika z faktu nie całkowicie komplementarnego oddziaływania z badanym RNA. Policzono wartości energii swobodnej dla takich prawdopodobnych alternatywnych oddziaływań i okazały się one mieścić w granicach około -4 kcal/mol (Tabela 9). Na podstawie badań modelowych na cząsteczce 5S rRNA z *E. coli*, zaobserwowano, że dla energii swobodnej -8 kcal/mol uzyskuje się mocne wiązanie sondy do RNA, zatem -6 kcal/mol uznano, jako wartość graniczną dla sond tworzących bibliotekę. Należy jednak pamiętać, że badania te przeprowadzono na większej cząsteczce RNA, posiadającej określoną strukturę trzeciorzędową. Wydaje się, że dla mniejszych cząsteczek RNA wiązania sond oligonukleotydowych o niższej wartości energii swobodnej dupleksów hybrydyzacyjnych są bardziej możliwe do zaobserwowania.

III. WYNIKI I Dyskusja

Tabela 9. Uśrednione wyniki hybrydyzacji modelowej spinki III DsrA RNA .

pozycja w DsrA	nazwa sondy	sekwencja penta- lub heptameru	sekwencja modyfikowanej sondy	nukleotyd parujący się z dodatkowym 3'G	przewidziane dG (kcal/mol) dla komplementarnego wiązania RNA-RNA	przewidziane dG (kcal/mol) dla wiązania modyfikowana sonda-RNA, 100 mM NaCl	wyniki hybrydyzacji spinki III	alternatywne miejsca wiązania	przewidziane dG (kcal/mol) dla alternatywnego miejsca wiązania RNA-RNA	przewidziane dG (kcal/mol) dla alternatywnego miejsca wiązania modyfikowana sonda-RNA, 100 mM NaCl
14	641	GGAAA	GGDDDG				m	63	-2,7	-3,7
15	161	AGGAA	DGGDDG				m	63 72	-2,9 -2,4	-3,7 -3,4
16	297	CAGGA	CDGGAG				m	63 72	-2,9 -2,4	-4,4 -3,6
42	131	AGAAG	DGDDGG				s	72	-2,3	-3,6
62	655	GGAUG	GGDUGG		-3,7	-4,8	m	65	-3,1	-4,0
63	676	GGGAU	GGGDUG		-5,5	-7,8	s	69,70,71 72 73	-5,2 -2,9 -2,7	-4,0 -2,6 -1,8
64	425	CGGGA	CGGGA		-6,8	-9,7	s	69,70,71 72 73 63	-5,4 -2,9 -2,7 -2,2	-4,1 -2,8 -2,3 -3,1
65	875	UCGGG	UCGGG		-6,8	-9,7	s	69,70,71 72 73	-4,2 -1,7 -1,5	-4,1 -2,8 -2,3
66	731	GUCGG	GUCGG		-6,2	-9,3	s			
67	695	GGUCG	GGUCGG	C	-6,2	-13,2	s			
68	686	GGGUC	GGGUC		-7,1	-9,3	w			
72	555	GAGGG	GAGGG		-7,0	-9,0	m	64 63	-4,3 -1,5	-4,1 -3,1
73	907	UGAGG	UGDGGG	C	-5,3	-12,9	m	64 63	-4,3 -1,7	-4,5 -1,5
74	483	CUGAG	CUGDGG	C	-4,6	-12,2	s			
75	377	CCUGA	CCUGDG	C	-5,3	-12,7	s			

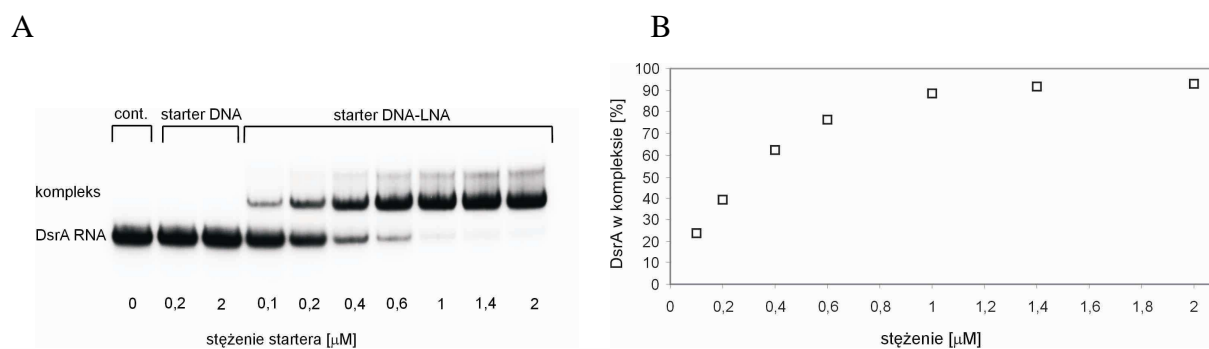
Jako s, m i w zaznaczono sygnały hybrydyzacji odpowiednio o wysokiej, średniej i słabej intensywności. Kolorem zakreślono najbardziej prawdopodobne komplementarne oraz ewentualne alternatywne miejsca wiązania.

1.6. Mapowanie chemiczne struktury drugorzędowej DsrA RNA.

1.6.1. Projektowanie i testowanie modyfikowanego startera DNA/LNA

Cząsteczka DsrA RNA okazała się nie być prostym modelem do badań strukturalnych. Pomimo przeprowadzonych licznych doświadczeń opisanych wcześniej w literaturze, jak i tych za pomocą izoenergetycznych mikromacierzy przedstawionych w tej rozprawie doktorskiej wiele elementów, zwłaszcza dotyczących rejonu środkowego DsrA RNA pozostało niejasnych. Postanowiono przeprowadzić dodatkowe eksperymenty mające na celu dalsze zweryfikowanie struktury drugorzędowej DsrA RNA. Zdecydowano się wykorzystać, nieużywaną wcześniej do badania struktury tej cząsteczki metodę chemicznego mapowania RNA. Do modyfikacji chemicznych zastosowano ketoksal modyfikujący G, 1-cykloheksylo-3-(2-morfolinoetylo)karbodiimid (CMCT) modyfikujący również G ale też U oraz bezwodnik kwasu N-metyloizotydowego (NMIA) modyfikujący grupy 2'-hydroksylowe w rejonach nie zaangażowanych w oddziaływanie. W celu wizualizacji produktów mapowania niezbędne jest przeprowadzenie reakcji wydłużania startera (ang. *primer extension*) z zastosowaniem odwrotnej transkryptazy. Zwykle projektuje się startery DNA komplementarne do końca 3' badanej cząsteczki RNA. Cząsteczka DsrA RNA, zgodnie z wynikami wszystkich opublikowanych prac, zawiera na końcu 3' bardzo stabilną strukturę spinkową (spinka III). W związku z tym użycie startera DNA projektowanego na ten rejon powodowało, że w czasie hybrydyzacji, poprzedzonej denaturacją, dochodziło do odtworzenia bardziej korzystnej termodynamicznie spinki RNA (spinka III), zamiast tworzenia się dupleksu starter DNA/RNA. Z tego powodu nie otrzymywano żadnych produktów reakcji wydłużania startera. Jedną z możliwości było przesunięcie miejsca hybrydyzacji w rejon poprzedzający spinkę III. Taki zabieg spowodowałby jednak utratę szczególnie istotnych danych eksperymentalnych, możliwe byłoby wówczas odczytanie wyników mapowania maksymalnie do 40 reszty nukleotydu. Konieczne było szukanie innego rozwiązania. Zdecydowano się na innowacyjne podejście i zaprojektowano starter o zwiększonej trwałości termodynamicznej (172). Efekt ten osiągnięto przez dodanie w kilku pozycjach nukleotydu typu LNA. LNA to typ modyfikacji nukleotydu, który z wszystkich dotychczas poznanych, zwiększa najbardziej znacząco trwałość termodynamiczną dupleksów z DNA i RNA (30-33, 35, 39, 42, 173). Projekt wydawał się o tyle obiecujący, że istniały już doniesienia literaturowe o zastosowaniu starterów zawierających nukleotydy typu LNA do reakcji PCR. Zastosowanie takich starterów powodowało zwiększeniem czułości oraz wydajności reakcji PCR (174, 175). Inne

doniesienia wskazywały, iż trójfosforany nukleotydów typu LNA są bardzo dobrymi substratami zarówno dla polimeraz DNA i RNA (176). Pokazano również, że DNA-LNA modyfikowany oligonukleotyd jest w stanie hybrydować do stabilnej struktury spinkowej DNA tworząc trwały heterodupleks (177). Zaprojektowano starter o tej samej sekwencji co starter DNA (DsrA-3), ale zawierający pięć reszt nukleotydowych typu LNA (DsrA-LNA) (5'AAATcCcGAcCcTgAGG). Starter projektowano w ten sposób, aby uzyskać bardziej korzystną wartość energii swobodnej dla tworzonego przez niego dupleksu z badanym RNA, niż wynosi ona dla spinki tworzonej przez to RNA. Ponieważ nie określono dotychczas kompletnych parametrów termodynamicznych dla dupleksów DNA-LNA/RNA oparto się pomocniczo na parametrach termodynamicznych uzyskanych dla dupleksów LNA-2'-O-MeRNA/RNA (39) oraz dotyczących dupleksów DNA-LNA/DNA (32) oraz na pozostałych dostępnych danych literaturowych (173). Po zaprojektowaniu startera w pierwszej kolejności sprawdzono jego zdolność asocjacji z badanym RNA oraz wyznaczono stałą dysocjacji (K_d).



Rysunek 19. (A) Analiza tworzenia się kompleksu DsrA RNA/starter DNA-LNA. Rozdział prowadzono w 8% żelu poliakrylamidowym w warunkach natywnych w 4°C. (B) Zależność frakcji związanej w stosunku do stężenia startera, która posłużyła do oznaczenia stałej dysocjacji.

W eksperymencie przedstawionym na rysunku 19, DsrA RNA inkubowano z rosnącymi stężeniami starterem DNA lub DNA-LNA, po czym przeprowadzano rozdział elektroforetyczny w warunkach niedenaturujących, w temperaturze 4°C. Eksperyment ten pokazuje wyraźną przewagę modyfikowanego startera nad starterem DNA. W przypadku startera DNA nawet w jego dziesięciokrotnym molowym nadmiarze nie obserwuje się kompleksu DsrA RNA/starter. Natomiast modyfikowany starter (DNA-LNA) wiąże się wydajnie do RNA, przy czym jego stała dysocjacji wynosi 234 nM. Obserwuje się, że nawet mniejszy niż 1:1 stosunek molowy jest wystarczający dla formowania dupleksu.

Ze względu na bardzo obiecujący wynik przeprowadzono jeszcze dodatkowo eksperymenty topnienia UV. W tym cel wykorzystano zsyntetyzowany chemicznie fragment cząsteczki DsrA RNA od nukleotydu 61 do 81 będącej modelem spinki III. Przeprowadzono

eksperymenty topnienia UV zarówno fragmentu RNA oddzielnie jak i w obecności startera DNA-LNA. Chcąc uzyskać wartości temperatury topnienia możliwe do zarejestrowania, w czasie topnień zastosowano bufor o bardzo niskim stężeniu chlorku sodu (5 mM). Tak jak można się było spodziewać spinka III okazała się bardzo stabilna termodynamicznie, a wartość jej temperatury topnienia wynosiła 84,6°C. Natomiast zgodnie z przewidywaniami kompleks powstały pomiędzy RNA będącym modelem spinki III a modyfikowanym starterem (DNA-LNA) okazał się na tyle stabilny, że niemożliwa była jego detekcja, nawet w 5 mM chlorku sodu; wartość jego temperatury topnienia przekraczała 90°C. Dla porównania obliczona temperatura topnienia dla nie obserwowanego dupletu RNA/starter DNA wynosiłaby zaledwie 44,9°C (178) (<http://eu.idtdna.com/analyzer>).

1.6.2. Mapowanie chemiczne DsrA RNA

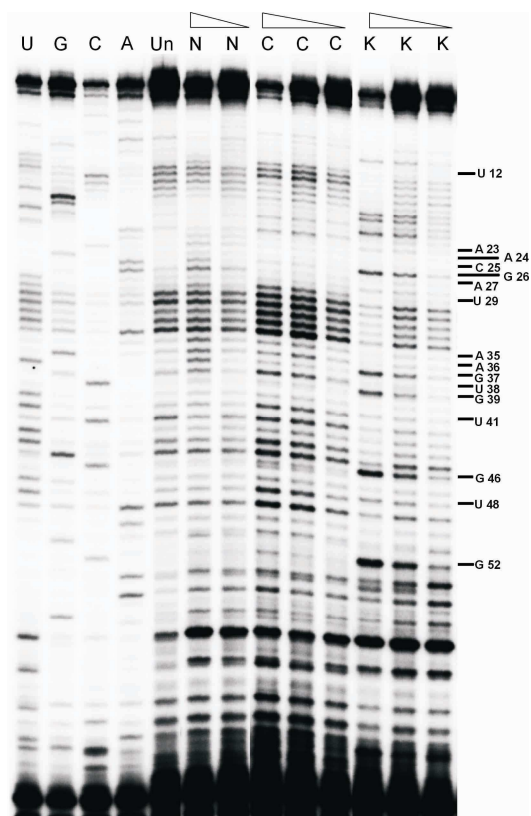
Po tak korzystnych wstępnych wynikach z udziałem modyfikowanego startera przeprowadzono reakcję wydłużania startera z wykorzystaniem startera DNA-LNA oraz odwrotnej transkryptazy Superscript III na matrycy DsrA RNA. Niewiadomą pozostawało czy enzym ten będzie w stanie rozpoznać tak modyfikowany starter i efektywnie przeprowadzać jego wydłużanie. Okazało się, że użyta odwrotna transkryptaza jest w stanie przeprowadzić reakcję wydłużania modyfikowanego startera DNA-LNA zhybrydowanego z RNA aż do otrzymania produktu pełnej długości z bardzo dobrą wydajnością. Należy nadmienić, że uzyskanie takiego wyniku nie było możliwe z użyciem standardowego startera DNA. Wykorzystanie tego typu podejścia może być niezwykle przydatne w wielu eksperymentach, gdzie konieczne jest hybrydowanie oligonukleotydów z stabilnymi termodynamicznie motywami strukturalnymi RNA. Otrzymany wynik pozwolił na przeprowadzenie eksperymentu mapowania chemicznego.

Użycie modyfikowanego startera umożliwiło wizualizację wyników eksperymentu mapowania chemicznego DsrA RNA (Rysunek 20). W celu lepszej analizy 5' końcowego fragmentu cząsteczki przeprowadzono również reakcję wydłużania startera z dodatkowym starterem zaprojektowanym na środkowy fragment DsrA RNA (DsrA_{sr}-3). Ze względu na mniej ustrukturalizowany charakter tego rejonu używano z powodzeniem niemodyfikowany starter DNA. Wyniki otrzymane z tego startera były zgodne z wynikami otrzymanymi z użyciem modyfikowanego startera (nie pokazano).

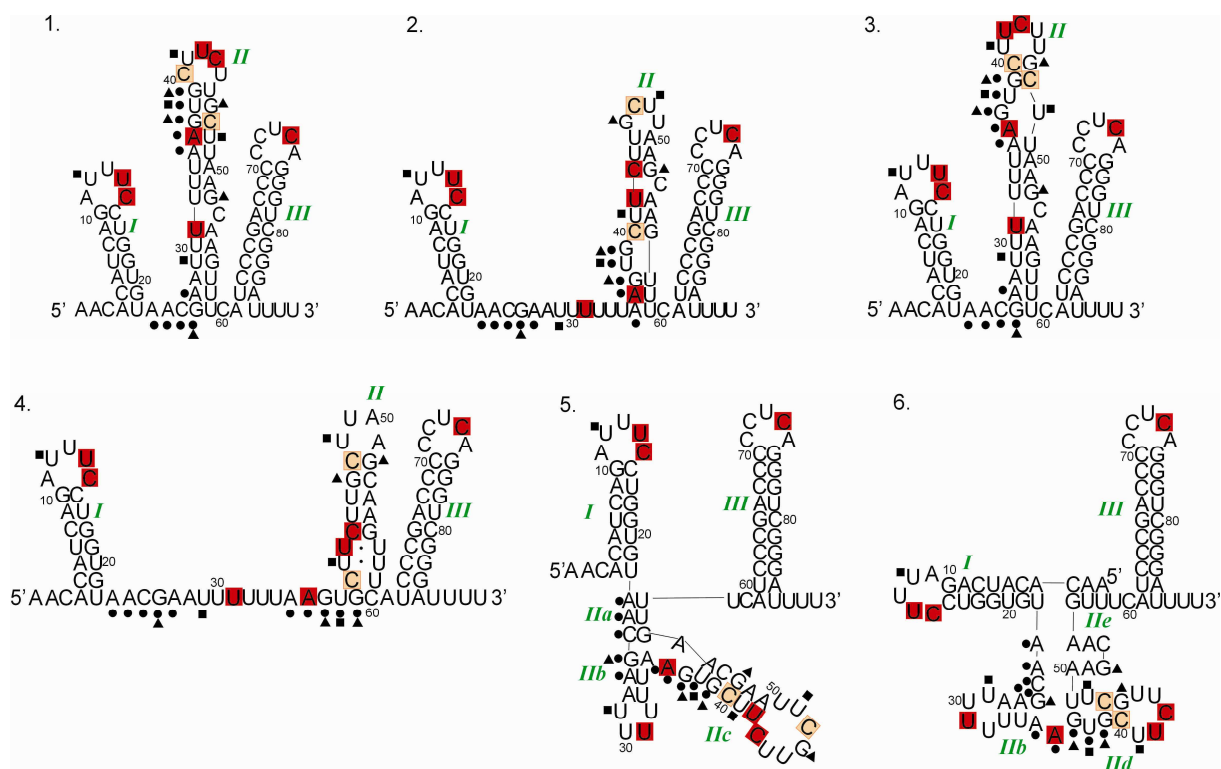
Uzyskano modyfikacje w pozycji 12, czyli w pętli spinki I. Mapowanie chemiczne potwierdziło również obecność trzonu tej spinki, w obrębie, którego nie obserwowano

modyfikacji. Kolejne modyfikacje odnotowano w rejonie II w pozycjach 23-27, 28, 35-39, 41, 46, 48 oraz 52. Modyfikacje te poza rejonem 23-27 oraz pozycją 52 są zgodne z mapowaniem macierzowym.

Po wprowadzeniu do programu RNAstruktura jako wyznaczników jednocześnie danych z mapowania chemicznego oraz z mapowania mikromacierzowego program generuje strukturę o najniższej wartości energii swobodnej (-30,5 kcal/mol) identyczną ze strukturą proponowaną tylko w przypadku wprowadzenia danych z mapowania chemicznego. Jednocześnie struktura ta jest zgodna ze strukturą proponowaną przez Rolle (Rysunek 21.3). Aczkolwiek, jak już zostało to wspomniane wcześniej, jeżeli do programu wprowadzi się tylko dane z mapowania macierzowego wówczas generowana jest struktura o wartości energii swobodnej -31,4 kcal/mol, a zatem o 1,1 kcal/mol korzystniejsza (Rysunek 21-4)



Rysunek 20. Mapowanie chemiczne DsrA RNA. U, C, G i A oznacza reakcje sekwencjonowania; Un – reakcję kontrolną bez dodania czynnika modyfikującego, natomiast N, C oraz K odpowiednio reakcje w obecności malejących stężeń NMIA, CMCT oraz ketoksalu.



Rysunek 21. Proponowane struktury DsrA RNA. Kolorem czerwonym oznaczono miejsca hybrydyzacji do mikromacierzy, kolorem pomarańczowym zaznaczono dwa możliwe miejsca hybrydyzacji sondy 37. Miejsca modyfikacji chemicznych oznaczono następująco: kwadratem zaznaczono pozycje zmodyfikowane przez CMCT, kółkiem przez NMIA a trójkątem przez ketoksal. Struktury DsrA RNA zaproponowane przez (1) Sledejski (1995), (2) Lease i Belfort (2000) i (3) Rolle (2006). Struktura (4) wygenerowana przez program RNAstructure, cechuje się najniższą energią swobodną (struktura optymalna). Struktury (5) i (6) są strukturami suboptymalnymi wygenerowane przez RNAstructure na podstawie otrzymanych wyników hybrydyzacji oraz pewnych manualnych rearanżacji.

Na podstawie zarówno mapowania mikromacierzowego i chemicznego całej cząsteczki DsrA RNA oraz jej fragmentów trudno jest absolutnie jednoznacznie rozstrzygnąć o jej strukturze drugorzędowej. Istnienie spinek I i III w formie pokazanej na wszystkich proponowanych modelach jest bezsporne. Jakkolwiek badania fragmentów sugerują, że ich stabilność strukturalna jest wzmocniona przez trudne do zdefiniowania oddziaływanie wyższego rzędu. Spornym pozostaje fragment środkowy (pomiędzy 23 i 60 resztą nukleotydową). Jest to fragment, który fałdując się może tworzyć jeden lub więcej motywów strukturalnych (helisy i spinki) cechujących się małą stabilnością termodynamiczną. Ich struktura może ulegać zmianie w warunkach stosowanych do analizy struktury drugorzędowej tego fragmentu. Obecność enzymu, kationów metali dwuwartościowych, sond mikromacierzy może zmieniać pofałdowanie tego fragmentu. Należy pamiętać, że wiązanie się białka Hfq z DsrA RNA proponowane jest głównie w obrębie rejonu środkowego. Ponadto, regulatorowa funkcja DsrA RNA w realizuje się poprzez oddziaływanie tego rejonu z docelowymi mRNA.

Można domniemywać, że nietrwałość termodynamiczna i strukturalna rejonu środkowego DsrA RNA jest wkomponowana w jego funkcje regulatorową.

Pozostaje jednak problem, jaka jest faktyczna struktura drugorzędowa rejonu środkowego (pomiędzy 23 i 60 resztą nukleotydową). Analiza wyników mapowania mikromacierzowego i chemicznego DsrA RNA oraz jego izolowanych fragmentów nie pozwala jednoznacznie przesądzić o strukturze RNA. Z istniejących struktur i wygenerowanych przez RNAstructure na podstawie przeprowadzonych eksperymentów (Rysunek 21) największą zgodność wykazuje struktura 21-4. Obserwowane wiązania sond mikromacierzowych oraz mapowania chemicznego mają miejsce w rejonach jednociowych lub terminalnych fragmentach rejonów dwunociowych a ponadto rejonach dwunociowych zawierających szereg niekanonicznych par zasad. Jest to struktura bardziej „klasyczna”, ale mająca silne umocowanie w tym co proponuje program RNAstructure i wykonane eksperymenty. Ponadto, bardzo godne uwagi, zwłaszcza z termodynamicznego spojrzenia na ich strukturę, są struktury 21-5 i 21-6. One również bardzo dobrze wynikają z mapowania mikromacierzowego oraz większości wyników mapowania chemicznego. Pewne rozbieżności mapowania chemicznego mogą wynikać z faktu, że w strukturach 21-5 i 21-6 rejon środkowy buduje szereg w miarę krótkich spinek, helis a reguły mapowania takich skumulowanych motywów mogą odbiegać od generalnych obserwacji dotyczących izolowanych motywów strukturalnych. Stabilność termodynamiczna takiego fragmentu może być w znaczącym stopniu wzmocniona przez oddziaływania sąsiadujących z sobą helis i fragmentów dwunociowych spinek. Wzmocnienie to może zachodzić z udziałem współosiowych oddziaływań warstwowych, oddziaływań w ramach pętli wieloramiennych czy platform typu AA lub oddziaływań trzeciorzędowych łącznie z powstaniem pseudowęzłów.

Przedstawione badania strukturalne DsrA RNA, najobszerniejsze z dotychczas przeprowadzonych, nie zdefiniowały ostatecznej struktury drugorzędowej tego RNA, ale pokazały złożoność i niestabilność rejonu środkowego DsrA RNA.

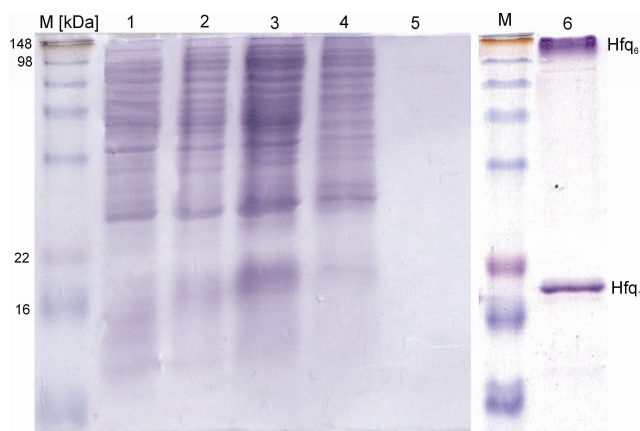
1.7. Badanie struktury i oddziaływań DsrA RNA w kompleksie z białkiem Hfq

1.7.1. Ekspresja i oczyszczanie białka Hfq

Ekspresję białka Hfq przeprowadzano w komórkach kompetentnych *E. coli* BL21 DES pLysS. Do komórek bakteryjnych metodą szoku termicznego wprowadzano plazmid pET28-Hfq-EC. Plazmid ten zawierał sekwencję kodującą białko Hfq wydłużoną od końca 3'

o sekwencję kodującą sześć reszt histydynowych. Przed przystąpieniem do eksperymentów sprawdzono poprawność składu nukleotydowego insertu poprzez sekwencjonowanie. W czasie ekspresji i oczyszczania stosowano procedurę opisaną przez Mikulecky i współpracowników (90) z pewnymi modyfikacjami. Szczegóły procedury zawarto w rozdziale Materiały i Metody. Hfq jest białkiem wykazującym wysokie powinowactwo do kwasów nukleinowych, nie wykazując przy tym specyfiki sekwencyjnej, dlatego też istotnym etapem oczyszczania była inkubacja z nukleazami. Testowano różne stężenia, czasy oraz temperatury inkubacji z DNazą I i RNazą A, jak również z Benzonazą. Warunki, które pozwoliły uzyskać preparat o najmniejszej zawartości kwasów nukleinowych opisano w rozdziale Materiały i Metody.

Dzięki obecności sześciohistydynowego fragmentu na końcu N białka, możliwe było jego oczyszczanie metodą chromatografii powinowactwa. Zastosowano chromatografię na kolumnie niklowej. Białko wypłukiwano z kolumny przy stężeniach imidazolu pomiędzy 150 a 350 mM. Po rozdziale elektroforetycznym uzyskanego preparatu na żelu z SDS otrzymywano dwa prążki, jeden na wysokości odpowiadającej wielkości monomeru, natomiast drugi na wysokości odpowiadającej heksamerowi. Zważywszy na denaturujący charakter elektroforezy, była to dość niespotykana obserwacja, aczkolwiek istnieją doniesienia o podobnych obserwacjach dotyczących Hfq (101). Chcąc upewnić się, że uzyskano właściwy i czysty preparat obydwa prążki poddano analizie za pomocą spektrometrii mas MALDI-TOF. Dla obu otrzymano potwierdzenie, że jest to bakteryjne białko Hfq. Stężenie białka oraz pozostałości kwasów nukleinowych oceniano stosując metodę Warburg-Christian (179).

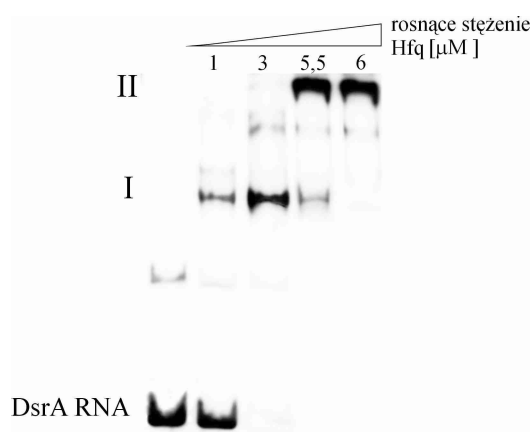


Rysunek 22. Etapy ekspresji i oczyszczania białka Hfq. M-markaer masy, 1- białka *E. coli* przed indukcją IPTG, 2 - białka *E. coli* po indukcji IPTG, 3- białka lizatu bakteryjnego po sonikacji, 4 – frakcja wymyta z kolumny buforem do lizy, 5 - frakcja wymyta z kolumny buforem przemywającym, 6 – połączone frakcja zawierające białko Hfq wymyte buforem elucyjnym w przedziale stężeń imidazolu 150-350 mM. Analizę prowadzono w 15% żelu poliakrylamidowym w obecności SDS.

1.7.2. Badanie tworzenia kompleksów DsrA RNA/Hfq

Najliczniejszą grupę bakteryjnych sRNA, stanowią te, które do efektywnego działania w warunkach *in vivo* wymagają obecności białka Hfq. Jednym z tych sRNA jest DsrA RNA. Jakkolwiek rola Hfq w regulacji ekspresji genów z udziałem małych niekodujących RNA (ncRNA) nie jest do końca poznana, wykazano zdolność do tworzenia się kompleksów pomiędzy większością wyżej wspomnianych ncRNA a białkiem Hfq, w tym również pomiędzy DsrA a Hfq (116).

W celu sprawdzenia aktywności biologicznej otrzymanego białka Hfq i jego zdolności do tworzenia kompleksów z badanym RNA, DsrA RNA wyznakowane radioizotopowo i inkubowano w danym buforze hybrydyzacyjnym w obecności rosnących stężeń białka. Inkubację prowadzono według procedury opisanej w rozdziale Materiały i Metody. Następnie przeprowadzano rozdział elektroforetyczny w warunkach niedenaturujących.



Rysunek 23. Tworzenie się kompleksu I i II pomiędzy DsrA RNA a białkiem Hfq, w obecności rosnącego stężenia białka. Analizę prowadzono w 6% żelu poliakrylamidowym.

Eksperymentalnie potwierdzono zdolność Hfq do wiązania się z DsrA RNA i tworzenia dwóch rodzajów kompleksów w używanych buforach hybrydyzacyjnych. Wraz ze wzrostem stężenia białka obserwuje się najpierw powstawanie kompleksu I a następnie II. W literaturze istnieją różniące się nieco od siebie doniesienia na temat stechiometrii kompleksów DsrA RNA/Hfq wynikające najprawdopodobniej z różnych procedury oczyszczania białka oraz różnic w warunkach prowadzenie reakcji. Postuluje się, że w skład kompleksu I wchodzi jedna cząsteczką DsrA RNA oraz jeden lub dwa heksamery Hfq (89, 90, 128). Przeprowadzone badania pozwoliły na ustalenie stężeń, przy których w używanym buforze hybrydyzacyjnym z 1 M NaCl i 0,5 mM Na₂EDTA (bufor VII), uzyskuje się pożądane

kompleksy DsrA RNA/Hfq. Stwierdzono, że przy stężeniu monomeru 3 μM uzyskuje się kompleks I, natomiast przy stężeniu monomeru 6 μM kompleks II.

1.7.3. Mapowanie mikromacierzowe kompleksów DsrA RNA/Hfq

Celem niniejszej pracy było przetestowanie oraz wykazanie możliwości zastosowania izoenergetycznych mikromacierzy do badania struktury drugorzędowej cząsteczek RNA. Interesujące było sprawdzenie czy metoda ta mogłaby być użyteczna do badania struktury cząsteczki RNA będącej w kompleksie z białkiem i czy daje możliwość uzyskania informacji o miejscu wiązania białka do RNA. Jeżeli przyjmie się założenie, że związanie białka powoduje zmianę strukturalną w cząsteczce RNA, których konsekwencją jest zmiana w dostępności do hybrydyzacji, wówczas byłoby to obserwowalne podczas hybrydyzacji na mikromacierzy. W drugim przypadku, w którym związanie białka nie powoduje zmian w strukturze badanego RNA, jednakże białko wiąże się w rejonie jednoniciowym, który wcześniej był dostępny do hybrydyzacji, również można byłoby to zaobserwować podczas hybrydyzacji do mikromacierzy.

Kompleks DsrA RNA/Hfq nadaje się do testowania nowej metody badania oddziaływania RNA i białka, gdyż istnieją wcześniejsze prace eksperymentalne, w których zajmowano się badaniem natury właśnie tego kompleksu (89, 90, 116, 128).

Bakteryjne białka Hfq, ze względu na duże podobieństwo strukturalne i sekwencyjne, zaliczane są do rodziny białek Sm i Sm-podobnych. Białka Sm charakteryzują się budową pierścieniową złożoną z sześciu lub siedmiu podjednostek oraz dwoma konserwatywnymi motywami Sm1 i Sm2, w obrębie, których znajdują się reszty aminokwasowe biorące udział w oddziaływaniach z RNA. Porównując różne bakteryjne homologi białka Hfq z eukariotycznymi białkami Sm obserwuje się wysokie podobieństwo w obrębie motywu Sm1. Jakkolwiek wśród białek Hfq nie obserwuje się motywu Sm2, posiadają one inny region zawierający konserwatywne hydrofobowe reszty aminokwasowe, który może być odpowiednikiem tego motywu (101, 111, 114). Dla białek Sm istnieje konserwatywna sekwencja w obrębie, której wiążą się one z RNA (PuAU₄₋₆GPu) jest ona otoczona z obu stron strukturami typu spinki (126). Dla Hfq wykazano, że poli(U) jest w stanie konkurować o miejsce wiązania z takimi sRNA jak DsrA RNA czy OxyS RNA (101, 116), przy czym dotychczasowe badania nie pozwalają na wyznaczenie konsensusowej sekwencji. Wskazują natomiast, że w przypadku sRNA jest to sekwencja bogata w reszty A i U, natomiast w przypadku tRNA nie zaobserwowano takiej zależności (138). Uważa się, że Hfq nie wiąże się z RNA wysoką specyficznością sekwencyjną i że najprawdopodobniej istotną rolę odgrywają

tutaj uwarunkowania strukturalne. Część doniesień literaturowych dla OxyS RNA i DsrA RNA wskazuje, że Hfq wiąże się w rejonach jednoniciowych otoczonych strukturami spinkowymi, czyli w sposób przypominający oddziaływania białek Sm z ich docelowymi RNA. Jednakże rejon jednoniciowy nie jest jedynym miejscem oddziaływania (101, 116). Rolle i współpracownicy sugerują natomiast, że w przypadku DsrA RNA oddziaływanie ma miejsce głównie w rejonie proponowanym przez nich, jako dwuniciowy (166).

Cząsteczkę DsrA RNA wyznakowaną radioizotopowo inkubowano w buforze hybrydyzacyjnym VII z białkiem Hfq o odpowiednim stężeniu (ustalonym na podstawie elektroforezy w warunkach natywnych) w celu uzyskania całkowitego związania DsrA RNA z Hfq, według procedury opisanej w rozdziale Materiały i Metody. Następnie przeprowadzano hybrydyzację na mikromacierzy. Każdorazowo przeprowadzano hybrydyzację kontrolną, w której próbkę traktowano identycznie jak próbę badaną z wyjątkiem dodawania Hfq. Taka próba kontrolna była zawsze odnośnikiem, do którego porównywano wynik otrzymany dla kompleksu DsrA RNA/Hfq.

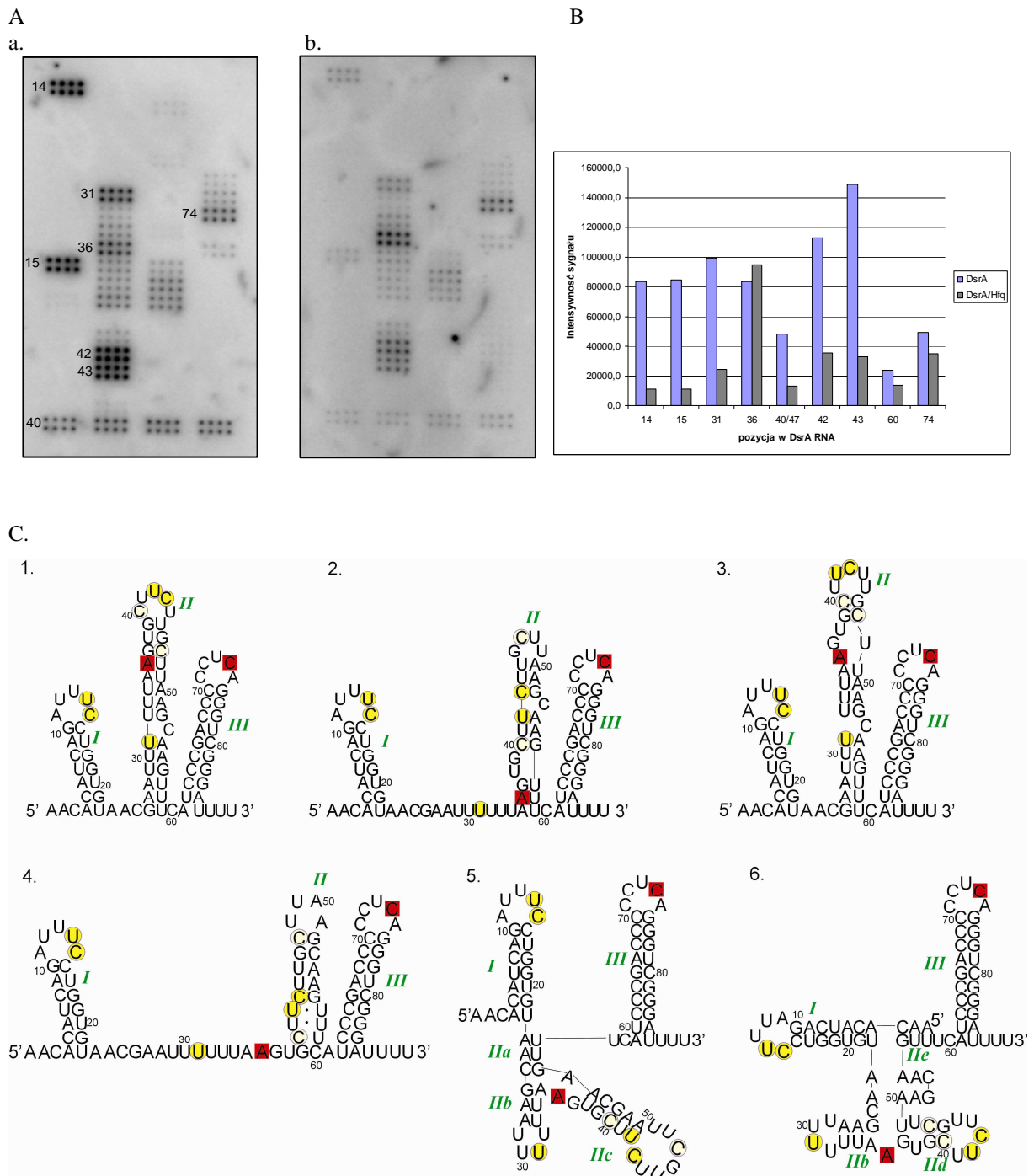
W wyniku przeprowadzonych eksperymentów dla kompleksów DsrA RNA/Hfq otrzymano profil hybrydyzacji, w którym obserwowano 3- do 7-krotne obniżenie intensywności niektórych sygnałów w stosunku do reakcji kontrolnej (Tabela 10, Rysunek 24). Nie zaobserwowano całkowitego zaniku sygnałów ani dodatkowych miejsc hybrydyzacji. Jest to zgodne z wcześniejszymi doniesieniami wskazującymi, że związanie Hfq nie powoduje zmian w strukturze drugorzędowej DsrA RNA (116). Zaobserwowano obniżenie intensywności w pozycji 14 i 15 czyli w obrębie pętli spinki I. Jest to zgodne z wynikami Lease i Woodson, którzy w obecności Hfq obserwowali obniżenie intensywności cięcia RNazą T2 w obrębie tej pętli (89). Kolejne obniżenie intensywności sygnału wystąpiło w pozycji 31, czyli w rejonie uznanym przez dwa niezależne zespoły za główne miejsce oddziaływania DsrA RNA z Hfq (89, 116). Słabszą intensywność obserwowano również w pozycjach 42 i 43 oraz 40 lub 47. Brescia i współpracownicy obserwowali w obecności Hfq zwiększoną intensywność cięcia RNazą V1 w pozycjach 42-45, co tłumaczą tym, że związanie białka powoduje sterycznie wzmocnienie dwuniciowego charakteru tego rejonu (116). Jest to zgodne z obserwacjami na mikromacierzach, które wskazywały, że bez Hfq rejon ten miał mało stabilną strukturę i był dostępny dla sond oligonukleotydowych, natomiast związanie białka Hfq na tyle wzmocniło jego strukturę, że stał się on niedostępny. Rolle i współpracownicy w rejonie 43-52 w obecności Hfq obserwowali ochronę przed hydrolizą indukowaną jonami ołowiu (166).

III. WYNIKI I DYSKUSJA

Tabela 10. Uśrednione wyniki hybrydyzacji dla kompleksu DsrA RNA/Hfq .

pozycja w DsrA	nazwa sondy	sekwencja penta- lub heptameru	sekwencja modyfikowanej sondy	nukleotyd parujący się z dodatkowym 3'G	przewidziane dG (kcal/mol) dla komplementarnego wiązania RNA-RNA	przewidziane dG (kcal/mol) dla wiązania modyfikowana sonda-RNA, 100 mM NaCl	wyniki hybrydyzacji dla DsrA	wyniki hybrydyzacji dla DsrA/Hfq	alternatywne miejsce wiązania	przewidziane dG (kcal/mol) dla alternatywnego miejsca wiązania RNA-RNA	przewidziane dG (kcal/mol) dla alternatywnego miejsca wiązania modyfikowana sonda-RNA, 100 mM NaCl
14	641	GGAAA	GGDDG	A	-2,9	-9,6	s	w (7x)	42/43	-1,4	-4,0
15	161	AGGAA	DGGDDG	U	-3,6	-10,2	s	w (7x)	42/43	-4,4	-9,8
31	31-7	AAAAAAU	DDDDDU		-0,5	-9,7	s	m (4x)			
36	36-7	CACUUA	CDCUUA		-4,9	-10,1	s	s			
40	37	AAGCA	DDGCDG	G	-3,4	-10,3	m	m (3x)			
42	131	AGAAG	DGDDG	G	-2,9	-9,6	s	m (3x)	13/14	-1,1	-3,3
43	33	AAGAA	DDGDDG	C	-1,2	-11,4	s	m (4x)	13/14	-0,6	-3,9
47	37	AAGCA	DDGCDG	U	-3,4	-10,3	m	m (3x)			
60	225	AUGAA	DUGDDG	U	-1,4	-9,1	w	w			
74	483	CUGAG	CUGDGG	C	-4,6	-12,2	m	m	41/42	-2,4	-4,8

Jako s, m i w zaznaczono sygnały hybrydyzacji odpowiednio o wysokiej, średniej i słabej intensywności. W nawiasach podano ilokrotnie następowała zmiana intensywności sygnału, w porównaniu do intensywności tego samego sygnału w reakcji kontrolnej (bez Hfq)



Rysunek 24. (A) Przykładowy wynik hybrydyzacji (a) DsrA RNA, (b) kompleks DsrA/Hfq. Macierz drukowana w układzie: 4 kolumny, 4 sondy w rzędzie, każda sonda po 8 powtórzeń. (B) Wykres prezentujący uśrednione intensywności sygnałów dla poszczególnych sond (C) Proponowane struktury DsrA RNA z zaznaczonymi wynikami mapowania w kompleksie z Hfq. Kolorem czerwonym zaznaczono miejsca hybrydyzacji, dla których intensywność sygnału nie zmieniła się w porównaniu z reakcją kontrolną (sam DsrA RNA). Kolorem żółtym zaznaczono miejsca o obniżonej intensywności sygnału w obecności Hfq.

Przeprowadzone eksperymenty potwierdziły wcześniejsze doniesienia, iż w wiązaniu Hfq bierze udział nie tylko proponowana jako jednoniciowa sekwencja bogata w reszty urydyny, zlokalizowana w okolicy 30-tego nukleotydu, ale również inne rejony cząsteczki tworzące drugo- i trzeciorzędowe elementy strukturalne (89, 116).

Analizując miejsca o osłabionej intensywności sygnału wiązania się sond w obecności białka Hfq, w świetle rozpatrywanych struktur DsrA RNA (struktury 24B-4, 24B-5 i 24B-6) wydaje się, że najlepiej do dokowania białka przygotowana jest struktura 24B-4. W tym przypadku rejon środkowy DsrA RNA nie wymaga żadnych rearanżacji struktury drugorzędowej. Natomiast związanie się Hfq do struktur alternatywnych, tzn. 24B-5 i 24B-6, mogłoby wiązać się z dość rozległymi zmianami strukturalnymi rejonu środkowego. Jakkolwiek jest to rejon o niskiej stabilności termodynamicznej budujących go motywów, zatem wspomniane zmiany strukturalne nie wymagałyby dużego nakładu energetycznego.

Opisane powyżej hybrydyzacje na mikromacierzach izoenergetycznych kompleksów RNA/białko są pierwszymi tego typu eksperymentami. Nie osiągnięto wyniku, w którym obserwuje się całkowity zanik hybrydyzacji. Należało się zastanowić czy przyczyna tego tkwi w charakterze oddziaływań DsrA RNA/Hfq. Podobną zależność obserwowali także Brescia (116) oraz Lease i Woodson (89), którzy podczas trawienia nukleazami również nie obserwowali całkowitej ochrony pewnych rejonów DsrA RNA przez białko. Innym wytłumaczeniem może być możliwość oddysocjowania podczas hybrydyzacji pewnej puli białka od DsrA RNA i wówczas uwolnione DsrA RNA wiązałyby się z komplementarnymi sondami. Możliwe jest też, że Hfq związane w kompleksie z DsrA RNA ma zdolność do tworzenia trójskładnikowego kompleksu z sondą (tworząc kompleks DsrA RNA/Hfq/sonda) poprzez oddziaływanie z nią inną powierzchnią niż powierzchnia zaangażowana w oddziaływanie z DsrA. Tworzenie się trójskładnikowych kompleksów obserwowano wcześniej, w przypadku dodania poli(A) do kompleksu DsrA/Hfq (116). Należałoby również rozważyć zagrożenie błędnego odczytania wyniku hybrydyzacji wynikające z faktu, że Hfq będące w mieszaninie hybrydyzacyjnej w pewnej części w stanie wolnym mogłoby oddziaływać z sondami oligonukleotydowymi, a tym samym uniemożliwić im hybrydyzację kompleksu DsrA RNA/Hfq. W efekcie obniżenie intensywności sygnału dla danej pozycji, odczytane jako miejsce wiązania Hfq do DsrA RNA, w rzeczywistości wynikałoby z zasłonięcia tej sondy przez wolne Hfq lub DsrA RNA lub też przez kompleks trójskładnikowy za pośrednictwem Hfq, a nie z zasłonięcia w DsrA RNA przez Hfq miejsca komplementarnego do tej sondy. Choć sytuacja taka wydaje się teoretycznie możliwa, nie istnieją dane eksperymentalne mówiące o tym, aby tak krótkie i w dodatku modyfikowane oligonukleotydy mogły być wiązane przez Hfq.

Podjęto próbę częściowej odpowiedzi na te przedstawione powyżej wątpliwości. Postanowiono sprawdzić czy Hfq w ogóle jest zdolne do wiązania modyfikowanych heksa- i heptamerów. Zsyntetyzowano kilka oligonukleotydów odpowiadających wybranym sondom,

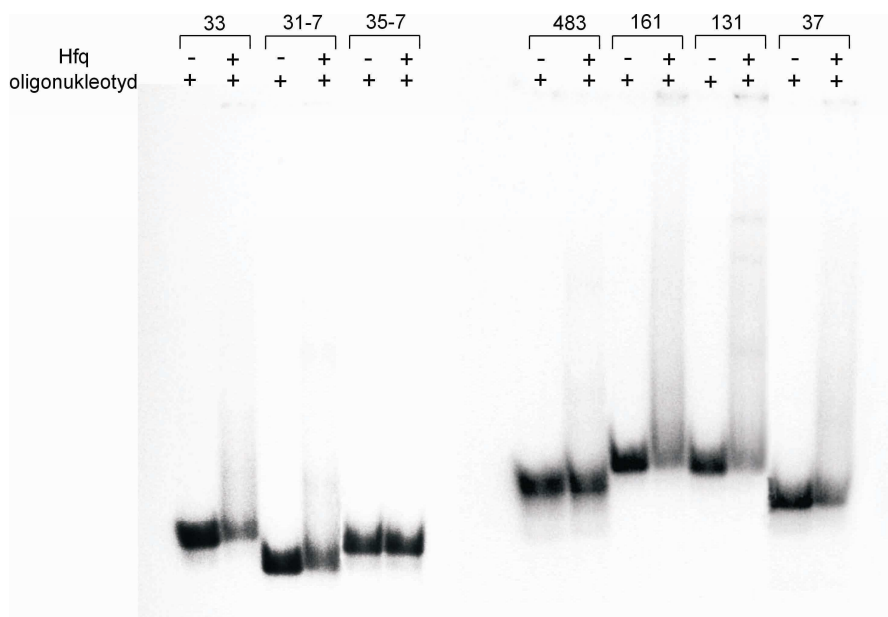
ale nie posiadających C6-aminoheksylowego łącznika na końcu 5' (Tabela 11). W grupie tej znalazły się oligonukleotydy, dla których obserwowano obniżenie intensywności sygnału w czasie hybrydyzacji kompleksu DsrA RNA/Hfq do mikromacierzy. Ponadto, wybrano do badań oligonukleotyd 35-7, dla którego nie obserwowano wiązania się z DsrA RNA. Jest to oligonukleotyd bogaty w reszty 2,6-diaminopurynorybozydowe (analog adenozyne) i U, czyli reszty nukleotydowe, które uważa się za preferencyjnie wiązane przez Hfq. Do badań wybrano także oligonukleotyd 483 komplementarny do miejsca 74 w DsrA RNA, w przypadku, którego w czasie hybrydyzacji DsrA RNA oraz DsrA RNA/Hfq nie obserwowano różnic w intensywności sygnału hybrydyzacyjnego. Zsyntetyzowane odpowiedniki sond wyznakowano radioizotopowo na końcu 5'. Następnie przeprowadzono inkubację z Hfq w buforze hybrydyzacyjnym I, po czym przeprowadzono rozdział elektroforetyczny w warunkach niedenaturujących.

Dla sondy 35-7 nie zaobserwowano wiązania z Hfq, dla pozostałych sond zaobserwowano bardzo słabe oddziaływania widoczne w postaci „smużących się” prążków i to w przypadku zastosowania 100-krotnego molowego nadmiaru heksameru białka w stosunku do oligonukleotydu (Rysunek 25).

Tabela 11. Zestawienie modyfikowanych oligonukleotydów, które wybrano do sprawdzenia zdolność do oddziaływania z Hfq.

pozycja w DsrA	nazwa sondy	sekwencja penta- lub heptameru	sekwencja modyfikowanej sondy bez aminołącznika	Oddziaływanie z Hfq
15	161	AGGAA	DGGDDG	słabe
31	31-7	AAAAAAU	DDDDDDU	słabe
35	35-7	ACUUAAA	DCUUDDD	brak
40	37	AAGCA	DDGCDG	słabe
42	131	AGAAG	DGDDGG	słabe
43	33	AAGAA	DDGDDG	słabe
74	483	CUGAG	CUGDGG	bardzo słabe

Można stwierdzić, że Hfq wykazuje bardzo słabe powinowactwo do modyfikowanych heksa- i heptamerów. Ponadto, należy pamiętać, że na mikromacierzy istnieje zdecydowanie mniej korzystna sytuacja, to znaczy, że stężenie białka jest nawet do 100-krotnie niższe od stężenia poszczególnych sond, a zatem jeżeli wiąże się ono z sondami to nie jest w stanie zablokować ich w takim stopniu, aby mogło to w sposób istotny uniemożliwić związanie się DsrA RNA czy kompleksu DsrA RNA/Hfq. Również sygnał pochodzący od ewentualnego trójskładnikowego kompleksu zwiazanego z sondą poprzez białko musiałby być na poziomie niewykrywalnym lub bardzo słabym.



Rysunek 25. Analiza zdolności tworzenia się kompleksu modyfikowany oligonukleotyd/Hfq. Rozdział prowadzono w 16% żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących, w 4°C.

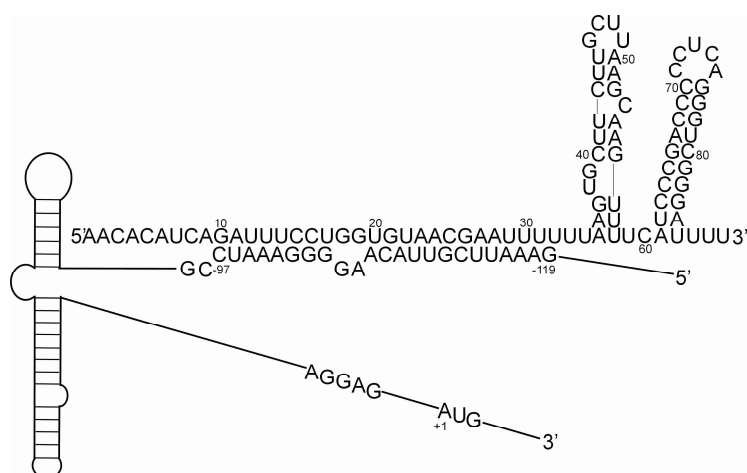
Na podstawie badań siedmiu różnych oligonukleotydów trudno jest stwierdzić dla czego do niektórych modyfikowanych oligonukleotydów Hfq wiąże się słabo a z niektórymi nie oddziałuje w ogóle. Trudno na podstawie przetestowanej grupy wnioskować o jakiś preferencjach sekwencyjnych Hfq, szczególnie że uważa się iż Hfq raczej nie wykazuje takich preferencji. Oligonukleotydy do których wykazywało ono słabe powinowactwo bogate były w reszty 2,6-diaminopurynorybozydu (D), z wyjątkiem 483, który jednocześnie oddziaływał najslabiej. Jednakże oligonukleotyd 35-7, do którego Hfq nie wiązało się również posiada 3 reszty D. Oligonukleotyd 35-7 posiada w pozycji drugiej LNA-C, a oligonukleotyd 483 ma 2'-O-metylowane C w pierwszej pozycji. Natomiast oligonukleotyd 37 posiada 2'-O-metylowane C w środku sekwencji. Na tym etapie przeprowadzonych eksperymentów, można jedynie przypuszczać, że być może dla oddziaływań znaczące jest, aby w pierwszej lub drugiej pozycji nie występowało C.

Reasumując wykazano, że metodę mikromacierzy izoenergetycznych można stosować również do badania kompleksów RNA z białkami, nie zapominając przy tym o pewnych ograniczeniach tego podejścia. Największa niedogodność może polegać na tym, że sondy, które stanowią krótkie modyfikowane oligonukleotydy, poza zamierzonymi i w miarę przewidywalnymi oddziaływaniami z badanym RNA mogą również oddziaływać z białkiem. Oczywiście oddziaływanie to zależy od właściwości badanego białka. Wiele białek, aby mogło się związać z kwasem nukleinowym potrzebuje znacznie dłuższych fragmentów niż

pięć reszt nukleotydowych oraz zdefiniowanego otoczenia strukturalnego, a także ściśle określonych warunków buforowych. Można sobie wyobrazić, że jeżeli będzie się badać kompleksy z białkami wykazującymi dużą specyficzną sekwencyjną wówczas problem niespecyficznego oddziaływania z sondami zostaje wyeliminowany. Należy również pamiętać, że choć hybrydyzacje można przeprowadzać w szerokim spektrum warunków buforowych, to jednak należy zachować jego wysoką siłę jonową, co niekiedy może mieć znaczący wpływ na trwałość i tworzenie się kompleksów RNA/białko. Niewątpliwym plusem metody mapowania mikromacierzowego jest szybkość wykonania pojedynczego eksperymentu i wspomniana dowolność buforowa, na którą nie można sobie pozwolić stosując, dla przykładu, trawienie niektórymi nukleazami. Żadna z metod nie jest pozbawiona wad, dlatego też im więcej metod zastosujemy, tym otrzymany wynik będzie bardziej zbliżał nas do zrozumienia rzeczywistych złożonych relacji międzycząsteczkowych.

1.8. Mapowanie mikromacierzowe dwóch oddziałujących ze sobą RNA (kompleksy RNA/RNA)

W kolejnej grupie eksperymentów postanowiono sprawdzić czy mikromacierze izoenergetyczne mogą być z powodzeniem stosowane do badania struktury i charakteru oddziaływań RNA znajdującego się w kompleksie z innym RNA. W tym eksperymencie wykorzystano, jako model cząsteczkę DsrA RNA i jej zdolność, jako posttranskrypcyjnego regulatora, do oddziaływania z rejonem liderowym jednego z docelowych mRNA. Jednym z tych mRNA jest *rpoS*, które koduje podjednostkę sigma s polimerazy RNA. Podczas nieobecności DsrA RNA *rpoS* nie podlega translacji, gdyż jego 5'UTR fałduje się tak, że tworzy się inhibitorowa struktura typu spinki uniemożliwiająca związanie rybosomu. DsrA RNA syntetyzowane podczas stresu temperaturowego oddziałuje z *rpoS* w taki sposób, że powoduje to otwarcie struktury inhibitorowej i umożliwia rozpoczęcie translacji. Dowiedziono eksperymentalnie, które fragmenty obu RNA biorą udział w oddziaływaniu ze sobą (89). Według doniesień literaturowych cząsteczki parują się na odcinku 22 reszt nukleotydowych. Ze strony DsrA RNA w oddziaływaniu biorą udział reszty nukleotydowe wchodzące częściowo w skład spinki I i rejonu II, na odcinku pomiędzy nukleotydem 10 a 32. Ze strony *rpoS* są to reszty od -97 do -119 (Rysunek 26). Ze względu na dość długi obszar oddziaływania cząsteczki tworzą ze sobą stabilny kompleks, który w warunkach *in vitro* może powstawać bez udziału żadnych dodatkowych czynników.

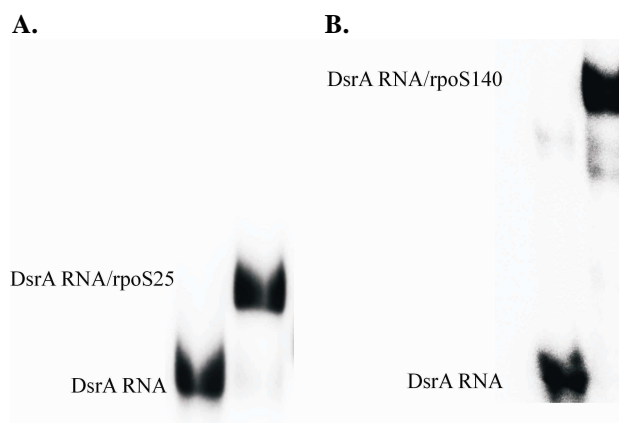


Rysunek 26. Kompleks DsrA RNA/*rpoS* mRNA według Lease i Woodson (2004).

Badanie kompleksów złożonych z dwóch cząsteczek RNA na mikromacierzach izoenergetycznych nie było nigdy wcześniej przeprowadzane. Interesujące wydawało się przetestowanie kompleksów zawierających pełnej długości DsrA RNA oraz fragmenty rejonu liderowego *rpoS* mRNA różnej długości. Z całkowitego rejonu liderowego o długości 576 reszt nukleotydowych wybrano dwa fragmenty o długościach 25 (*rpoS*25) i 140 (*rpoS*140) reszt nukleotydowych. Fragment 25 nukleotydowy *rpoS* odpowiadał rejonowi, który postulowany jest jako odcinek oddziałujący z DsrA RNA. Natomiast fragment 140 nukleotydowy zawierał motyw struktury inhibitorowej otwierającej się po związaniu się z DsrA RNA. Nie zdecydowano się na testowanie dłuższych fragmentów, gdyż dotychczasowa wiedza jak i analizy przeprowadzone w programie RNAstructure pozwalają sądzić, że nie biorą one udziału w oddziaływaniu z DsrA RNA. Ponadto dowiedziono, że dłuższe fragmenty wiążą się z DsrA RNA wolniej i mniej efektywnie. Sugeruje się, że być może wynika to z faktu, że rejon zlokalizowany powyżej struktury inhibitorowej wpływa na nią w jakiś sposób stabilizując ją tak, że przy braku dodatkowych czynników białkowych jest ona trudniej dostępna dla DsrA RNA (91).

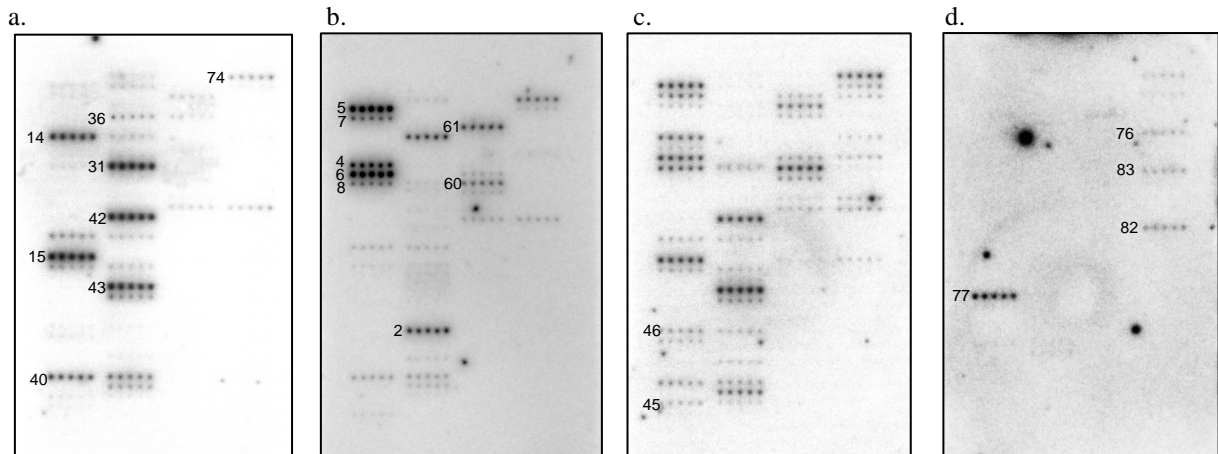
*RpoS*25 otrzymano drogą syntezy chemicznej, natomiast *rpoS*140 wykorzystując metody PCR oraz transkrypcję *in vitro* zgodnie z procedurami opisanymi w rozdziale Materiały i Metody. DsrA RNA znakowany radioizotopowo i poddany fałdowaniu inkubowano z 30-krotnym molowym nadmiarem *rpoS*25 lub *rpoS*140, poddanym uprzednio również procesowi pofałdowania. Mieszaninę hybrydyzowano do mikromacierzy izoenergetycznej. Zdolność wiązania się fragmentów *rpoS* z DsrA RNA w buforze hybrydyzacyjnym VII (1 M NaCl, 0,5 mM Na₂EDTA) sprawdzono wcześniej za pomocą elektroforezy w warunkach nie denaturujących (Rysunek 27). Używany 30-krotny molowy

nadmiar fragmentów *rpoS* określono na podstawie analiz elektroforetycznych, gdzie DsrA inkubowano w obecności rosnących stężeń *rpoS*25 lub *rpoS*140 tak, aby uzyskać 100% DsrA związanego z oligomerem. Każdorazowo przeprowadzano hybrydyzację kontrolną, w której do mikromacierzy hybrydyzowano samą cząsteczkę DsrA RNA, traktowaną identycznie jak próbki badane. Ze względu na długość *rpoS*140 i możliwość oddziaływania w sposób niespecyficzny z sondami na mikromacierzy, przeprowadzano dodatkowy eksperyment kontrolny. W eksperymencie tym *rpoS*140 znakowano radioizotopowo, fałdowano a następnie hybrydyzowano do mikromacierzy izoenergetycznej dedykowanej cząsteczce DsrA.

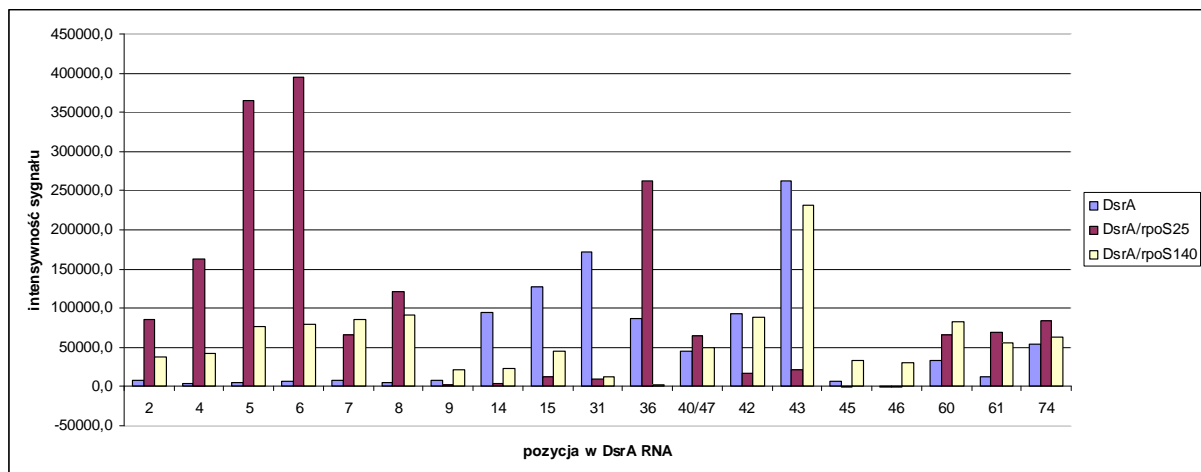


Rysunek 27. Rozdział elektroforetyczny kompleksów (A) DsrA RNA/*rpoS*25 oraz (B) DsrA RNA/*rpoS*140. Do stworzenia kompleksu użyto 30-krotny molowy nadmiar *rpoS*25 oraz *rpoS*140. Analizę prowadzono w (A) 6% oraz (B) 8% żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących w 4°C.

A



B



Rysunek 28.(A) Przykładowy wynik hybrydyzacji (a) DsrA RNA, (b) kompleksu DsrA/rpoS25, (c) kompleksu DsrA/rpoS140, (d) rpoS140 do macierzy dedykowanej cząsteczce DsrA. Macierz drukowana w układzie: 4 kolumny, 4 sondy w rzędzie, każda sonda po 5 powtórzeń. (B) Wykres prezentujący uśrednione intensywności sygnałów pochodzące od poszczególnych sond dla DsrA RNA i jego kompleksów z rpoS25 i rpoS140.

III. WYNIKI I DYSKUSJA

Tabela 12. Uśrednione wyniki hybrydyzacji dla kompleksów DsrA RNA/rpoS25 i DsrA RNA/rpoS140.

pozycja w DsrA	nazwa sondy	sekwencja penta- lub heptameru	sekwencja modyfikowanej sondy	nukleotyd parujący się z dodatkowym 3'G	przewidziane dG (kcal/mol) dla komplem-tarnego wiązania RNA-RNA	przewidziane dG (kcal/mol) dla wiązania modyfikowana sonda-RNA, 100 mM NaCl	wyniki hybrydyzacji dla DsrA	wynik hybrydyzacji dla DsrA/RpoS25	wynik hybrydyzacji dla DsrA/RpoS140	wynik hybrydyzacji dla RpoS 140	alternatywne miejsce wiązania	przewidziane dG (kcal/mol) dla alternatywnego miejsca wiązania RNA-RNA	przewidziane dG (kcal/mol) dla alternatywnego miejsca wiązania modyfikowana sonda-RNA, 100 mM NaCl
2	958	UGUUC	UGUUCG	G	-3,0	-7,9		m	m				
4	956	UGUGU	UGUGUG	A	-3,5	-7,8		s	m				
5	239	AUGUG	DUGUGG	A	-2,9	-9,3		s	s				
6	572	GAUGU	GDUGUG	C	-3,2	-11,0		s	s				
7	911	UGAUG	UGDUGG	A	-3,1	-9,0		m	s				
8	484	CUGAU	CUGDUG	C	-3,1	-10,7		m	s				
9	889	UCUGA	UCUGDG	A	-3,9	-9,4			w				
14	641	GGAAA	GGDDDG	A	-2,9	-9,6	s		m (3x)		42/43	-1,4	-4,0
15	161	AGGAA	DGGDDG	U	-3,6	-10,2	s		m (3x)		42/43	-4,4	-9,8
31	31-7	AAAAAAU	DDDDDDU		-0,5	-9,7	s		w (20x)				
36	36-7	CACUUA	CDCUUDA		-4,9	-10,1	s (3x)	s					
40	37	AAGCA	DDGCDG	G	-3,4	-10,3	m	m	m				
42	131	AGAAG	DGDDGG	G	-2,9	-9,6	s		s		13/14	-1,1	-3,3
43	33	AAGAA	DDGDDG	C	-1,2	-11,4	s		s		13/14	-0,6	-3,9
45	579	GCAAG	GCDDGG	U	-4,4	-9,9			m				
46	145	AGCAA	DGCDDG	C	-3,4	-11,9			m				
47	37	AAGCA	DDGCDG	U	-3,4	-10,3	m	m	m				
60	225	AUGAA	DUGDDG	U	-1,4	-9,1	w	m	s		41/42 13/14 8	-2,7 -0,4 -1,0	-6,0 -3,9 -2,4
61	569	GAUGA	GDUGDG	U	-3,4	-9,3		m	m		6/7	-4,3	-4,1
74	483	CUGAG	CUGDGG	C	-4,6	-12,2	m	m	m		41/42	-2,4	-4,8
76	351	CCCUG	CCCUG		-6,7	-9,2				m			
77	88	ACCCU	ACCCUG	C	-5,8	-12,1				s			
82	855	UCCCG	UCCCG		-6,8	-9,6				m			
83	214	AUCCC	AUCCCG	C	-5,5	-11,2				m			

Jako s, m i w zaznaczono sygnały hybrydyzacji odpowiednio o wysokiej, średniej i słabej intensywności. W nawiasach podano ilokrotnie następowo obniżenie intensywności sygnału, w porównaniu do intensywności tego samego sygnału w reakcji kontrolnej (bez rpoS), lub w przypadku sondy 36-7 ilokrotnie niższy był sygnał w reakcji kontrolnej, w porównaniu do jego intensywności w eksperymencie z kompleksem.

W wyniku hybrydyzacji do mikromacierzy kompleksu DsrA RNA/rpoS25 otrzymano obraz wykazujący istotne różnice w porównaniu z profilem hybrydyzacji samej cząsteczki DsrA RNA (Tabela 11). Zaobserwowano pojawienie się intensywnych sygnałów w pozycjach 4-6 i średniej intensywności w pozycjach 2, 7 i 8, które tworzą trzon spinki I. Ponadto zaobserwowano brak sygnałów w pozycjach 14, 15 i 31, które w reakcji kontrolnej są dostępne do hybrydyzacji. Zatem, zgodnie z oczekiwaniami przyłączenie rpoS25 powoduje rozplecenie struktury DsrA RNA tak, że 5' końcowy fragment budujący trzon spinki I staje się dostępny do hybrydyzacji, natomiast rejon oddziałujący z *rpoS* staje się nie dostępny dla sond. Zaobserwowano również dodatkowe zmiany w profilu hybrydyzacji. W tym trzykrotne zwiększenie intensywności sygnału w pozycji 36 wobec macierzy kontrolnej, brak dostępności w pozycjach 42 i 43 oraz pojawienie się dostępności w pozycjach 60 i 61. Brak dostępności w pozycjach 42 i 43 można tłumaczyć faktem, że sondy dedykowane tym pozycją w rzeczywistości nie parowały się z nimi jak wcześniej zakładano, lecz oddziaływały nie w pełni komplementarnie w rejonie 13/14. Jednakże energia swobodna takiego dupleksu wydaje się być zbyt niska (około -3,5 kcal/mol), aby mogła podlegać detekcji. Podobnie można wyjaśnić pojawienie się sygnałów w pozycjach 60 i 61, że są to nie w pełni komplementarne oddziaływania z pozycjami odpowiednio 8 i 6/7, lecz znów wartość energii swobodnej wynosi tutaj zaledwie -2,4 i -4.0 kcal/mol. Zwiększenie intensywności sygnału w pozycji 36 oraz oddziaływania w wyżej wymienionych dodatkowych pozycjach wskazują, że oddziaływanie z rpoS25 nie wiąże się tylko z rozpleceniem spinki I, ale wpływa również na pozostałe elementy strukturalne budujące DsrA RNA. Fakt ten byłby kolejnym argumentem przemawiającym za tym, że postulowany przez Lease i Belfort rejon jednoniciowy jest jednak zaangażowany w jakiegoś typu oddziaływania (87).

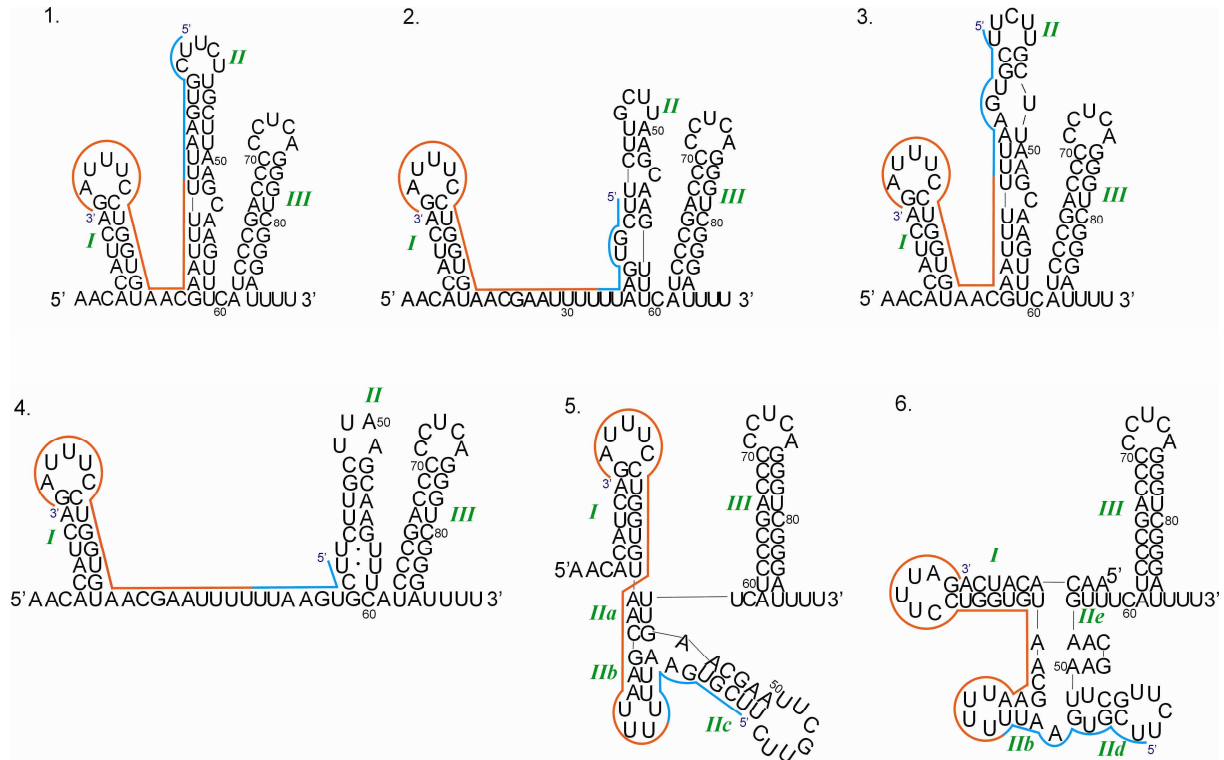
Wynik ten pokazuje, że z powodzeniem można badać na mikromacierzach izoenergetycznych strukturę cząsteczki RNA będącej w kompleksie z innym komplementarnym RNA.

Można by się spodziewać, że skoro DsrA RNA oddziałuje z *rpoS* tylko na odcinku 22 nukleotydów to hybrydyzacja kompleksu DsrA/rpoS140 zakończy się takim samym wynikiem jak hybrydyzacja kompleksu DsrA/rpoS25, gdyż wydłużanie cząsteczki rpoS nie powinno powodować dodatkowych rearanżacji DsrA RNA. Jednakże profil hybrydyzacji tego kompleksu okazał się nieco odmienny od omawianego powyżej. Dla DsrA/rpoS140, podobnie jak w przypadku DsrA/RpoS25, również zaobserwowano pojawienie się sygnałów w pozycjach 2, 4-8. Sygnały w rejonie uznawanym za miejsce oddziaływania z rpoS uległy w tym eksperymencie nie całkowitemu wyciszeniu a 3- i 20-krotnemu obniżeniu. Co ciekawe,

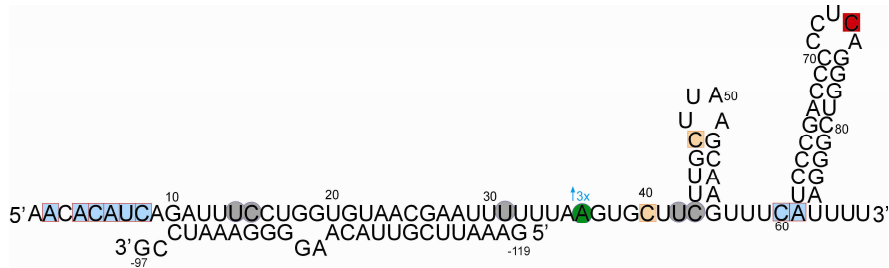
pozycja 36 dla której w eksperymencie z rpoS25 obserwowano zwiększenie intensywności sygnału okazała się w ogóle nie dostępna do hybrydyzacji. Ponadto, zaobserwowano dodatkowe miejsca hybrydyzacji o średniej intensywności w pozycjach 45, 46 oraz tak samo, jak dla DsrA/rpoS25 w pozycjach 60, 61. Wynik ten wskazuje, że w oddziaływaniu z DsrA RNA nie jest zaangażowany tylko wcześniej sugerowany rejon inhibitorowej struktury, lecz istnieją jeszcze jakieś dodatkowe miejsca oddziaływania. Brak dostępności do hybrydyzacji pozycji 36 wskazuje, że rejon ten może być zaangażowany w oddziaływania z rpoS. Odcinek od nukleotydu 35 do 41 w DsrA RNA mógłby parować się z rejonem od -121 do -127 w rpoS, tym samym rejon oddziaływania wydłużyłby się z 22 do 33 reszt nukleotydowych (Rysunek 29). Wyniki uzyskane za pomocą izoenergetycznych mikromacierzy są zgodne z wynikami uzyskanymi przez Lease i Woodson, którzy zastosowali mapowanie nukleazami T1 i T2 specyficznymi wobec rejonów jednoniciowych. W czasie mapowania kompleksu DsrA RNA/RpoS obserwowali oni w cząsteczce DsrA RNA ochronę przed cięciem nukleazami nie tylko w rejonie postulowanym przez nich jako miejsce oddziaływania, ale również w pozycjach 37 i 39 jednakże pominęli to w rozważaniach na temat struktury kompleksu (89).

Na rysunku 29A przedstawiono schematycznie rejony parowania się rpoS25 i rpoS140 z różnymi proponowanymi strukturami DsrA RNA. Niezależnie od proponowanej struktury DsrA RNA utworzenie kompleksu DsrA RNA/rpoS wymaga rearanżacji struktury drugorzędowej DsrA RNA. W każdym przypadku dotyczy to spinki I oraz (zależnie od proponowanej struktury DsrA RNA) różnych fragmentów rejonu środkowego (spinki II i jej wariantów). W przypadku struktury 29A-4 utworzenie kompleksu RNA/RNA wymaga jedynie w obrębie helikalnym spinki II rozplecenie jej terminalnego fragmentu. Natomiast dla struktur 29A-5 i 29A-6 związane jest z większymi przegrupowaniami strukturalnymi rejonu środkowego. Pamiętając, że jest to niestabilny termodynamicznie rejon, to jego rearanżacja prowadząca do powstania trwałego termodynamicznie fragmentu helikalnego pomiędzy DsrA RNA i rpoS25 czy rpoS140 jest termodynamicznie uzasadniona. Na rysunkach 29B i 29C zaznaczono wyniki mapowania mikromacierzowego dla kompleksów DsrA RNA z rpoS25 i rpoS140. Przedstawiono je na strukturze DsrA, która mogłaby powstać ze struktury 4 po przyłączeniu *rpoS*.

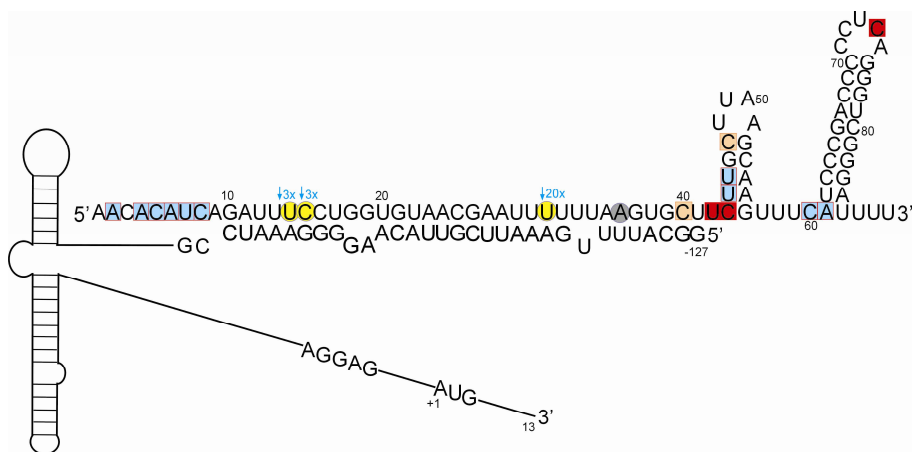
A



B



C



Rysunek 29. (A) Na wszystkich sześciu proponowanych strukturach DsrA RNA zaznaczono rejon oddziaływania rpos25 (pomarańczowa linia) i rpos140 (pomarańczowa i niebieska linia). (B) Wynik mapowania mikromacierzowego dla kompleksów DsrA/rpoS25 oraz (C) DsrA/rpoS140 zaznaczone na strukturze 4. Kolorem czerwonym zaznaczono miejsca hybrydyzacji występujące również w reakcji kontrolnej (sam DsrA RNA), kolorem niebieskim dodatkowe miejsca hybrydyzacji w stosunku do kontroli, szarym brak hybrydyzacji, żółtym obniżenie intensywności sygnału, a zielonym podwyższenie.

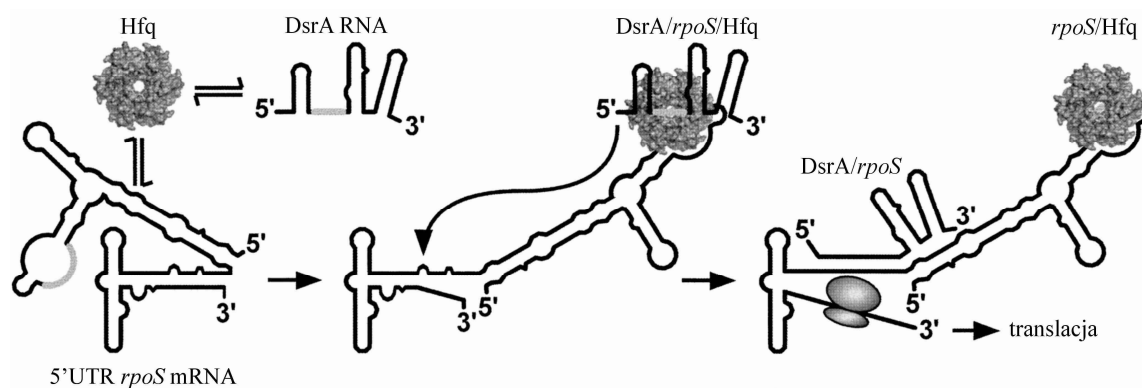
Wykazano, że za pomocą izoenergetycznych mikromacierzy można z powodzeniem badać strukturę kompleksów RNA/RNA. Poza swoimi niewątpliwymi atutami oczywiście metoda ta nie jest pozbawiona wad. Jednym z największych zagrożeń jest możliwość oddziaływania rejonów dostępnych cząsteczki, której nie jest dedykowana macierz w sposób niespecyficzny z sondami na mikromacierzy, co mogłoby przyczynić się do mylnej interpretacji wyniku. O takim zagrożeniu należy pamiętać, jednakże zastosowanie odpowiednich eksperymentów kontrolnych pozwala ustrzec się błędnych interpretacji uzyskanych wyników.

Ponadto używając nowatorskiej metody zaproponowano odmienny od dotychczasowego model oddziaływania pomiędzy regulatorowym DsrA RNA a jego docelowym mRNA *rpoS*.

1.9. Mapowanie mikromacierzowe kompleksów trójskładnikowych RNA/RNA/białko

W kolejnym etapie badań postanowiono sprawdzić możliwość wykorzystania mikromacierzy izoenergetycznych do badania jeszcze bardziej skomplikowanych układów, a mianowicie układów trójskładnikowych zawierających dwie różne cząsteczki RNA oraz białko. *In vivo* DsrA RNA do aktywacji translacji *rpoS* mRNA potrzebuje obecności białka Hfq. Uważa się, że Hfq ułatwia oddziaływanie pomiędzy obydwoma RNA, jednak dokładny mechanizm tego procesu wymaga jeszcze wyjaśnień. Dla DsrA RNA, rpoS140 i Hfq obserwowano tworzenie się kompleksów trójskładnikowych. Zaobserwowano też, że Hfq może wiązać się do każdej z cząsteczek oddzielnie. W czasie tworzenia kompleksu trójskładnikowego DsrA i rpoS140 wiążą się ze sobą i pozostają trwale związane nawet przez wiele cykli przyłączania i uwalniania Hfq. Należy nadmienić, że obecność Hfq w takim układzie zwiększała szybkość asocjacji i stabilność kompleksu RNA/RNA jedynie dwukrotnie (89). Soper i Woodson zaobserwowali, że użycie dłuższych fragmentów liderowych *rpoS* powoduje nawet 50-krotne przyspieszenie asocjacji obu RNA w obecności Hfq, w porównaniu z szybkością asocjacji DsrA/rpoS140, gdy brak jest Hfq. Wyjaśniają tą obserwację pokazując, że aktywacja *rpoS* mRNA jest procesem dwuetapowym. Do procesu tego niezbędna jest dłuższa sekwencje liderowa *rpoS* mRNA. W pierwszym etapie następuje związanie Hfq przez *rpoS* w miejscu zbudowanym z powtórzeń AAYAA (Y oznacza dowolny nukleotyd) znacznie oddalonym od inhibitorowej spinki, następnie do takiego kompleksu zostaje przyłączony DsrA RNA. Dopiero w drugim etapie następuje przeniesienie DsrA RNA do miejsca właściwego oddziaływania z *rpoS* (Rysunek 30). W cząsteczce DsrA

RNA miejsce oddziaływania z RpoS pokrywa się z głównym miejscem oddziaływania z Hfq. Uważa się, że po związaniu obu RNA następuje usunięcie Hfq z głównego miejsca oddziaływania i być może oddziałuje ono wówczas z innym miejscem w DsrA RNA. Przemawia za tym fakt, iż Hfq oddziałuje słabiej z kompleksem DsrA/*rpoS* niż z samym DsrA (89).

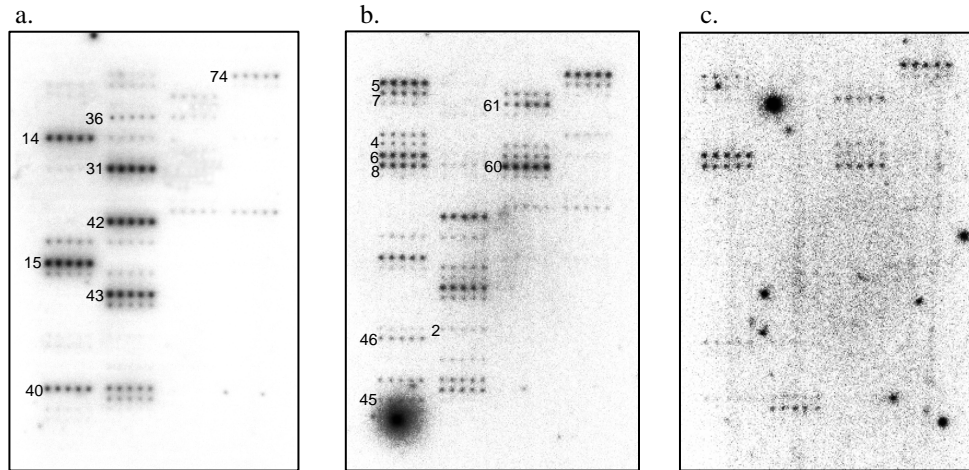


Rysunek 30. Model udziału białka Hfq w aktywacji *rpoS* mRNA przez DsrA. W przypadku braku Hfq rejon liderowy *rpoS* jest sfałdowany w taki sposób, że inhibuje inicjację translacji oraz utrudnia przyłączenie DsrA. Związanie Hfq przez *rpoS* powyżej inhibitorowej spinki w rejonie AAYAA (szara linia) powoduje rekrutację DsrA. Jeden lub kilka heksamerów Hfq ułatwia hybrydyzację obu RNA po czym następuje rozpoczęcie translacji. Po sparowaniu się obu RNA Hfq uwalnia się z głównego miejsca oddziaływania w DsrA, ale pozostaje związany do RpoS w rejonie AAYAA (91).

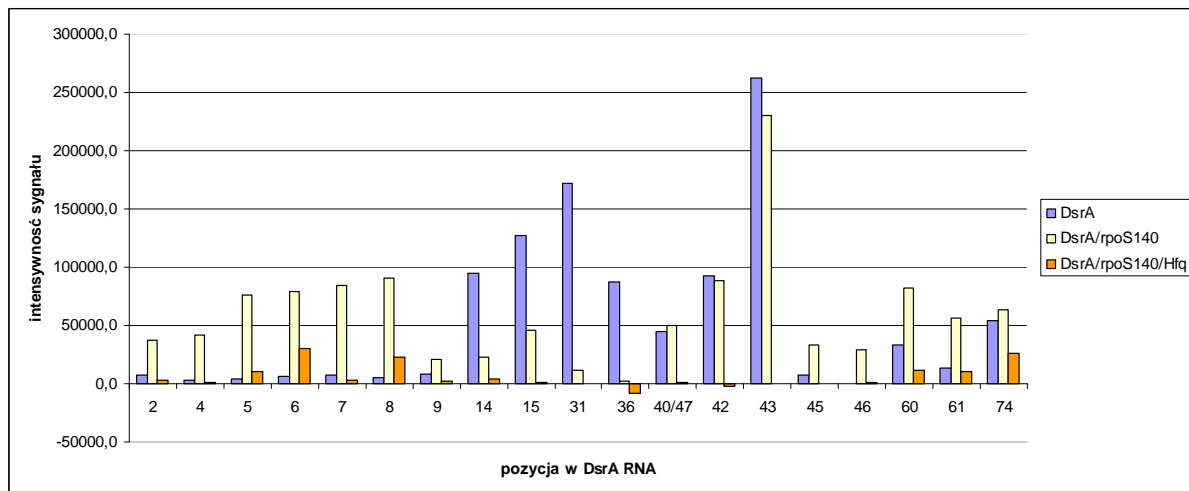
W eksperymencie z trójskładnikowym kompleksem użyto DsrA RNA, *rpoS*140 i Hfq. Ze względu na pierwsze tego typu badania na mikromacierzach, dodatkowo z dosyć skomplikowanym układem, o nie do końca wyjaśnionym charakterze zdecydowano się zastosować krótszy fragment *rpoS*. Po pierwsze, aby mieć pewność, że w uzyskanym kompleksie oba RNA oddziałują ze sobą na zasadzie komplementarności a nie ewentualnie poprzez białko i być może zaobserwować dodatkowe miejsce wiązania białka w DsrA RNA. Ponadto, aby móc porównać otrzymane wyniki z wcześniej przeprowadzonymi eksperymentami dla kompleksów DsrA RNA/*rpoS*140. DsrA RNA znakowany radioizotopowo i poddany fałdowaniu w buforze hybrydyzacyjnym VIII (1 M NaCl, 0,5 mM Na₂EDTA), inkubowano z 30-krotnym molowym nadmiarem *rpoS*140, poddanym uprzednio również fałdowaniu w buforze hybrydyzacyjnym VIII oraz białkiem Hfq o stężeniu 1,5 μM heksameru, według procedury opisanej w rozdziale Materiały i Metody. Mieszaninę hybrydyzowano do mikromacierzy. Tworzenie się kompleksu trójskładnikowego sprawdzono wcześniej za pomocą elektroforezy w warunkach niedenaturujących. Każdorazowo przeprowadzano dwa rodzaje hybrydyzacji kontrolnych. W pierwszej, do mikromacierzy hybrydyzowano sam DsrA RNA, traktowany identycznie jak próbki badane. W drugiej,

hybrydyzowano kompleks DsrA RNA/rpoS140. Takie próby służyły jako odnośniki do których porównywano wynik otrzymany dla kompleksu trójskładnikowego.

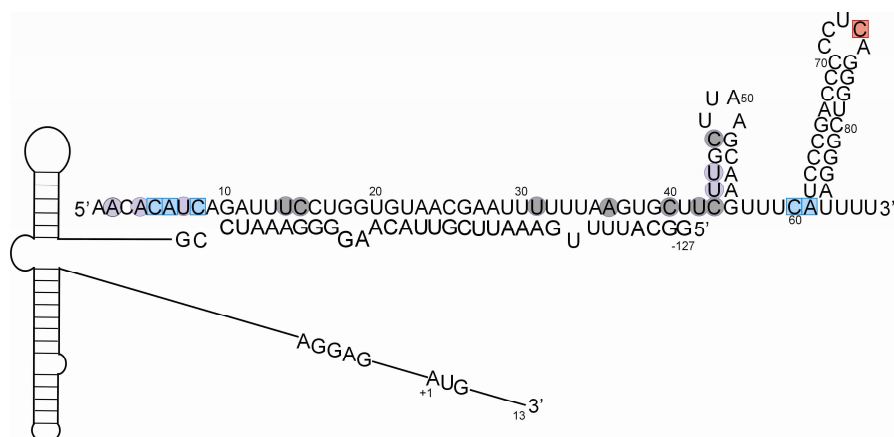
A



B



Rysunek 31. (A) Przykładowy wynik hybrydyzacji (a) DsrA RNA (b) kompleksu DsrA RNA/rpoS140 (c) kompleksu DsrA RNA/rpoS140/Hfq do macierzy dedykowanej DsrA RNA. Macierz drukowana w układzie: 4 kolumny, 4 sondy w rzędzie, każda sonda po 5 powtórzeń. (B) Wykres prezentujący uśrednione intensywności sygnałów pochodzące od poszczególnych sond dla DsrA RNA oraz dla kompleksów.



Rysunek 32. Wynik mapowania mikromacierzowego kompleksu DsrA RNA/rpoS140/Hfq. Kolorem szarym zaznaczono brak hybrydyzacji w miejscach, w których obserwowano dostępność w reakcji kontrolnej (sam DsrA RNA), kolorem fioletowym zaznaczono brak hybrydyzacji w miejscach, w których obserwowano dodatkową dostępność w reakcji DsrA RNA/rpoS140, kolorem niebieskim miejsca hybrydyzacji, które obserwowano również w hybrydyzacji DsrA/rpoS140, czerwonym miejsce wspólne z hybrydyzacją samego DsrA RNA.

W wyniku przeprowadzonych eksperymentów zaobserwowano hybrydyzacje w pozycjach 5, 6, 8, 60, 61 i 74. Wszystkie otrzymane sygnały były o podobnej intensywności, była ona relatywnie słaba w porównaniu z reakcjami kontrolnymi. Otrzymane sygnały były od 2- do 7-krotnie słabsze od sygnałów dla tych samych sond w reakcji kontrolnej DsrA RNA/rpoS140 (Tabela 13, Rysunek 31B). W przypadku hybrydyzacji kompleksu DsrA RNA/rpoS140, w rejonie oddziaływania z *rpoS*, w pozycjach 14, 15 i 31 DsrA RNA, otrzymano obniżenie intensywności sygnałów 3- do 20-krotne. Jeżeli w kompleksie było obecne dodatkowo białko Hfq w pozycjach tych obserwuje się całkowity brak dostępności. Otrzymany wynik może świadczyć o tym, że białko Hfq wzmacnia oddziaływanie pomiędzy komplementarnymi rejonami w DsrA RNA i rpoS140 co jest zgodne z opublikowanymi obserwacjami (89). Lease i Woodson wnioskowali, że w kompleksie trójskładnikowym Hfq pozostaje związane z RpoS140 w miejscach znajdujących się poniżej rejonu oddziaływania z DsrA. Nie wykluczali jednak równoczesnego oddziaływania z DsrA RNA, aczkolwiek w rejonie innym niż obszar parowania się z *rpoS*. Otrzymany wynik wskazuje, że w kompleksie trójskładnikowym Hfq pozostaje związane z DsrA RNA, obserwuje się zanik sygnałów w pozycjach 42, 43 i 47. Obniżenie dostępności tych pozycji dla sond obserwowano również w przypadku hybrydyzacji kompleksu DsrA RNA/Hfq (Tabela 10), natomiast nie obserwowano dla kompleksu DsrA RNA/rpoS. Świadczy to, iż są to pozycje nie dostępne dla sond w skutek oddziaływania z Hfq zarówno w wolnej cząsteczce DsrA RNA jak i znajdującej się w kompleksie z rpoS140. Zaobserwowano także brak dostępności w pozycjach 44 i 45, które nie były dostępne w wolnej cząsteczce DsrA RNA, ale były dostępne, gdy znajdowała się ona w kompleksie z rpoS140. Może to świadczyć, iż po związaniu się DsrA RNA z *rpoS*, kiedy

główne miejsce wiązania Hfq w DsrA zostaje zasłonięte, wówczas zostaje ono przeniesione w rejon 41- 47.

Wykazano, że metoda mikromacierzy izoenergetycznych jest na tyle uniwersalna, że można ją stosować również do badanie struktury cząsteczki RNA będącej w kompleksie z więcej niż jedną molekułą. Ponadto stwierdzono, że w kompleksie trójskładnikowym Hfq pozostaje związane z DsrA w rejonie poniżej miejsca parowania się z *rpoS* mRNA

III. WYNIKI I Dyskusja

Tabela 13. Uśrednione wyniki hybrydyzacji dla kompleksu DsrA RNA/rpoS140/Hfq.

pozycja w DsrA	nazwa sondy	sekwencja pentalu lub heptameru	sekwencja modyfikowanej sondy	nukleotyd parujący się z dodatkowym 3'G	przewidziane dG (kcal/mol) dla komplementarnego wiązania RNA-RNA	przewidziane dG (kcal/mol) dla wiązania modyfikowana sonda-RNA, 100 mM NaCl	wyniki hybrydyzacji dla DsrA	wynik hybrydyzacji dla DsrA/RpoS140	wynik hybrydyzacji dla DsrA/RpoS140/Hfq	alternatywne miejsca wiązania	przewidziane dG (kcal/mol) dla alternatywnego miejsca wiązania RNA-RNA	przewidziane dG (kcal/mol) dla alternatywnego miejsca wiązania- modyfikowana sonda-RNA, 100 mM NaCl
2	958	UGUUC	UGUUCG	G	-3,0	-7,9		m				
4	956	UGUGU	UGUGUG	A	-3,5	-7,8		m				
5	239	AUGUG	DUGUGG	A	-2,9	-9,3		s	7x			
6	572	GAUGU	GDUGUG	C	-3,2	-11,0		s	3x			
7	911	UGAUG	UGDUGG	A	-3,1	-9,0		s				
8	484	CUGAU	CUGDUG	C	-3,1	-10,7		s	4x			
9	889	UCUGA	UCUGDG	A	-3,9	-9,4		w				
14	641	GGAAA	GGDDDG	A	-2,9	-9,6	s	m (3x)		42/43	-1,4	-3,96
15	161	AGGAA	DGGDDG	U	-3,6	-10,2	s	m (3x)		42/43	-4,4	-9,78
31	31-7	AAAAAAU	DDDDDU		-0,5	-9,7	s	w (20x)				
36	36-7	CACUUA	CDCUUA		-4,9	-10,1	s					
40	37	AAGCA	DDGCDG	G	-3,4	-10,3	m	m				
42	131	AGAAG	DGDDGG	G	-2,9	-9,6	s	s		13/14	-1,1	-3,32
43	33	AAGAA	DDGDDG	C	-1,2	-11,4	s	s		13/14	-0,6	-3,87
45	579	GCAAG	GCDDGG	U	-4,4	-9,9		m				
46	145	AGCAA	DGCDDG	C	-3,4	-11,9		m				
47	37	AAGCA	DDGCDG	U	-3,4	-10,3	m	m				
60	225	AUGAA	DUGDDG	U	-1,4	-9,1	w	s	7x	41/42 13/14 8	-2,7 -0,4 -1,0	-6,0 -3,87 -2,36
61	569	GAUGA	GDUGDG	U	-3,4	-9,3		m	5x	6/7	-4,3	-4,11
74	483	CUGAG	CUGDGG	C	-4,6	-12,2	m	m	2x	41/42	-2,4	-4,77

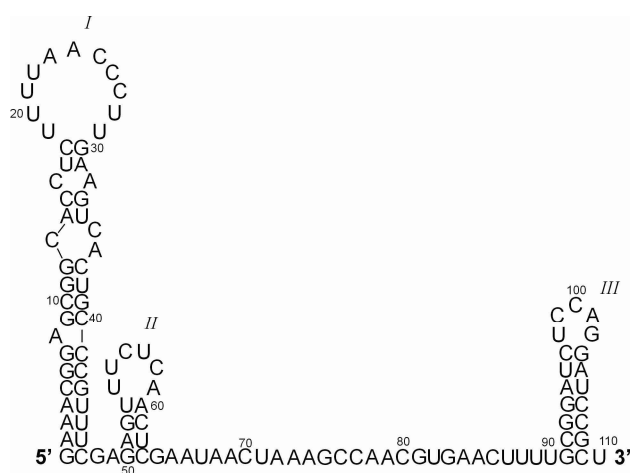
Jako s, m i w zaznaczono sygnały hybrydyzacji odpowiednio o wysokiej, średniej i słabej intensywności. Dla DsrA RNA/rpoS140 nawiasach podano ilokrotnie następowoło obniżenie intensywności sygnału, w porównaniu do intensywności tego samego sygnału w reakcji kontrolnej (sam DsrA RNA). Dla DsrA RNA/rpoS140/Hfq podano ilokrotnie następowoło obniżenie intensywności sygnału, w porównaniu do intensywności tego samego sygnału w reakcji DsrA RNA/rpoS140.

2. Wykorzystanie metody izoenergetycznych mikromacierzy (mapowania mikromacierzowego) do badania struktury drugorzędowej OxyS RNA i jego oddziaływań z innymi biomolekułami

2.1. Wprowadzenie

Drugą cząsteczką, którą wybrano do modelowych badań mapowania mikromacierzowego była OxyS RNA z *E. coli*. Należy ona do tej samej grupy niekodujących RNA co DsrA RNA, a mianowicie do RNA, które nie są w pełni komplementarne do swoich docelowych mRNA i wiążą białko Hfq.

OxyS RNA i mechanizmy jej działania są mniej poznane niż jest to w przypadku DsrA RNA. Postuluje się, że OxyS RNA reguluje pośrednio lub bezpośrednio ekspresję ponad 40 genów (97). Do tej pory tylko dla *flhA* mRNA wskazano miejsca bezpośredniego oddziaływania powodujące inhibicję jego ekspresji (100). Zaproponowana struktura drugorzędowa OxyS RNA powstała na podstawie mapowania chemicznego z wykorzystaniem siarczanu dimetylu (DMS). W strukturze tej postuluje się istnienie trzech spinek oraz 27 nukleotydowego rejonu jednoniciowego zlokalizowanego pomiędzy spinką II a III (Rysunek 33). Program RNAstructure 4.6 oblicza energie swobodne (ΔG°_{37}) równe -14,4, -1,5 oraz -11,5 kcal/mol, odpowiednio dla spinki I, II i III.

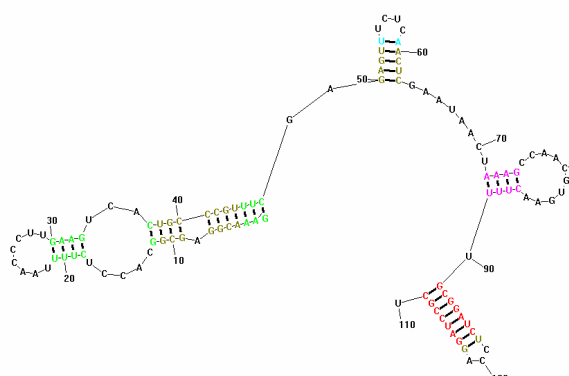


Rysunek 33. Struktura drugorzędowa OxyS RNA zaproponowana przez Altuvia (1997).

2.2. Analiza struktur OxyS RNA wygenerowanych przez program komputerowy, służących do przewidywania struktury drugorzędowej RNA

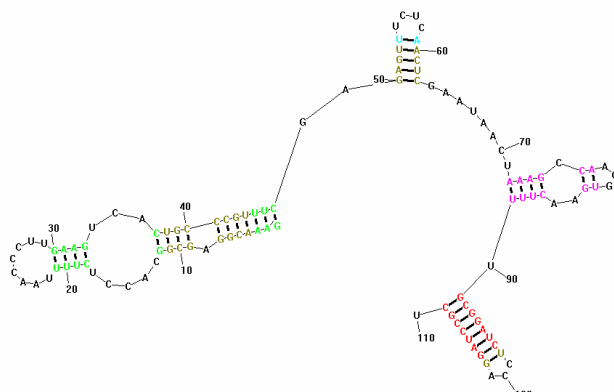
Badania struktury OxyS RNA rozpoczęto od analizy struktur drugorzędowych generowanych przez, bazujący na najbardziej aktualnych parametrach termodynamicznych, program RNAstructure. W przedziale 20% różnicy optymalnej wartości energii swobodnej oraz dla „window size” równego 1 program wygenerował 11 struktur drugorzędowych OxyS RNA (Rysunek 34).

A



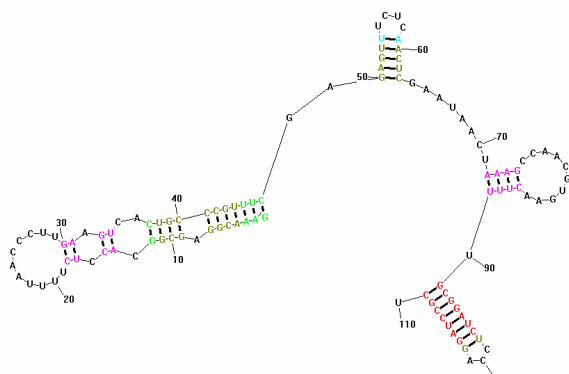
$$\Delta G_{37}^{\circ} = -33,4 \text{ kcal/mol}$$

B



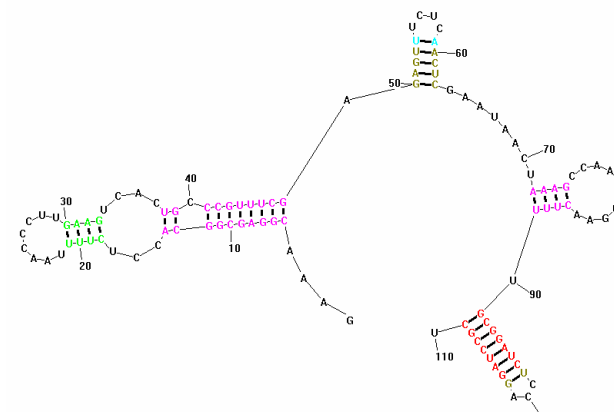
$$\Delta G_{37}^{\circ} = -32,7 \text{ kcal/mol}$$

C



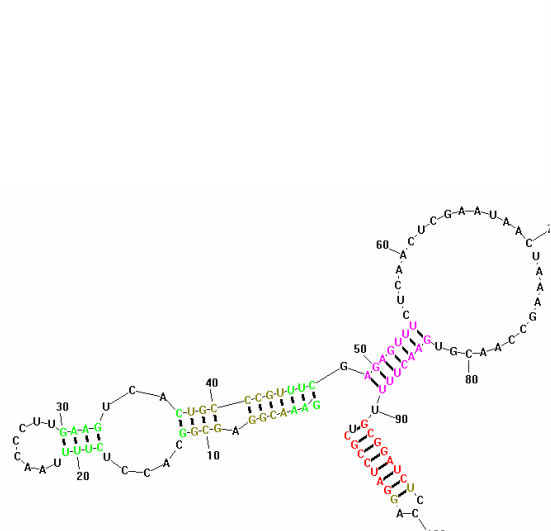
$$\Delta G_{37}^{\circ} = -32,5 \text{ kcal/mol}$$

D



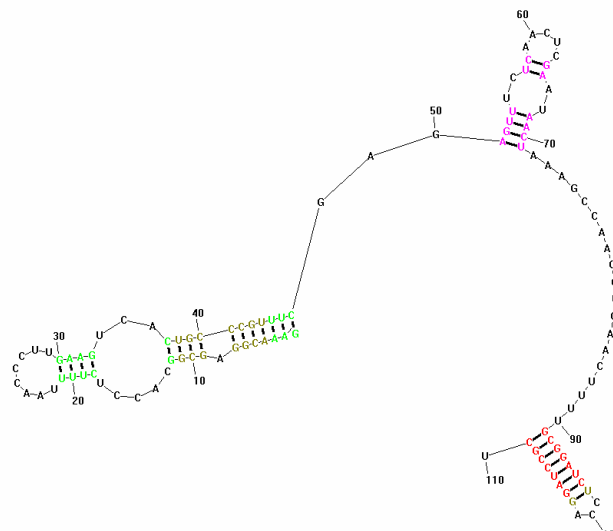
$$\Delta G_{37}^{\circ} = -32,4 \text{ kcal/mol}$$

E



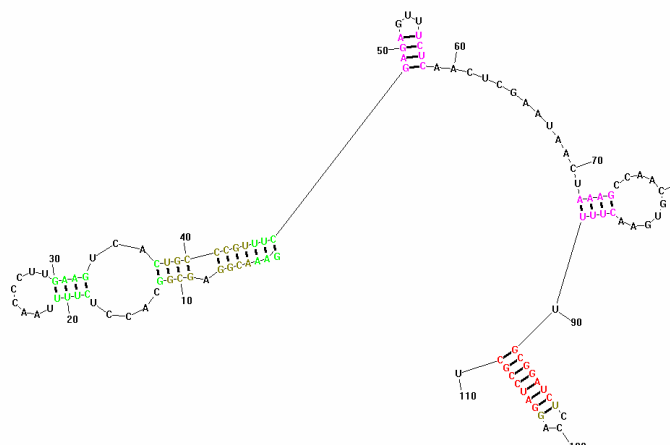
$$\Delta G_{37}^{\circ} = -32,0 \text{ kcal/mol}$$

F



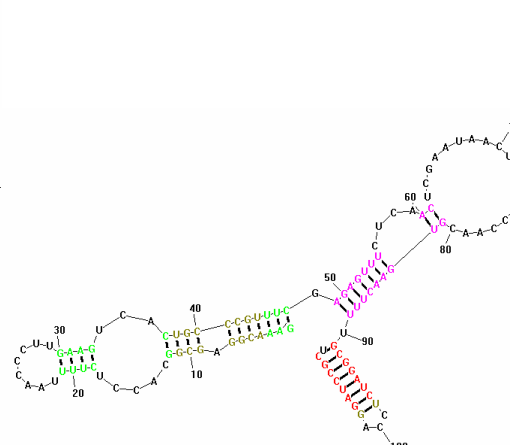
$$\Delta G_{37}^{\circ} = -31,6 \text{ kcal/mol}$$

G



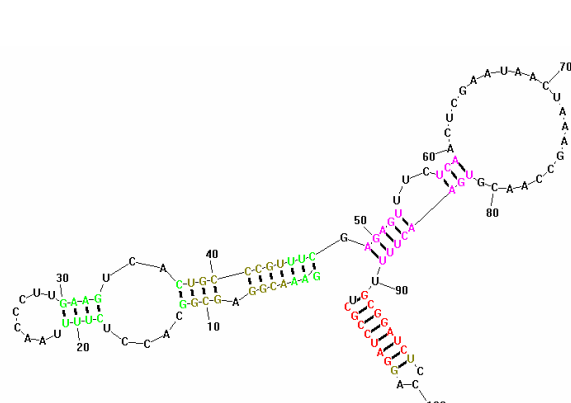
$$\Delta G_{37}^{\circ} = -31,3 \text{ kcal/mol}$$

H



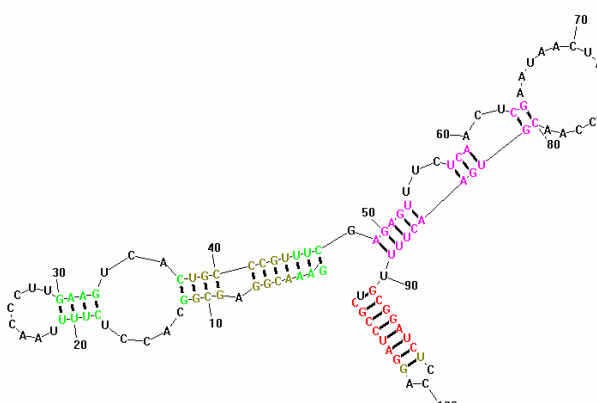
$$\Delta G_{37}^{\circ} = -31,3 \text{ kcal/mol}$$

I



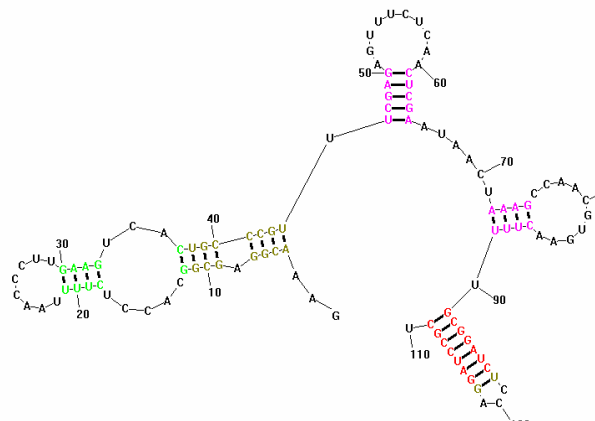
$$\Delta G_{37}^{\circ} = -30,6 \text{ kcal/mol}$$

J



$$\Delta G_{37}^{\circ} = -30,5 \text{ kcal/mol}$$

K



$$\Delta G^{\circ}_{37} = -30,1 \text{ kcal/mol}$$

Rysunek 34. Struktury drugorzędowe OxyS RNA wygenerowane przez program RNAstructure 4.6 oraz obliczonych wartościami energii swobodnej. Kolorami na rysunku 36 K zaznaczono prawdopodobieństwo tworzenia się par zasad i tak odpowiednio: czerwonym <99%;100%>, pomarańczowym <95%;99%>, żółtozielonym <90%;95%>, zielonym <80%;90%>, jasno zielonym <70%;80%>, jasno niebieskim <60%;70%>, granatowym <50%;60%> i różowym <0%;50%>).

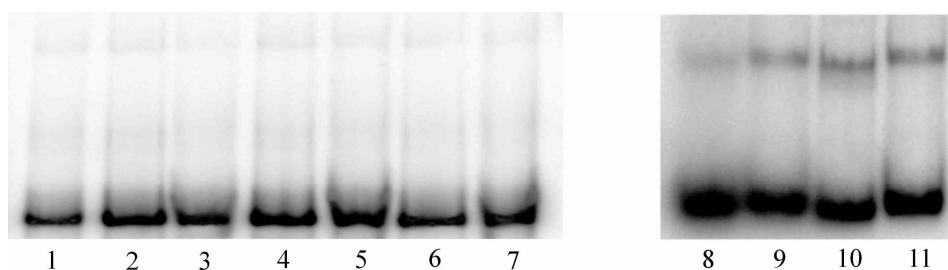
We wszystkich wygenerowanych strukturach OxyS RNA wspólnym elementem jest ostatnia spinka, w której prawdopodobieństwo tworzonych par zasad wynosi powyżej 99%. Spinka ta jest identyczna ze spinką III proponowaną w literaturze, z wyjątkiem zamykającej pętlę pary G-U, której autorzy nie uwzględnili (97). Jeśli chodzi o spinkę I to w proponowanych strukturach została ona pofałdowana na trzy sposoby. Najkorzystniejsza energetycznie i zarazem najczęściej proponowana jest spinka I widoczna na rysunkach 34A, B oraz E-H, o wartości energii swobodnej -15,3 kcal/mol. Na strukturze pokazanej na rysunku 34C wygenerowana została spinka I (wartości energii swobodnej równa -14,4 kcal/mol) identyczna z proponowaną wcześniej w literaturze (97). Jak widać obie spinki różnią się częścią apikalną. W przypadku nieco trwalszej termodynamicznie spinki I, proponowane pary zasad występują z prawdopodobieństwem 70-80%, natomiast w przypadku spinki I pokazanej na rysunku 34C, prawdopodobieństwo to wynosi poniżej 50%. Program RNAstructure proponuje jeszcze trzeci sposób pofałdowania spinki I pokazany na rysunku 34D, wartość energii swobodnej dla takiej spinki wynosi -12,0 kcal/mol. Co do rejonu pomiędzy spinką I a III, sytuacja wygląda bardzo podobnie jak w przypadku DsrA RNA. Rejon ten jest bogaty w reszty adenozyne, a program RNAstructure proponuje kilka możliwych sposobów jego pofałdowania. W strukturach pokazanych na rysunkach 34A-D występuje spinka II, taka sama jak proponowana w literaturze, z prawdopodobieństwem tworzenia się par zasad wynoszącym 80-90% oraz jeszcze jedna dodatkowa spinka, z prawdopodobieństwem poniżej 50%, zlokalizowana w rejonie, który Altuvia uznał za jednoniciowy (97). W pozostałych

strukturach wszystkie pary zasad w rejonie pomiędzy spinką I a III, tworzone są z prawdopodobieństwem poniżej 50%.

2.3. Otrzymywanie OxyS RNA

Cząsteczkę OxyS RNA wykorzystywaną do badań struktury drugorzędowej otrzymywano metodą transkrypcji *in vitro*. W celu otrzymania matryc DNA niezbędnych do transkrypcji zaprojektowano i zsyntetyzowano 2 oligomery DNA - OxyS1 i OxyS2 - zgodnie z procedurami opisanymi w rozdziale Materiały i Metody. Oligonukleotydy były tak zaprojektowane, aby otrzymane matrycowe DNA zawierało od końca 5' promotor dla polimerazy T7. Oligomery były komplementarne do siebie na odcinku 25 nukleotydów w rejonie końców 3'. Równomolowe ilości OxyS1 i OxyS2 poddawano hybrydyzacji a następnie reakcji PCR, w której następowało „wypełnianie” brakujących fragmentów nici. Otrzymane DNA oczyszczano i poddawano reakcji transkrypcji *in vitro*, po uprzednim sprawdzeniu jego składu nukleotydowego poprzez sekwencjonowanie. Powstałe RNA oczyszczano metodą elektroforezy w warunkach denaturujących, a następnie OxyS RNA znakowano na końcu 5' izotopem ^{32}P .

Przed przystąpieniem do mapowania mikromacierzowego przetestowano warunki denaturacji i renaturacji OxyS RNA w różnych buforach, aby upewnić się, że używany preparat jest homogeny strukturalnie. Profil migracji cząsteczek analizowano na niedenaturujących żelach poliakrylamidowych (Rysunek 35).



Rysunek 35. Rozdział OxyS RNA w 10 mM Tris-HCl pH 7,5 w różnych stężeniach NaCl i MgCl₂. Stosowano następujące bufony: **1** - 1 M NaCl, 0,5 mM Na₂EDTA (bufor VIII), **2** - 1 M NaCl, 0,2 mM MgCl₂ (bufor III), **3** - 1 M NaCl, 4 mM MgCl₂ (bufor I), **4** - 0,2 M NaCl, 0,5 mM Na₂EDTA (bufor IX), **5** - 0,2 mM NaCl, 0,2 mM MgCl₂ (bufor IV), **6** - 0,2 mM NaCl, 4 mM MgCl₂ (bufor II), **7** - 0,2 M NaCl, 30 mM MgCl₂ (bufor VII), **8** - 1 M NaCl, 4 mM MgCl₂ (bufor I), **9** - 1 M NaCl, 0,5 mM Na₂EDTA (bufor VIII), **10** - 0,2 mM NaCl, 4 mM MgCl₂ (bufor II), **11** - 0,2 M NaCl, 0,5 mM Na₂EDTA (bufor IX). Przed rozdziałem przeprowadzono denaturację i renaturację 3 minuty 75°C, 20 minut 25°C. Analizę prowadzono na 6% żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących w 4°C. Ścieżki 1-7 rozdział prowadzono w buforze TBE, ścieżki 8-11 rozdział prowadzono w buforze TBM.

Zaobserwowano, że warunki buforowe nie powodują zmian w migracji OxyS RNA. W dowolnie wybranym buforze do hybrydyzacji w obrazie elektroforetycznym obserwuje się homogenne prążki RNA zlokalizowane na tej samej wysokości. Rozdzielając elektroforetycznie OxyS RNA, bez uprzedniego fałdowania, również uzyskuje się taki sam obraz, jak wówczas, gdy poddaje się ją denaturacji i renaturacji. We wszystkich przypadkach obserwuje się śladowe ilości form dimerycznych. Stosując rozdział w buforze TBM (bufor zawierający 10 mM MgCl₂) obserwowano zwiększoną ilość form dimerycznych OxyS RNA, niezależnie od stosowanego buforu do fałdowania oraz samej procedury fałdowania.

2.4. Przygotowanie mikromacierzy dedykowanych badaniu struktury OxyS RNA

Przygotowanie mikromacierzy przeznaczonych do badania struktury OxyS RNA poprzedzono selekcją odpowiednich sond spośród wszystkich znajdujących się w bibliotece izoenergetycznej. Wyboru dokonywano analogicznie jak w przypadku DsrA RNA, czyli korzystając z pomocy programu RNAstructure i dostępnej w nim funkcji „*OligoWalk*”. Uzyskano 108 sekwencji pentamerów (z których trzy pojawiły się dwukrotnie), na podstawie których wybrano odpowiednie sondy z biblioteki izoenergetycznej. Z wyselekcjonowanej puli dostępnych w bibliotece było 89 sond. Sondy komplementarne do dwóch różnych miejsc w cząsteczce to oligonukleotydy 3, 514 i 566. Dla rejonów między 21 a 23 oraz 66 i 74 resztą nukleotydową nie dysponowano sondami, dlatego podobnie jak w przypadku DsrA RNA, również dla OxyS RNA zdecydowano się zsyntetyzować kilka dłuższych heptamerowych sond komplementarnych do wymienionych rejonów. W czasie ich projektowania starano się, aby wartości energii swobodnej tworzonych dupleksów hybrydyzacyjnych wynosiły około -10 kcal/mol. Zestawienie użytych sond oraz wartości przewidzianej energii swobodnej tworzonych dupleksów hybrydyzacyjnych przedstawiono w tabeli 14. Cyfry w kolumnie „pozycja w OxyS RNA” oznaczają resztę nukleotydową, na którą przypada środek komplementarnej sondy penta- lub heptamerowej. W tabeli 14 przedstawiono wartości energii swobodnej dupleksów niemodyfikowanych RNA/RNA przewidywane za pomocą funkcji „*fold RNA bimolecular*” w programie RNAstructure, a także wartości energii swobodnej dupleksów modyfikowana sonda/RNA obliczone na podstawie parametrów najbliższego sąsiedztwa ustalonych w Pracowni Chemii RNA. Obliczenia prowadzono według wzoru podanego w rozdziale II.1.5. (Część Literaturowa).

Tabela 14. Zestawienie izoenergetycznych sond stosowanych do badań mikromacierzowych OxyS RNA.

pozycja w OxyS RNA	nazwa sondy	sekwencja penta lub heptameru	sekwencja modyfikowanej sondy	nukleotyd parujący się z dodatkowym 3'G	przewidziane dG (kcal/mol) dla komplementarnego dupletu RNA-RNA	przewidziane dG (kcal/mol) dla dupletu modyfikowana sonda/RNA w 100 mM NaCl
3		GUUUC	brak		-2,3	
4		CGUUU	brak		-1,8	
5	368	CCGUU	CCGUUG	A	-4,2	-9,1
6	860	UCCGU	UCCGUG	A	-5,2	-9,1
7	471	CUCCG	CUCCGG	A	-6,1	-10,3
8	630	GCUCC	GCUCC		-7,1	-9,6
9	414	CGCUC	CGCUCG	G	-6,2	-10,4
10	360	CCGCU	CCGCU		-6,6	-9,9
11	602	GCCGC	GCCGC		-8,4	-9,4
12	919	UGCCG	UGCCG		-6,6	-9,8
13	742	GUGCC	GUGCC		-6,9	-9,4
14	698	GGUGC	GGUGC		-6,9	-9,7
15	175	AGGUG	AGGUGG	G	-5,1	-9,5
16	556	GAGGU	GDGGUG	C	-5,4	-11,2
17	139	AGAGG	DGDGG		-5,3	-9,7
18	35	AAGAG	DDGDGG	C	-2,9	-13,0
19	9	AAAGA	DDDAG	C	-1,2	-10,2
20	3	AAAAG	DDDDGG	U	-0,2	-8,1
21	21-7	UUAAAAG	UUDDDDG		-2,4	-9,7
22	22-7	GUUAAAA	GUUDDDD		-2,5	-9,8
23	23-7	GGUAAAA	GGUDDDA		-4,9	-10,9
24	701	GGUUA	GGUUDG	U	-3,1	-8,8
25	688	GGGUU	GGGUUG	U	-5,1	-9,6
26	172	AGGGU	AGGGUG	A	-5,8	-10,4
27	43	AAGGG	DDGGG		-5,0	-9,5
28	267	CAAGG	CDDGGG	C	-4,3	-12,3
29	835	UCAAG	UCDDGG	C	-2,9	-11,6
30		UUCAA	brak		-1,2	
31	501	CUUCA	CUUCDG	U	-2,9	-8,2
32	126	ACUUC	DCUUCG	U	-3,0	-7,9
33		GACUU	brak		-3,0	
34	904	UGACU	UGDCUG	A	-3,7	-8,0
35	738	GUGAC	GUGDCG	A	-4,8	-9,2
36	185	AGUGA	DGUGDG	G	-3,7	-10,1
37	303	CAGUG	CDGUGG	U	-4,4	-9,2
38	588	GCAGU	GCDGUG	C	-5,2	-11,9
39	659	GGCAG	GGCDGG	A	-6,8	-9,6
40	677	GGGCA	GGGCA		-7,5	-10,1
41	426	CGGGC	CGGGC		-8,3	-9,3
42	107	ACGGG	DCGGG		-6,6	-9,4
43	27	AACGG	DDCGGG	C	-4,2	-12,2
44	7	AAACG	DDDCGG	C	-1,8	-11,4
45	514	GAAAC	GDDDCG	C	-2,3	-10,2
46	385	CGAAA	CGDDDG	G	-2,0	-9,1
47	865	UCGAA	UCGDAG	U	-3,0	-8,5
48	473	CUCGA	CUCGDG	U	-4,7	-9,9
49	887	UCUCG	UCUCGG	U	-4,7	-9,4
50	478	CUCUC	CUCUCG	C	-4,9	-11,5
51	120	ACUCU	DCUCUG	G	-3,7	-9,1
52	30	AACUC	DDCUCG	A	-3,0	-8,9
53	8	AAACU	DDDCUG	G	-1,0	-6,9
54	514	GAAAC	GDDDCG	A	-2,3	-8,1
55	129	AGAAA	DGDDDG	G	-1,2	-9,0
56	545	GAGAA	GDGDDG	U	-3,2	-9,5

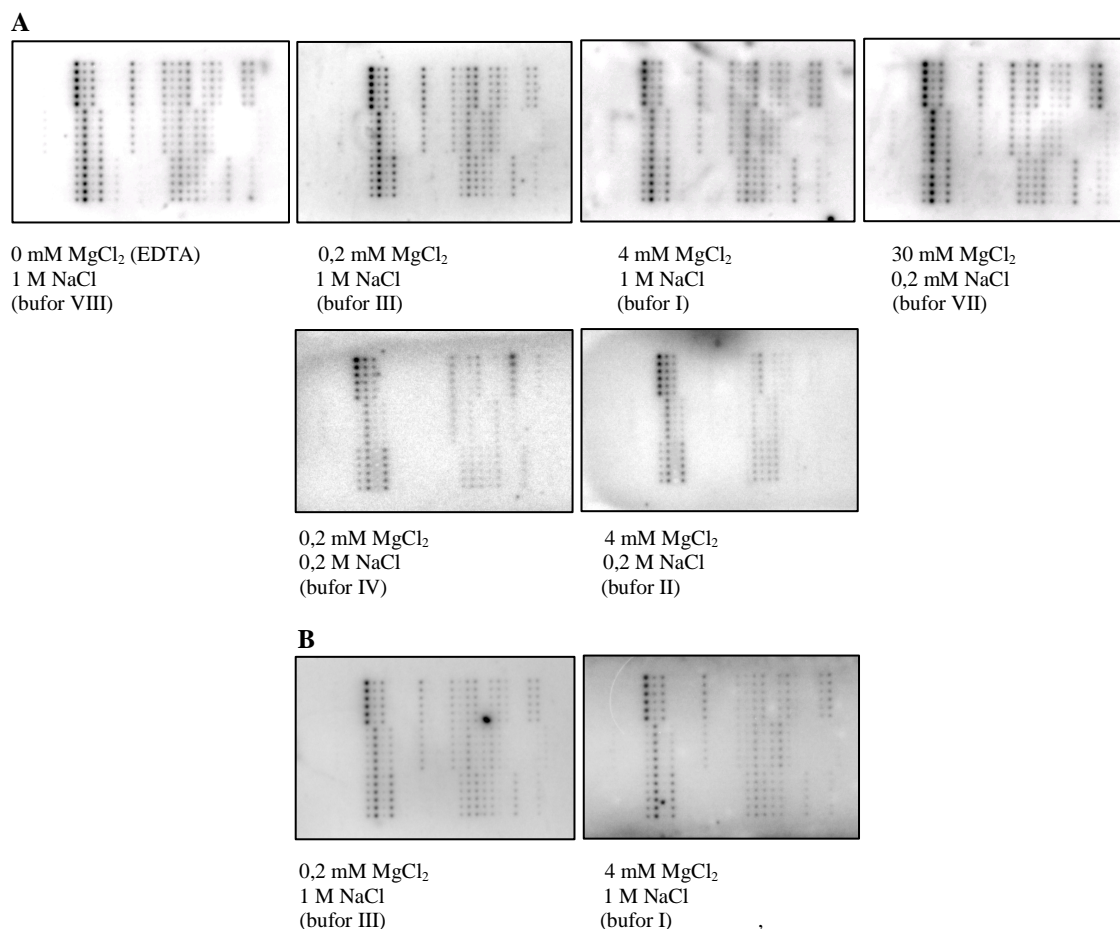
57	905	UGAGA	UGDGDG	U	-3,9	-10,1
58	995	UUGAG	UUGDGG	U	-2,9	-8,9
59	761	GUUGA	GUUGDG	C	-3,0	-10,8
60	191	AGUUG	DGUUGG	U	-2,7	-8,6
61		GAGUU	brak		-3,0	
62	396	CGAGU	CGDGUG	A	-4,5	-9,2
63	869	UCGAG	UCGDGG		-4,7	-9,8
64	985	UUCGA	UUCGDG	C	-3,0	-11,0
65	247	AUUCG	DUUCGG	U	-2,2	-8,1
66	66-7	UUAUUCG	UUDUUCG		-4,4	-9,9
67		UUAUU	brak		0,9	
68	68-7	AGUUAUU	DGUUDUU		-3,4	-10,2
69	69-7	UAGUUAU	UDGUUDU		-3,8	-10,3
70	70-7	UUAGUUA	UUDGUUD		-3,6	-10,0
71	71-7	UUUAGUU	UUUDGUU		-3,2	-8,9
72	72-7	CUUUAGU	CUUUAGU		-4,9	-9,7
73	73-7	GCUUUAG	GCUUUDG		-6,6	-11,8
74	74-7	GGCUUUA	GGCUUUA		-7,3	-11,6
75	672	GGCUU	GGCUUG	A	-5,1	-9,1
76	936	UGGCU	UGGCUG	A	-5,8	-10,7
77	1002	UUGGC	UUGGCG	A	-5,1	-9,4
78	763	GUUGG	GUUGGG	G	-4,4	-9,1
79	447	CGUUG	CGUUGG	C	-3,5	-11,6
80	112	ACGUU	DCGUUG	C	-2,6	-10,6
81	284	CACGU	CDCGUG	A	-4,3	-8,5
82	839	UCACG	UCDCGG	A	-4,5	-9,1
83	978	UUCAC	UUCDCG	C	-3,0	-10,3
84	757	GUUCA	GUUCDG	G	-3,0	-8,2
85	190	AGUUC	DGUUCG	U	-3,0	-8,5
86		AAGUU	brak		-1,0	
87	12	AAAGU	DDDGUG	A	-1,0	-7,4
88	3	AAAAG	DDDDGG	A	-0,2	-8,1
89	257	CAAAA	CDDDDG	C	-0,2	-9,4
90	577	GCAAA	GCDDDG	U	-2,7	-9,1
91	401	CGCAA	CGCDDG	U	-4,2	-9,9
92	357	CCGCA	CCGCA		-6,6	-9,6
93	858	UCCGC	UCCGC		-6,9	-9,6
94	215	AUCCG	AUCCGG	G	-4,6	-8,7
95	566	GAUCC	GDUCCG	C	-5,1	-10,7
96	142	AGAUC	DGDUCG	G	-3,4	-9,6
97	548	GAGAU	GDGDUG	G	-3,4	-9,5
98	649	GGAGA	GGDGAG	A	-5,6	-10,7
99	931	UGGAG	UGGDGG	U	-5,3	-10,3
100	489	CUGGA	CUGGDG	C	-5,3	-12,5
101	379	CCUGG	CCUGG		-6,7	-9,6
102	863	UCCUG	UCCUGG	C	-5,3	-13,0
103	216	AUCCU	DUCCUG	C	-3,8	-11,8
104	566	GAUCC	GDUCCG	A	-5,1	-8,6
105	654	GGAUC	GGDUCCG	G	-5,1	-9,6
106	420	CGGAU	CGGDUG	G	-4,6	-10,2
107	617	GCGGA	GCGGA		-6,9	-9,8
108	155	AGCGG	AGCGG		-6,6	-9,2

Czerwonym kolorem oznaczono reszty nukleotydowe typu LNA, czarnym 2'-O-metylowane a niebieskim dodatkową resztę LNA G. Literą D oznaczono 2,6-diaminopurynorybozyd.

2.5. Mapowanie mikromacierzowe OxyS RNA

2.5.1. Analiza struktury drugorzędowej OxyS RNA z wykorzystaniem izoenergetycznych mikromacierzy

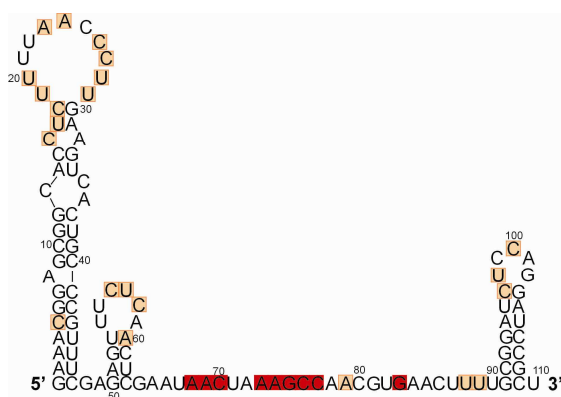
Na podstawie analiz elektroforetycznych w warunkach niedenaturujących można sądzić, że OxyS RNA jest cząsteczką, dla której siła jonowa buforu nie wpływa w sposób istotny na strukturę drugorzędową. Pomimo tych obserwacji, ze względu na zastosowanie nowatorskiego podejścia do badania struktury drugorzędowej, postanowiono jednak przeprowadzić hybrydyzacje OxyS RNA do mikromacierzy w różnych warunkach buforowych i w dwóch różnych temperaturach (4 i 22°C). Zastosowano bufony różniące się stężeniem chlorku magnezu, które wynosiło 0, 0,2, 4 lub 30 mM oraz chlorku sodu, którego stężenie wynosiło 0,2 lub 1 M. Na podstawie doświadczeń z cząsteczką DsrA RNA zastosowano 1-minutową procedurę płukania mikromacierzy po hybrydyzacji. Na rysunku 36 przedstawiono kilka przykładowych wyników hybrydyzacji.



Rysunek 36. Wybrane wyniki hybrydyzacji OxyS RNA w różnych warunkach buforowych w temperaturze (A) 4°C oraz (B) 22°C, czas płukania 1 minuta. Macierz drukowana była w następującym układzie: 1 kolumna, 3 sondy w rzędzie, każda sonda po 6 powtórzeń.

Na podstawie przeprowadzonych hybrydyzacji można stwierdzić, że zastosowanie różnych warunków buforowych nie wpływa znacząco na profil hybrydyzacji. Jakkolwiek można wysnuć podobne wnioski jak w przypadku DsrA RNA, że im wyższa siła jonowa tym wszystkie sygnały są intensywniejsze. Wraz ze spadkiem siły jonowej buforu oraz podwyższaniem temperatury intensywność sygnałów proporcjonalnie spada.

Wyniki przeprowadzonych eksperymentów mikromacierzowych uzyskane na podstawie wielu powtórzeń w różnych warunkach buforowych uśredniono i zestawiono w tabeli 16. Łatwo zaobserwować, że badana cząsteczka posiada strukturę zdecydowanie bardziej dostępną dla sond niż opisana wcześniej DsrA RNA. Niestety, w przypadku OxyS RNA pojawił się problem, którego nie było podczas interpretacji wyników hybrydyzacji dla DsrA RNA. W przypadku OxyS RNA okazało się, że wiele sond wiążących się do niej, poza właściwymi miejscami hybrydyzacji może posiadać kilka alternatywnych miejsc wiązania. Dla wielu z tych miejsc wyliczone wartości energii swobodnej wskazują, że energia swobodna takiego nie w pełni komplementarnego duplexu jest wystarczająca, aby można go zaobserwować. Na podstawie wcześniejszych eksperymentów z 5S rRNA z *E. coli* oraz DsrA RNA stwierdzono, że duplexy hybrydyzacyjne (komplementarne i „alternatywne”) cechujące się energią swobodną korzystniejszą od -6 kcal/mol, a w niektórych przypadkach nawet -4 kcal/mol, są wystarczająco trwałe, aby ich tworzenie obserwować podczas hybrydyzacji. Miejsca hybrydyzacji OxyS RNA do mikromacierzy izoenergetycznych zaznaczono na strukturze na rysunku 37. Pomimo wielu możliwych alternatywnych miejsc wiązania przeprowadzone eksperymenty mapowania mikromacierzowego pozwalają potwierdzić część wcześniejszych doniesień literaturowych dotyczących struktury drugorzędowej OxyS RNA (97). Zarówno w rejonie trzonu spinki I, jak i III nie zaobserwowano żadnych wiązań sond, co potwierdza ich dwuniciową naturę. Z kolei długi rejon postulowany wcześniej, jako jednoniciowy rzeczywiście jest bardzo dostępny dla sond podczas hybrydyzacji. Chcąc wykluczyć lub potwierdzić istnienie proponowanych alternatywnych miejsc wiązania, a tym samym dowiedzieć się więcej o dostępności dla sond, a więc i strukturze drugorzędowej OxyS RNA postanowiono przeprowadzić dodatkowe eksperymenty.



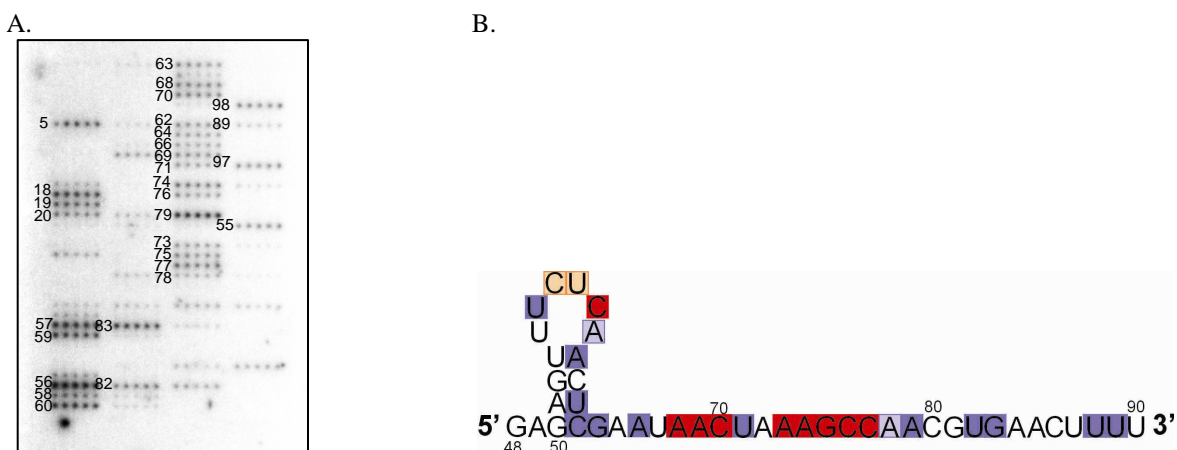
Rysunek 37. Proponowana struktura OxyS RNA z zaznaczonymi miejscami hybrydyzacji. Kolorem czerwonym zaznaczono pozycje dostępne, dla których wykluczono alternatywne miejsca wiązania, kolorem pomarańczowym zaznaczono te, dla których istnieje prawdopodobieństwo wiązania się sond w alternatywnym miejscu.

2.5.2. Mikromacierzowe mapowanie modelowego rejonu środkowego OxyS RNA

Przeprowadzone mapowanie OxyS RNA nie pozostawia wątpliwości, że cząsteczka ta w środkowej części (rejon 48-90 nukleotydu) posiada mało stabilną termodynamicznie strukturę drugorzędową. Zdecydowano się jednak na przeprowadzenie mapowania tego fragmentu, aby wykluczyć część alternatywnych miejsc wiązania. Chcąc poszerzyć informacje na temat struktury tej cząsteczki jej 43 nukleotydowy środkowy fragment zsyntetyzowano chemicznie (Materiały i Metody). Wyznakowany na końcu 5' izotopem ^{32}P RNA hybrydyzowano do mikromacierzy zaprojektowanej dla pełnej długości OxyS RNA. Hybrydyzacje prowadzono w buforach z 4 mM MgCl_2 i 1 M lub 200 mM NaCl (bufor I i II) oraz w buforze z 1 M NaCl i 0,5 mM Na_2EDTA (bufor VII). Modelowe RNA (rejon środkowy) rozpuszczono w buforze do hybrydyzacji i poddawano fałdowaniu, tak samo jak w przypadku OxyS RNA o pełnej długości, po czym przeprowadzano hybrydyzacje.

Uzyskane wyniki zestawiono w tabeli 16. Pokazują one, że izolowany fragment środkowy jest jeszcze bardziej dostępny dla sond niż wówczas, gdy występuje on w cząsteczce o pełnej długości (Rysunek 38). Najprawdopodobniej wobec braku spinki I i III ulega on niemalże całkowitemu rozfałdowaniu; albo też istniejąca struktura jest na tyle nie stabilna termodynamicznie, że zostaje zmieniona przez komplementarne sondy podczas hybrydyzacji. Jakkolwiek cel przeprowadzenia eksperymentu nie został w pełni osiągnięty to udało się wykluczyć, dla sond posiadających kilka możliwych alternatywnych miejsc wiązania, niektóre z nich. I tak, na przykład, obserwowano wiązanie się modelowego 43-meru z sondą komplementarną do pozycji 5. Pozycji 5 nie ma w badanym modelowym fragmencie, zatem wiązanie odpowiedniej sondy (komplementarnej do pozycji 5) następuje w którymś z nie w pełni komplementarnych miejsc (tabela 16). Sugeruje to, że analogiczna sytuacja ma

miejsce w OxyS RNA o pełnej długości. Podobnie jest z sondami przypisanym pozycjom 18 i 19. Dla sondy dedykowanej pozycjom 20 lub 88 wykluczono alternatywne miejsca 27/28 i 16, gdyż nie występują one w badanym fragmencie, ponadto w przypadku tej sondy, w modelowym fragmencie OxyS RNA, jedyne możliwe miejsce wiązania to pozycja 88. Z kolei sonda komplementarna do pozycji 97 musi być wiązana w alternatywnym miejscu 56/57.



Rysunek 38. (A) Obraz hybrydyzacji fragmentu środkowego (rejon 48-90 nukleotydu) OxyS RNA w buforze I. (B) Fragment środkowy OxyS RNA z zaznaczonymi miejscami hybrydyzacji. Kolorem czerwonym zaznaczono pozycje dostępne w przypadku, których wykluczono alternatywne miejsca wiązania i które były również dostępne w cząsteczce pełnej długości, kolorem pomarańczowym zaznaczono te, dla których istnieje prawdopodobieństwo wiązania się sond w alternatywnym miejscu i również były dostępne w całej OxyS RNA. Kolorem ciemnoniebieskim zaznaczono miejsca o zwiększonej intensywności sygnału lub dodatkowe miejsca hybrydyzacji, w stosunku do OxyS RNA o pełnej długości i nie posiadające alternatywnych miejsc wiązania, a jasnoniebieskim miejsca również o zwiększonej intensywności lub dodatkowe w stosunku do OxyS RNA, ale posiadające alternatywne miejsca wiązania.

2.5.3. Mikromacierzowe mapowanie kompleksu OxyS RNA z modyfikowanymi oligonukleotydami

Celem mapowanie OxyS RNA w kompleksie z przyłączonymi modyfikowanymi oligonukleotydami było zasłonięcie pewnych fragmentów OxyS RNA i sprawdzenie jak wpłynie to na profil hybrydyzacji do mikromacierzy izoenergetycznych. Eksperymenty te zdecydowano się przeprowadzić z dwóch powodów. Po pierwsze, aby wykluczyć alternatywne miejsca wiązania i po drugie, aby upewnić się, czy długi rejon pomiędzy spinką II a III rzeczywiście jest jednoniciowy a spinka II wygląda tak, jak jest to proponowane w literaturze (97).

Zaprojektowano trzy oligonukleotydy o1, o2 i o3 (tabela 15), aby zwiększyć trwałość termodynamiczną tworzonych przez nie kompleksów z OxyS RNA zbudowano je z 2'-O-metylowanych reszt nukleotydowych wstawiając dodatkowo w niektóre pozycje nukleotydy

typu LNA. Dzięki tym modyfikacją udało się uzyskać stosunkowo wysoką trwałość termodynamiczną tworzonych dupleksów.

Tabela 15. Zestawienie modyfikowanych oligonukleotydów użytych do mikromacierzowego badania struktury OxyS RNA.

nazwa oligonukleotydu	rejon komplementarny w OxyS RNA	sekwencja	przewidziane dG (kcal/mol) dla dupleksu modyfikowana sonda/RNA w 100 mM NaCl
o1	54-64	CGD <u>G</u> UUGD <u>G</u> DD	-21,6
o2	65-80	GUUGGC <u>U</u> UD <u>G</u> UUD <u>U</u>	-27,7
o3	81-91	G <u>D</u> DD <u>C</u> UUG <u>C</u> UUD <u>D</u> GC	-19,6

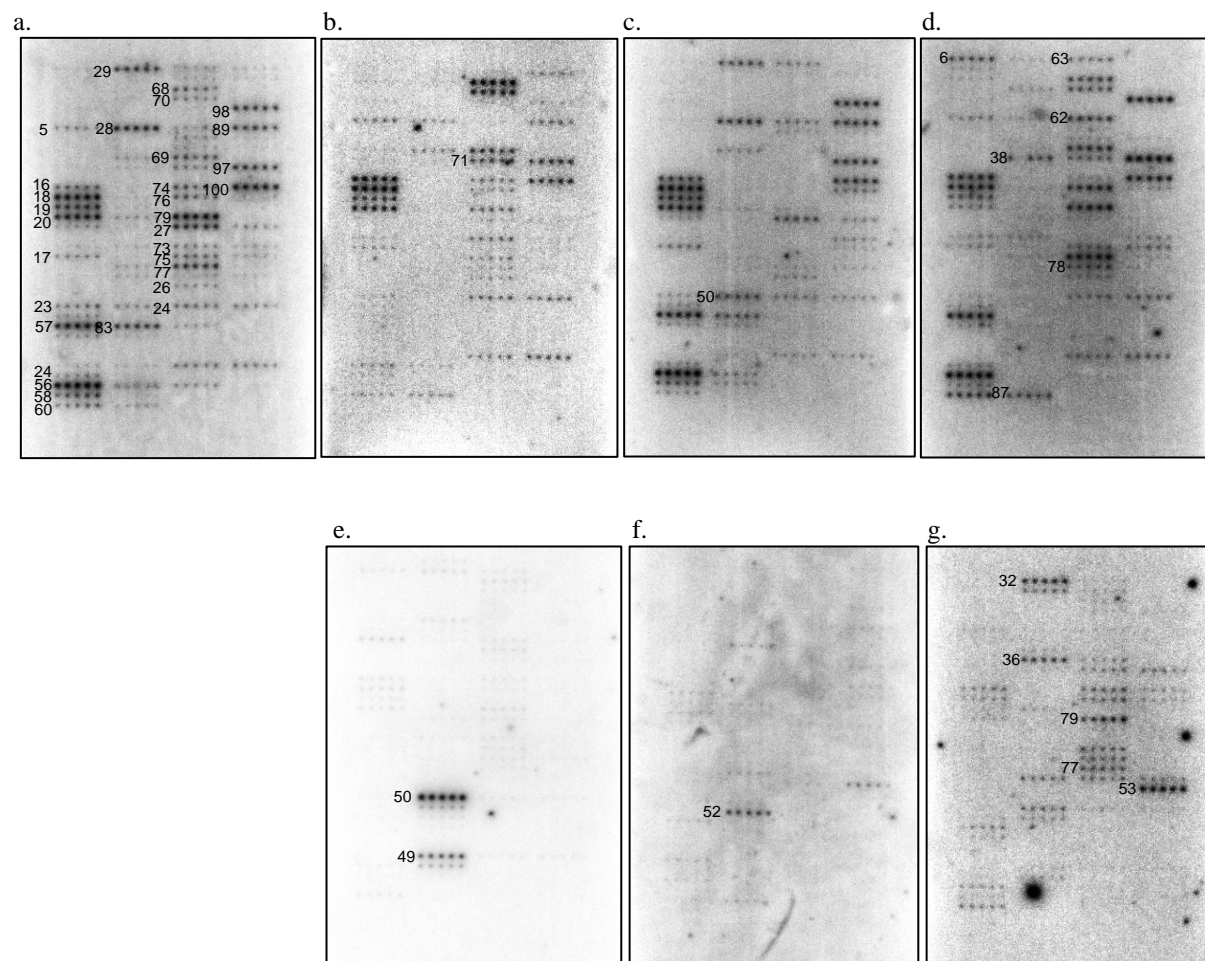
Kolorem czarnym oznaczono reszty 2'-O-metylowane, czerwonym reszty nukleotydowe typu LNA, literą D oznaczono 2,6-diaminopurynorybozyd

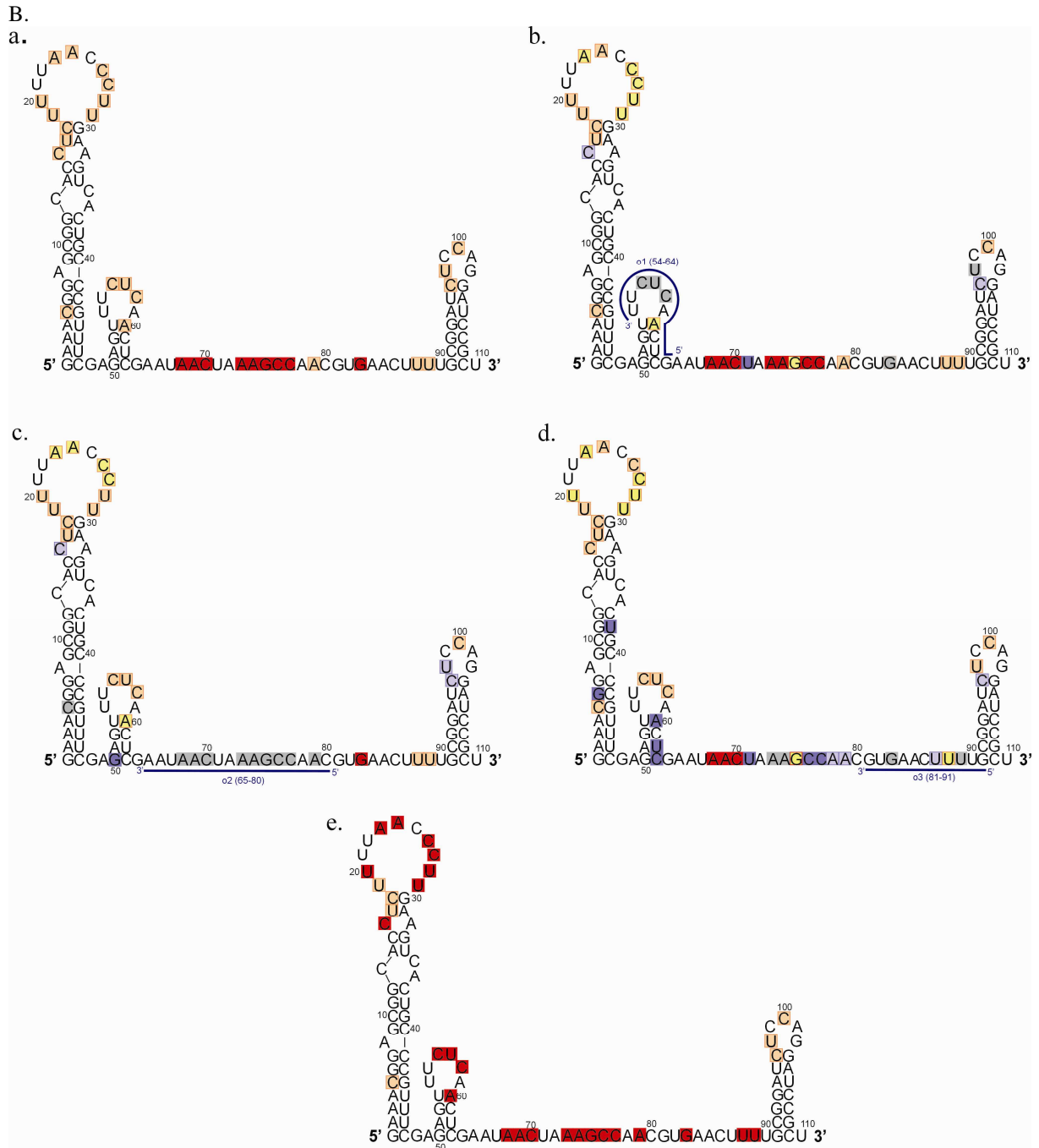
Eksperymenty przeprowadzono w buforze z 1 M NaCl i 4 mM MgCl₂ (bufor I). Stosowano 50-krotny molowy nadmiar oligonukleotydu w stosunku do OxyS RNA. Przetestowano dwa rodzaje procedur przygotowania próbki do hybrydyzacji. W pierwszej, RNA poddawano fałdowaniu w buforze hybrydyzacyjnym, po czym dodawano oligomer i inkubowano 20 minut w temperaturze pokojowej. W drugiej, w buforze hybrydyzacyjnym rozpuszczano RNA wraz z oligomerem i całą mieszaninę poddawano denaturacji i renaturacji. Niezależnie od zastosowanego podejścia uzyskiwano porównywalny profil sygnałów na mikromacierzy. Każdorazowo przeprowadzono hybrydyzację kontrolną traktowaną identycznie jak eksperyment właściwy, przy czym do mieszaniny reakcyjnej dodawano tylko OxyS RNA.

Zdecydowano się też przeprowadzić dodatkowe eksperymenty kontrolne, w których hybrydyzowano do mikromacierzy same oligonukleotydy. Choć nie ma takich danych literaturowych można się spodziewać, że modyfikowany oligonukleotyd i modyfikowana sonda mogą tworzyć bardzo stabilne dupleksy; nawet, jeśli są komplementarne do siebie na długości zaledwie trzech par zasad. Eksperymenty przeprowadzono, pomimo iż mało prawdopodobne wydaje się, aby oligonukleotyd, który teoretycznie może wiązać się do wielu sond a w roztworze hybrydyzacyjnym jest w nadmiarze w stosunku do OxyS RNA, mógł wysycić wszystkie cząsteczki sond i uczynić je niedostępnymi dla kompleksu OxyS RNA/oligonukleotyd. Każdy z trzech oligonukleotydów znakowano izotopem ³²P na końcu 5' i poddano hybrydyzacji do mikromacierzy dedykowanej cząsteczce OxyS RNA. Wyniki tych eksperymentów przedstawiono na rysunku 39 oraz w tabeli 17. Na przykładzie o3, który wykazuje powinowactwo do wielu sond widać, że nawet w przypadku sond do których wiąże

się on silnie np. sondy dla pozycji w OxyS RNA 77 czy 79, wciąż pozostają one dostępne dla kompleksu OxyS RNA/o3 na tyle, aby również on mógł się silnie związać. W przypadku DsrA RNA i oligonukleotydu d1 nie było możliwości zaobserwowania takiej sytuacji. Dzięki przeprowadzonym doświadczeniom, na przykładzie oligonukleotydu o3, można stwierdzić, że każda sonda na mikromacierzy jest w na tyle dużym nadmiarze, że dodanie dodatkowego czynnika oddziałującego z sondami, w stężeniu co najmniej do 0,3 μM (wyższych stężeń nie badano) nie zaburza obrazu hybrydyzacji cząsteczki badanej.

A.





Rysunek 39. (A) Wynik hybrydyzacji: (a) OxyS RNA, (b) kompleks OxyS RNA/o1, (c) kompleks OxyS RNA/o2, (d) kompleks OxyS RNA/o3, (e) oligonukleotyd o1, (f) oligonukleotyd o2, (g) oligonukleotyd o3. (B) Struktura OxyS RNA z zaznaczonymi miejscami hybrydyzacji dla: (a) OxyS RNA, (b) kompleksu OxyS RNA/o1, (c) kompleksu OxyS RNA/o2, (d) kompleksu OxyS RNA/o3, (e) OxyS RNA z wykluczonymi alternatywnymi miejscami wiązania. Granatową linią przedstawiono schematycznie zhybrydyzowany oligonukleotyd. Kolorem czerwonym zaznaczono pozycje dostępne jednocześnie w reakcji kontrolnej (sam OxyS RNA) oraz w reakcji z kompleksem OxyS RNA/oligonukleotyd, w przypadku, których wykluczono alternatywne miejsca. Kolorem pomarańczowym zaznaczono te pozycje, dla których istnieje prawdopodobieństwo wiązania się sond w alternatywnym miejscu i również były dostępne zarówno w kontroli jak i w kompleksach. Kolorem ciemnoniebieskim zaznaczono dodatkowe miejsca hybrydyzacji obserwowane tylko dla kompleksów i nieposiadające alternatywnych miejsc wiązania, a jasnoniebieskim również dodatkowe miejsca, ale posiadające alternatywne miejsca wiązania. Żółtym kolorem zaznaczono pozycje o obniżonej intensywności sygnału w stosunku do kontroli, a szarym brak sygnału.

III. WYNIKI I DyskusJA

Tabela 16. Uśrednione wyniki hybrydyzacji OxyS RNA, rejonu środkowego OxyS RNA oraz kompleksów OxyS RNA/o1, OxyS RNA/o2 i OxyS RNA/o3.

pozycja w OxyS	nazwa sondy	sekwencja penta- lub heptameru	sekwencja modyfiko-wanej sondy	nukleotydy parujące się z dodatkowym 3'G	przewidziane dG (kcal/mol) dla kompleksu wiązania RNA-RNA	przewidziane dG (kcal/mol) dla wiązania modyfikowana sonda-RNA, 100 mM NaCl	uśrednione wyniki hybrydyzacji dla OxyS RNA	uśrednione wyniki hybrydyzacji dla fragmentu 48-90 OxyS RNA	dla kompleksu OxyS RNA/o1	dla kompleksu OxyS RNA/o2	dla kompleksu OxyS RNA/o3	alternatywne miejsce wiązania	przewidziane dG (kcal/mol) dla alternatywnego wiązania RNA-RNA	przewidziane dG (kcal/mol) dla alternatywnego wiązania modyfikowana sonda-RNA, 100 mM NaCl
5	368	CCGUU	CCGUUG	A	-4,2	-9,1	m	m	m		m	79 59/60 68/69 23/24 75	-4,8 -2,6 -1,2 -0,8 -0,7	-7,1 -4,3 -2,3 -2,3 -2,3
6	860	UCCGU	UCCGUG	A	-5,2	-9,1					s	-		
16	556	GAGGU	GDGGUG	C	-5,4	-11,2	m		s	s	s	97 27/28 56/57 76 25 62	-4,8 -3,8 -3,7 -3,6 -3,3 -3,1	-9,0 -4,1 -4,8 -3,5 -3,5 -2,6
17	139	AGAGG	DGDGG		-5,3	-9,7	m	w	m	m	m	62 56/57 27/28 97/98 88,20	-3,7 -3,3 -3,1 -2,7 -1,2	-3,2 -5,3 -4,6 -5,3 -4,5
18	35	AAGAG	DDGDGG	C	-2,9	-13,0	s	s	s	s	s	56/57 27/28 97/98 88,20 55	-3,3 -3,1 -2,7 -2,6 -1,4	-4,7 -5,9 -4,7 -7,3 -6,7
19	9	AAAGA	DDDGAG	C	-1,2	-10,2	s	m	s	s	s	57 20,88 98 56 28 97	-2,2 -1,9 -1,5 -1,1 -1,0 -0,9	-3,0 -5,7 -3,0 -4,0 -1,8 -4,0
20	3	AAAAG	DDDDGG	U	-0,2	-8,1	s	m	s	s	m	27/28 16	-3,1 -2,0	-6,7 -4,6
23	23-7	GGUAAAA	GGUDDA		-4,9	-10,9	m		w	w	w	75/76 69	-4,5 -2,9	-4,1 -5,7
24	701	GGUUA	GGUUDG	U	-3,1	-8,8	m	w	m	w	m	75/76 69	-4,5 -2,9	-4,2 -7,4
25	688	GGGUU	GGGUUG	U	-5,1	-9,6	w		w	w	w			
26	172	AGGGU	AGGGUG	A	-5,8	-10,4	m		w	w	m	76	-3,6	-4,5

III. WYNIKI I DYSKUSJA

27	43	AAGGG	DDGGG		-5,0	-9,5	s		m	m	w	16 18 57	-3,1 -2,4 -1,3	-4,9 -7,6 -2,3	
28	267	CAAGG	CDDGGG	C	-4,3	-12,3	s		m	s	w	16 88/89 18 57	-3,1 -3,0 -2,9 -1,3	-5,1 -7,7 -8,2 -3,0	
29	835	UCAAG	UCDDGG	C	-2,9	-11,6	m		w	m	w	16 83 19 89/90	-2,0 -1,0 -0,5 -0,5	-4,6 -2,0 -3,7 -5,3	
36	185	AGUGA	DGUGDG	G	-3,7	-10,1	w	w	w	w	w				
38	588	GCAGU	GCDGUG	C	-5,2	-11,9					m	-			
43	27	AACGG	DDCGGG	C	-4,2	-12,2	w								
45	514	GAAAC	GDDDCG	C	-2,3	-10,2	w	w							
46	385	CGAAA	CGDDDG	G	-2,0	-9,1	w	w							
50	478	CUCUC	CUCUCG	C	-4,9	-11,5	w	w		m		-			
54	514	GAAAC	GDDDCG	A	-2,3	-8,1	w	w							
55	129	AGAAA	DGDDDG	G	-1,2	-9,0	w	m			w	w	20,88 18 97	-1,7 -0,5 -0,3	-6,6 -3,2 -3,2
56	545	GAGAA	GDGDDG	U	-3,2	-9,5	s	s			s	s	97/98 17 20,88 18/19 54/55 28	-3,9 -3,1 -2,0 -1,8 -1,7 -1,0	-6,4 -2,7 -8,3 -4,7 -3,9 -2,7
57	905	UGAGA	UGDGDG	U	-3,9	-10,1	s	s			s	s	18 97 20,88 54/55 28	-4,1 -3,9 -2,6 -1,7 -1,1	-8,3 -7,9 -7,5 -5,4 -1,0
58	995	UUGAG	UUGDGG	U	-2,9	-8,9	m	m			m	m	16/17 28/29 97/98	-5,4 -4,2 -2,5	-7,6 -9,2 -4,7
59	761	GUUGA	GUUGDG	C	-3	-10,8	w	m				w	78/79 63	-4,3 -3,9	-3,6 -7,9
60	191	AGUUG	DGUUGG	U	-2,7	-8,6	m	s	w	w	s		78 69 23	-6,3 -2,6 -1,2	-8,7 -7,5 -4,7
62	396	CGAGU	CGDGUG	A	-4,5	-9,2	w	m		w	s		86/87 98	-2,2 -2,2	-4,6 -2,7
63	869	UCGAG	UCGDGG		-4,7	-9,8	w	m	w	w	m		98	-3,0	-4,2
64	985	UUCGA	UUCGDG	C	-3,0	-11,0		m					83/84	-0,9	-2,9

III. WYNIKI I DYSKUSJA

65	247	AUUCG	DUUCGG	U	-2,2	-8,1		w						
66	66-7	UUAUUCG	UUDUUCG		-4,4	-9,9		m				83/84	-0,4	-2,9
68	68-7	AGUUAUU	DGUUDUU		-3,4	-10,2	m	m	m		m	23/24 79 60/61 75	-1,6 -1,0 -1,0 -0,5	-3,2 -0,2 -3,5 -0,2
69	69-7	UAGUUAU	UDGUUDU		-3,8	-10,3	m	m	m		m	23/24 60/61 79 75 82/83	-1,6 -1,4 -1,0 -0,5 -0,3	-3,9 -3,6 -0,8 -3,6 -2,2
70	70-7	UUAGUUA	UUDGUUD		-3,6	-10,0	m	m	m		m	60/61 23/24 79 75	-1,4 -1,0 -1,0 -0,5	-3,5 -3,1 -0,2 -0,2
71	71-7	UUUAGUU	UUUDGUU		-3,2	-8,9	w	m	m		m	60/61 79 82/83	-0,9 -0,5 -0,3	-3,6 -0,8 -2,4
73	73-7	GCUUUAG	GCUUUDG		-6,6	-11,8	m	m	m		-	-	-	
74	74-7	GGCUUUA	GGCUUUA		-7,3	-11,6	m	m	m		-	-	-	
75	672	GGCUU	GGCUUG	A	-5,1	-9,1	m	m	w		w	-	-	
76	936	UGGCU	UGGCUG	A	-5,8	-10,7	m	m	m		s	100	-2,1	-2,8
77	1002	UUGGC	UUGGCG	A	-5,1	-9,4	m	m	m		s	100/101	-2,7	-3,7
78	763	GUUGG	GUUGGG	G	-4,4	-9,1		m			m	58/59 63 71/72	-6,0 -3,0 -1,8	-9,9 -6,9 -4,2
79	447	CGUUG	CGUUGG	C	-3,5	-11,6	m	s	m		s	59/60 100/101 68/69 23/24	-4,0 -2,3 -1,7 -1,6	-5,8 -5,5 -4,7 -4,7
80	112	ACGUU	DCGUUG	C	-2,6	-10,6	w	w	w		w			
82	839	UCACG	UCDCGG	A	-4,5	-9,1	w	m		w				
83	978	UUCAC	UUCDCG	C	-3,0	-10,3	m	s	-	m		-		
87	12	AAAGU	DDDGUG	A	-1,0	-7,4					m	61	-1,0	-3,1
88	3	AAAAG	DDDDGG	A	-0,2	-8,1	s	m	s	s	m	27/28 46	-3,1 -2,0	-6,7 -4,6
89	257	CAAAA	CDDDDG	C	-0,2	-9,4	m	m	m	m		20,88 29	-1,1 -0,5	-6,6 -1,5
97	548	GAGAU	GDGDUG	G	-3,4	-9,5	m	m	s	s	s	56/57 17 54 18/19 28	-4,8 -3,1 -3,0 -1,6 -1,0	-6,4 -2,7 -7,0 -4,7 -1,0

III. WYNIKI I DYSKUSJA

98	649	GGAGA	GGDGAG	A	-5,6	-10,7	m	m	-	s	s	56/57 18 57 55	-5,0 -4,2 -2,2 -2,2	-6,8 -8,2 -2,3 -6,6
99	931	UGGAG	UGGDGG	U	-5,3	-10,3	w		w	w	w			
100	489	CUGGA	CUGGDG	C	-5,3	-12,5	m		m	m	m	77 17/18 57	-3,1 -2,8 -2,2	-2,8 -6,0 -4,0
101	379	CCUGG	CCUGG		-6,7	-9,6	w				w			

Jako s, m i w zaznaczono sygnały hybrydyzacji odpowiednio o wysokiej, średniej i słabej intensywności. Kolorem zielonym zakreślono najbardziej prawdopodobne alternatywne miejsca wiązania, natomiast szarym mniej prawdopodobne, ale możliwe. Przekreślone alternatywne miejsca wykluczone po przeanalizowaniu wyników badań dla rejonu środkowego oraz kompleksów z oligonukleotydami o1, o2 i o3.

Tabela 17. Wyniki hybrydyzacji oligonukleotydów o1, o2 i o3 do macierzy dedykowanej OxyS RNA.

pozycja w OxyS	nazwa sondy	sekwencja penta- lub heptameru	sekwencja modyfikowanej sondy	wyniki hybrydyzacji dla o1	wyniki hybrydyzacji dla o2	wyniki hybrydyzacji dla o3
15	175	AGGUG	AGGUGG			w
18	35	AAGAG	DDGDGG			m
19	9	AAAGA	DDDGAG			w
20	3	AAAAG	DDDDGG			w
27	43	AAGGG	DDGGG			w
32	126	ACUUC	DCUUCG			s
34	904	UGACU	UGDCUG			w
35	738	GUGAC	GUGDCG			m
36	185	AGUGA	DGUGDG			s
45	514	GAAAC	GDDDCG		w	m
49	887	UCUCG	UCUCGG	m		w
50	478	CUCUC	CUCUCG	s		m
51	120	ACUCU	DCUCUG	w		w
52	30	AACUC	DDCUCG	w	s	w
53	8	AAACU	DDCUCG		w	s
54	514	GAAAC	GDDDCG		w	m
56	545	GAGAA	GDGDDG			m
57	905	UGAGA	UGDGDG			m
58	995	UUGAG	UUGDGG			w
59	761	GUUGA	GUUGDG			w
60	191	AGUUG	DGUUGG			m
64	985	UUCGA	UUCGDG			w
68	68-7	AGUUAUU	DGUUDUU			w
69	69-7	UAGUUAU	UDGUUDU			w
70	70-7	UUAGUUA	UDGUUD			w
71	71-7	UUUAGUU	UUUDGUU			m
72	72-7	CUUUAGU	CUUUAGU			w
73	73-7	GCUUUAG	GCUUUDG			m
74	74-7	GGCUUUA	GGCUUUA			m
75	672	GGCUU	GGCUUG			m
76	936	UGGCU	UGGCUG			w
77	1002	UUGGC	UUGGCG			s
78	763	GUUGG	GUUGGG			m
79	447	CGUUG	CGUUGG			s
88	3	AAAAG	DDDDGG			w
97	548	GAGAU	GDGDUG			m
100	489	CUGGA	CUGGDG			w
102	863	UCCUG	UCCUGG			w
103	216	AUCCU	DUCCUG			w
106	420	CGGAU	CGGDUG			w

Jako s, m i w zaznaczono sygnały hybrydyzacji odpowiednio o wysokiej, średniej i słabej intensywności względem najintensywniejszego sygnału.

Po hybrydyzacji kompleksu OxyS RNA/o1, zgodnie z założeniem nie dostępne dla sond okazały się pozycje zasłonięte przez przyłączony oligonukleotyd (tabela 16). Pozwoliło to stwierdzić, że pozycje 56, 57 i 58 są faktycznymi miejscami wiązania sond w reakcji kontrolnej i wykluczyć wszystkie alternatywne. Ponadto niedostępna dla sondy okazała się pozycja 98, nie zasłonięta przez o1. Sugeruje to, że w OxyS RNA bez przyłączonego oligonukleotydu sygnał od sondy komplementarnej do pozycji 98 w rzeczywistości wynika z jej alternatywnego parowania się z pozycją 56/57. Pozostałe alternatywne miejsca wiązania dla omawianej sondy odrzucono na podstawie porównań eksperymentu kontrolnego (sam OxyS RNA) i eksperymentu z przyłączonym o1 (OxyS RNA/o1). Dla przykładu, odrzucono alternatywną pozycję 18, gdyż zarówno w kontroli, jak i z przyłączonym oligonukleotydem obserwuje się w tej pozycji silne sygnały. Wszystkie wykreślone w tabeli 16 alternatywne miejsca wiązania analizowano właśnie w ten sposób. Nie dostępna okazała się pozycja 83, dla której sonda nie posiada żadnego alternatywnego miejsca wiązania. Mniej dostępne były pozycje 23, 26-29, 60, 75. Natomiast bardziej dostępne 16, 71 i 97. Taki obraz hybrydyzacji może świadczyć, że rejon, z którym hybrydyzował oligonukleotyd o1 był zaangażowany w jakiegoś oddziaływania wyższego rzędu. Zatem przyłączenie o1 mogło spowodować rearanżację struktury, a to przeniosło się na zmianę obrazu hybrydyzacji.

Hybrydyzacja kompleksu OxyS RNA/o2, dzięki zasłonięciu rejonu 65-80 potwierdziła, iż w reakcji kontrolnej dla pozycji 68-77 sygnały pochodziły od komplementarnych wiązań. Wynik taki założono wcześniej ze względu na niekorzystną (powyżej -4 kcal/mol) wartość energii swobodnej dla alternatywnych pozycji. Eksperyment pozwolił również wykluczyć wiązanie się sondy w reakcji kontrolnej w pozycji 5, która stała się niedostępna. Pozwoliło to wywnioskować, że omawiany sygnał pochodził od alternatywnej pozycji 79. Zaobserwowano obniżenie intensywności sygnałów w pozycjach 23, 24, 26, 27 i 60, natomiast podwyższenie w pozycjach 16, 50, 97 i 98.

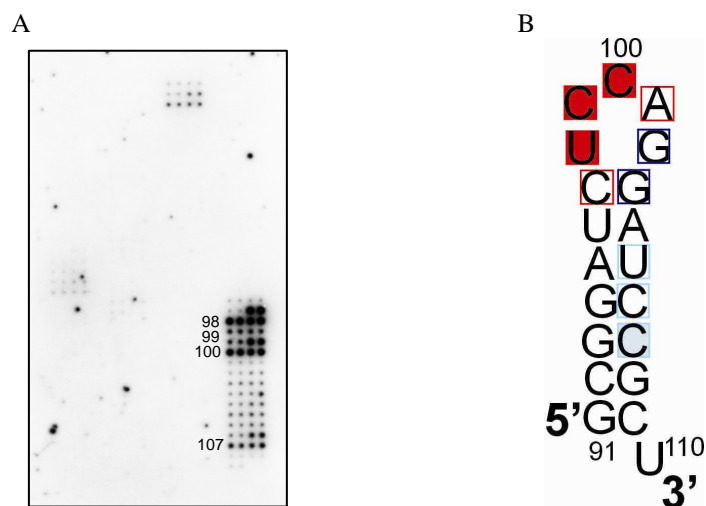
Hybrydyzacja kompleksu OxyS RNA/o3 przyniosła oczekiwane braki sygnału w pozycjach 82, 83 i 89, zasłoniętych przez o3, wykluczając tym samym alternatywne miejsca dla tych pozycji. Brak sygnału zanotowano również w pozycjach 73 i 74, a obniżenie intensywności w pozycjach 20, 23, 27-29, 75 i 88. Obniżenie intensywności dla pozycji 20 i 88 sugeruje, że w reakcji kontrolnej obie pozycje są dostępne a otrzymana wartość intensywności sygnału jest sumą z nich obydwu. Tak więc, zasłonięcie oligonukleotydem o3 pozycji 88 pozwala na uzyskanie sygnału nieco słabszego, bo pochodzącego tylko z wiązania się w pozycji 20. Analogicznie było w przypadku eksperymentu hybrydyzacji rejonu środkowego, gdzie również sygnał dla tej sondy był słabszy gdyż, tym razem odwrotnie,

pochodził on tylko od pozycji 88. Dodatkowe sygnały pojawiły się w pozycjach 6, 38, 78 i 87. Natomiast dla pozycji 60, 62, 63, 71, 76, 77, 79, 97 i 98 intensywność sygnałów wzrosła. Trudno jest wyjaśnić, dlaczego przyłączenie oligonukleotydu w rejonie 81-91 powoduje pojawienie się dostępności w pozycjach 6, 38 i 78. Pojawienie się sygnału dla pozycji 87 może wynikać z alternatywnego wiązania w pozycji 61 (nie istnieje dla niej sonda komplementarna), co byłoby zgodne z tym, że rejon 60-63 staje się bardziej dostępny. Tak duże zmiany w profilu hybrydyzacji świadczą, że przyłączenia oligonukleotydu o3 spowodowało rearanżacje strukturalne w OxyS RNA. To z kolei sugeruje, że rejon uznawany za jednoniciowy jest jednak zaangażowany w jakieś oddziaływanie.

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów hybrydyzacji środkowego fragmentu OxyS RNA oraz trzech kompleksów tej cząsteczki z oligonukleotydami udało się wykluczyć wiele alternatywnych miejsc wiązania sond, w konsekwencji otrzymano profil dostępności dla sond OxyS RNA przedstawiony na rysunku 39 e.

2.5.4. Mapowanie mikromacierzowe modelowej spinki III OxyS RNA

W DsrA RNA stabilna termodynamicznie spinka III wykazywała zgodny z założeniami profil hybrydyzacji (dostępność dla sond tylko w obrębie pętli), gdy stanowiła jeden z motywów strukturalnych kompletnej cząsteczki. Natomiast, gdy poddano hybrydyzacji samą spinkę III, nieoczekiwanie 5'-końcowy fragment trzonu stał się dostępny do hybrydyzacji. OxyS RNA również posiada stabilną terminalną spinkę III z trzonem niedostępnym do hybrydyzacji. Interesujące było sprawdzenie jak będzie się przedstawiał profil hybrydyzacji kolejnej izolowanej spinki, o innym składzie nukleotydowym i innych parametrach termodynamicznych. Zsyntetyzowano chemicznie fragment RNA odpowiadający spince III OxyS RNA; zawierającej reszty nukleotydowe 91-110. Otrzymane RNA wyznakowano na końcu 5' izotopem ^{32}P i przeprowadzono hybrydyzacje do mikromacierzy dedykowanej OxyS RNA. Eksperymenty przeprowadzono w buforach z 4 mM MgCl_2 i 1 M lub 200 mM NaCl (bufor I i II). RNA rozpuszczono w buforze do hybrydyzacji i poddawano fałdowaniu identycznie jak w przypadku OxyS RNA o pełnej długości, po czym przeprowadzano hybrydyzacje.



Rysunek 40. (A) Obraz hybrydyzacji spinki III do mikromacierzy dedykowanej OxyS RNA o pełnej długości. Macierz drukowana w układzie: 4 kolumny, 4 sondy w rzędzie, każda sonda po 6 powtórzeń. (B) Struktura spinki III OxyS RNA. Kolorem czerwonym zaznaczono miejsce hybrydyzacji występujące w tej spince również w cząsteczce OxyS RNA o pełnej długości, kolorem ciemno- i jasnoniebieskim zaznaczono dodatkowe miejsca dostępne w czasie hybrydyzacji izolowanej spinki III, przy czym jasnoniebieskim oznaczono te, w których występuje prawdopodobieństwo wiązania się w alternatywnym miejscu. Pełnym kwadratem oznaczono silne i średniej intensywności sygnały, pustym kwadratem oznaczono słabe sygnały.

W wyniku przeprowadzonych eksperymentów otrzymano silnej i średniej intensywności sygnały w pozycjach 98-100 a zatem w obrębie pętli (tabela 18). Ponadto otrzymano średniej intensywności sygnał dla pozycji 107. Próby znalezienia alternatywnego miejsca wiązania wskazują pozycję 99, jakkolwiek obliczona wartość energii swobodnej dla tej pozycji wynosi zaledwie $-2,9$ kcal/mol. Dodatkowo, słabej intensywności sygnały otrzymano w pozycjach 97, 101-103, 105 i 106, przy czym sygnały dla pozycji 105 i 106 to najprawdopodobniej alternatywne wiązanie w pozycji 99. Zatem hybrydyzacja spinki III OxyS RNA prowadzi do innych wyników niż spinki III DsrA RNA. Tutaj izolowana spinka wykazuje dostępność do hybrydyzacji najprawdopodobniej tylko w obrębie pętli. Dostępność pętli jest nieco większa (pozycje 98-100) niż miało to miejsce w cząsteczce o pełnej długości (tylko pozycja 100), również dla DsrA RNA obserwowano taką zależność.

III. WYNIKI I Dyskusja

Tabela 18. Uśrednione wyniki hybrydyzacji spinki III OxyS RNA.

pozycja w OxyS	nazwa sondy	sekwencja penta- lub heptameru	sekwencja modyfikowanej sondy	nukleotyd parujący się z dodatkowym 3'G	przewidziane dG (kcal/mol) dla komplementarnego wiązania RNA-RNA	przewidziane dG (kcal/mol) dla wiązania modyfikowana sonda-RNA, 100 mM NaCl	wyniki hybrydyzacji spinki III w całej OxyS RNA*	uśrednione wyniki hybrydyzacji spinki III	alternatywne miejsce wiązania	przewidziane dG (kcal/mol) dla alternatywnego wiązania RNA-RNA	przewidziane dG (kcal/mol) dla alternatywnego wiązania modyfikowana sonda-RNA, 100 mM NaCl
18	35	AAGAG	DDGDGG					w	98	-2,9	-4,7
56	545	GAGAA	GDGDDG					w	98	-3,9	-6,4
57	905	UGAGA	UGDGDG					w	98	-3,9	-8,5
97	548	GAGAU	GDGDUG	G	-3,4	-9,5	m (18/19 i/lub 56/57)	w			
98	649	GGAGA	GGDGAG	A	-5,6	-10,7	m (56/57)	s			
99	931	UGGAG	UGGDGG	U	-5,3	-10,3	w	m			
100	489	CUGGA	CUGGDG	C	-5,3	-12,5	m	s			
101	379	CCUGG	CCUGG		-6,7	-9,6	w	w			
102	863	UCCUG	UCCUGG	C	-5,3	-13,0		w			
103	216	AUCCU	DUCCUG	C	-3,8	-11,8		w			
105	654	GGAUC	GGDUCC	G	-5,1	-9,6		w	99	-3,6	-3,2
106	420	CGGAU	CGGDUG	G	-4,6	-10,2		w	99	-3,6	-3,7
107	617	GCGGA	GCGGA		-6,9	-9,8		m	99	-2,9	-2,9

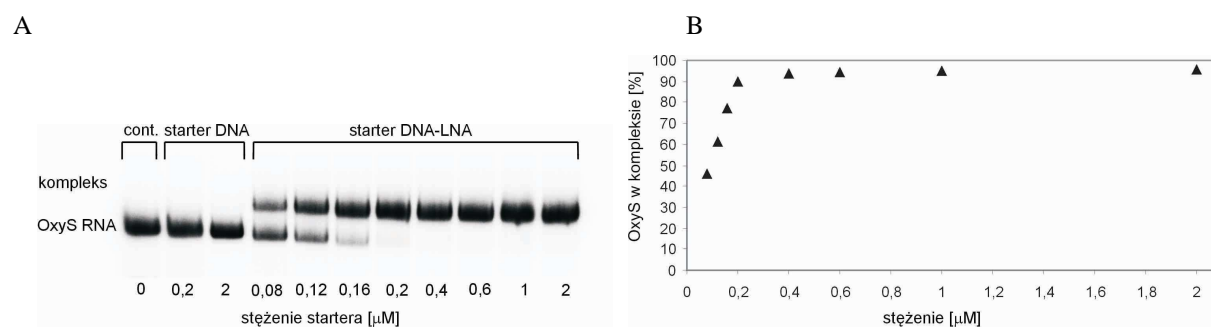
s, m i w - oznaczono sygnały hybrydyzacji odpowiednio o wysokiej, średniej i słabej intensywności. Kolorem zakreślono najbardziej prawdopodobne komplementarne oraz ewentualne alternatywne miejsca wiązania. * - dla porównania podano wyniki hybrydyzacji tej spinki w OxyS RNA o pełnej długości, pozycje podane obok intensywności, oznaczają najbardziej prawdopodobne alternatywne miejsca wiązania.

2.6. Mapowanie chemiczne struktury drugorzędowej OxyS RNA.

2.6.1. Projektowanie i testowanie modyfikowanego startera DNA/LNA

Metoda mikromacierzy izoenergetycznych jest nową metodą badania struktury drugorzędowej RNA, dlatego warto potwierdzić wyniki dzięki niej uzyskane za pomocą dodatkowych eksperymentów, tym bardziej, że struktura drugorzędowa OxyS RNA nie była wcześniej zbyt intensywnie badana. Zdecydowano się więc przeprowadzić mapowanie chemiczne, z wykorzystaniem modyfikacji ketoksalem, 1-cykloheksylo-3-(2-morfolinoetylo)karbodiimidem (CMCT) oraz bezwodnikiem kwasu N-metyloizotidowego (NMIA). Opublikowana struktura OxyS RNA została zaproponowana jedynie na podstawie mapowania chemicznego z użyciem siarczanu dimetylu (DMS). Ponadto, z mapowania uzyskano tylko częściowe informacje, gdyż zastosowano wówczas starter ulokowany powyżej spinki III. Zatem uzyskano obraz mapowania zaledwie około 70 reszt nukleotydowych od końca 5', tracąc tym samym sporą część informacji strukturalnych (97). Można przypuszczać, że użyto starter przesunięty bliżej środka cząsteczki, przed spinę III, gdyż napotkano na problemy podobne do tych, które zostały opisane w niniejszej pracy w przypadku DsrA RNA. Mianowicie, ze względu na wysoką stabilność termodynamiczną terminalnej spinki, niemożliwe było przyłączenie w tym rejonie startera DNA. Po udanych eksperymentach z modyfikowanym starterem DNA/LNA dla DsrA RNA, postanowiono zaprojektować również modyfikowany starter dla OxyS RNA i dzięki temu odczytać więcej informacji o cząsteczce niż udało się to Altuvi i współpracownikom (97). Zaprojektowano dwa startery komplementarne do spinki III (172). Pierwszy z nich (OxyS-3, 5'AGCGGATCCTGGAGATCCGCAA) był starterem DNA, o długości 22 nukleotydów. Natomiast drugi (OxyS-LNA, 5'AGcGgATCcTgGaGaTCCG) był modyfikowanym starterem DNA-LNA o takiej samej sekwencji jak starter DNA, ale skrócony o 3 nukleotydy od końca 3' i zawierał w sześciu pozycjach nukleotydy typu LNA (zaznaczone małymi literami i kolorem czerwonym). Projektując modyfikowany starter starano się uzyskać bardziej korzystną wartość energii swobodnej dla tworzonego przez niego dupleksu z OxyS RNA niż wynosi ona dla spinki III. Podczas projektowania kierowano się pomocniczo takimi samymi parametrami termodynamicznymi jak w przypadku startera DsrA-LNA (rozdział III.1.6.1). Po zsyntetyzowaniu chemicznym starterów sprawdzono ich zdolność przyłączania się do OxyS RNA. W tym celu OxyS RNA inkubowano z starterami o rosnących stężeniach, po czym

przeprowadzono rozdział elektroforetyczny w temperaturze 4°C w warunkach niedenaturujących (Rysunek 41).



Rysunek 41. (A) Analiza tworzenia się kompleksu OxyS RNA/starter DNA-LNA. Rozdział prowadzono w 8% żelu poliakrylamidowym w warunkach natywnych w 4°C. (B) Zależność frakcji związanej w stosunku do stężenia startera, która posłużyła do oznaczenia stałej dysocjacji dupleksu OxyS RNA/starter DNA-LNA.

Przeprowadzony eksperyment potwierdził przypuszczenia, że starter DNA nie jest w stanie stworzyć dupleksu ze stabilnym strukturalnie końcem 3' OxyS RNA. Nawet przy dziesięciokrotnym molowym nadmiarze startera DNA nie otrzymuje się dupleksów z RNA. Zastosowanie startera DNA-LNA również i w tym przypadku zakończyło się sukcesem. Starter ten wiąże się bardzo wydajnie z RNA, ze stałą dysocjacji równą 66 nM. Użycie równomolowych ilości startera w stosunku do RNA skutkuje uzyskaniem niemalże 100% RNA związanego ze starterem DNA-LNA.

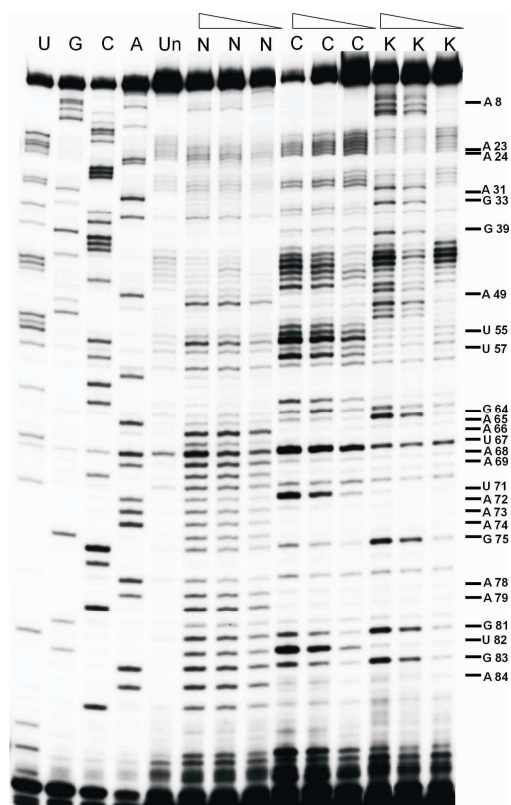
W celu termodynamicznej analizy oddziaływań OxyS RNA/starter DNA-LNA przeprowadzono eksperymenty topnienia UV. Do badań tych wykorzystano zsyntetyzowany chemicznie fragment OxyS RNA reprezentujący spinę III (reszty nukleotydowe 91-110). W celu obniżenia temperatury topnienia do możliwej do zarejestrowania używano bufor o 5 mM stężeniu chlorku sodu. Dla spinii III uzyskano temperaturę topnienia 78,4°C, potwierdzającą wysoką jej stabilność termodynamiczną i zarazem niedostępność dla startera DNA. Obliczona temperatura topnienia dla nieobserwowalnego kompleksu RNA reprezentujący spinę III/starter DNA wynosiłaby 52,1°C, czyli zdecydowanie za mało, aby konkurować z korzystniejszą termodynamicznie spiną III. Zgodnie z założeniami dla kompleksu RNA reprezentujący spinę III/starter DNA-LNA uzyskano temperaturę topnienia wyższą niż temperatura topnienia spinii wynoszącą 84,9°C. Ponadto zaobserwowano, że kompleks RNA/DNA-LNA topnieje w sposób dwustanowy, korelacja temperatury topnienia (T_m) ze stężeniem użytego RNA i startera dowodzi, że topnieniu ulega dupleks a nie spinka.

2.6.2. Mapowanie chemiczne OxyS RNA

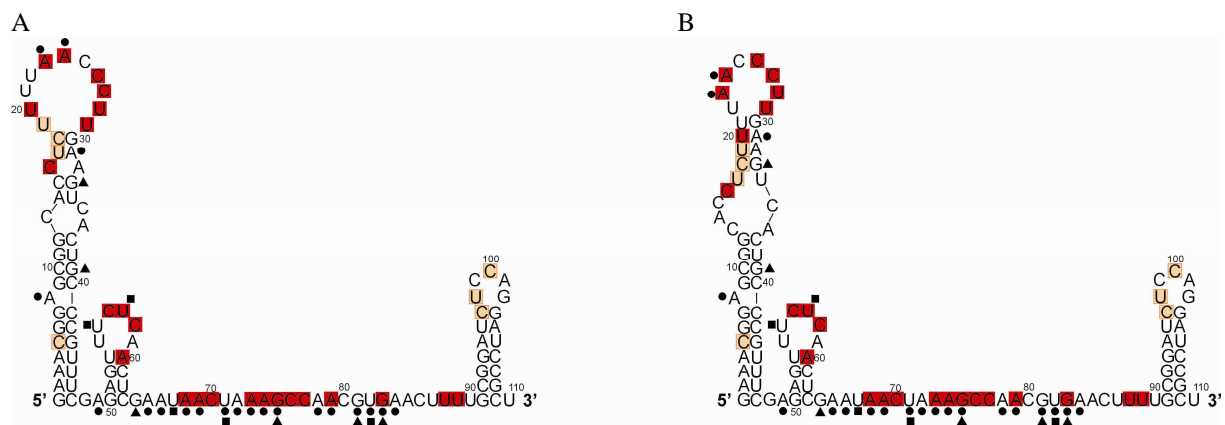
Po pomyślnych doświadczeniach z wydłużaniem startera DNA-LNA na matrycy DsrA RNA przez odwrotną transkryptazę Superscript III z dużymi nadziejami przeprowadzono analogiczny eksperyment na matrycy OxyS RNA. Doświadczenie zakończyło się powodzeniem, ponownie okazało się, że odwrotna transkryptaza Superscript III rozpoznaje modyfikowany starter przyłączony do RNA i efektywnie przeprowadza jego wydłużanie dając produkt pełnej długości. Oczywiście w reakcji kontrolnej, gdzie użyto starter DNA nie otrzymano żadnego produktu. Eksperyment potwierdził uniwersalność starterów/oligonukleotydów zawierających modyfikowane nukleotydy typu LNA oraz ich niezwykłą przydatność w sytuacjach, gdy konieczne jest zhybrydowanie oligonukleotydu, a ze względów strukturalnych i termodynamicznych nie jest to wykonalne z użyciem standardowych oligonukleotydów DNA.

Przeprowadzono mapowanie chemiczne OxyS RNA, wykorzystując jako odczynniki modyfikujące ketoksal, CMCT i NMIA. Dzięki zastosowaniu modyfikowanego startera OxyS-LNA z sukcesem przeprowadzono eksperymenty mapowania chemicznego (Rysunek 42). W celu lepszej analizy wyniku mapowania 5'-końcowego fragmentu cząsteczki, przeprowadzono również reakcje odwrotnej transkrypcji z użyciem dodatkowego startera zaprojektowanego dla środkowej części OxyS RNA. Ze względu na mniejszą stabilność termodynamiczną tego rejonu z powodzeniem stosowano standardowy starter DNA (OxyS_{sr}-3). Wyniki otrzymane z użyciem tego startera były zgodne z wynikami otrzymanymi z wykorzystaniem startera DNA-LNA (wyniki nie są pokazane).

OxyS RNA uległ mapowaniu w następujących pozycjach: 8, 23, 24, 31, 33, 39, 49, 55, 57, 64-69, 71-75, 78, 79 i 81-84. Wyniki mapowanie mikromacierzowego oraz chemicznego okazały się w większości ze sobą zgodne. Obie metody potwierdzają wcześniejsze doniesienia literaturowe, pokazując dostępność pętli apikalnej spinki I, a także dowodzą tworzenia się spinki II. Bardzo dostępny zarówno dla sond jak i odczynników chemicznych stał się rejon pomiędzy spinką II a III, co wskazuje, że nie jest on uwikłany w stabilne oddziaływania drugorzędowe. Patrząc jednak na wyniki kompleksów OxyS z oligonukleotydami o1, o2 i o3 należałoby przypuszczać, że odgrywa on istotną rolę w oddziaływaniach wyższego rzędu. Istnienie takich oddziaływań w strukturze OxyS RNA potwierdzają też wyniki dla izolowanej spinki III, która stała się bardziej dostępna niż wówczas, gdy występowała w cząsteczce pełnej długości.



Rysunek 42. Mapowanie chemiczne OxyS RNA. U, C, G i A oznacza reakcje sekwencjonowania; Un – reakcję kontrolną bez dodania czynnika modyfikującego, natomiast N, C oraz K odpowiednio reakcje w obecności malejących stężeń NMIA, CMCT oraz ketoksalu.



Rysunek 43. (A) Proponowana struktura OxyS RNA. (B) Struktura OxyS RNA wygenerowana przez program RNAstructure po wprowadzeniu danych z mapowania mikromacierzowego oraz chemicznego. Kolorem czerwonym oznaczono miejsca hybrydyzacji do mikromacierzy, dla których wykluczono alternatywne miejsca wiązania, kolorem pomarańczowym zaznaczono miejsca hybrydyzacji, dla których istnieją alternatywne miejsca wiązania. Miejsca modyfikacji chemicznych oznaczono następująco: kwadratem zaznaczono pozycje zmodyfikowane przez CMCT, kółkiem przez NMIA a trójkątem przez ketoksal.

Należy jeszcze nadmienić, że po wprowadzeniu danych zarówno z mapowania chemicznego jak i mikromacierzowego do programu RNAstructure generuje on strukturę nieco odmienną od tej proponowanej w literaturze (Rysunek 43). Struktura 43A, proponowana wcześniej, posiada energię swobodną równą -32,3 kcal/mol. Natomiast, energia

swobodna dla struktury OxyS RNA oznaczonej jako 43B wynosi -33,2 kcal/mol. Struktury różnią się pofałdowaniem fragmentu 14-34, czyli części apikalnej spinki I. Jakkolwiek dla obu struktur jest to spinka, różnica dotyczy wielkości i sekwencji pętli oraz rozkładu niesparowań w rejonie helikalnym graniczącym z pętlą. W obu strukturach w rejonie helikalnym występuje jedno lub dwa dwustronne wybrzuszenia. Należy pamiętać, że zarówno w rejonie pętli, jak i wybrzuszeń należy spodziewać się niekanonicznych oddziaływań, które program RNAstructure nie zawsze uwzględnia podczas generowania struktur drugorzędowych RNA. Fragmenty helikalne graniczące z pętlą nie są termodynamicznie trwałe i mogą ulegać rearanzacji zarówno podczas oddziaływania z sondami oligonukleotydowymi mikromacierzy, jak również podczas oddziaływań z mRNA, których ekspresje regulują. Wydaje się, że nie można wykluczyć możliwości, iż obie struktury współistnieją w komórce w pewnej równowadze dynamicznej, w zależności od spełnianej w danym momencie funkcji biologicznej przez OxyS RNA. Podobnie jak sugerowano to dla DsrA RNA, niestabilność termodynamiczna określonych rejonów jest być może konieczna do sprawowanie przez nie funkcji regulatorowych. Zebrane wyniki uzyskane na podstawie mapowania mikromacierzowego i chemicznego wraz z eksperymentami przedstawionymi przez Altuvia i współpracowników, sugerują jednak że bardziej prawdopodobną jest struktura przedstawiona na rysunku 43 A. Z tego powodu w dalszej części rozprawy dyskusja wyników oddziaływań OxyS RNA z innymi biomolekułami prowadzona jest w oparciu o strukturę 43A.

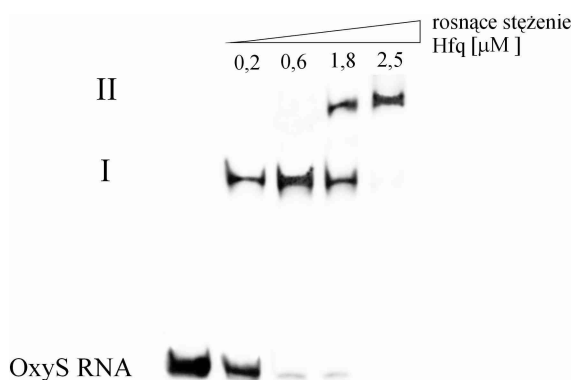
2.7. Badanie struktury i oddziaływań OxyS RNA w kompleksie z białkiem Hfq

2.7.1. Badanie tworzenia kompleksów OxyS RNA/Hfq

OxyS RNA należy do tej samej grupy bakteryjnych sRNA co DsrA RNA. Grupę tą charakteryzuje to, że do efektywnego działania *in vivo* wymagają one obecności białka Hfq. Dla OxyS RNA wykazano zdolność oddziaływania z Hfq zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Wykazano również, że do efektywnej represji translacji *rpoS* oraz *fhlA* mRNA przez OxyS RNA niezbędna jest obecność białka Hfq. Ponadto pokazano, że obecność Hfq ułatwia oddziaływanie pomiędzy OxyS RNA a jego dwoma docelowymi mRNA (98, 101).

Białko Hfq otrzymano drogą ekspresji w komórkach kompetentnych *E. coli* BL21 DES pLysS (Rozdział III.1.7.1.). W celu sprawdzenia jego zdolności do tworzenia kompleksów z OxyS RNA w używanych buforach hybrydyzacyjnych, OxyS RNA

znakowano radioizotopowo na końcu 5', a następnie inkubowano w buforze hybrydazyjnym w obecności rosnących stężeń białka Hfq (Materiały i Metody). Następnie przeprowadzono rozdział elektroforetyczny w żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących (Rysunek 43).



Rysunek 43. Tworzenie się kompleksu I i II pomiędzy OxyS RNA a białkiem Hfq, w obecności rosnącego stężenia białka. Analizę prowadzono w 6% żelu poliakrylamidowym.

Zaobserwowano tworzenie się dwóch rodzajów kompleksów pomiędzy Hfq a OxyS RNA. Przy niższych stężeniach białka obserwuje się kompleks I, natomiast im wyższe stężenie Hfq tym przeważać zaczyna kompleks II. Na podstawie tych eksperymentów ustalono stężenia, przy których uzyskuje się odpowiednie kompleksy. Stwierdzono, że w buforze hybrydazyjnym I (1 M NaCl, 4 mM MgCl₂) przy stężeniu monomeru 0,6 μM uzyskuje się kompleks I, natomiast przy stężeniu monomeru 2,5 μM uzyskuje się kompleks II.

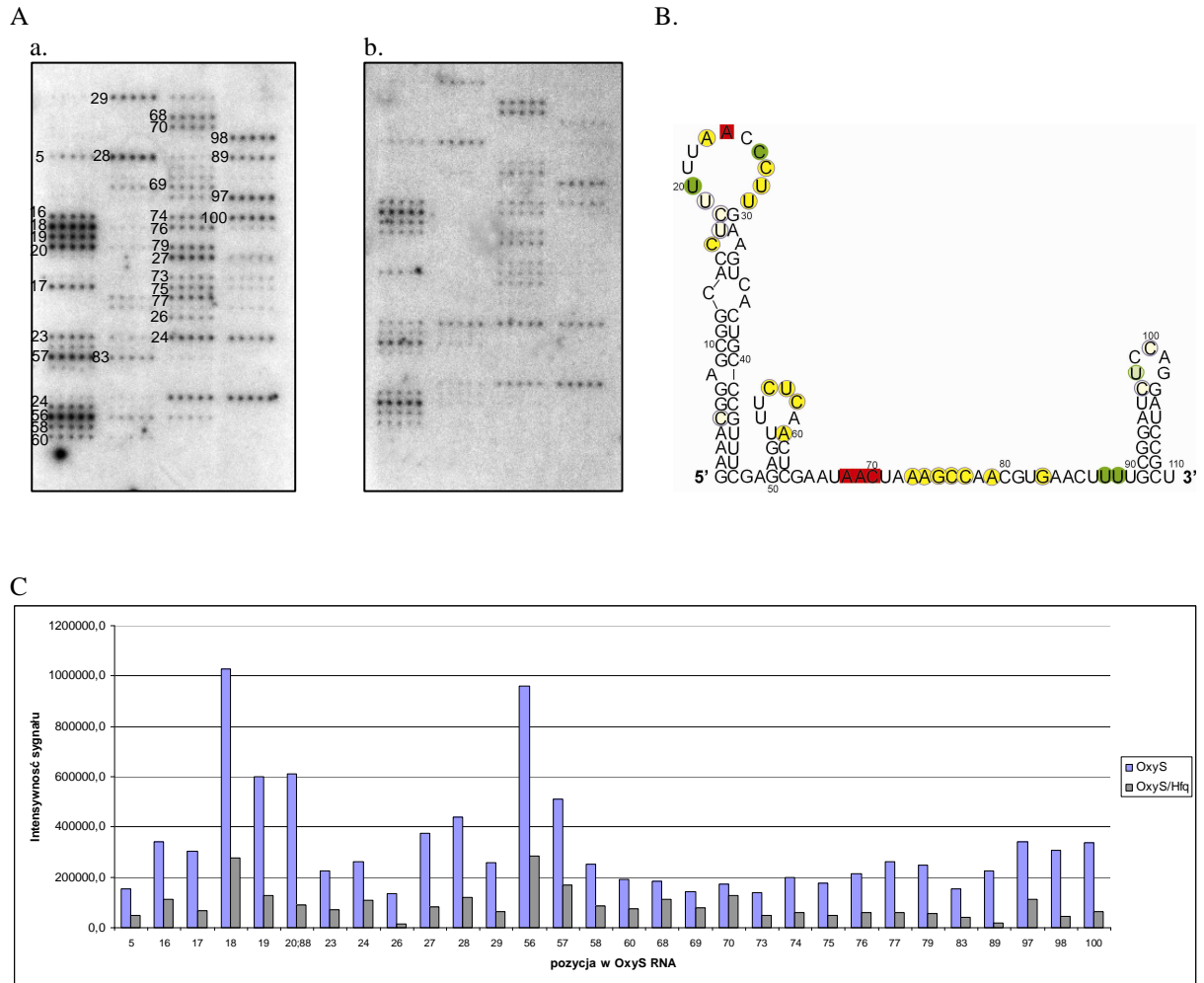
2.7.2. Mapowanie mikromacierzowe kompleksów OxyS RNA/Hfq

Tak samo, jak to uczyniono w przypadku DsrA RNA, również dla OxyS RNA przetestowano użyteczność mikromacierzy izoenergetycznych do badania kompleksów RNA/białko. Jak już wcześniej wspomniano, OxyS RNA cieszy się nieco mniejszym zainteresowaniem badaczy niż DsrA RNA. Niemniej jednak istnieją doniesienia, w których podjęto próby scharakteryzowania jego oddziaływań z Hfq (101), tak więc jak najbardziej kompleks ten nadaje się do przetestowania na mikromacierzach i porównania otrzymanych wyników z istniejącymi doniesieniami literaturowymi.

OxyS RNA znakowane izotopem ³²P na końcu 5' inkubowano w buforze hybrydazyjnym I z białkiem Hfq według procedury opisanej w rozdziale Materiały i Metody. Następnie przeprowadzono hybrydazję do mikromacierzy. Równocześnie

przeprowadzano reakcję kontrolną, w której próbkę traktowano identycznie jak właściwy eksperyment, z wyjątkiem dodawania białka. Kontrolę używano jako odnośnik, do którego porównywano wynik hybrydyzacji otrzymany dla kompleksu.

W wyniku przeprowadzonych eksperymentów otrzymano profil hybrydyzacji, w którym obserwowano obniżenie intensywności większości sygnałów w stosunku do reakcji kontrolnej (sam OxyS RNA). Za istotne uznano obniżenie sygnału jeżeli było ono co najmniej 3-krotnie niższe od tego samego sygnału w reakcji kontrolnej (tabela 19, wykres na rysunku 44 B). Największe, bo 11-krotne obniżenie intensywności uzyskano dla pozycji 89, 9-krotne dla pozycji 26, natomiast 7-krotne dla pozycji 20, 88 oraz 98 (alternatywne, właściwe miejsce 56/57). Od 5- do 3-krotne obniżenie uzyskano dla pozycji 5, 16-19, 23, 27-29, 56-58, 60, 73-77, 79, 83, 97 i 100. Wydaje się, że rejon 89 nukleotydu a także 26 i 98 (56/57) są głównym miejscem oddziaływania z Hfq. Niemniej jednak pozostałe rejony również muszą być zaangażowane w tworzenie kompleksu lub być zasłonięte przez białko na zasadzie zawady przestrzennej tak, że oddziaływanie z sondą jest utrudnione. Otrzymany wynik jest zgodny z obserwacjami Zhang i współpracowników (101). Wydaje się, że w przypadku OxyS oddziaływanie z Hfq ma charakter bardziej złożony i nie ogranicza się jedynie do rejonu jednoniciowego pomiędzy spinkami II a III. Grupa ta zaobserwowała, że zarówno sama spinka I lub III czy też rejon jednonicowy pomiędzy spinką II a III nie są wystarczające do związania białka. Wykazali również, że spinka I nie jest konieczna do wiązania, ale tylko wówczas, gdy obecna jest spinka III. Z kolei, jeżeli brakuje spinki III to żeby Hfq mogło się związać niezbędna jest spinka I. Na podstawie cięć rybonukleazą T2 stwierdzili oni również, że po związaniu Hfq struktura OxyS staje się bardziej otwarta. Zwiększona dostępność dotyczyła górnej części spinki I oraz całej spinki II. Takiej zależności z kolei nie zaobserwowano z wykorzystaniem metody mikromacierzowej.



Rysunek 44. (A) Przykładowy wynik hybrydyzacji (a) OxyS RNA, (b) kompleks OxyS RNA/Hfq. Macierz drukowana w układzie 4 kolumny, 4 sondy w rzędzie, każda sonda po 5 powtórzeń. (B) Struktura OxyS RNA z zaznaczonymi wynikami mapowania w kompleksie z Hfq. Kolorem czerwonym zaznaczono miejsca hybrydyzacji, dla których intensywność sygnału nie zmieniła się w porównaniu z reakcją kontrolną (sam OxyS RNA). Kolorem żółtym zaznaczono miejsca o obniżonej intensywności sygnału w obecności Hfq, kolorem zielonym miejsca o największym spadku intensywności w obecności Hfq, kolorami jasnożółtym i jasnozielonym te, które posiadają alternatywne miejsca wiązania. (C) Wykres prezentujący uśrednione intensywności wiązania się poszczególnych sond.

III. WYNIKI I DYSKUSJA

Tabela 19. Uśrednione wyniki hybrydyzacji dla kompleksu OxyS RNA/Hfq.

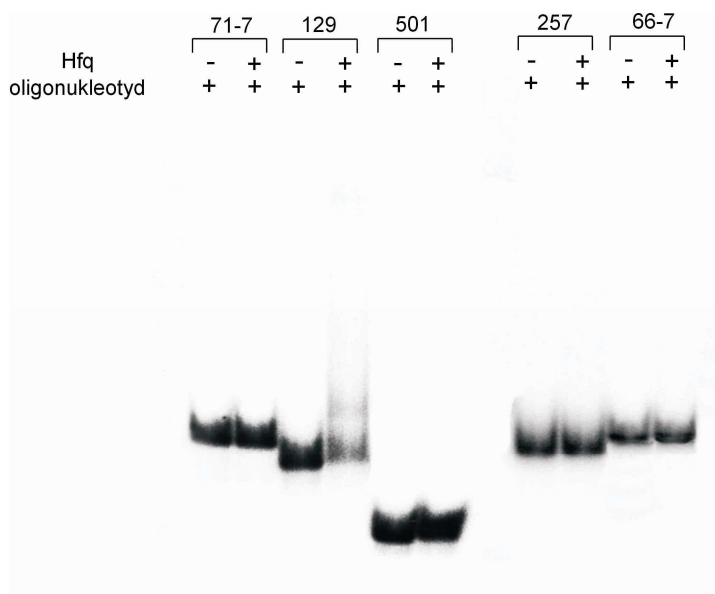
pozycja w OxyS	nazwa sondy	sekwencja penta- lub heptameru	sekwencja modyfikowanej sondy	nukleotydy parujący się z dodatkowym 3'G	przewidziane dG (kcal/mol) dla komplementarnego wiązania RNA-RNA	przewidziane dG (kcal/mol) dla wiązania modyfikowana sonda-RNA, 100 mM NaCl	uśrednione wyniki hybrydyzacji dla OxyS RNA	uśrednione wyniki hybrydyzacji dla OxyS RNA/Hfq	alternatywne miejsce wiązania	przewidziane dG (kcal/mol) dla alternatywnego wiązania RNA-RNA	przewidziane dG (kcal/mol) dla alternatywnego wiązania modyfikowana sonda-RNA, 100 mM NaCl
5	368	CCGUU	CCGUUG	A	-4,2	-9,1	m	m (3x)	79	-4,8	-7,1
16	556	GAGGU	GDGGUG	C	-5,4	-11,2	m	s (3x)			
17	139	AGAGG	DGDGG		-5,3	-9,7	m	m (4x)	88,20	-1,2	-4,5
18	35	AAGAG	DDGDGG	C	-2,9	-13,0	s	s (4x)	88,20	-2,6	-7,3
19	9	AAAGA	DDDGAG	C	-1,2	-10,2	s	s (5x)	20,88 56	-1,9 -1,1	-5,7 -4,0
20	3	AAAAG	DDDDGG	U	-0,2	-8,1	s	s (7x)			
23	23-7	GGUAAA	GGUDDA		-4,9	-10,9	m	m (3x)			
24	701	GGUUA	GGUUDG	U	-3,1	-8,8	m	s			
25	688	GGGUU	GGGUUG	U	-5,1	-9,6	w	m			
26	172	AGGGU	AGGGUG	A	-5,8	-10,4	m	w (9x)			
27	43	AAGGG	DDGGG		-5,0	-9,5	s	m (4x)			
28	267	CAAGG	CDDGGG	C	-4,3	-12,3	s	s (4x)			
29	835	UCAAG	UCDDGG	C	-2,9	-11,6	m	m (4x)			
36	185	AGUGA	DGUGDG	G	-3,7	-10,1	w	w			
38	588	GCAGU	GCDGUG	C	-5,2	-11,9			-		
43	27	AACGG	DDCGGG	C	-4,2	-12,2	w				
45	514	GAAAC	GDDDCG	C	-2,3	-10,2	w				
46	385	CGAAA	CGDDDG	G	-2,0	-9,1	w				
50	478	CUCUC	CUCUCG	C	-4,9	-11,5	w	m	-		
54	514	GAAAC	GDDDCG	A	-2,3	-8,1	w				
55	129	AGAAA	DGDDDG	G	-1,2	-9,0	w	w			
56	545	GAGAA	GDGDDG	U	-3,2	-9,5	s	s (3x)			
57	905	UGAGA	UGDGDG	U	-3,9	-10,1	s	s (3x)			
58	995	UUGAG	UUGDGG	U	-2,9	-8,9	m	m (3x)			
59	761	GUUGA	GUUGDG	C	-3,0	-10,8	w	m			
60	191	AGUUG	DGUUGG	U	-2,7	-8,6	m	m (3x)			

III. WYNIKI I DYSKUSJA

62	396	CGAGU	CGDGUG	A	-4,5	-9,2	w				
63	869	UCGAG	UCGDGG		-4,7	-9,8	w	w			
68	68-7	AGUUAUU	DGUUDUU		-3,4	-10,2	m	s			
69	69-7	UAGUUAU	UDGUUDU		-3,8	-10,3	m	m			
70	70-7	UUAGUUA	UUDGUUD		-3,6	-10,0	m	s			
71	71-7	UUUAGUU	UUUDGUU		-3,2	-8,9	w	m			
73	73-7	GCUUUAG	GCUUUDG		-6,6	-11,8	m	m (3x)	-		
74	74-7	GGCUUUA	GGCUUUA		-7,3	-11,6	m	m (3x)	-		
75	672	GGCUU	GGCUUG	A	-5,1	-9,1	m	m (4x)	-		
76	936	UGGCU	UGGCUG	A	-5,8	-10,7	m	m (4x)			
77	1002	UUGGC	UUGGCG	A	-5,1	-9,4	m	m (4x)			
79	447	CGUUG	CGUUGG	C	-3,5	-11,6	m	m (4x)			
80	112	ACGUU	DCGUUG	C	-2,6	-10,6	w	w			
82	839	UCACG	UCDCGG	A	-4,5	-9,1	w				
83	978	UUCAC	UUCDCG	C	-3,0	-10,3	m	m (4x)	-		
88	3	AAAAG	DDDDGG	A	-0,2	-8,1	s	s (7x)			
89	257	CAAAA	CDDDDG	C	-0,2	-9,4	m	w (11x)			
97	548	GAGAU	GDGDUG	G	-3,4	-9,5	m	s (3x)	56/57 17 18/19	-4,8 -3,1 -1,6	-6,4 -2,7 -4,7
98	649	GGAGA	GGDGAG	A	-5,6	-10,7	m	m (7x)	56/57 57	-5,0 -2,2	-6,8 -2,3
99	931	UGGAG	UGGDGG	U	-5,3	-10,3	w	w			
100	489	CUGGA	CUGGDG	C	-5,3	-12,5	m	m (5x)	17/18	-2,8	-6,0
101	379	CCUGG	CCUGG		-6,7	-9,6	w				

Jako s, m i w zaznaczono sygnały hybrydyzacji odpowiednio o wysokiej, średniej i słabej intensywności. Kolorem zielonym zakreślono najbardziej prawdopodobne alternatywne miejsca wiązania, natomiast szarym mniej prawdopodobne, ale możliwe.

Analogicznie do eksperymentów z DsrA RNA, w związku z wątpliwościami omówionymi w rozdziale III.1.7.3, postanowiono sprawdzić na kolejnych kilku przykładach czy Hfq może wiązać się z modyfikowanymi sondami. Do eksperymentu wybrano sondę 257, dla której w obecności Hfq obserwowano największe obniżenie intensywności sygnału, a także sondy 129 i 71-7, dla których nie obserwowano istotnych zmian w intensywności. Ponadto sonda 129 jest bogata w reszty 2,6-diaminopurynorybozydowe, tak więc na przykładzie eksperymentów z sondami dla DsrA RNA widać, że mogłaby być wiązana przez Hfq. Ponadto wybrano jeszcze sondy 501 i 66-7, dla których w ogóle nie obserwowano hybrydyzacji, ale są one bogate w reszty urydyny, a zatem mogłyby być potencjalnie wiązane przez Hfq (Tabela 20). Oligonukleotydy odpowiadające wybranym sondom zsyntetyzowano bez C6-aminoheksylowego łącznika na końcu 5'. Wybrane odpowiedniki sond wyznakowano radioizotopowo na końcu 5', a następnie inkubowano ze 100-krotnym molaowym nadmiarem białka Hfq w buforze hybrydyzacyjnym I. Wynik eksperymentu analizowano poprzez rozdział elektroforetyczny w warunkach niedenaturujących (Rysunek 45).



Rysunek 45. Analiza zdolności tworzenia się kompleksu modyfikowany oligonukleotyd/Hfq. Rozdział prowadzono w 16% żelu poliakrylamidowym, w warunkach niedenaturujących w 4°C.

Tabela 20. Zestawienie modyfikowanych oligonukleotydów, które wybrano do sprawdzenia zdolność do oddziaływania z Hfq.

pozycja w OxyS	nazwa sondy	sekwencja penta- lub heptameru	sekwencja modyfikowanej sondy	Oddziaływanie z Hfq
31	501	CUUCA	CUUCDG	brak
55	129	AGAAA	DGDDDG	słabe
66	66-7	UUAUUCG	UUDUUCG	brak
71	71-7	UUUAGUU	UUUDGUU	brak
89	257	CAAAA	CDDDDG	brak

Bardzo słabe oddziaływanie zaobserwowano dla sondy 129. Dla pozostałych oligonukleotydów, pomimo zastosowania tak dużego nadmiaru białka nie zaobserwowano wiązania z Hfq. Zatem, potwierdził się wynik uzyskany w badaniach nad cząsteczką DsrA RNA, że białko Hfq nie wykazuje znaczącego powinowactwa do modyfikowanych hekso- i heptanukleotydów. Można więc wykluczyć ewentualne zafałszowanie wyniku hybrydyzacji wynikające z oddziaływania Hfq z sondami na mikromacierzy.

W przypadku wcześniej testowanych sond (rozdział III.1.7.3.) zastanawiano się, jaka mogłaby być ewentualna sekwencja oligonukleotydu preferowana przez Hfq. Rozważano, że być może do wiązania konieczna jest obecność reszt D, jednak oligonukleotydy 35-7 i 483 nie potwierdziły tej teorii (Rysunek 25, Tabela 11). Wynioskowano wówczas, że być może dla oddziaływania istotne jest by w pierwszej lub drugiej pozycji nie występowała cytydyna. Przetestowanie kilku kolejnych modyfikowanych oligonukleotydów potwierdziło to przypuszczenie. Ponadto zauważono również, że oddziaływaniu nie sprzyja obecność modyfikowanych pochodnych urydyny. Wynik ten jest w zasadzie zgodny z obserwacjami Zhang, który pokazał, że poli(C) nie jest w stanie konkurować z OxyS o miejsce wiązania w Hfq. Natomiast pozostałe polinukleotydy w różnym stopniu wypierały OxyS z kompleksu z Hfq (101). Jak również zgodne z obserwacjami Brescia, który pokazał, że do stworzenia trójskładnikowego kompleksu DsrA/Hfq/poli(A) wystarczy relatywnie krótki 27 nukleotydowy oligo(A). Natomiast do wyparcia DsrA z kompleksu z Hfq niezbędny jest długi 200-400 nukleotydowy poli(U) (116).

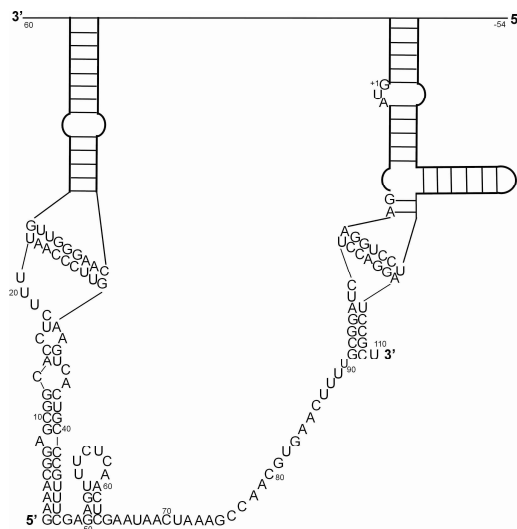
Na przykładzie drugiego testowanego regulatorowego RNA pokazano, że używając metody izoenergetycznych mikromacierzy można zaobserwować różnice w profilu hybrydyzacji cząsteczki RNA poddanej hybrydyzacji samodzielnie oraz znajdującej się w kompleksie z białkiem. Ponadto potwierdzono, iż oddziaływanie OxyS RNA z białkiem Hfq

odbywa się w sposób bardziej złożony niż tylko na zasadzie wyłącznie oddziaływania z rejonem jednoniciowym bogatym w reszty adenozyiny i urydynym.

2.8. Próby mapowania mikromacierzowego kompleksów OxyS RNA/fragment mRNA

2.8.1. Próby mapowania mikromacierzowego kompleksów OxyS RNA/fragment *fhlA* mRNA

Jednym z docelowych mRNA OxyS RNA jest *fhlA*, kodujący aktywator transkrypcji. Wykazano, że oddziaływanie, skutkujące represją translacji tego mRNA zachodzi w poprzez parowanie się obu RNA na krótkich odcinkach, w dwóch oddalonych od siebie rejonach obu cząsteczek tak, że powstaje tzw. *kissing complex* pomiędzy czterema pętlami (Rysunek 46). Jeden z tych rejonów pokrywa się z miejscem wiązania rybosomu, natomiast drugi znajduje się poniżej w obrębie sekwencji kodującej *fhlA* mRNA. Fragment zawierający sekwencję Shine-Delgarno paruje się na odcinku siedmiu nukleotydów z pętlą spinki III OxyS RNA. Natomiast oddalony od niego o 41 nukleotydów fragment zlokalizowany w obrębie sekwencji kodującej paruje się na odcinku dziewięciu nukleotydów z pętlą apikalną spinki I OxyS RNA (99, 100).



Rysunek 46. Struktura *kissing complex* pomiędzy OxyS RNA a *fhlA* mRNA według Argman i Altuvia (2000) (100).

Kissing complex jest ciekawym modelem do przetestowania użyteczności mapowania mikromacierzowego. W przypadku DsrA RNA i fragmentu *rpoS* mRNA powstający kompleks sparowany był na dość długim odcinku liczącym ponad 20 par zasad, a zatem był on stosunkowo stabilny i trwały, można było więc z powodzeniem zaobserwować jego

obecność po wykonaniu hybrydyzacji do mikromacierzy. Oddziaływania typu *kissing complex*, czyli pętla-pętla pomiędzy dwoma ustrukturalizowanymi cząsteczkami RNA są znacznie mniej stabilne. Interesujące było sprawdzenie czy tego typu kompleksy również można badać za pomocą izoenergetycznych mikromacierzy.

W pierwszym etapie badań postanowiono sprawdzić, czy podczas procesu hybrydyzacji, oligonukleotydy reprezentujące komplementarne do OxyS RNA fragmenty *fhlA*, pozostaną związane z regulatorowym RNA, czy też oddziaływania te będą na tyle słabe, że nastąpi oddysocjowanie oligorybonukleotydów od OxyS RNA na korzyść wiązania się OxyS RNA z modyfikowanymi sondami. W tym celu zsyntetyzowano chemicznie jedenastonukleotydowy fragment *fhlA*, parujący się z pętlą apikalną spinki I OxyS RNA (*fhlA11*) oraz dziewięcionukleotydowy fragment parujący się z pętlą spinki III OxyS RNA (*fhlA9*). Obliczona w programie RNAstructure wartość energii swobodnej dla tych dwóch krótkich dupleksów RNA/RNA jest zbliżona i wynosi -12,9 kcal/mol oraz -12,3 kcal/mol odpowiednio dla dupleksu z *fhlA11* i *fhlA9*. Przy czym wartości te nie uwzględniają nakładu energii niezbędnej do rozplecenie fragmentu helisy, szczególnie w przypadku *fhlA9*, którego parowanie zachodzi na trzy reszty nukleotydowe wchodzące w skład stabilnej helisy spinki III (Rysunek 47B). OxyS RNA znakowano radioizotopowo na końcu 5', następnie poddawano procesowi fałdowania w buforze hybrydyzacyjnym I (1 M NaCl, 4 mM MgCl₂). Przygotowane RNA inkubowano w obecności 50-krotnego molowego nadmiaru *fhlA11* lub *fhlA9*. Następnie przeprowadzano hybrydyzację do mikromacierzy izoenergetyczne. Hybrydyzację kontrolną traktowano identycznie jak próbę badaną z wyjątkiem dodawania oligorybonukleotydów do mieszaniny reakcyjnej.

III. WYNIKI I Dyskusja

Tabela 21. Uśrednione wyniki hybrydyzacji dla kompleksów OxyS RNA/fhlA11 oraz OxyS RNA/fhlA9 .

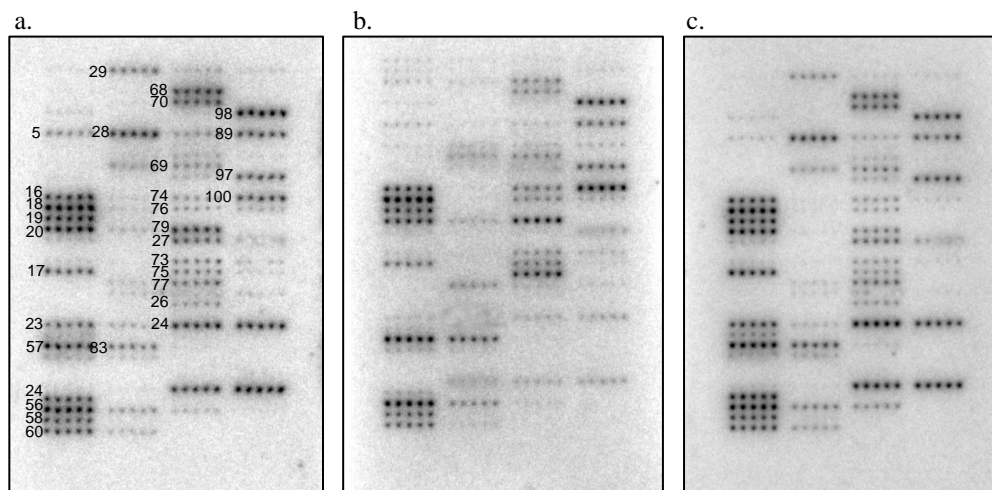
pozycja w OxyS	nazwa sondy	sekwencja pentalub heptameru	sekwencja modyfikowanej sondy	nukleotyd parujący się z dodatkowym 3'G	przewidziane dG (kcal/mol) dla komplementarnego wiązania RNA-RNA	przewidziane dG (kcal/mol) dla wiązania modyfikowana sonda-RNA, 100 mM NaCl	uśrednione wyniki hybrydyzacji dla OxyS RNA	uśrednione wyniki hybrydyzacji dla OxyS RNA/fhlA11	uśrednione wyniki hybrydyzacji dla OxyS RNA/fhlA9	alternatywne miejsce wiązania	przewidziane dG (kcal/mol) dla alternatywnego wiązania RNA-RNA	przewidziane dG (kcal/mol) dla alternatywnego wiązania modyfikowana sonda-RNA, 100 mM NaCl
5	368	CCGUU	CCGUUG	A	-4,2	-9,1	m	m	m	79	-4,8	-7,1
16	556	GAGGU	GDGGUG	C	-5,4	-11,2	m	m	m			
17	139	AGAGG	DGDGG		-5,3	-9,7	m	m	m	88,20	-1,2	-4,5
18	35	AAGAG	DDGDGG	C	-2,9	-13,0	s	s	s	88,20	-2,6	-7,3
19	9	AAAGA	DDDGAG	C	-1,2	-10,2	s	s	s	20,88 56	-1,9 -1,1	-5,7 -4,0
20	3	AAAAG	DDDDGG	U	-0,2	-8,1	s	s	s			
23	23-7	GGUAAA	GGUDDA		-4,9	-10,9	m	w	m			
24	701	GGUUA	GGUUDG	U	-3,1	-8,8	m	w	m			
25	688	GGGUU	GGGUUG	U	-5,1	-9,6	w		w			
26	172	AGGGU	AGGGUG	A	-5,8	-10,4	m		m			
27	43	AAGGG	DDGGG		-5,0	-9,5	s		s			
28	267	CAAGG	CDDGGG	C	-4,3	-12,3	s		s			
29	835	UCAAG	UCDDGG	C	-2,9	-11,6	m		m			
36	185	AGUGA	DGUGDG	G	-3,7	-10,1	w	w	w			
38	588	GCAGU	GCDGUG	C	-5,2	-11,9				-		
43	27	AACGG	DDCGGG	C	-4,2	-12,2	w	w	w			
45	514	GAAAC	GDDDCG	C	-2,3	-10,2	w	w	w			
46	385	CGAAA	CGDDDG	G	-2,0	-9,1	w	w	w			
50	478	CUCUC	CUCUCG	C	-4,9	-11,5	w	w	w	-		
54	514	GAAAC	GDDDCG	A	-2,3	-8,1	w	w	w			
55	129	AGAAA	DGDDDG	G	-1,2	-9,0	w	w	w			
56	545	GAGAA	GDGDDG	U	-3,2	-9,5	s	s	s			
57	905	UGAGA	UGDGDG	U	-3,9	-10,1	s	s	s			
58	995	UUGAG	UUGDGG	U	-2,9	-8,9	m	m	m			
59	761	GUUGA	GUUGDG	C	-3,0	-10,8	w	w	w			
60	191	AGUUG	DGUUGG	U	-2,7	-8,6	m	m	m			

III. WYNIKI I DYSKUSJA

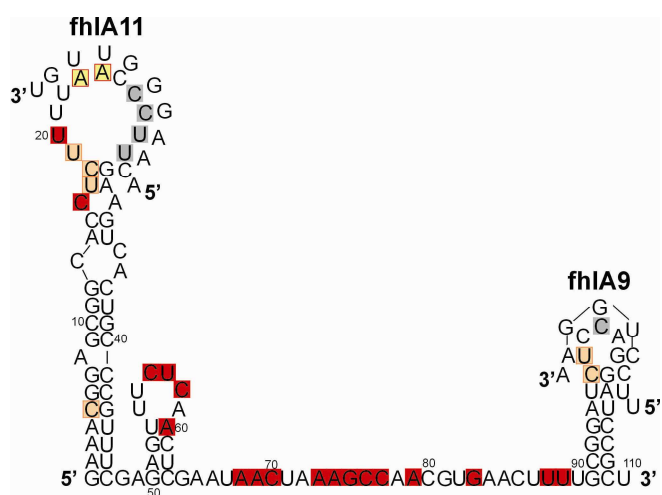
62	396	CGAGU	CGDGUG	A	-4,5	-9,2	w	w	w			
63	869	UCGAG	UCGDGG		-4,7	-9,8	w	w	w			
68	68-7	AGUUAUU	DGUUDU		-3,4	-10,2	m	m	m			
69	69-7	UAGUUAU	UDGUUDU		-3,8	-10,3	m	m	m			
70	70-7	UUAGUUA	UUDGUUD		-3,6	-10,0	m	m	m			
71	71-7	UUUAGUU	UUUDGUU		-3,2	-8,9	w	w	w			
73	73-7	GCUUUAG	GCUUUDG		-6,6	-11,8	m	m	m	-		
74	74-7	GGCUUUA	GGCUUUA		-7,3	-11,6	m	m	m	-		
75	672	GGCUU	GGCUUG	A	-5,1	-9,1	m	m	m	-		
76	936	UGGCU	UGGCUG	A	-5,8	-10,7	m	m	m			
77	1002	UUGGC	UUGGCG	A	-5,1	-9,4	m	m	m			
79	447	CGUUG	CGUUGG	C	-3,5	-11,6	m	m	m			
80	112	ACGUU	DCGUUG	C	-2,6	-10,6	w	w	w			
82	839	UCACG	UCDCGG	A	-4,5	-9,1	w	w	w			
83	978	UUCAC	UUCDCG	C	-3,0	-10,3	m	m	m	-		
88	3	AAAAG	DDDDGG	A	-0,2	-8,1	s	s	s			
89	257	CAAAA	CDDDDG	C	-0,2	-9,4	m	m	m			
97	548	GAGAU	GDDUG	G	-3,4	-9,5	m	m	m	56/57 17 18/19	-4,8 -3,1 -1,6	-6,4 -2,7 -4,7
98	649	GGAGA	GGDGAG	A	-5,6	-10,7	m	m	m	56/57 57	-5,0 -2,2	-6,8 -2,3
99	931	UGGAG	UGGDGG	U	-5,3	-10,3	w	w	w			
100	489	CUGGA	CUGGDG	C	-5,3	-12,5	m	m		17/18	-2,8	-6,0
101	379	CCUGG	CCUGG		-6,7	-9,6	w	w	w			

Jako s, m i w zaznaczono sygnały hybrydyzacji odpowiednio o wysokiej, średniej i słabej intensywności. Kolorem zielonym zakreślono najbardziej prawdopodobne alternatywne miejsca wiązania, natomiast szarym mniej prawdopodobne, ale możliwe.

A



B



Rysunek 47. (A) Przykładowy wynik hybrydyzacji (a) OxyS RNA, (b) kompleks OxyS RNA/fhlA11, (c) kompleks OxyS RNA/fhlA9. Macierz drukowana w układzie 4 kolumny, 4 sondy w rzędzie, każda sonda po 5 powtórzeń. (B) Struktura OxyS RNA z zaznaczonymi wynikami mapowania w kompleksie z fhlA11 oraz fhlA9. Kolorem czerwonym i pomarańczowym zaznaczono miejsca hybrydyzacji, dla których intensywność sygnału nie zmieniła się w porównaniu z reakcją kontrolną (sam OxyS RNA). Kolorem żółtym zaznaczono miejsca o obniżonej intensywności sygnału w obecności fhlA11, kolorem szarym brak sygnału w obecności z fhlA11 lub fhlA9.

Przeprowadzone eksperymenty pokazały, że obydwa oligonukleotydy oddziałują z OxyS RNA oraz pozostają z nim związane podczas procesu hybrydyzacji do mikromacierzy.

W wyniku hybrydyzacji kompleksu OxyS RNA/fhlA11 otrzymano obniżenie intensywności sygnałów do bardzo słabych w pozycjach 23 i 24 oraz całkowity zanik sygnałów w pozycjach 26-29, profil hybrydyzacji pozostałych sond pozostał bez zmian (Tabela 21). Zatem zanik sygnałów nastąpił dokładnie w miejscu oddziaływania fhlA11 z OxyS RNA. Można także wnioskować, że oddziaływanie *fhlA* z pętlą apikalną spinki I OxyS RNA nie powoduje istotnych zmian w strukturze drugorzędowej regulatorowego RNA.

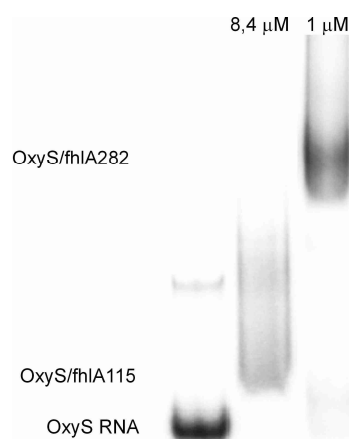
W wyniku hybrydyzacji kompleksu OxyS RNA/fhlA9 zaobserwowano zanik sygnału w pozycji 100. Należy zauważyć, iż intensywność sygnałów dla pozycji 97 i 98 pozostała bez zmian, co jest kolejnym potwierdzeniem tego, że sygnały te pochodzą od alternatywnych miejsc wiązania (Tabela 21). Uzyskany profil hybrydyzacji świadczy również o oddziaływaniu fhlA9 z OxyS RNA we właściwym miejscu (pętla spinki III). Ponadto, również to oddziaływanie nie wpływa w sposób zauważalny na zmianę struktury drugorzędowej OxyS RNA. Identyczne rezultaty uzyskano, gdy przeprowadzano hybrydyzację OxyS RNA ze związanymi jednocześnie obydwoma oligorybonukleotydami.

W następnym etapie postanowiono przeprowadzić hybrydyzację do mikromacierzy dwóch dłuższych RNA oddziałujących ze sobą z utworzeniem *kissing complex*. Do eksperymentów tych użyto OxyS RNA oraz 115 nukleotydowy fragment *fhlA* mRNA (od -54 do 60 reszty nukleotydowej). Zdecydowano się na wybranie tego fragmentu gdyż, zostały przeprowadzone jego badania strukturalne. Pokazały one, że budują go dwa motywy spinki do włosów, których pętle apikalne oddziałują z pętlami apikalnymi spinki I i III OxyS RNA (100) (Rysunek 46). Spinka pierwsza fhlA115 zawiera sekwencje Shine-Dalgarno i kodon AUG, natomiast druga znajduje się w obrębie sekwencji kodującej. FhlA115 otrzymano wykorzystując metody PCR oraz transkrypcję *in vitro* zgodnie z procedurami opisanymi w rozdziale Materiały i Metody. Chcąc sprawdzić w jakim nadmiarze, w stosunku do OxyS, w stosowanych warunkach reakcji należy użyć fhlA115, by związać w 100% OxyS w kompleksie, przeprowadzono eksperymenty, w których w buforze hybrydyzacyjnym V (1 M NaCl, 10 mM MgCl₂) lub VI (0,2 M NaCl, 10 mM MgCl₂) inkubowano OxyS w obecności rosnących stężeń fhlA115. Następnie przeprowadzono rozdział elektroforetyczny w warunkach niedenaturujących w buforze TBM. Bufory o 10 mM stężeni MgCl₂ zastosowano ze względu na charakter oddziaływań typu *kissing complex*. Struktury tego typu charakteryzują się słabymi oddziaływaniami pętla-pętla, które stabilizowane są przez jony magnezu. Chcąc zaobserwować tego typu oddziaływania konieczne jest również prowadzenie elektroforezy w buforze zawierającym jony magnezu (TBM). Stwierdzono, że do związania 100% OxyS RNA w kompleksie konieczne jest użycie 84-krotnego molowego nadmiaru fhlA115 (Rysunek 48). W tak dobranych warunkach postanowiono przeprowadzić hybrydyzację. Wyznakowane radioizotopowo OxyS RNA oraz poddane fałdowaniu inkubowano z również poddanym fałdowaniu fhlA115 w buforze hybrydyzacyjnym V lub VI. Następnie przeprowadzono hybrydyzację do mikromacierzy. Stosowaną hybrydyzację kontrolną traktowano identycznie, jak próbę badaną z wyjątkiem dodawania fhlA115 do

mieszaniny reakcyjnej. Ze względu na możliwość niespecyficznego oddziaływania *fhlA115* z sondami na mikromacierzy, co mogłoby ewentualnie zafałszować wynik hybrydyzacji przeprowadzono dodatkowy eksperyment kontrolny. *FhlA115* znakowano radioizotopowo na końcu 5' i poddawano hybrydyzacji do mikromacierzy zaprojektowanej dla *OxyS* RNA.

Niestety nawet podwyższenie temperatury inkubacji obu RNA ze sobą z 22°C do 37°C nie spowodowało zmiany profilu hybrydyzacji w stosunku do reakcji kontrolnej (sam *OxyS* RNA). Wszystko wskazuje na to, że jeżeli oba RNA oddziałują ze sobą z powstaniem *kissing complex*, to jest to typ oddziaływań, których nie można zaobserwować za pomocą mapowania mikromacierzowego. Prawdopodobnie wynika to z nietrwałości termodynamicznej tego typu kompleksów.

Wstępne dane uzyskane przez grupę profesora Andrew Feiga (Wayne State University, niepublikowane dane) sugerują, iż wydłużona w stronę 5'UTR forma *fhlA* (*fhlA282*) przyjmuje inną strukturę niż fragment 115 nukleotydowy. Oznaczałoby to, że *in vivo* oddziaływania pomiędzy *OxyS* RNA a *fhlA* mRNA nie koniecznie zachodzą z utworzeniem wyłącznie *kissing complex*. Proponowany model struktury *fhlA282* sugeruje, że oddziałujący rejon, zlokalizowany w okolicy miejsca wiązania rybosomu, miałby nie znajdować się w obrębie pętli apikalna a w obrębie jednostronnego wybrzuszenia. Według Feiga takie oddziaływanie byłoby korzystniejsze termodynamicznie. Wydawało się interesujące sprawdzić czy sugerowany trwalszy kompleks pomiędzy *OxyS* RNA a *fhlA282* rzeczywiście istnieje i czy mógłby być obserwowalny z wykorzystaniem metody mikromacierzowej. *FhlA282* otrzymano wykorzystując technikę PCR oraz transkrypcję *in vitro* zgodnie z procedurami opisanymi w rozdziale Materiały i Metody. W pierwszym etapie sprawdzono zdolność wiązania się *OxyS* z *fhlA282* w buforze V i VI. Wyznakowany radioizotopowo *OxyS* inkubowano w obecności rosnących stężeń *fhlA282*, a następnie rozdzielano elektroforetycznie w warunkach niedenaturujących w buforze TBM. Stwierdzono, że chcąc uzyskać 100% *OxyS* RNA związanego w kompleksie wystarczy 10-krotny molowym nadmiar *fhlA282* (Rysunek 48). Zatem, porównując ten wynik z otrzymanym dla *fhlA115* można wnioskować, że kompleks ten tworzy się łatwiej. Oznaczałoby to, że albo w oddziaływaniu z *OxyS* w przypadku wydłużonej formy *fhlA* zaangażowane są te same rejony jednakże w innym kontekście strukturalnym lub też, że w oddziaływaniu z *OxyS* biorą udział jakieś dodatkowe fragmenty *fhlA*. Niezmiennym pozostaje fakt, że istotną stabilizującą rolę w tych oddziaływaniach odgrywają jony magnezu. Identycznie przeprowadzony eksperyment poddany rozdziałowi elektroforetycznemu w buforze TBE, daje wynik, w którym brak jest kompleksów *OxyS* RNA/*fhlA282* nawet przy znacznie wyższych stężeniach *fhlA282*.



Rysunek 48. Rozdział elektroforetyczny kompleksów OxyS RNA/fhlA115 oraz OxyS RNA/fhlA282. Analizę prowadzono w 6% żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących w 4°C w buforze TBM.

Po tak obiecującym wyniku postanowiono przeprowadzić hybrydyzację do mikromacierzy. OxyS RNA wyznakowane radioizotopowo oraz poddane fałdowaniu inkubowano z również poddanym fałdowaniu fhlA282 w buforze hybrydyzacyjnym V (1 M NaCl, 10 mM MgCl₂) lub VI (0,2 M NaCl, 10 mM MgCl₂). Następnie przeprowadzano hybrydyzację, każdorazowo przeprowadzając hybrydyzacje kontrolne – same OxyS RNA oraz fhlA282 uprzednio wyznakowany radioizotopowo.

Niestety również dla dłuższej formy *fhlA* nie otrzymano profilu hybrydyzacji, który byłby odmienny od hybrydyzacji kontrolnej (sam OxyS). Najwyraźniej natura również tego kompleksu jest nie wystarczająco trwała termodynamicznie, aby można go było badać z wykorzystaniem metody izoenergetycznych mikromacierzy. Niemniej jednak bardzo interesująca jest obserwacja, iż wydłużona forma *fhlA* wiąże się bardziej efektywnie z OxyS RNA. Problem ten wymaga dalszych, bardziej szczegółowych badań, które z pewnością zostaną podjęte przez grupę Feiga.

Oddziaływania z utworzeniem *kissing complex* są ważnymi strukturalnie i funkcjonalnie motywami powstającymi pomiędzy dwoma elementami struktury drugorzędowej RNA. Tworzenie się tego typu motywu wykazano między innymi pomiędzy RNAI i RNAII plazmidu ColEI. Motyw ten jest miejscem rozpoznawanym przez białko Rom, podczas regulacji replikacji plazmidu (57). *Kissing loops* powstają także pomiędzy fragmentami genomowego RNA wirusa HIV podczas procesu dimeryzacji (180). W ramach niniejszej pracy podjęto próbę badania *kissing complex*, utworzonego pomiędzy regulatorowym RNA OxyS a jego docelowym mRNA *fhlA*, za pomocą metody

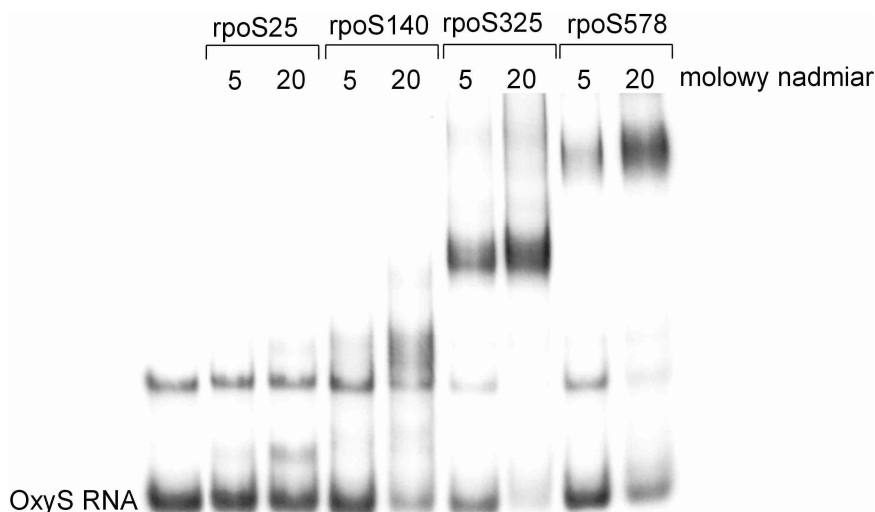
izoenergetycznych mikromacierzy. Przeprowadzone eksperymenty wykazały pewne ograniczenia testowanej metody. Pokazano, że mapowanie mikromacierzowe jest metodą, która nie sprawdza się w analizowaniu tego typu oddziaływań. Jednocześnie na przykładzie kompleksu DsrA RNA/*rpoS*140 pokazano, że metoda ta nadaje się do badania kompleksów RNA/RNA jednakże w przypadku, gdy obszar oddziaływania cząsteczek jest dłuższy, a tym samym powstały kompleks stabilniejszy.

2.8.2. Próby mapowania mikromacierzowego kompleksów OxyS RNA/fragment *rpoS* mRNA

OxyS RNA inhibuje ekspresję *rpoS* mRNA, kodującego podjednostkę sigma polimerazy RNA. Jednakże mechanizm tej inhibicji nie jest znany. Jedną z teorii zakłada, że OxyS RNA „wyłapuje” całą pulę białka Hfq, co z kolei uniemożliwia białku rozluźnienie struktury inhibitorowej w *rpoS* mRNA, tak aby miejsce wiązania rybosomu stało się dostępne i mogła rozpocząć się translacja. Druga teoria zakłada, że oba RNA wraz z Hfq tworzą trójskładnikowy kompleks, którego obecność uniemożliwia rozpoczęcie translacji (98). Z pewnością represja *rpoS* mRNA jest zależna od obecności Hfq, gdyż w mutantach pozbawionych tego białka represja nie zachodzi (98). Wykazano, że do represji *rpoS* niezbędny jest rejon jednoniciowy pomiędzy spinką II a III oraz pętlą spinki III OxyS (98, 99). Jednakże nie rozstrzygnięto czy chodzi tutaj o oddziaływanie z *rpoS* czy z Hfq, aczkolwiek nie wyklucza się bezpośredniego parowania pomiędzy regulatorowym RNA a jego docelowym mRNA.

Postanowiono sprawdzić zdolność wiązania różnej długości fragmentów *rpoS* mRNA do OxyS RNA. Do eksperymentów wybrano *rpoS*25, *rpoS*140, *rpoS*325 oraz *rpoS*578. *RpoS*25 jest rejonem *rpoS* mRNA oddziałującym z DsrA RNA. Ulokowany jest on w strukturze na przeciwko nici zawierającej miejsce wiązania rybosomu. *RpoS*140 zawiera strukturę inhibitorową, która musi zostać rozpleciona, aby możliwe było rozpoczęcie translacji *RpoS*325 jest wydłużony w stronę 5' w stosunku do *rpoS*140. Pokazano, że białko Hfq najefektywniej ułatwia jego oddziaływanie z DsrA RNA. *RpoS*578 jest wydłużony jeszcze bardziej w stronę 5', tak że zawiera cały rejon liderowy. *RpoS*25 otrzymano drogą syntezy chemicznej, natomiast pozostałe RNA wykorzystując technikę PCR oraz transkrypcję *in vitro* (Materiały i Metody). Zdolność wiązania badano przeprowadzając analizy elektroforetyczne w różnych warunkach buforowych. Wyznakowany radioizotopowo OxyS RNA inkubowano w obecności rosnących stężeń poszczególnych fragmentów *rpoS*. Jeżeli inkubację prowadzono w buforze II (0,2 M NaCl, 4 mM MgCl₂), a następnie rozdział

elektroforetyczny w buforze TBE, przy zastosowaniu 50-krotnego molowego nadmiaru fragmentów *rpoS* obserwowano śladowe ilości kompleksów począwszy od *rpoS140*. Dla *rpoS25* nie obserwowano kompleksów. Jeżeli jednak inkubację prowadzono buforze VI (0,2 M NaCl, 10 mM MgCl₂), a następnie rozdział elektroforetyczny w buforze TBM wówczas obserwacje były odmienne (Rysunek 49).



Rysunek 49. Rozdział elektroforetyczny kompleksów OxyS RNA z różnej długości fragmentami *rpoS* mRNA. Analizę prowadzono w 6% żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących w 4°C w buforze TBM, stosując 5- lub 20-krotny molowy nadmiar fragmentów *rpoS* w stosunku do OxyS RNA.

Okazało się, że w warunkach zastosowanych w eksperymencie OxyS RNA można zaobserwować słabe oddziaływania już z *rpoS25*, przy czym dalsze zwiększanie molowego nadmiaru *rpoS25* nie powoduje zwiększenia ilości powstających dupleksów (wyników nie pokazano). Posiada natomiast zdolność oddziaływania z *rpoS140*, *rpoS325* oraz *rpoS578*, przy czym do najefektywniejszego oddziaływania konieczny jest fragment *rpoS* 5'UTR 325 nukleotydowy. Eksperyment pokazał również, że charakter oddziaływań OxyS/*rpoS* mRNA musi być podobny do charakteru oddziaływań OxyS/*fhIA* mRNA, gdzie stabilizującą rolę odgrywają jony magnezu.

Pomimo nieudanej próby hybrydyzacji do mikromacierzy OxyS w kompleksie z *fhIA*, postanowiono przeprowadzić hybrydyzację OxyS RNA w kompleksie z najefektywniej oddziałującym z nim fragmentem *rpoS*, a mianowicie *rpoS325*. Wyznakowane radioizotopowo OxyS RNA oraz poddane fałdowaniu inkubowano z również poddanym fałdowaniu *rpoS325* w buforze hybrydyzacyjnym V (1 M NaCl, 10 mM MgCl₂) lub VI

(0,2 M NaCl, 10 mM MgCl₂). Przeprowadzono również hybrydyzacje kontrolne – sam OxyS RNA oraz sam rpoS325 uprzednio wyznakowany radioizotopowo.

Również te eksperymenty nie dały zadowalającego rezultatu, nie zaobserwowano różnicy w stosunku do macierzy kontrolnej.

Pierwszy raz pokazano, że OxyS RNA posiada zdolność bezpośredniego oddziaływania z *rpoS* mRNA, przy czym najefektywniej wiązany jest fragment rpoS325. Niemniej oddziaływania te są na tyle nie trwałe (kompleksów nie obserwowano, jeżeli rozdział prowadzono w żelu z buforem TBE), iż metoda mikromacierzowa nie pozwala na ich zaobserwowanie. Już wcześniej, wykorzystując niehomologiczną randomową rekombinację oraz selekcję *in vitro* znaleziono dwa rejony w OxyS RNA, które mogłyby być potencjalnymi miejscami oddziaływania z *rpoS* (181). W eksperymentach tych używano jednak fragment *rpoS* zawierający tylko 150 nukleotydów powyżej kodonu start. Eksperymenty przeprowadzone w ramach niniejszej pracy wskazują, że w oddziaływaniu są zaangażowane jeszcze inne rejony 5'UTR tego mRNA. Uzyskany wynik sugeruje, że najprawdopodobniej OxyS RNA inhibuje ekspresję *rpoS* poprzez bezpośrednie oddziaływanie, a nie pośrednio poprzez wyłapywanie całej dostępnej puli Hfq. Obserwacje te wymagają dalszych szczegółowych badań, które wyjaśniłyby mechanizm inhibicji translacji *rpoS* mRNA przez OxyS RNA.

Istnieją doniesienia sugerujące, że Hfq wspomaga lub stabilizuje oddziaływanie pomiędzy OxyS RNA a jego docelowymi mRNA (*fhla* i *rpoS*) (101). Ponadto, kompleks dwóch RNA wraz z białkiem Hfq udało się zaobserwować z wykorzystaniem metody mikromacierzowej dla DsrA RNA. Podjęto więc próbę mającą na celu sprawdzenie czy być może i kompleks trójskładnikowy z udziałem OxyS i fragmentów dwóch jego docelowych mRNA byłby na tyle trwały by można go badać używając nowej metody. Niestety dla obu mRNA próby te zakończyły się niepowodzeniem. Obserwowano obraz identyczny z hybrydyzacją kontrolną (sam OxyS RNA).

IV. PODSUMOWANIE

Celem pracy doktorskiej była optymalizacja oraz wykazanie możliwości, jakie daje opracowana w Pracowni Chemii RNA Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN nowa metoda mapowania mikromacierzowego do badania struktury drugorzędowej RNA.

Jako modelowe do badań wybrano dwa regulatorowe RNA z *E. coli* DsrA RNA oraz OxyS RNA. Zdecydowano się na wybór właśnie tych cząsteczek ze względu na optymalną do planowanych badań długość (około 100 nukleotydów) oraz ich zdolność do oddziaływania z innymi RNA oraz białkiem Hfq. W toku badań opisanych w pracy doktorskiej wykorzystywano mikromacierze izoenergetyczne do określenia struktury drugorzędowej OxyS RNA i DsrA RNA. Analizowano również użyteczność nowej metody do badania struktury obu RNA w kompleksie z białkiem opiekuńczym Hfq oraz w kompleksie z fragmentami docelowych mRNA *rpoS* oraz *fhIA*, a także w kompleksie zawierającym zarówno fragment mRNA, jak i białko Hfq.

Prace rozpoczęto od przygotowania liczącej 855 sond biblioteki izoenergetycznych pentanukleotydów. W kolejnym etapie dobrano odpowiednie warunki drukowania sond. Po dopracowaniu szczegółów technicznych przygotowywania mikromacierzy rozpoczęto badania struktury obu regulatorowych RNA, jak również będących w kompleksach, z wykorzystaniem do tego celu w pierwszej kolejności metody mapowania mikromacierzowego.

Uzyskane wyniki można podsumować w następujących punktach:

1. Przeprowadzone badania z wykorzystaniem mapowania mikromacierzowego doprowadziły do zaproponowania nowej struktury drugorzędowej DsrA RNA. Struktura ta wsparta jest także wynikami mapowania chemicznego. Rozważano także alternatywne sposoby pofałdowania się tego RNA. Są one w zgodne z wynikami mapowania mikromacierzowego i chemicznego, a ich trwałość termodynamiczna wynikałaby ze stabilizujących warstwowych oddziaływań współosiowych budujących je fragmentów helikalnych oraz oddziaływań występujących w pętlach wieloramiennych. W przypadku struktury OxyS RNA mapowania mikromacierzowe oraz chemiczne potwierdziły istnienie wcześniej zaproponowanej struktury drugorzędowej, w obrębie której występuje 27 nukleotydowy rejon jednoniciowy.

2. Wykazano, że proponowana struktura drugorzędowa DsrA RNA oraz jej alternatywne formy, jak również struktura OxyS RNA są zgodne z wynikami mapowania mikromacierzowego oddzielnych motywów strukturalnych zawartych w badanej cząsteczce. Jakkolwiek w każdym z badanych przypadków wiązanie się sond oligonukleotydowych do izolowanych motywów strukturalnych wykazywało ich większą dostępność do hybrydyzacji, niż wówczas, gdy występowały w całej cząsteczce. Szczególnie wyraźnie zależność tą obserwowano dla stabilnych struktur spinkowych, w przypadku których, gdy występowały w całej cząsteczce, nie odnotowano wiązania sond do dwuniciowych trzonów, natomiast obserwowano je w obrębie pętli. Otrzymane wyniki sugerują istnienie oddziaływań stabilizujących strukturę drugorzędową, być może nawet oddziaływań trzeciorzędowych, które nie występują w izolowanych motywach strukturalnych.

3. Wykazano, że hybrydyzowanie określonych oligonukleotydów to wybranych rejonów badanego RNA jest użyteczne w określeniu jego struktury drugorzędowej. Ponadto, jest to prosty sposób identyfikacji alternatywnych miejsc wiązania się sond, jak również dostarcza informacji o możliwych oddziaływaniach wyższego rzędu w obrębie badanego RNA.

4. Przeprowadzając mapowanie chemiczne DsrA RNA oraz OxyS RNA, które miało za zadanie potwierdzenie wyników nowatorskiej metody mapowania mikromacierzowego, wykorzystano chimeryczne startery DNA-LNA. Ten nowy typ starterów wykazuje ogromną przewagę nad tradycyjnymi starterami DNA. Są one szczególnie użyteczne, gdy konieczne jest zhybrydowanie startera w rejonie RNA zawierającym stabilny termodynamicznie element struktury drugorzędowej. Użycie chimerycznych LNA-DNA oligonukleotydów zamiast starterów DNA sprawia, że termodynamicznie stabilniejsze, niż istniejąca struktura drugorzędowa RNA, stają się duplekisy tworzone przez starter i komplementarny fragment badanego RNA. Dzięki zastosowaniu modyfikowanych starterów możliwe było przeprowadzenie odwrotnej transkrypcji, co pozwoliło na wizualizację eksperymentu mapowania chemicznego obu badanych regulatorowych RNA.

5. Testowano użyteczność metody mapowania mikromacierzowego do badania kompleksów RNA/białko. Badania przeprowadzono dla kompleksów DsrA RNA/Hfq oraz OxyS RNA/Hfq. Pokazano, że metodą mikromacierzową można badać strukturę RNA w kompleksie z białkiem oraz określić rejony w RNA uczestniczące w oddziaływaniu z białkiem. Dla DsrA RNA potwierdzono rejony wcześniej uznane za miejsce wiązania Hfq. Natomiast, dla OxyS RNA pokazano, że oddziaływanie z Hfq nie odbywa się w jednym zdefiniowanym jednociowym rejonie cząsteczki, ale ma charakter bardziej złożony.

6. Wykazano, że mapowanie mikromacierzowe jest dobrą metodą badania oddziaływań RNA/RNA. Na przykładzie kompleksu DsrA RNA/*rpoS*25 oraz DsrA RNA/*rpoS*140 z powodzeniem zastosowano mapowanie mikromacierzowe do badania RNA zaangażowanego w oddziaływanie z innym RNA. Pokazano, że rejon sparowania obu cząsteczek może być nieco dłuższy od tego proponowanego w literaturze.

7. Stwierdzono, że metoda mapowania mikromacierzowego może dostarczyć również wiele informacji o strukturze komponentów i oddziaływaniach w kompleksach trójskładnikowych typu RNA/RNA/białko. Pokazano to na przykładzie kompleksu DsrA RNA/*rpoS*140/Hfq. Wyniki tych eksperymentów potwierdziły, że Hfq wzmacnia oddziaływanie pomiędzy obydwoma RNA a w powstałym kompleksie białko pozostaje związane z DsrA powyżej miejsca oddziaływania z *rpoS*.

8. Pokazano, że wydłużony w stronę 5'UTR fragment *fhlA* mRNA (*fhlA*282) oddziałuje bardziej efektywnie z OxyS RNA niż opisany wcześniej w literaturze *fhlA*115. Ponadto pokazano, że OxyS RNA posiada zdolność oddziaływania z *rpoS* mRNA, co sugeruje, że regulacja transkrypcji tego mRNA najprawdopodobniej odbywa się poprzez bezpośrednie sparowanie się z nim.

Reasumując, badania opisane w przedstawionej pracy doktorskiej należy stwierdzić, że doprowadziły one do wyraźnego poszerzenia wiedzy na temat wykorzystania mikromacierzy izoenergetycznych do badania struktury drugorzędowej RNA oraz ich oddziaływań trzeciorzędowych i czwartorzędowych w kompleksach dwu- i trójskładnikowych z innymi RNA i białkami. Wykazano, że metoda mapowania mikromacierzowego cechuje się szybkością wykonania pojedynczego eksperymentu, powtarzalnością uzyskiwanych wyników oraz dużą dowolnością warunków prowadzenia badań. Możliwość szybkiego powtarzania eksperymentów ogranicza też błędy podczas ich prowadzenia. Mapowanie mikromacierzowe dostarcza też informacji o strukturze RNA, których inne metody badania nie pozwalają uzyskać. Dzięki mapowaniu mikromacierzowemu uzyskuje się dane o dostępności pewnych rejonów RNA do oddziaływań z oligonukleotydami. Jest to szczególnie ważne dla prowadzenia badań z wykorzystaniem oligonukleotydów, jako inhibitorów czy ogólniej modulatorów aktywności biologicznej badanych RNA. Ma to bezpośrednie przełożenie na wykorzystanie oligonukleotydów jako potencjalnych terapeutyków. Metody mapowania chemicznego i enzymatycznego wykazują pod tym względem duże ograniczenia (wymogi dotyczące obecności określonych soli i wartości pH).

Pokazano też pewne ograniczenia metody mikromacierzowej takie, jak występowanie alternatywnych miejsc wiązania, możliwość występowania oddziaływań z cząsteczką, której badaniu nie jest dedykowany eksperyment, a także brak możliwości badania słabych kompleksów, jak na przykład kompleks powstały poprzez oddziaływania typu *kissing loops*.

V. MATERIAŁY I METODY

1. *Materiały*

1.1. **Odczynniki**

Kakodylan sodu, kwas hydroksyetylodietylenodiaminoetanolosulfonowy (HEPES), hydrat 3-[(3-cholamidopropyl)dimetyloamoniolo]-1-propanosulfonianu (CHAPS), glukoza, borowodorek sodu, metyloamina, błękit bromofenolowy, cyjanol ksylenowy, glicerol, chlorek amonu, ampicylina, nadsiarazan amonu (APS), bromek etydyny, tetrametyloetylenodiamina (TEMED), siarczan dimetylu (DMS), fenol, chloroform/alkohol izoamyłowy (24:1 v/v), wodorotlenek sodu (NaOH), imidazol, 1-cykloheksylo-3-(2-morfolinoetylo)karbodiimid (CMCT) - **Sigma-Aldrich**

Sól disodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego (Na₂EDTA), chlorek magnezu (MgCl₂), chlorek sodu (NaCl), dodecylsiarazan sodu (SDS), chlorek potasu (KCl), węglan sodu (NaHCO₃), kanamycyna, formamid, sulfotlenek dimetylu (DMSO), octan sodu (CH₃COONa), kwaśny fosforan potasu (K₂HPO₄), kwaśny fosforan sodu (Na₂HPO₄), trihydroksymetylenoaminometan (Tris) – **Fluka**

Pepton, wyciąg drożdżowy, agar, 40% roztwór akrylamid/N,N'-metylenobisakrylamid (29:1 w/v) - **Serva**

Roztwory 5'-trifosforanów deoksyrybonukleozydowych (dATP, dCTP, dGTG, dNTP), roztwory 5'-triosforanów dideoksyrybonukleozydowych (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP,) -

Fermentas

Ketoksal - **ICN Biomedicals Inc.**

Izopropylotiogalaktozyd (IPTG), glicyna, kwas borowy (H₂BO₃) - **Bioskop**

Bezwodnik kwasu N-metyloizotidowego (NMIA) - **Molecular Probes**

Inhibitor proteaz wolny od EDTA (Complete mini) - **Roch**

Kwas octowy, metanol - **Polskie Odczynniki Chemiczne**

Izopropanol - **Chempur**

Amoniak - **Merck**

Agaroz - **Invitrogen**

Mocznik - **Promega**

1.2. Enzymy

Odwrotna transkryptaza SuperScript III – **Invitrogen**

Polimeraza DNA Taq (5U/μl), Kinaza polinukleotydowa T4 (10U/μl), – **Fermentas**

1.3. Plazmidy

Plazmid pET28-Hfq-EC zawierający sekwencje kodującą białko Hfq otrzymano dzięki uprzejmości prof. Andrew L. Feiga z Wayne State University, Detroit, Michigan.

1.4. Akcesoria dodatkowe

Silanizowane płytki mikroskopowe, komory hybrydyzacyjne 9 x 0,8 mm - **Sigma**

Płytki do drukowania mikromacierzy 384 dołkowe – **Perkin Elmer**

Płytki pokryte żelazem krzemionkowym 60 F₂₅₄ 0,25 mm (20x20 cm) – **Merck**

Kolumny zawierające silanizowane podłoże Sep-pak - **Waters**

Kolumny do oczyszczania białek posiadających sekwencję His-Tag metodą chromatografii powinowactwa – **GE Healthcare**

Kolumny do zagęszczania preparatów białkowych, 10,000MW- **Millipore**

1.5. Izotopy promieniotwórcze

[γ ³²P] ATP 4000-5000Ci/mmol – **Hertman Analytic**

1.6. Gotowe zestawy do badań biochemicznych

Zestaw do transkrypcji *in vitro* T7-MEGAshortscript™ – **Ambion**

Zestawy do oczyszczania DNA: QIAquick PCR Purification Kit - **Qiagen**

1.7. Szczepy bakteryjne

Escherichia coli szczep DH5α - **Gibco BRL**

Escherichia coli szczep BL21 DES pLysS – **Sigma-Aldrich**

1.8. Wzorce długości kwasów nukleinowych

Wzorzec długości DNA do rozdziłu elektroforetycznego w żelach agarozowych w warunkach natywnych -1kB 0,5mg/ml – **Sigma-Aldrich**

Wzorce masy białek do rozdziłu elektroforetycznego w żelach poliakrylamidowych w warunkach denaturujących – SeeBlue Plus 2 - **Invitrogen**

1.9. Oligonukleotydy

Oligorybonukleotydy:

nazwa	długość	sekwencja zapisana w orientacji 5'→3'
rpoS25	25	GAAAUUCGUUACAAGGGGAAUCCG
fhlA9	9	UUCCUGGAA
fhlA11	11	ACAAGGGUUGU
DsrA spinka III	25	AUCCCGACCCCUACAGGGUCGGGAU
OxyS spinka III	19	GCGGAUCUCCAGGAUCCGC
DsrA rejon II (23-60)	38	AACGAAUUUUUAAGUGCUUCUUGCUUAAGCAAGUUUC
OxyS rejon II (48-90)	43	GAGAGUUUCUCAACUCGAAUAACUAAAGCCAACGUGAACUUUU

Oligodezoksyrybonukleotydy stosowane jako startery w reakcjach PCR w celu uzyskania matryc do transkrypcji *in vitro*, jako startery w reakcjach sekwencjonowania, oraz jako startery w reakcji odwrotnej transkrypcji:

nazwa	długość	sekwencja zapisana w orientacji 5'→3'
DsrA1	66	TAATACGACTCACTATA GGAACACATCAGATTTCTGGTGTAACGAATTTTT TAAGTGCTTCTTGC
DsrA2	63	AAATCCCGACCCTGAGGGGGTCGGGATGAAACTTGCTTAAGCAAGAAGCACT TAAAAAATTTCG
DsrAśr-3	20	GCTTAAGCAAGAAGCACTTA
DsrA-3	18	AAATCCCGACCCTGAGG
OxyS1	78	TAATACGACTCACTATA GAAACGGAGCGGCACCUCUUUUAAACCUUGAAGUC ACUGCCCGUUUCGAGAGUUUCUCAAC
OxyS2	74	AGCGGATCCTGGAGATCCGCAAAAGTTACGTTGGCTTTAGTTATTCGAGTT GAGAACTCTCGAAACGGGCAG
OxySśr-3	23	CGAGTTGAGAACTCTCGAAACG
OxyS-3	22	AGCGGATCCTGGAGATCCGCAA

FhlA135_1	58	<u>GTTAGTCAATGACCTTTTGCACCGCTTTGCGGTGCTTTCCTGGAAGAACAAA</u> <u>ATGTCA</u>
FhlA135_2	69	<u>CGAACCAACCCCTTGTTGTCCGAGATCACTCATCGGTGTATATGACATTTTGTT</u> <u>CTTCCAGGAAAGCACCG</u>
FhlA135_3	40	<u>TAATACGACTCACTATA</u> AGGAGTTAGTCAATGACCTTTTGC
FhlA135_4	33	TGTCCGAGTGATGT <u>CGAACCAACCCCTTGTTGTCC</u>
RpoS157_1	65	<u>ATAGGCATTTTGAAATTCGTTA</u> CAAGGGGAAATCCGTAAACCCGCTGCGTTA TTTGCCGCAGCGA
RpoS157_2	69	<u>TGATCCCTTGACGGAACATTCAAGCAAAAAGCC</u> TGGTTCCGCCGATTTATCGC TGCGGCAAATAACGCAG
RpoS157_3	36	<u>TAATACGACTCACTATA</u> AGGCATTTTGAAATTCGTTA
RpoS157_4	62	AATTCTGACTCATAAGGTGGCTCCTACCCGT <u>GATCCCTTGACGGAACATTC</u> <u>AGCAAAAAGCC</u>
T7	18	<u>TAATACGACTCACTATAG</u>
seqF3	16	TGTCCGAGTGATGTGCG
SeqR3	21	AATTCTGACTCATAAGGTGGC
Rd578	22	GTATTCTGACTCATAAGGTGGC
Ru578	36	<u>TAATACGACTCACTATA</u> AGGGTGAACAGAGTGCTAAC
Ru325	36	<u>TAATACGACTCACTATA</u> AGGCCGCGTTGTTTATGCTG
Fu282	43	<u>TAATACGACTCACTATA</u> AGGCAGCGTTACATTCCCATCCACTGG
Fd282	25	GTGTCCGAGTGATGT <u>CGAACCAACCC</u>

Kolorem czerwonym zapisano sekwencje promotorowe polimerazy RNA T7, podkreślono fragmenty nakładające się.

Startery DNA-LNA:

nazwa	długość	sekwencja zapisana w orientacji 5'→3'
OxyS-LNA	19	AGcGgATCctgGaGaTCCG
DsrA-LNA	17	AAATcCcGAcCctgAGG

Małymi literami w kolorze czerwonym zapisano reszty nukleotydowe typu LNA

Sondy użyte do eksperymentów przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej, wybrane z 855 dostępnych w obrębie biblioteki izoenergetycznej, zawierające C6-aminoheksylový łącznik na końcu 5':

nazwa	sekwencja
3	DDDDGG
7	DDDCGG
8	DDDCUG

nazwa	sekwencja
216	DUCCUG
223	DUCUGG
225	DUGDDG

nazwa	sekwencja
506	CUUGCG
514	GDDDCG
514	GDDDCG

nazwa	sekwencja
742	GUGCC
754	GUUDCG
757	GUUDCG

8	DDDCUG	239	DUGUGG	522	GDAGCG	758	GUUCCG
9	DDDGAG	247	DUUCGG	534	GACCC	761	GUUGDG
12	DDDGUG	247	DUUCGG	545	GDGDDG	763	GUUGGG
14	DDDUUG	257	CDDDDG	548	GDGDUG	778	UDDGCG
27	DDCGGG	265	CDDGDD	555	GAGGG	786	UDCDCG
30	DDCUUG	267	CDDDGG	556	GDGGUG	835	UCDDGG
32	DDCUUG	277	CDCCAG	566	GDUCCG	839	UCDCGG
33	DDGDDG	284	CDCGUG	566	GDUCCG	855	UCCCG
35	DDGDGG	297	CDGGAG	569	GDUGDG	858	UCCGC
37	DDGCDG	303	CDGUGG	572	GDUGUG	860	UCCGUG
43	DDGGG	331	CCDDGG	577	GCDDDG	863	UCCUGG
54	DDUCCG	345	CCCGA	579	GCDDDG	865	UCGDAG
70	DCDCC	351	CCCUG	584	GCDUCG	867	UCGDGG
83	DCCDGG	354	CCGDC	588	GCDGUG	875	UCGGG
88	ACCCUG	357	CCGCA	602	GCCGC	887	UCUCGG
107	DCGGG	360	CCGCU	617	GCGGA	889	UCUGDG
112	DCGUUG	368	CCGUUG	630	GCUCC	897	UGDDDG
120	DCUCUG	377	CCUGDG	637	GCUUDG	904	UGDCUG
126	DCUUCG	379	CCUGG	641	GGDDDG	905	UGDGDG
129	DGDDDG	385	CGDDDG	649	GGDGAG	907	UGDGGG
131	DGDDGG	390	CGDCC	654	GGDUCC	911	UGDUGG
139	DGDGG	396	CGDGUG	655	GGDUGG	919	UGCCG
142	DGDUCG	401	CGCDDG	659	GGCDGG	928	UGCUUG
145	DGCDDG	414	CGCUCG	672	GGCUUG	931	UGGDGG
146	AGCDCG	420	CGGDUG	676	GGGDUG	936	UGGCUG
155	AGCGG	425	CGGGA	677	GGGCA	956	UGUGUG
161	DGGDDG	426	CGGGC	683	GGGGG	958	UGUUCG
171	AGGGG	447	CGUUGG	684	GGGGU	978	UUCDCG
172	AGGGUG	471	CUCCGG	686	GGGUC	982	UUCCCG
175	AGGUGG	473	CUCGDG	688	GGGUUG	985	UUCGDG
185	DGUGDG	478	CUUCUG	695	GGUCGG	988	UUCGUG
190	DGUUCG	483	CUGDGG	698	GGUGC	995	UUGDGG
191	DGUUGG	484	CUGDUG	701	GGUUDG	1000	UUGCUG
214	AUCCCG	489	CUGGDG	731	GUCGG	1002	UUGGCG
215	AUCCGG	501	CUUCDG	738	GUGDCG		

Czerwonym kolorem oznaczono reszty nukleotydydowe typu LNA, czarnym 2'-o-metylowane a niebieskim dodatkową resztę LNA G. Literą D oznaczono 2,6-diaminopurynoribozyd.

Dodatkowe sondy heptamerowe, zawierające C6-aminołącznik na końcu 5':

nazwa	sekwencja	nazwa	sekwencja	nazwa	sekwencja
21-7	U <u>U</u> DDDDG	71-7	UUUD <u>G</u> UU	31-7	DDDD <u>D</u> U
22-7	<u>G</u> UUDDDD	72-7	<u>C</u> UUUAGU	34-7	<u>C</u> UUDDDD
23-7	GGU <u>U</u> DDA	73-7	GC <u>U</u> UUDG	35-7	DC <u>U</u> UDDD
66-7	UU <u>D</u> UUCG	74-7	GG <u>C</u> UUUA	36-7	CD <u>C</u> UUDA
68-7	D <u>G</u> UUUUU	24-7	UC <u>G</u> UUAC	49-7	<u>C</u> UU <u>A</u> AGC
69-7	U <u>D</u> GUUDU	28-7	<u>A</u> ADUUCG		
70-7	UU <u>D</u> GUUD	29-7	DDDD <u>U</u> UC		

Czerwonym kolorem oznaczono reszty nukleotydowe typu LNA, czarnym 2'-O-metylowane. Literą D oznaczono 2,6-diaminopurynorybozyd.

Modyfikowane oligonukleotydy komplementarne do DsrA RNA oraz OxyS RNA

nazwa	długość	sekwencja zapisana w orientacji 5'→3'
d1	15	GDDDCUUG <u>C</u> UDDG <u>C</u>
o1	11	<u>C</u> GDGUUGDGD
o2	16	<u>G</u> UUGGC <u>U</u> UDGUUD <u>U</u>
o3	15	GDDDCUUG <u>C</u> UDDG <u>C</u>

Czerwonym kolorem oznaczono reszty nukleotydowe typu LNA, czarnym 2'-O-metylowane. Literą D oznaczono 2,6-diaminopurynorybozyd.

1.10. Roztwory i bufory

Faza rozwijająca do chromatografii cienkowarstwowej

n-propanol/amoniak/woda 55/35/10 v/v/v

Bufor do rozdzielania elektroforetycznego białek w warunkach denaturujących

25 mM Tris-HCl; pH 8,3

192 mM glicyna

0,1% SDS

Roztwory do wybarwiania białek rozdzielonych metodą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym

Roztwór barwiący

50% metanol

10% kwas octowy

0,05% w/v Serva Blue R-250

Roztwór odbarwiający

5% metanol

13% kwas octowy

Bufor TBE do rozdziału elektroforetycznego kwasów nukleinowych w żelach agarozowych i poliakrylamidowych (10x stężony)

1 M Tris

1 M kwas borowy

10 mM Na₂EDTA; pH 8,3

Do rozdziału elektroforetycznego w żelach poliakrylamidowych stosowano bufor 1x stężony, natomiast do rozdziału elektroforetycznego w żelach agarozowych stosowano bufor 0,5x stężony.

Bufor TBM do rozdziału elektroforetycznego kwasów nukleinowych w nienaturujących żelach poliakrylamidowych (10x stężony)

1 M Tris

1 M kwas borowy

100 mM MgCl₂

Do rozdziału elektroforetycznego w żelach poliakrylamidowych stosowano bufor 1x stężony.

Bufor obciążający do rozdziału elektroforetycznego kwasów nukleinowych w żelach agarozowym w warunkach nienaturujących (6x stężony)

25 mM Tris-HCl, pH 7,5

25% (w/v) glicerol

0,2% (w/v) błękit bromofenolowy

0,2% (w/v) cyjanol ksylenowy

Bufor obciążający do rozdziału elektroforetycznego kwasów nukleinowych w żelach poliakrylamidowych w warunkach nienaturujących (10x stężony)

10 mM Tris-HCl, pH 7,5

50% (w/v) glicerol

0,2% (w/v) błękit bromofenolowy

0,2% (w/v) cyjanol ksylenowy

Roztwory obciążające do rozdzielania elektroforetycznego kwasów nukleinowych w żelach poliakrylamidowych, w warunkach denaturujących**Roztwór z mocznikiem**

- 8 M mocznik
- 0,2% (w/v) błękit bromofenolowy
- 0,2% (w/v) cyjanol ksylenowy

Roztwór z formamidem

- 80% (v/v) formamid
- 10 mM EDTA
- 0,2% (w/v) błękit bromofenolowy
- 0,2% (w/v) cyjanol ksylenowy

Roztwory dodawano do próbki w stosunku 1:1 v/v i nakładano na żel. W przypadku rozdzielania po mapowaniu chemicznym próby przed nałożeniem na żel denaturowano 3 minuty w temperaturze 95°C.

Bufor SB do rozdzielania elektroforetycznego białek w żelach poliakrylamidowych, w warunkach denaturujących (4 x stężony)

- 200 mM Tris-HCl; pH 6,9
- 20% β-merkaptoetanol
- 8% SDS
- 0,15% błękit bromofenolowy
- 40% glicerol

Bufor do elucji kwasów nukleinowych z żelu poliakrylamidowego

- 0,3 M CH₃COONa, pH 5,5

Bufor do topień UV

- 5 mM NaCl
- 5 mM kakodylan sodu
- 0,5 mM Na₂EDTA; pH 7,0

Bufory do hybrydyzacji na mikromacierzy**Bufor I**

1 M NaCl
4 mM MgCl₂
10 mM Tris-HCl; pH 7,5

Bufor II

200 mM NaCl
4 mM MgCl₂
10 mM Tris-HCl; pH 7,5

Bufor III

1 M NaCl,
0,2 mM MgCl₂
10 mM Tris-HCl; pH 7,5

Bufor IV

200 mM NaCl
0,2 mM MgCl₂
10 mM Tris-HCl; pH 7,5

Bufor V

1 M NaCl
10 mM MgCl₂
10 mM Tris-HCl; pH 7,5

Bufor VI

200 mM NaCl
10 mM MgCl₂
10 mM Tris-HCl; pH 7,5

Bufor VII

200 mM NaCl
30 mM MgCl₂
10 mM Tris-HCl; pH 7,5

Bufor VIII

1 M NaCl
0,5 mM Na₂EDTA
10 mM Tris-HCl; pH 7,5

Bufor IX

200 mM NaCl
0,5 mM Na₂EDTA
10 mM Tris-HCl; pH 7,5

Bufor PBS do drukowania mikromacierzy

137 mM NaCl
2,7 mM KCl
4,3 mM Na₂HPO₄·7H₂O
1,4 mM KH₂PO₄; pH 7,3

Roztwór do redukcji nadrukowanych sond37 mM NaBH₄

72% bufor PBS

28% etanol

Bufory do oczyszczania białka Hfq**Bufor do lizy**

50 mM HEPES, pH 7,5

500 mM NH₄Cl

20 mM imidazol

5% (w/v) glicerol

Bufor płuczący

50 mM HEPES, pH 7,5

1 M NH₄Cl

5% (w/v) glicerol

Bufory elucyjne

50 mM HEPES, pH 7,5

500 mM NH₄Cl

50-500 mM imidazol

5% (w/v) glicerol

Bufor czyszczący kolumnę

50 mM HEPES, pH=7,5

8 M mocznik

1 M NH₄Cl50 mM Na₂EDTA

5% (w/v) glicerol

Bufor do przechowywania białka Hfq

50 mM HEPES, pH 7,5

250 mM NH₄Cl1 mM Na₂EDTA

10% (w/v) glicerol

1.11. Pożywki**Pożywka stała LB z kanamycyną i chloramfenikolem**

2 g pepton

1,25 g wyciąg drożdżowy

1,25 g NaCl

3,75 g agar

dopełniano H₂O do 250 ml i sterylizowano w autoklawie, po schłodzeniu do temperatury 55°C do otrzymanego roztworu dodawano roztworu kanamycyny do stężenie końcowego 50 µg/ml oraz roztworu chloramfenikolu do stężenia końcowego 34 µg/ml. Pożywkę wylewano na płytki na stole z laminarnym przepływem powietrza.

Pożywka płynna LB

10 g pepton

5 g wyciąg drożdżowy

5 g NaCl

dopełniano H₂O do 1000 ml i sterylizowano w autoklawie

Pożywka płynna LB z kanamycyną i chloramfenikolem

Do płynnej pożywki LB dodawano roztworu kanamycyny do stężenie końcowego 50 µg/ml oraz roztworu chloramfenikolu do stężenia końcowego 34 µg/ml

Roztwory wyjściowe antybiotyków:

roztwór chloramfenikolu w etanolu 34 mg/ml

roztwór kanamycyny w wodzie 10 mg/ml

1.12. Żele

Żele agarozowe

1% lub 1,5% roztwór agarozy w buforze 0,5x TBE podgrzewano w kuchence mikrofalowej; dodawano bromku etydydy do końcowego stężenia 7,5 µg/ml, wylewano do aparatu do elektroforezy pozostawiano do polimeryzacji.

Żele poliakrylamidowe do rozdzielania elektroforetycznego białek

Żel rozdzielający 15%

15% w/v akrylamid/N,N'-metylenobisakrylamid (29:1)

250 mM bufor Tris-HCl, pH=8,7

0,1% (w/v) SDS

0,1% (w/v) APS

0,04% (v/v) TEMED

wylewano pomiędzy szyby i spryskiwano 1% SDS, pozostawiano do polimeryzacji.

Żel zagęszczający 5%

5% w/v akrylamid/N,N'-metylenobisakrylamid (29:1)

126 mM bufor Tris-HCl, pH=6,8

0,1% (w/v) SDS

0,1% (w/v) APS

0,1% (v/v) TEMED

wylewano pomiędzy szyby powyżej wcześniej spolimeryzowanego żelu rozdzielającego, pozostawiano do polimeryzacji.

Żele poliakrylamidowe do rozdzielania elektroforetycznego kwasów nukleinowych w warunkach denaturujących

6, 8 lub 12% w/v akrylamid-N,N'-metylenobisakrylamid (29:1)

1x bufor TBE

8 M mocznik

0,6% (w/v) APS

0,04% (v/v) TEMED

mieszaninę wylewano między szyby i pozostawiano do polimeryzacji.

Żele poliakrylamidowe do rozdzielania elektroforetycznego kwasów nukleinowych w warunkach niedenaturujących

6, 8, 12 lub 16% w/v akrylamid-N,N'-metylenobisakrylamid (29:1)

1x bufor TBE lub TBM

0,6% (w/v) APS

0,04% (v/v) TEMED

mieszaninę wylewano między szyby i pozostawiano do polimeryzacji.

1.13. Ważniejsza aparatura

- syntetyzer MerMade 12 BioAutomation Corporation
- syntetyzer Applied Biosystems 393
- phosphoimager Typhoon G-8600 Amersham Pharmacia
- phosphoimager FLA-5100 Fuji

- licznik scyntylicyjny LS5000TA Beckman
- spektrometr masowy MALDI-TOF Bruker Autoflex
- drukarka do mikromacierzy SpotArray 24 PerkinElmer

2. Metody

2.1. Synteza chemiczna oligonukleotydów

Syntezę oligonukleotydów metodą amidofosforynową na podłożu stałym przeprowadzano na syntetyzerach Applied Biosystems 392 oraz BioAutomation Corporation MerMade 12. Do syntezy wykorzystano handlowo dostępne amidofosforyny RNA, DNA oraz 2'-O-metyloRNA. Amidofosforyny LNA oraz 2'-O-metylo-2,6-diaminopurynorybozydów zostały zsyntetyzowane w Pracowni Chemii RNA.

2.2. Odblokowywanie i oczyszczanie modyfikowanych oligonukleotydów zawierających C6-aminoheksylowy łącznik na końcu 5', stosowanych jako sondy na mikromacierzy.

Do podłoża zawierającego oligorybonukleotydy dodawano 1 ml 40% wodnego roztworu metyloaminy i pozostawiano w temperaturze pokojowej przez 16 godzin. Następnie zbierano roztwór z nad podłoża, po czym podłoże przemywano dwukrotnie 0,5 ml wody. Zebrany roztwór odparowywano do sucha.

W celu usunięcia grupy monometoksytrytylowej zlokalizowanej na C6-aminoheksylowym łączniku do suchych próbek dodawano 0,9 ml 80% wodnego roztworu kwasu octowego i inkubowano 3 godziny w temperaturze pokojowej i odparowywano do sucha.

Próbki rozpuszczano w 0,5 ml wody i przenoszono do nowej próbówki, poprzednie próbówki przepłukiwano dwukrotnie 250 μ l wody. Całość wirowano 5 minut przy 10 000 rpm, klarowny roztwór przenoszono do kolejnej nowej próbówki, a osad przepłukiwano 200 μ l wody. Zebrany roztwór odparowywano do sucha.

Tak przygotowane próbki rozpuszczano w 150 μ l wody i oczyszczano metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) na płytkach analitycznych z żelem krzemionkowym 60 F₂₅₄ z zastosowaniem fazy rozwijającej n-propanol/amoniak/woda. Prażki zawierające pożądane oligonukleotydy izolowano z płytki, po czym eluowano trzykrotnie przemywając 2

ml wody. Połączone frakcje odparowywano do sucha. próbki rozpuszczano w 500 μ l wody i przenoszono do nowych probówek. Poprzednie probówki przepłukiwano jeszcze dwukrotnie 200 μ l wody. Całość wirowano 5 minut przy 10 000 rpm. Roztwór przenoszono do nowych probówek. Pozostałości silikażelu przepłukiwano 200 μ l i wirowano 5 minut przy 10 000 rpm, roztwór z nad silikażelu łączono z wcześniej zebrany.

Następnie przeprowadzano analizę masową związków, za pomocą spektrometru masowego MALDI-TOF.

Stężenie oligonukleotydów obliczano korzystając z współczynnika ekstynkcji przewidzianego dla RNA oraz pomiaru absorpcji. Absorbencję mierzono spektrofotometrycznie w świetle UV o długości fali 260 nm.

2.3. Odblokowywanie i oczyszczanie modyfikowanych oligorybonukleotydów

Odblokowywanie i oczyszczanie przeprowadzano analogicznie jak w punkcie 1 z pominięciem etapu inkubacji z kwasem octowym.

2.4. Odblokowywanie i oczyszczanie oligorybonukleotydów

Do podłoża zawierającego oligorybonukleotydy dodawano 1,5 ml 28% wodnego roztworu amoniaku oraz 0,5 ml etanolu. Inkubowano w temperaturze 55°C przez 16 godzin. Próbkę schładzano 20 minut w temperaturze -20°C, następnie odsączano podłoże i przemywano dwukrotnie 0,5 ml wody. Roztwór odparowywano do sucha.

Do suchych próbek dodawano 100 μ l N,N'-dimetyloformamidu i ponownie odparowywano. Dodawano 30 μ l N,N'-dimetyloformamidu i 270 μ l fluorowodoru trietyloamoniowego i inkubowano 2,5 godziny w temperaturze 55°C, co jakiś czas mieszając.

Następnie do próbek dodawano 4 ml n-butanolu i strącano przez 1 godzinę w temperaturze -20°C. Zawiesinę wirowano 10 minut przy 5 000 rpm, roztwór zlewano, a otrzymany osad suszono pod próżnią.

Oligorybonukleotydy odsalano za pomocą kolumn zawierających silanizowane podłoże C18 (Sep-pak). Przed nałożeniem prób na kolumny przemywano 10 ml acetonitrylu, a następnie 10 ml 10 mM roztworu octanu amonu. Suche próbki rozpuszczano w 10 ml 10 mM roztworu octanu amonu i nakładano na przygotowaną kolumnę. Zbierano trzy frakcje: L - zebrana po nałożeniu próbki, W – wmywana 10 ml 10 mM roztworu octanu amonu oraz C – frakcja właściwa zawierająca oczyszczony oligorybonukleotyd wmywany 5 ml roztworu

acetonitryl/woda (3:7 v/v). Zawartość wszystkich trzech frakcji sprawdzano przeprowadzając analityczną chromatografię na płytce silikażelowej (TLC). Frakcję C odparowywano do sucha.

Tak przygotowane oligorybonukleotydy oczyszczano, jeżeli ich długość wynosiła do kilkunastu nukleotydów, na płytkach silikażelowych analogicznie jak w punkcie 1 lub jeżeli były dłuższe, za pomocą rozdzielania elektroforetycznego w denaturującym żelu poliakrylamidowym. Rozdzielone kwasy nukleinowe lokalizowano dzięki zastosowaniu światła UV o długości fali 260 nm; pożądanej długości prążki wycinano z żelu, z wyciętych fragmentów żelu eluowano oligorybonukleotydy a następnie strącano.

Każdorazowo przeprowadzano analizę masową związków, za pomocą spektrometru masowego MALDI-TOF.

2.5. Odblokowywanie i oczyszczanie oligodezoksyrybonukleotydów oraz oligodezoksyrybonukleotydów zawierających w niektórych pozycjach nukleotydy typu LNA

Do podłoża zawierającego oligodezoksyrybonukleotydy dodawano 1,5-2 ml 28% wodnego roztworu amoniaku. Inkubowano w temperaturze 55°C przez 16 godzin. Próbki schładzano 20 minut w temperaturze -20°C, następnie odsączano podłoże i przemywano dwukrotnie 0,5 ml wody. Roztwór odparowywano do sucha.

Odblokowane kwasy nukleinowe oczyszczano metodą rozdzielania elektroforetycznego w denaturującym żelu poliakrylamidowym. Rozdzielone kwasy nukleinowe lokalizowano dzięki zastosowaniu światła UV o długości fali 260 nm; prążki reprezentujące pożądanej długości kwasy nukleinowe wycinano z żelu, z wyciętych fragmentów żelu eluowano oligorybonukleotydy a następnie strącano.

Następnie przeprowadzano analizę masową związków, za pomocą spektrometru masowego MALDI-TOF

2.6. Znakowanie końca 5' kwasów nukleinowych izotopem ³²P

Reakcję przeprowadzano w celu uzyskania znakowanych radioizotopowo cząsteczek RNA, DNA oraz modyfikowanych oligonukleotydów.

Reakcją prowadzono zgodnie z zaleceniami producenta. Zwykle reakcję przeprowadzano w objętości 10 µl, mieszanina reakcyjna zawierała: 10-100 pmoli kwasu

nukleinowego z wolną grupą hydroksylową na końcu 5', 10-20 μCi [γ - ^{32}P] ATP o aktywności 4000-5000 Ci/mmol, 5-10 U (0,5-1 μl) kinazy polinukleotydowej T4 oraz bufor dostarczony wraz z enzymem. Reakcję prowadzono przez 30 minut w 37°C.

Produkty reakcji oczyszczano metodą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. Następnie wykonywano autoradiografię po czym wycinano z żelu pożądany prążek. Z wyciętych fragmentów żelu eluowano kwasy nukleinowe a następnie strącano.

2.7. Elektroforeza DNA w żelach agarozowych

Produkty reakcji PCR, stanowiące matryce do reakcji transkrypcji *in vitro* poddawane były analizie metodą elektroforezy w 1% lub 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny (7,5 $\mu\text{g/ml}$) w warunkach natywnych.

Do preparatów rozdzielanych w żelu dodawano 1/6 objętości buforu obciążającego. Rozdział prowadzono w buforze 0,5x TBE przy natężeniu 40-50 mA i napięciu 120-130 V. Produkty rozdziału elektroforetycznego analizowano w świetle UV.

2.8. Elektroforeza kwasów nukleinowych w żelach poliakrylamidowych w warunkach denaturujących

Metodę elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących stosowano do oczyszczania cząsteczek RNA po reakcji transkrypcji *in vitro* oraz do oczyszczania oligonukleotydów syntetyzowanych chemicznie (grubość żelu 1 mm); a także do oczyszczania kwasów nukleinowych po znakowaniu izotopowym i do analizy produktów reakcji wydłużania startera (ang. *primer extension*) przeprowadzanej po chemicznym mapowaniu struktury drugorzędowej RNA (grubość żelu 0,5 mm).

Stosowano żel poliakrylamidowy o usieciowaniu 29:1 (stosunek wagi akrylamidu do bisakrylamidu) z 8 M mocznikiem. Jako buforu elektroforetycznego używano 1x TBE. Sporządzano żele 6, 8 i 12% w zależności od długości rozdzielanych cząsteczek. Elektroforezę prowadzono przy mocy prądu 30-40 W (żel 42 x 22 cm) lub 40-55 W (żel 42 x 33 cm). Każdą elektroforezę poprzedzano 15-30 minutową preelektroforezą. Próbkę przed nałożeniem na żel rozcieńczano w stosunku 1:1 v/v barwnikami obciążającymi.

2.9. Elektroforeza kwasów nukleinowych, kompleksów kwasów nukleinowych oraz kompleksów kwasów nukleinowych z białkiem w żelach poliakrylamidowych w warunkach niedenaturujących

Metodę elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących stosowano do analizy homogenności badanych cząsteczek RNA, analizy formowania kompleksów RNA/białko Hfq, kompleksów RNA/RNA, kompleksów sonda/Hfq oraz trójskładnikowych kompleksów RNA/RNA/Hfq a także analizy tworzenia kompleksów RNA z niemodyfikowanymi oraz modyfikowanymi starterami.

Stosowano płyty o rozmiarze 20 x 27 cm i przekładki o grubości 1 mm. Elektroforezę prowadzono przy mocy prądu 20 W, stosując system chłodzący o stałej temperaturze 4°C. Każdą elektroforezę poprzedzano 15-30 minutową preelektroforezą. Stosowano żel poliakrylamidowy o usieciowaniu 29:1 (stosunek wagowy akrylamidu do bisakrylamidu). Jako buforu elektroforetycznego używano 1x TBE lub 1x TBM. Sporządzano żele 6, 8, 12 i 16% w zależności od długości rozdzielanych cząsteczek. Do próbek dodawano barwnika obciążającego w trakcie sporządzania mieszaniny reakcyjnej. Próbki nakładano na schłodzony żel.

Po zakończeniu elektroforezy żel suszono. Obraz wizualizowano używając ekranów odwzorowujących i komputerowego skanera materiałów znakowanych radioizotopowo (PhosphorImager, Typhoon 8600 lub FLA-5100). Analizy ilościowe wykonywano z użyciem oprogramowania ImageQuant (Molecular Dynamics) lub MultiGauge V3.0 (FujiFilm)

2.10. Elektroforeza białek w żelach poliakrylamidowych w obecności SDS

Metodę tą stosowano do kontroli poszczególnych etapów nadekspresji oraz oczyszczania białka Hfq. Zgodnie ze standardową procedurą żele składały się z dwóch warstw: 5% żelu zagęszczającego pH 6,8 oraz 15 % żelu rozdzielającego pH 8,8. Stosowano bufor do elektroforezy białek. Elektroforezę prowadzono w żelach o rozmiarze 10 x 6,5 cm i grubości 1 mm. Do próbek dodawano 1/4 objętości buforu 4x SB; następnie preparaty poddawano denaturacji 3 minuty w 95°C, po czym inkubowano 5 minut na lodzie i nanoszono na żel. Początkowe warunki rozdziału wynosiły: natężenie 25 mA oraz napięcie 80 V (w żelu zagęszczającym). Po wejściu preparatów w żel rozdzielający, podwyższono natężenie do 50 mA, a napięcie do 200 V.

Produkty rozdziału elektroforetycznego wybarwiano w roztworze barwiącym przez 1 godzinę, stosując lekkie wytrząsanie, następnie odbarwiano w roztworze odbarwiającym, po czym skanowano obraz żelu.

2.11. Elucja kwasów nukleinowych z żelu poliakrylamidowego

Fragmenty żelu zawierające kwasy nukleinowe przenoszono do probówek, dodawano buforu do elucji i wytrząsano przy 1000 rpm przez około 2 godziny w temperaturze 4°C. Zbierano supernatant do osobnych probówek, do fragmentów żelu ponownie dodawano buforu do elucji i wymywano kwasy nukleinowe przez 16 godzin w temperaturze 4°C. Zbierano drugi supernatant, łączono z pierwszym i wytrącano zawarte w nich kwasy nukleinowe.

2.12. Strącanie kwasów nukleinowych po elucji z żelu poliakrylamidowego

W celu precypitacji kwasów nukleinowych do otrzymanych po elucji supernatantów dodawano 3 objętości schłodzonego do 4°C 96% etanolu; wytrącano w temperaturze -20°C przez 2 godziny. Mieszaninę wirowano przy 12 000 rpm, w temperaturze 4°C przez 30 minut i supernatant usuwano. W niektórych przypadkach w celu usunięcia soli osad dodatkowo przepłukiwano 70% etanolem, wirowano przy 12 000 rpm, w temperaturze 4°C przez 10 minut. Supernatant dekantowano, a osad suszono pod próżnią. Próbkę przechowywano w -20°C w stanie zliofilizowanym lub rozpuszczone w sterylnej wodzie.

Stężenie kwasów nukleinowych określano na podstawie pomiaru absorpcji światła UV o długości fali 260 nm oraz korzystając z obliczonego współczynnika ekstynkcji. W przypadku cząsteczek znakowanych radioizotopowo mierzono radioaktywność przy użyciu licznika scyntylicyjnego

2.13. Oczyszczanie kwasów nukleinowych metodą fenol-chloroform

Produkty reakcji PCR oczyszczano poprzez wytrząsanie z 0,5 objętości fenolu i 0,5 objętości mieszaniny chloroform/alkohol izoamylowy 24:1 (v/v). Mieszaninę wirowano przy 10 000 rpm przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Zbierano górną fazę wodną i czynność powtarzano. Następnie do zebranej górnej fazy wodnej dodawano 1 objętość mieszaniny chloroform/alkohol izoamylowy 24:1 (v/v) w celu usunięcia śladów fenolu i ponownie wytrząsano i wirowano. DNA zawarte w otrzymanej fazie wodnej wytrącano w -20°C

poprzez dodanie 0,3 M octanu sodu pH 5 oraz 3 objętości schłodzonego do 4°C 96% etanolu. Mieszaninę wirowano przy 12 000 rpm, w temperaturze 4°C przez 30 minut. Supernatant usuwano a osad suszono pod próżnią. Próbki przechowywano w -20°C w stanie zliofilizowanym lub rozpuszczone w sterylnej wodzie. Stężenie kwasów nukleinowych określano na podstawie pomiaru absorpcji światła UV o długości fali 260 nm oraz korzystając z obliczonego współczynnika ekstynkcji.

2.14. Otrzymywanie matryc do transkrypcji *in vitro*

Otrzymywanie matryc do transkrypcji *in vitro*, której produktem były cząsteczki OxyS i DsrA

W celu otrzymania matrycowych dwuniciowych DNA wykorzystywanych do reakcji transkrypcji *in vitro*, której produktem były cząsteczki DsrA i OxyS RNA przeprowadzano hybrydyzacje równomolowych ilości dwóch oligomerów OxyS1 i OxyS2 dla OxyS oraz DsrA1 i DsrA2 dla DsrA, a następnie reakcje PCR. Standardowa mieszanina reakcyjna zawierała parę oligomerów, każdy o stężeniu 1,5 µM, 3 mM MgCl₂, mieszanina czterech dNTP każdy o stężeniu 0,2 mM, bufor z KCl dostarczony wraz z enzymem, 5U polimerazy Taq.

Warunki reakcji PCR były następujące:

a) wstępna denaturacja 5 minut 95°C

b) 8 cykli obejmujących:

- 75 sekund 95°C

- 75 sekund 50°C

- 2 minuty 72°C

c) końcowe wydłużanie 10 minut 72°C.

Produkty reakcji oczyszczano przy pomocy zestawu QIAGEN PCR Purification Kit lub poprzez ekstrakcję fenol-chloroform, po której do DNA dodawano 0,3 M octan sodu i strącano etanolem. Oczyszczone DNA rozpuszczano w sterylnej wodzie i przechowywano w temperaturze -20°C. DNA analizowano poprzez elektroforezę w żelu agarozowym. Skład nukleotydowy matryc sprawdzano poprzez sekwencjonowanie używając starterów T7, DsrA-3 oraz OxyS-3.

Otrzymywanie matryc do transkrypcji *in vitro*, której produktem były cząsteczki *fhlA115* i *rpoS140*

DNA służące jako matryce do transkrypcji *in vitro* w wyniku których otrzymywano *fhlA115* RNA oraz *rpoS140* RNA uzyskiwano przeprowadzając trzy następujące po sobie reakcje PCR. Pierwsza mieszanina reakcyjna dla *rpoS140* zawierała poza standardowymi składnikami (3 mM MgCl₂, mieszanina czterech dNTP każdy 0,2 mM, bufor z KCl dostarczony wraz z enzymem, 5U polimerazy Taq) oligomery RpoS_1 i RpoS_2 o stężeniu 2 μM oraz oligomery RpoS_3 i RpoS_4.2 o stężeniu 0,3 μM. Natomiast dla *fhlA115* analogicznie oligomery FhlA_1 i FhlA_2 o stężeniu 2 μM oraz oligomery FhlA_3 i FhlA_4 o stężeniu 0,3 μM. W reakcji PCR I hybrydowały ze sobą oligomery 1 i 2 po czym następowało ich wydłużanie.

Warunki reakcji PCR I były następujące:

- a) wstępna denaturacja 2 minuty 95°C
- b) 8 cykli obejmujących:
 - 1 minuta 95°C
 - 30 sekund 61°C
 - 2 minuty 72°C

W wyniku tej reakcji powstawało dwuniciowe DNA o długości 113 nukleotydów będące produktem pośrednim dla matrycy *rpoS140* oraz 98 nukleotydów dla matrycy *fhlA115*.

Następnie ta sama mieszanina reakcyjna poddawana była reakcji PCR II, w której produkty reakcji PCR I stanowiły matryce do syntezy dłuższych dwuniciowych DNA z wykorzystaniem jako starterów oligomerów 3 i 4.

Warunki reakcji PCR II były następujące:

- a) wstępna denaturacja 2 minuty 95°C
- b) 30 cykli obejmujących:
 - 1 minuta 95°C
 - 30 sekund 49°C
 - 2 minuty 72°C

c) końcowe wydłużanie 10 minut 72°C.

W wyniku reakcji PCR II otrzymywano końcowe produkty o pożądanej długości.

W celu zwiększenia ilości matrycowych DNA przeprowadzano reakcje PCR III używając jako matryc oczyszczonych przy pomocy zestawu QIAGEN PCR Purification Kit oraz 100-krotnie rozcieńczonych produktów reakcji PCR II, natomiast jako starterów dla

fhlA115 oraz rpoS140 odpowiednio oligomerów T7 i seqF3 oraz T7 i seqR3 o stężeniu 0,3 μM każdy (pozostałe składniki mieszaniny reakcyjnej analogicznie jak w PCR I).

Warunki reakcji PCR III były następujące:

a) wstępna denaturacja 2 minuty 95°C

b) 30 cykli obejmujących:

- 1 minuta 95°C

- 30 sekund 53°C

- 2 minuty 72°C

c) końcowe wydłużanie 10 minut 72°C.

Produkty reakcji oczyszczano przy pomocy zestawu QIAGEN PCR Purification Kit lub poprzez ekstrakcję fenol-chloroform, po której do DNA dodawano 0,3 M octan sodu i strącano etanolem. Oczyszczone DNA rozpuszczano w sterylnej wodzie i przechowywano w temperaturze -20°C. DNA analizowano poprzez elektroforezę w żelu agarozowym. Skład nukleotydowy matrycy sprawdzano poprzez sekwencjonowanie.

Otrzymywanie matrycy do transkrypcji *in vitro*, której produktem były cząsteczki fhlA282, rpoS325 i rpoS578

W celu otrzymania matrycy do transkrypcji *in vitro*, w wyniku których uzyskano cząsteczki fhlA282, rpoS325 i rpoS578 przeprowadzono reakcje PCR bezpośrednio na koloniach bakterii *E. coli* DH5 α (powstałe na bazie szczepu K12). 50 μl zawiesiny komórek *E. coli* DH5 α rozmrażano w lodzie przez 15 minut, dodawano 1 ml płynnej pożywki LB i wytrząsano przy 300 rpm w temperaturze 37°C przez 45 minut, następnie 100 μl otrzymanej zawiesiny wylewano i rozprowadzano bagietką na szalkach ze stałą pożywką LB, inkubowano w temperaturze 37°C przez 12-14 godzin. Pojedyncze kolonie bakterii wyhodowane na stałej pożywce LB przenoszono do 100 μl sterylnej wody.

Następnie przeprowadzano reakcję PCR. Mieszanina reakcyjna o objętości 20 μl poza standardowymi składnikami (3 mM MgCl₂, mieszanina czterech dNTP każdy o stężeniu 0,2 mM, bufor z KCl dostarczony wraz z enzymem) zawierała jako matrycę 4,8 μl wyżej opisanej zawiesiny oraz parę oligomerów, każdy o stężeniu 1,5 μM (dla fhlA282 były to Fu282 i Fd282, dla rpoS325 Rd578 i Ru325, a dla rpoS578 Rd578 i Ru578). Do mieszaniny nie dodawano polimerazy Taq.

Warunki reakcji PCR były następujące:

- a) wstępna denaturacja 7 minut 95°C, po której do mieszaniny dodawano 2,5 U polimerazy Taq
- b) 30 cykli obejmujących:
- 1 minuta 95°C
 - 30 sekund 54°C (dla rpoS325 i rpoS578)/62°C (dla fhlA282)
 - 2 minuty 72°C
- c) końcowe wydłużanie 10 minut 72°C.

Produkty reakcji oczyszczano przy pomocy zestawu QIAGEN PCR Purification Kit lub poprzez ekstrakcję fenol-chloroform, po której do DNA dodawano 0,3 M octan sodu i strącano etanolem. Oczyszczone DNA rozpuszczano w sterylnej wodzie i przechowywano w temperaturze -20°C. DNA analizowano poprzez elektroforezę w żelu agarozowym. Skład nukleotydowy matrycy sprawdzano poprzez sekwencjonowanie.

2.15. Transkrypcja *in vitro*

Transkrypty otrzymywano korzystając z zestawu do badań biochemicznych Ambion T7-MEGAscriptTM stosując się do zaleceń producenta z pewnymi modyfikacjami. Jako matryce stosowano dwuniciowe DNA otrzymane według procedur opisanych powyżej. Reakcję prowadzono w objętości 20 µl, stosowano różne stężenia matrycy w zależności od długości docelowego transkryptu, im dłuższy transkrypt tym mniejsze stężenie matrycy. Końcowe stężenie każdego z trójfosforanów nukleozydów wynosiło 7,5 mM. W przypadku gdy zamierzano otrzymać RNA z wolną grupą hydroksylową na końcu 5' do mieszaniny reakcyjnej dodawano guanozynę, której końcowe stężenie wynosiło 6 mM i obniżano wówczas stężenia trójfosforanów nukleozydów do 3,75 mM. Reakcję prowadzono przez 16 godzin w 37°C. W celu usunięcia dsDNA, do mieszaniny reakcyjnej dodawano 2 U DNazy I i inkubowano w temperaturze 37°C przez 15 minut. Transkrypty oczyszczano metodą elektroforezy w denaturującym żelu poliakrylamidowym, wizualizowano w świetle UV, eluowano z żelu i strącano. RNA przechowywano w -20°C w stanie zliofilizowanym lub jako roztwory w sterylnej wodzie.

2.16. Nadekspresja i oczyszczanie białka Hfq w komórkach bakteryjnych

Transformacja komórek *E. coli* BL-21 metodą szoku termicznego

50 µl zawiesiny komórek kompetentnych *E. coli* BL-21 rozmrażano w lodzie przez 15 minut. Do zawiesiny komórkowej dodawano 50 ng plazmidu pET28-Hfq-EC po czym inkubowano w lodzie przez 45 minut. Następnie zawiesinę ogrzewano w temperaturze 42°C przez 20 sekund. Po czym inkubowano w lodzie przez kolejne 2 minuty.

Do transformowanych komórek dodawano 1 ml płynnej pożywki LB i wytrząsano przy 300 rpm w 37°C przez 45 minut. Następnie 100-300 µl otrzymanej zawiesiny wlewano i rozprowadzano bagietką na szalkach ze stałą pożywką LB zawierającą kanamycynę i chloramfenikol, inkubowano w 37°C przez 12-14 godzin.

Przygotowanie stoków glicerolowych

Pojedyncze kolonie bakterii wyhodowane na stałej pożywce LB zawierającej kanamycynę i chloramfenikol przenoszono do 20 ml płynnej pożywki LB zawierającej kanamycynę i chloramfenikol, wytrząsano przy 300 rpm w 37°C przez około 4 godziny; inkubację prowadzono do momentu osiągnięcia gęstości optycznej $OD_{600}=0,8-0,9$. Z hodowli pobierano 500 µl i dodawano 500 µl 50% glicerolu, delikatnie mieszano i umieszczano w suchym lodzie, po czym przenoszono do -80°C i tak przechowywano.

Ekspresja białka w komórkach bakteryjnych

Bakterie *E. coli* BL21 transformowanych wektorem pET28-Hfq-EC pochodzące z pojedynczej koloni lub ze stoku glicerolowego przenoszono do 20 ml płynnej pożywki LB zawierającej kanamycynę i chloramfenikol, wytrząsano przy 300 rpm w temperaturze 37°C przez 12-14 godzin.

Z powstałej zawiesiny bakteryjnej 15 ml przenoszono do 1 litra pożywki LB z kanamycyną i chloramfenikolem, rozdzielano na 4 kolby i wytrząsano przy 300 rpm w 37°C przez około 2-3 godzin; inkubację prowadzono do momentu osiągnięcia przez bakterie gęstości optycznej $OD_{600}=0,6-0,8$. Następnie indukowano nadekspresję białka przez dodanie wodnego roztworu IPTG do końcowego stężenia 1 mM. Hodowlę kontynuowano przez kolejne 4 godziny w tych samych warunkach.

Po zakończeniu hodowli zawiesinę bakterii wirowano z prędkością 4000 rpm w 12°C przez 10 minut. Dekantowano roztwór, a osad zawieszano w 30 ml buforu do lizy z

dodatkiem inhibitorów proteaz (3 tabletki). Inkubowano w temperaturze 0°C przez 5 minut, po czym przez kolejne 5 minut w temperaturze 37°C. Preparat sonikowano 3-krotnie po 20 sekund, przy amplitudzie 60% (aparat Autotune Series, High Intensity Ultrasonic Processor, 750 Watt Model, producent Sigma), z 5 minutowymi odstępami na inkubację w temperaturze 0°C. Następnie do zawiesiny dodawano 200 U DNazy I oraz 200 µg RNazy A i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 7 godzin, uzyskaną zawiesinę wirowano z prędkością 9000 rpm w 4°C przez 30 minut. Supernatant przenoszono do nowej próbówki po czym nanoszono na kolumnę niklową uprzednio zrównoważoną buforem do lizy.

Przebieg hodowli oraz wydajność ekspresji analizowano metodą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym.

Oczyszczanie białka na kolumnie niklowej – chromatografia powinowactwa

Białko Hfq oczyszczano z zastosowaniem chromatografii powinowactwa stosując kolumnę niklową. Ekstrakt białkowy otrzymany z 1 litra hodowli bakteryjnej nanoszono na wcześniej przygotowaną zgodnie z zaleceniami producenta kolumnę niklową, zrównoważoną buforem do lizy. Następnie kolumnę przemywano 10 objętościami buforu do lizy. W kolejnym etapie kolumnę przemywano 20 objętościami buforu przemywającego w celu usunięcia innych nie pożądanых białek. Następnie przeprowadzano wymywanie białka buforami elucyjnymi o rosnącym stężeniu imidazolu (od 50 do 500 mM) po 10 objętości każdym. W ostatnim etapie kolumnę przemywano 5 objętościami buforu czyszczącego. Zebrane frakcje analizowano metodą elektroforezy w denaturującym żelu poliakrylamidowym. Preparaty zawierające właściwe białko sączono na filtrach Milipore oraz poddawano dializie w celu wymiany buforu na bufor do przechowywania białka. Preparat przechowywano w 10% glicerolu w -20°C.

2.17. Analiza homogenności RNA w różnych buforach w żelach poliakrylamidowych w warunkach niedenaturujących

W celu przeprowadzenia eksperymentu cząsteczki RNA znakowano radioizotopowo na końcu 5' i oczyszczano na żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących.

Mieszanina reakcyjna w objętości 10 µl zawierała RNA w ilości 10 000 cpm, 2 µl wybranego buforu hybrydacyjnego (5x stężony), 1 µl (10x stężonego) buforu obciążającego do elektroforezy w warunkach niedenaturujących. Mieszaninę denaturowano 3 minuty w 70°C lub 95°C (DsrA RNA i jej fragmenty), a następnie inkubowano 20 minut w

25°C lub nanoszono na żel bezpośrednio po przygotowaniu. Próbki analizowano za pomocą elektroforezy w niedenaturującym żelu poliakrylamidowym o procentowości dobranej w zależności od długości analizowanych RNA, w buforze 1x TBE lub TBM. Po zakończonej elektroforezie żele suszono. Produkty reakcji wizualizowano używając ekranów odwzorowujących i skanera materiałów znakowanych radioizotopowo Typhoon 6800. Do analizy wykorzystywano oprogramowanie ImageQuant 5.1 (Molecular Dynamics).

2.18. Analiza kompleksów RNA/Hfq w żelach poliakrylamidowych w warunkach niedenaturujących

W celu przeprowadzenia eksperymentu cząsteczki RNA znakowano radioizotopowo na końcu 5' i oczyszczano na żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących.

Mieszanina reakcyjna w objętości 10 µl zawierała RNA w ilości 20 000 cpm, 2 µl wybranego buforu hybrydizacyjnego (5x stężony), 1 µl (10x stężonego) buforu obciążającego do elektroforezy w warunkach niedenaturujących oraz białko Hfq w rosnącym stężeniu. Mieszaninę przed dodaniem białka denaturowano 3 minuty w 70°C lub 95°C (DsrA RNA), a następnie inkubowano 20 minut w 25°C. Po dodaniu białka prowadzono inkubację kolejne 20 minut w 25°C. Próbki analizowano za pomocą elektroforezy w 6% niedenaturującym żelu poliakrylamidowym, w buforze 1x TBE. Po zakończonej elektroforezie żele suszono. Produkty reakcji wizualizowano używając ekranów odwzorowujących i skanera materiałów znakowanych radioizotopowo Typhoon 6800. Do analizy wykorzystywano oprogramowanie ImageQuant 5.1 (Molecular Dynamics).

2.19. Analiza kompleksów RNA/RNA oraz RNA/RNA/białko w żelach poliakrylamidowych w warunkach niedenaturujących

W celu przeprowadzenia eksperymentu cząsteczki OxyS i DsrA RNA znakowano radioizotopowo na końcu 5' i oczyszczano na żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących.

Przed sporządzeniem mieszaniny reakcyjnej oba RNA dla których badano tworzenie kompleksu oddzielnie rozpuszczano w wybranym buforze hybrydizacyjnym, a następnie poddawano denaturacji 3 minuty w 70°C lub 95°C (DsrA RNA), po czym inkubowano 20 minut w 25°C. Tak przygotowane RNA dodawano do mieszaniny reakcyjnej o końcowej objętości 10 µl, tak aby zawierała 10 000 cpm znakowanego [³²P] badanego RNA oraz to

samo RNA nie znakowane o końcowym stężeniu 0,1 μM , rosnące stężenia RNA tworzącego kompleks z badaną cząsteczką, wybrany bufor hybrydizacyjny w takiej ilości, aby otrzymać całkowite końcowe stężenie 1x, 1 μl (10x stężonego) buforu obciążającego do elektroforezy w warunkach niedenaturujących. Całość inkubowano 20 minut w 25°C. Jeżeli badano kompleksy trójskładnikowe mieszaninę reakcyjną sporządzano w odpowiednio mniejszej objętości tak, aby po inkubacji dodać Hfq i otrzymać całkowitą objętość 10 μl . Po dodaniu białka mieszaninę inkubowano kolejne 20 minut w 25°C.

Próbki analizowano za pomocą elektroforezy w niedenaturującym żelu poliakrylamidowym, o procentowości dobranej w zależności od długości analizowanych RNA, w buforze 1 x TBE lub TBM. Po zakończonej elektroforezie żele suszono. Produkty reakcji wizualizowano używając ekranów odwzorowujących i skanera materiałów znakowanych radioizotopowo Typhoon 6800. Do analizy wykorzystywano oprogramowanie ImageQuant 5.1 (Molecular Dynamics).

2.20. Analiza kompleksów modyfikowany oligonukleotyd/Hfq w żelach poliakrylamidowych w warunkach niedenaturujących

W celu przeprowadzenia eksperymentu modyfikowane oligonukleotydy znakowano radioizotopowo na końcu 5' i oczyszczano na żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących.

Mieszanina reakcyjna w objętości 10 μl zawierała oligonukleotydy w ilości ok. 20 000 cpm (0,02 μM), 2 μl buforu hybrydizacyjnego I (5x stężony), 1 μl (10x stężonego) buforu obciążającego do elektroforezy w warunkach niedenaturujących oraz białko Hfq w 100-krotnym molowym nadmiarze. Mieszaninę inkubowano 20 minut w 25°C. Próbki analizowano za pomocą elektroforezy w 16% niedenaturującym żelu poliakrylamidowym, w buforze 1x TBE. Po zakończonej elektroforezie żele suszono. Produkty reakcji wizualizowano używając ekranów odwzorowujących i skanera materiałów znakowanych radioizotopowo Typhoon 6800. Do analizy wykorzystywano oprogramowanie ImageQuant 5.1 (Molecular Dynamics).

2.21. Analiza tworzenia kompleksów OxyS RNA i DsrA RNA ze starterami DNA oraz DNA-LNA w żelach poliakrylamidowych w warunkach niedenaturujących

W celu przeprowadzenia eksperymentu cząsteczki OxyS i DsrA RNA znakowano radioizotopowo na końcu 5' i oczyszczano na żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących.

Wiązanie starterów do RNA przeprowadzano w objętości 10 μ l w dostępnym handlowo buforze do odwrotnej transkryptazy SuperScript III (5 x stężony, Invitrogen). Każda mieszanina reakcyjna zawierała 10 000 cpm znakowanego [³²P] RNA oraz RNA nie znakowane o końcowym stężeniu 200 nM, rosnące stężenia starterów, 1 μ l 10 x stężonego buforu obciążającego do elektroforezy w warunkach niedenaturujących. Mieszaninę denaturowano 3 minuty w 95°C, a następnie inkubowano 20 minut w 25°C.

Próbki analizowano za pomocą elektroforezy w 8% niedenaturującym żelu poliakrylamidowym w buforze 1x TBE. Po zakończonej elektroforezie żele suszono. Produkty reakcji wizualizowano używając ekranów odwzorowujących i skanera materiałów znakowanych radioizotopowo Typhoon 6800. Do analizy wykorzystywano oprogramowanie ImageQuant 5.1 (Molecular Dynamics).

2.22. Chemiczne mapowanie struktury drugorzędowej DsrA RNA i OxyS RNA

W pierwszym etapie sporządzano jedną mieszaninę, w której na każdą próbkę używano 1 pmol badanego RNA oraz tzw. nośnikowe RNA (ang. *carrier RNA*) o końcowym stężeniu 8 μ M; kwasy nukleinowe mieszano w buforze hybrydazyjnym I lub II. do końcowej objętości 9 μ l na każdą próbkę. Roztwór inkubowano przez 3 minuty w 70°C (OxyS RNA) lub 95°C (DsrA RNA), a następnie 20 minut w 25°C. Rozdzielano na pojedyncze próbki.

W celu przeprowadzenia reakcji modyfikacji za pomocą ketoksalu do 9 μ l mieszaniny dodawano 1 μ l roztworu ketoksalu o finalnym stężeniu 40, 80 lub 160 mM. Roztwory ketoksalu uzyskiwano przez rozpuszczenie go w mieszaninie etanol/woda 1:3 (v/v). Reakcję modyfikacji prowadzono przez 20 minut w 37°C. Reakcję zatrzymywano poprzez precypitację etanolem w suchym lodzie.

W przypadku modyfikacji z udziałem CMCT 9 μ l roztworu CMCT w buforze hybrydazyjnym I lub II dodawano do 9 μ l próbki tak, aby jego końcowe stężenie w

mieszaniu reakcyjnej wynosiło 40, 100 lub 200 mM. Reakcję prowadzono przez 20 minut w 37°C. Reakcję zatrzymywano poprzez precypitację etanolem w suchym lodzie.

W czasie modyfikacji metodą SHAPE z wykorzystaniem NMIA na 9 µl próbki dodawano 1 µl roztworu NMIA do uzyskania końcowych stężeń 33, 67 lub 135 mM. Roztwory NMIA sporządzano rozpuszczając go w DMSO. Reakcję modyfikacji prowadzono 1 godzinę w 37°C Reakcję zatrzymywano poprzez precypitację etanolem w suchym lodzie.

Do wszystkich reakcji modyfikacji sporządzano próbę kontrolną, traktowaną analogicznie jak próby badane ale bez dodawania odczynnika modyfikującego.

Strącone próbki po modyfikacji wirowano 30 minut przy 12 000 rpm w 4°C, supernatant usuwano a osad suszono pod próżnią.

Miejsca modyfikacji identyfikowano poprzez przeprowadzenie reakcji odwrotnej transkrypcji (ang. *primer extension*). W tym celu do strąconych wcześniej próbek dodawano od 1 do 5 pmol startera DNA lub DNA-LNA znakowanego izotopem ³²P na końcu 5' i dopełniano wodą do 6 µl. denaturowano 3 minuty w 95°C, po czym inkubowano 20 minut w 25°C. Następnie do każdej reakcji dodawano 2 µl handlowo dostępnego buforu do odwrotnej transkryptazy SS III (5x stężonego), DTT do końcowego stężenia 10 mM, mieszaninę czterech dNTP do końcowego stężenia 0,5 mM oraz 50 U odwrotnej transkryptazy SS III, objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 10 µl.

W celu uzyskania reakcji sekwencjonowania z użyciem ddNTP przeprowadzono analogicznie reakcje odwrotnej transkrypcji, w których mieszaninę czterech dNTP zastępowano mieszaniną odpowiedniego ddNTP z wszystkimi czterema dNTP. Stężenie końcowe wszystkich trójfosforanów nukleozydów wynosiło 0,5 mM, z wyjątkiem tego dNTP, którego analog w serii ddNTP był dodawany do próby, stężenie takiego dNTP było wówczas 10-krotnie niższe.

Reakcje odwrotnej transkrypcji prowadzono 50 minut w 55°C, następnie zatrzymywano reakcje przez przeniesienie próbek na lód i dodanie 1 objętości barwnika elektroforetycznego z formamidem.

Produkty reakcji mapowania chemicznego analizowano metoda elektroforezy w 12% denaturującym żelu poliakrylamidowym. Bezpośrednio przed nałożeniem na żel próbki denaturowano 3 minuty w temperaturze 95°C, na żel nakładano po 5 µl z każdej próbki. Po zakończonej elektroforezie żele suszono. Produkty reakcji wizualizowano używając ekranów odwzorowujących i skanera materiałów znakowanych radioizotopowo Typhoon 6800. Do analizy wykorzystywano oprogramowanie ImageQuant 5.1 (Molecular Dynamics).

2.23. Pomiary trwałości termodynamicznej z użyciem metody topnienia UV (ang. *UV melting*)

Pomiary termodynamiczne prowadzono na spektrofotometrze Beckman DU-640 z termoprogramatorem. Oligonukleotydy rozpuszczano w buforze do topnień. Przed przystąpieniem do eksperymentu topnienia UV oligonukleotydy podgrzewano 3 minuty w 80°C, po czym powoli schładzano do 4°C. Pomiary wykonywano w świetle UV przy długości fali 260 nm. Pojedynczy eksperyment prowadzono w zakresie temperatury od 4°C do 95°C, szybkość zmiany temperatury wynosiła 1°C/minutę, a wartość absorbancji próbek mierzona była co 0,5 minuty. W celu uzyskania jak najdokładniejszych parametrów termodynamicznych pomiary trwałości termodynamicznej prowadzono dla dziewięciu różnych stężeń, w zakresie 10^{-3} - 10^{-6} M. Uzyskane w wyniku eksperymentu krzywe topnienia poddawano analizie w programie MeltWin 3.5 .

2.24. Przygotowanie płytek mikromacierzowych

Przygotowanie płytek mikroskopowych pokrytych 2% agarozą

Sporządzano 2% wodny roztwór agarozy, do którego dodawano 10 mM NaIO₄. Tak przygotowany roztwór wylewano na aminosilanizowane płytki mikroskopowe (2,5 x 7,5 cm), po 2 ml na płytkę. Pozostawiano na 1 godzinę w celu polimeryzacji. Płukano trzykrotnie po 15 minut w wodzie w celu pozbycia się nadmiaru NaIO₄. Pozostawiano do wyschnięcia. Tak sporządzone płytki przechowywano w temperaturze pokojowej do kilku miesięcy.

Przygotowanie sond do drukowania na mikromacierzy

Stosując funkcję *OligoWalk*, dostępną w programie komputerowym RNAStructure 4.6, uzyskiwano sekwencje pentamerów komplementarnych krok po kroku, z przesunięciem co 1 resztę nukleotydową, do badanego RNA. Na podstawie tych sekwencji wybierano modyfikowane sondy z biblioteki izoenergetycznej.

Wybrane z biblioteki roztwory wodne sondy zawierających C6-aminoheksylowy łącznik pobrano w pożądanych ilościach i odparowywano do sucha po próżną. Następnie, sondy rozpuszczano w buforze do drukowania do stężenia 0,1 mM (zwykle w objętości 20 µl). Przenoszono na 384 dołkową płytkę do drukowania. Na płytce umieszczano również w kilku miejscach oligomer UUUUU lub sam bufor do drukowania jako kontrolę negatywną.

Drukowanie sond na mikromacierzy

W czasie drukowania zachowywano wilgotność 60%, stosowano 8-krotny „preprint”, każdą sondę drukowano w ilości od 4 do 8 powtórzeń, odległość pomiędzy kolejnymi nadrukowanymi punktami wynosiła 750 lub 800 μm . Po drukowaniu mikromacierze inkubowano 16 godzin w 37°C, zachowując 100% wilgotność. Płytki pokrywano 1 ml świeżo przygotowanego roztworu do redukcji i inkubowano 15 minut. Po czym płukano 3-krotnie po 15 minut w wodzie. Następnie inkubowano około 1 godziny w 1% roztworze SDS w temperaturze 55°C w celu pozbycia się nadmiaru sond nie związanych kowalencyjnie do agarozy. Kolejny raz płukano trzykrotnie po 15 minut w wodzie. Gotowe mikromacierze suszono w temperaturze pokojowej.

2.25. Hybrydyzacja na mikromacierzy

W celu przeprowadzenia eksperymentu hybrydyzacji badaną cząsteczkę RNA znakowano radioizotopowo na końcu 5' i oczyszczano na żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących.

Do pojedynczej hybrydyzacji używano około 200 000 cpm badanego RNA. W wybranym buforze hybrydyzacyjnym, w objętości 200 μl , RNA poddawano fałdowaniu poprzez denaturację 3 minuty w 70°C lub 95°C (w przypadku DsrA RNA i jej fragmentów-rejon II i spinka III) oraz renaturację 20 minut w 25°C.

W przypadku hybrydyzacji kompleksów RNA/białko Hfq, fałdowanie prowadzono w zmniejszonej objętości. Po renaturacji do mieszaniny reakcyjnej dodawano białko w odpowiednim stężeniu, tak aby uzyskać pożądaną kompleks, zawieszony w buforze hybrydyzacyjnym i całość inkubowano w objętości 200 μl kolejne 20 minut w temperaturze 25°C.

W przypadku kompleksów RNA/RNA każdą z cząsteczek fałdowano oddzielnie w buforze hybrydyzacyjnym w objętości o połowę mniejszej od końcowej. Następnie roztwory łączono i całość inkubowano 20 minut w 25°C. Chcąc hybrydyzować kompleksy trójskładnikowe oba RNA również fałdowano oddzielnie, końcową mieszaninę (200 μl) uzyskiwano przez połączenie roztworów obu zrenaturowanych RNA i białka Hfq. Mieszaninę inkubowano 20 minut w 25°C.

Tak przygotowane roztwory наносzono na szkiełko mikroskopowe zawierające nadrukowaną macierz i przykrywano komorą hybrydyzacyjną. Hybrydyzację prowadzono 16

godzin w 4°C lub 22°C z zachowaniem 100% wilgotności otoczenia. Następnie roztwór usuwano, po czym szkiełka płukano 1 lub 3 minuty w 4°C w tym samym buforze, w którym przeprowadzano hybrydyzację. Szkiełka osuszano wirując je 2 minuty przy 2 000 rpm i zawijano w przezroczystą folię. Wyniki eksperymentu wizualizowano używając ekranów odwzorowujących oraz skanera materiałów znakowanych radioizotopowo Typhoon 8600 lub FLA-500. Każdy eksperyment powtarzano kilkakrotnie a otrzymane wyniki uśredniano.

2.26. Analiza komputerowa wyników mikromacierzowych

Do analizy intensywności z jaką wiąże się badana cząsteczka RNA do sondy na mikromacierzy wykorzystywano oprogramowanie ImageQuant 5.1 lub ArrayGauge V2.1. Dalsze analizy prowadzono w programie Microsoft Excel. Przyjęto jako intensywne rozpatrywać te miejsca wiązania, które są od 1 do 3-krotnie słabsze od najintensywniejszego miejsca wiązania, średnio intensywne od 3 do 9-krotnie słabsze, natomiast słabe od 9 do 27-krotnie słabsze od najintensywniejszego. W analizach brano po uwagę tylko intensywne i średnio intensywne miejsca wiązania sond. Powyższe zasady stosowano w przypadku hybrydyzacji pojedynczych cząsteczek RNA. W przypadku analizy hybrydyzacji kompleksów konieczne było zastosowanie bardzo indywidualnego podejścia do interpretacji każdego eksperymentu. W takich eksperymentach często poza rozpatrywaniem, które sygnały są intensywne, średnio intensywne i słabe, porównywano intensywność sygnały pochodzącego od danej sondy z intensywnością sygnału pochodzącego od tej samej sondy w reakcji kontrolnej i sprawdzano ilekroć jest on słabszy lub mocniejszy.

Dla każdego miejsca wiązania sprawdzano możliwość występowania alternatywnego miejsca wiązania wykorzystując funkcję „*fold RNA bimolecular*” dostępnej w programie RNAstructure. W rozważaniach zwracano szczególną uwagę na te alternatywne miejsca wiązania, dla których jednocześnie obserwowano wiązanie z komplementarną sondą. Dla każdego alternatywnego miejsca przewidywano wartość energii swobodnej powstałego dupleksu. Program RNAstructure oblicza tylko wartość energii swobodnej dla dupleksu RNA/RNA konieczne było więc stworzenie specjalnie oprogramowania na potrzeby modyfikowanych sond. Oprogramowanie, z którego korzystano powstało na podstawie parametrów najbliższego sąsiedztwa ustalonych w Pracowni Chemii RNA dla dupleksów RNA z modyfikowanymi oligonukleotydami. Do jego stworzenia wykorzystano wzór podany w rozdziale II.1.5 (Część Literaturowa).

2.27. Odzyskiwanie zużytych mikromacierzy

Szkiełka mikroskopowe po przeprowadzeniu eksperymentu hybrydyzacji z mikromacierzą odzyskiwano do ponownego użycia poprzez trzykrotnie płukanie po 15 minut w wodzie. Następnie mikromacierz inkubowano około 1 godziny w 1% roztworze SDS w 55°C w celu pozbycia się cząsteczek zhybrydyzowanych z sondami. Kolejny raz płukano 3-krotnie po 15 minut w wodzie. Odzyskane mikromacierze suszono w temperaturze pokojowej i używano ponownie. Jedną mikromacierz używano wielokrotnie stosując procedurę odmywania po każdym eksperymencie hybrydyzacji.

VI. BIBLIOGRAFIA

- (1) Simons, W., and Grunberg-Mango, M. (1998) *RNA structure and function*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- (2) Kruger, K., Grabowski, P. J., Zaug, A. J., Sands, J., Gottschling, D. E., and Cech, T. R. (1982) Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. *Cell* 31, 147-157.
- (3) Guerriertakada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N., and Altman, S. (1983) The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* 35, 849-857.
- (4) Turner, D. H. (2000) University Science Press, Chapter 8, *Nucleic Acids: Structures, properties and functions*, (Bloomfield, V. A., Crothers D.M., Tinoco, I., Ed.).
- (5) Wu, M., McDowell, J. A., and Turner, D. H. (1995) A periodic table of symmetrical tandem mismatches in RNA. *Biochemistry* 34, 3204-3211.
- (6) Pace, N. R., Thomas, B.C., Woese, C.R. (1999) Probing RNA structure, function, and history by comparative analysis, in *The RNA World* (Gesteland, R. F., Cech, T.R., Atkins, J.F., Ed.) pp 113-141, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- (7) Zuker, M. (1989) On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule. *Science* 244, 48-52.
- (8) Mathews, D. H., Sabina, J., Zuker, M., and Turner, D. H. (1999) Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J Mol Biol* 288, 911-940.
- (9) Ehresmann, C., Baudin, F., Mougel, M., Romby, P., Ebel, J. P., and Ehresmann, B. (1987) Probing the Structure of RNAs in Solution. *Nucleic Acids Res* 15, 9109-9128.
- (10) Knapp, G. (1989) Enzymatic approaches to probing of RNA secondary and tertiary structure. *Method Enzymol* 180, 192-212.
- (11) Ziehler, W. A., Engelke, D.R. (2000) Probing RNA structure with chemical reagents and enzymes. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem* 2, 6.1.1-6.1.21.
- (12) Wilkinson, K. A., Merino, E. J., and Weeks, K. M. (2006) Selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension (SHAPE): quantitative RNA structure analysis at single nucleotide resolution. *Nat Protoc* 1, 1610-1616.
- (13) Gopinath, S. C. B. (2009) Mapping of RNA-protein interactions. *Anal Chem Acta* 636, 117-128.
- (14) Ciesiolka, J., Michalowski, D., Wrzesinski, J., Krajewski, J., and Krzyzosiak, W. J. (1998) Patterns of cleavages induced by lead ions in defined RNA secondary structure motifs. *J Mol Biol* 275, 211-220.
- (15) Felden, B. (2007) RNA structure: experimental analysis. *Curr Opinion Microbiol* 10, 286-291.
- (16) Selmer, M., Dunham, C. M., Murphy, F. V., Weixlbaumer, A., Petry, S., Kelley, A. C., Weir, J. R., and Ramakrishnan, V. (2006) Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. *Science* 313, 1935-1942.
- (17) Milner, N., Mir, K. U., and Southern, E. M. (1997) Selecting effective antisense reagents on combinatorial oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol* 15, 537-541.
- (18) Ooms, M., Verhoef, K., Southern, E., Huthoff, H., and Berkhout, B. (2004) Probing alternative foldings of the HIV-1 leader RNA by antisense oligonucleotide scanning arrays. *Nucleic Acids Res* 32, 819-827.
- (19) Sohail, M., Akhtar, S., and Southern, E. M. (1999) The folding of large RNAs studied by hybridization to arrays of complementary oligonucleotides. *RNA* 5, 646-655.

- (20) Southern, E. M., Casegreen, S. C., Elder, J. K., Johnson, M., Mir, K. U., Wang, L., and Williams, J. C. (1994) Arrays of complementary oligonucleotides for analyzing the hybridization behavior of nucleic acids. *Nucleic Acids Res* 22, 1368-1373.
- (21) Mir, K. U., and Southern, E. M. (1999) Determining the influence of structure on hybridization using oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol* 17, 788-792.
- (22) Kierzek, E., Kierzek, R., Turner, D. H., and Catrina, I. E. (2006) Facilitating RNA structure prediction with microarrays. *Biochemistry* 45, 581-593.
- (23) Kierzek, E., Mathews, D. H., Ciesielska, A., Turner, D. H., and Kierzek, R. (2006) Nearest neighbor parameters for Watson-Crick complementary heteroduplexes formed between 2'-O-methyl RNA and RNA oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 34, 3609-3614.
- (24) Sproat, B. S., Lamond, A. I., Beijer, B., Neuner, P., and Ryder, U. (1989) Highly efficient chemical synthesis of 2'-O-methyloligoribonucleotides and tetrabiotinylated derivatives - novel probes that are resistant to degradation by RNA or DNA specific nucleases. *Nucleic Acids Res* 17, 3373-3386.
- (25) Cramer, H., and Pfleiderer, W. (2000) Nucleotides LXIV[1]: Synthesis, hybridization and enzymatic degradation studies of 2'-O-methyl-oligoribonucleotides and 2'-O-methyl/deoxy gapmers. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 19, 1765-1777.
- (26) Dallas, A., and Moore, P. B. (1997) The loop E loop D region of Escherichia coli 5S rRNA: the solution structure reveals an unusual loop that may be important for binding ribosomal proteins. *Structure* 5, 1639-1653.
- (27) Correll, C. C., Freeborn, B., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (1997) Metals, motifs, and recognition in the crystal structure of a 5S rRNA domain. *Cell* 91, 705-712.
- (28) Szymanski, M., Specht, T., Barciszewska, M. Z., Barciszewski, J., and Erdmann, V. A. (1998) 5S rRNA Data Bank. *Nucleic Acids Res* 26, 156-159.
- (29) Mathews, D. H., Disney, M. D., Childs, J. L., Schroeder, S. J., Zuker, M., and Turner, D. H. (2004) Incorporating chemical modification constraints into a dynamic programming algorithm for prediction of RNA secondary structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 7287-7292.
- (30) Pedersen, D. S., Rosenbohm, C., and Koch, T. (2002) Preparation of LNA phosphoramidites. *Synthesis*, 802-808.
- (31) Koshkin, A. A., Singh, S. K., Nielsen, P., Rajwanshi, V. K., Kumar, R., Meldgaard, M., Olsen, C. E., and Wengel, J. (1998) LNA (Locked Nucleic Acids): Synthesis of the adenine, cytosine, guanine, 5-methylcytosine, thymine and uracil bicyclonucleoside monomers, oligomerisation, and unprecedented nucleic acid recognition. *Tetrahedron* 54, 3607-3630.
- (32) McTigue, P. M., Peterson, R. J., and Kahn, J. D. (2004) Sequence dependent thermodynamic parameters for locked nucleic acid (LNA)-DNA duplex formation. *Biochemistry* 43, 5388-5405.
- (33) Singh, S. K., Nielsen, P., Koshkin, A. A., and Wengel, J. (1998) LNA (locked nucleic acids): synthesis and high-affinity nucleic acid recognition. *Chem Commun*, 455-456.
- (34) Frieden, M., Hansen, H. F., and Koch, T. (2003) Nuclease stability of LNA oligonucleotides and LNA-DNA chimeras. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 22, 1041-1043.
- (35) Vester, B., and Wengel, J. (2004) LNA (Locked nucleic acid): High-affinity targeting of complementary RNA and DNA. *Biochemistry* 43, 13233-13241.
- (36) Rosenbohm, C., Pedersen, D. S., Frieden, M., Jensen, F. R., Arent, S., Larsen, S., and Koch, T. (2004) LNA guanine and 2,6-diaminopurine. Synthesis, characterization and hybridization properties of LNA 2,6-diaminopurine containing oligonucleotides. *Bioorg Med Chem* 12, 2385-2396.

- (37) Koshkin, A. A. (2004) Syntheses and base-pairing properties of locked nucleic acid nucleotides containing hypoxanthine, 2,6-diaminopurine, and 2-aminopurine nucleobases. *J Org Chem* 69, 3711-3718.
- (38) Pasternak, A., Kierzek, E., Pasternak, K., Fratzczak, A., Turner, D. H., and Kierzek, R. (2008) The thermodynamics of 3'-terminal pyrene and guanosine for the design of isoenergetic 2'-O-methyl-RNA-LNA chimeric oligonucleotide probes of RNA structure. *Biochemistry* 47, 1249-1258.
- (39) Kierzek, E., Ciesielska, A., Pasternak, K., Mathews, D. H., Turner, D. H., and Kierzek, R. (2005) The influence of locked nucleic acid residues on the thermodynamic properties of 2'-O-methyl RNA/RNA heteroduplexes. *Nucleic Acids Res* 33, 5082-5093.
- (40) Pasternak, A., Kierzek, E., Pasternak, K., Turner, D. H., and Kierzek, R. (2007) A chemical synthesis of LNA-2,6-diaminopurine riboside, and the influence of 2'-O-methyl-2,6-diaminopurine and LNA-2,6-diaminopurine ribosides on the thermodynamic properties of 2'-O-methyl RNA/RNA heteroduplexes. *Nucleic Acids Res* 35, 4055-4063.
- (41) Kierzek, E., Kierzek, R., Moss, W. N., Christensen, S. M., Eickbush, T. H., and Turner, D. H. (2008) Isoenergetic penta- and hexanucleotide microarray probing and chemical mapping provide a secondary structure model for an RNA element orchestrating R2 retrotransposon protein function. *Nucleic Acids Res* 36, 1770-1782.
- (42) Pasternak, A., Kierzek, E., Pasternak, K., Turner, D. H., and Kierzek, R. (2007) The chemical synthesis of 2'-O-methyl-2,6-diaminopurine riboside and LNA-2,6-diaminopurine riboside and their influence on the thermodynamic properties of 2'-O-methyl RNA/RNA heteroduplexes. *Nucleic Acids Res* 35, 4055-4063.
- (43) Afanassiev, V., Hanemann, V., and Wöfl, S. (2000) Preparation of DNA and protein micro arrays on glass slides coated with an agarose film. *Nucleic Acids Res* 28, e66.
- (44) Ruschak, A. M., Mathews, D. H., Bibillo, A., Spinelli, S. L., Childs, J. L., Eickbush, T. H., and Turner, D. H. (2004) Secondary structure models of the 3' untranslated regions of diverse R2 RNAs. *RNA* 10, 978-987.
- (45) Christensen, S. M., Ye, J. Q., and Eickbush, T. H. (2006) RNA from the 5' end of the R2 retrotransposon controls R2 protein binding to and cleavage of its DNA target site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 17602-17607.
- (46) Kierzek, E., Christensen, S. M., Eickbush, T. H., Kierzek, R., Turner, D. H., and Moss, W. N. (2009) Secondary Structures for 5' Regions of R2 Retrotransposon RNAs Reveal a Novel Conserved Pseudoknot and Regions that Evolve under Different Constraints. *J Mol Biol* 390, 428-442.
- (47) Kierzek, E., Barciszewska, M. Z., and Barciszewski, J. (2008) Isoenergetic microarray mapping reveals differences in structure between tRNA^{iMet} and tRNA^{mMet} from *Lupinus luteus*. *Nucleic Acids Symp Ser*, 215-6.
- (48) Jenek, M., and Kierzek, E. (2008) Isoenergetic microarray mapping-the advantages of this method in studying the structure of *Saccharomyces cerevisiae* tRNA^{Phe}. *Nucleic Acids Symp Ser*, 219-20.
- (49) Papenfort, K., and Vogel, J. (2009) Multiple target regulation by small noncoding RNAs rewires gene expression at the post-transcriptional level. *Res Microbiol* 160, 278-287.
- (50) Storz, G., and Gottesman, S. (2006) Versatile roles of small RNA regulators in bacteria, in *RNA World, 3rd Ed.* pp 567-594, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- (51) Livny, J., and Waldor, M. K. (2007) Identification of small RNAs in diverse bacterial species. *Curr Opin Microbiol* 10, 96-101.

-
- (52) Vogel, J., and Sharma, C. M. (2005) How to find small non-coding RNAs in bacteria. *Biological Chemistry* 386, 1219-1238.
- (53) Tomizawa, J. (1986) Control of ColE1 plasmid replication: binding of RNA I to RNA II and inhibition of primer formation. *Cell* 47, 89-97.
- (54) Malmgren, C., Engdahl, H. M., Romby, P., and Wagner, E. G. H. (1996) An antisense/target RNA duplex or a strong intramolecular RNA structure 5' of a translation initiation signal blocks ribosome binding: The case of plasmid R1. *RNA* 2, 1022-1032.
- (55) Novick, R. P., Iordanescu, S., Projan, S. J., Kornblum, J., and Edelman, I. (1989) PT181 plasmid replication is regulated by a countertranscript-driven transcriptional attenuator. *Cell* 59, 395-404.
- (56) Brantl, S., and Wagner, E. G. H. (2000) Antisense RNA-mediated transcriptional attenuation: an in vitro study of plasmid pT181. *Mol Microbiol* 35, 1469-1482.
- (57) Eguchi, Y., and Tomizawa, J. (1991) Complexes formed by complementary RNA stem-loops. Their formations, structures and interaction with ColE1 Rom protein. *J Mol Biol* 220, 831-842.
- (58) Arthur, D. C., Ghetu, A. F., Gubbins, M. J., Edwards, R. A., Frost, L. S., and Glover, J. N. M. (2003) FinO is an RNA chaperone that facilitates sense-antisense RNA interactions. *EMBO J* 22, 6346-6355.
- (59) Blomberg, P., Wagner, E. G. H., and Nordstrom, K. (1990) Control of replication of plasmid R1: the duplex between the antisense RNA, CopA, and its target, CopT, is processed specifically in vivo and in vitro by RNase III. *EMBO J* 9, 2331-2340.
- (60) Gerdes, K., Nielsen, A., Thorsted, P., and Wagner, E. G. H. (1992) Mechanism of killer gene activation. Antisense RNA-dependent RNase III cleavage ensures rapid turn-over of the stable hok, srnB and pndA effector messenger RNAs. *J Mol Biol* 226, 637-649.
- (61) Gerdes, K., Gulyaev, A. P., Franch, T., Pedersen, K., and Mikkelsen, N. D. (1997) Antisense RNA-regulated programmed cell death. *Annual Review of Genetics* 31, 1-+.
- (62) Briani, F., Ghisotti, D., and Deho, G. (2000) Antisense RNA-dependent transcription termination sites that modulate lysogenic development of satellite phage P4. *Mol Microbiol* 36, 1124-1134.
- (63) Krinke, L., and Wulff, D. L. (1987) OOp RNA, produced from multicopy plasmids, inhibits lambda cII gene expression through an RNase III-Dependent mechanism. *Genes Dev* 1, 1005-1013.
- (64) Case, C. C., Simons, E. L., and Simons, R. W. (1990) The IS10 transposase mRNA is destabilized during antisense RNA control. *EMBO J* 9, 1259-1266.
- (65) Ma, C., and Simons, R. W. (1990) The IS10 antisense RNA blocks ribosome binding at the transposase translation initiation site. *EMBO J* 9, 1267-1274.
- (66) Arini, A., Keller, M. P., and Arber, W. (1997) An antisense RNA in IS30 regulates the translational expression of the transposase. *Biol Chem* 378, 1421-1431.
- (67) Vogel, J., Argaman, L., Wagner, E. G. H., and Altuvia, S. (2004) The small RNA IstR inhibits synthesis of an SOS-induced toxic peptide. *Curr Biol* 14, 2271-2276.
- (68) Darfeuille, F., Unoson, C., Vogel, J., and Wagner, E. G. H. (2007) An antisense RNA inhibits translation by competing with standby ribosomes. *Mol Cell* 26, 381-392.
- (69) Kawano, M., Reynolds, A. A., Miranda-Rios, J., and Storz, G. (2005) Detection of 5'- and 3'-UTR-derived small RNAs and cis-encoded antisense RNAs in Escherichia coli. *Nucleic Acids Res* 33, 1040-1050.
- (70) Waters, L. S., and Storz, G. (2009) Regulatory RNAs in Bacteria. *Cell* 136, 615-628.
- (71) Storz, G. (2002) An expanding universe of noncoding RNAs. *Science* 296, 1260-1263.

- (72) Carpousis, A. J. (2002) The Escherichia coli RNA degradosome: structure, function and relationship to other ribonucleolytic multienzyme complexes. *Biochem Soc Trans* 30, 150-155.
- (73) Masse, E., Escorcia, F. E., and Gottesman, S. (2003) Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in Escherichia coli. *Genes Dev* 17, 2374-2383.
- (74) Mizuno, T., Chou, M. Y., and Inouye, M. (1984) A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA). *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 1966-1970.
- (75) Andersen, J., Delihias, N., Ikenaka, K., Green, P. J., Pines, O., Ilercil, O., and Inouye, M. (1987) The isolation and characterization of RNA coded by the micF gene in Escherichia coli. *Nucleic Acids Res* 15, 2089-2101.
- (76) Chou, J. H., Greenberg, J. T., and Dimple, B. (1993) Posttranscriptional repression of Escherichia coli OmpF protein in response to redox stress: positive control of the micF antisense RNA by the soxRS locus. *J Bacteriol* 175, 1026-1031.
- (77) Coyer, J., Andersen, J., Forst, S. A., Inouye, M., and Delihias, N. (1990) MicF RNA in OmpB mutants of Escherichia coli: different pathways regulate micF RNA levels in response to osmolarity and temperature change. *J Bacteriol* 172, 4143-4150.
- (78) Andersen, J., Forst, S. A., Zhao, K., Inouye, M., and Delihias, N. (1989) The function of micF RNA. MicF RNA is a major factor in the thermal regulation of OmpF protein in Escherichia coli. *J Biol Chem* 264, 17961-17970.
- (79) Delihias, N., and Forst, S. (2001) MicF: An antisense RNA gene involved in response of Escherichia coli to global stress factors. *J Mol Biol* 313, 1-12.
- (80) Russo, F. D., and Silhavy, T. J. (1991) EnvZ controls the concentration of phosphorylated OmpR to mediate osmoregulation of the porin genes. *J Mol Biol* 222, 567-580.
- (81) Nakashima, K., Kanamaru, K., Aiba, H., and Mizuno, T. (1991) Osmoregulatory expression of the porin genes in Escherichia coli: evidence for signal titration in the signal transduction through EnvZ-OmpR phosphotransfer. *FEMS Microbiol Lett* 66, 43-7.
- (82) Zhang, A. X., Wassarman, K. M., Rosenow, C., Tjaden, B. C., Storz, G., and Gottesman, S. (2003) Global analysis of small RNA and mRNA targets of Hfq. *Mol Microbiol* 50, 1111-1124.
- (83) Sledjeski, D. D., and Gottesman, S. (1995) A small RNA acts as an antisilencer of the H-NS silencer rcsA gene of Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 2003-2007.
- (84) Sledjeski, D. D., Gupta, A., and Gottesman, S. (1996) The small RNA, DsrA, is essential for the low temperature expression of RpoS during exponential growth in Escherichia coli. *Embo J* 15, 3993-4000.
- (85) Klauck, E., Bohringer, J., and Hengge-Aronis, R. (1997) The LysR-like regulator LeuO in Escherichia coli is involved in the translational regulation of rpoS by affecting the expression of the small regulatory DsrA RNA. *Mol Microbiol* 25, 559-569.
- (86) Hommais, F., Krin, E., Laurent-Winter, C., Soutourina, O., Malpertuy, A., Le Caer, J. P., Danchin, A., and Bertin, P. (2001) Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS. *Mol Microbiol* 40, 20-36.
- (87) Lease, R. A., and Belfort, M. (2000) A trans-acting RNA as a control switch in Escherichia coli: DsrA modulates function by forming alternative structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9919-9924.
- (88) Tanaka, K., Takayanagi, Y., Fujita, N., Ishihama, A., and Takahashi, H. (1993) Heterogeneity of the principal sigma factor in Escherichia coli - the rpoS gene

- product, sigma(38), is a 2nd principal sigma factor of RNA polymerase in stationary phase *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3511-3515.
- (89) Lease, R. A., and Woodson, S. A. (2004) Cycling of the Sm-like protein Hfq on the DsrA small regulatory RNA. *J Mol Biol* 344, 1211-1223.
- (90) Mikulecky, P. J., Kaw, M. K., Brescia, C. C., Takach, J. C., Sledjeski, D. D., and Feig, A. L. (2004) *Escherichia coli* Hfq has distinct interaction surfaces for DsrA, rpoS and poly(A) RNAs. *Nat Struct Mol Biol* 11, 1206-1214.
- (91) Soper, T. J., and Woodson, S. A. (2008) The rpoS mRNA leader recruits Hfq to facilitate annealing with DsrA sRNA. *RNA* 14, 1907-1917.
- (92) Resch, A., Afonyushkin, T., Lombo, T. B., McDowall, K. J., Blasi, U., and Kaberdin, V. R. (2008) Translational activation by the noncoding RNA DsrA involves alternative RNase III processing in the rpoS 5'-leader. *RNA* 14, 454-459.
- (93) Lease, R. A., Cusick, M. E., and Belfort, M. (1998) Riboregulation in *Escherichia coli*: DsrA RNA acts by RNA:RNA interactions at multiple loci. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 12456-12461.
- (94) Majdalani, N., Chen, S., Murrow, J., John, K. S., and Gottesman, S. (2001) Regulation of RpoS by a novel small RNA: the characterization of RprA. *Mol Microbiol* 39, 1382-1394.
- (95) Majdalani, N., Hernandez, D., and Gottesman, S. (2002) Regulation and mode of action of the second small RNA activator of RpoS translation, RprA. *Mol Microbiol* 46, 813-826.
- (96) Updegrave, T., Wilf, N., Sun, X. G., and Wartell, R. M. (2008) Effect of Hfq on RprA-rpoS mRNA pairing: Hfq-RNA binding and the influence of the 5' rpoS mRNA leader region. *Biochemistry* 47, 11184-11195.
- (97) Altuvia, S., Weinstein-Fischer, D., Zhang, A. X., Postow, L., and Storz, G. (1997) A small, stable RNA induced by oxidative stress: role as a pleiotropic regulator and antimutator. *Cell* 90, 43-53.
- (98) Zhang, A. X., Altuvia, S., Tiwari, A., Argaman, L., Hengge-Aronis, R., and Storz, G. (1998) The OxyS regulatory RNA represses rpoS translation and binds the Hfq (HF-I) protein. *EMBO J* 17, 6061-6068.
- (99) Altuvia, S., Zhang, A. X., Argaman, L., Tiwari, A., and Storz, G. (1998) The *Escherichia coli* OxyS regulatory RNA represses fhlA translation by blocking ribosome binding. *EMBO J* 17, 6069-6075.
- (100) Argaman, L., and Altuvia, S. (2000) FhlA repression by OxyS RNA: kissing complex formation at two sites results in a stable antisense-target RNA complex. *J Mol Biol* 300, 1101-1112.
- (101) Zhang, A. X., Wassarman, K. M., Ortega, J., Steven, A. C., and Storz, G. (2002) The Sm-like Hfq protein increases OxyS RNA interaction with target mRNAs. *Mol Cell* 9, 11-22.
- (102) Wassarman, K. M., Repoila, F., Rosenow, C., Storz, G., and Gottesman, S. (2001) Identification of novel small RNAs using comparative genomics and microarrays. *Genes Dev* 15, 1637-1651.
- (103) Becker, G., Klauck, E., and Hengge-Aronis, R. (1999) Regulation of RpoS proteolysis in *Escherichia coli*: The response regulator RssB is a recognition factor that interacts with the turnover element in RpoS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6439-6444.
- (104) Zhou, Y. N., Gottesman, S., Hoskins, J. R., Maurizi, M. R., and Wickner, S. (2001) The RssB response regulator directly targets sigma(S) for degradation by ClpXP. *Genes Dev* 15, 627-637.

- (105) Bougdour, A., Cuning, C., Baptiste, P. J., Elliott, T., and Gottesman, S. (2008) Multiple pathways for regulation of sigma(S) (RpoS) stability in *Escherichia coli* via the action of multiple anti-adaptors. *Mol Microbiol* 68, 298-313.
- (106) Guillier, M., and Gottesman, S. (2006) Remodelling of the *Escherichia coli* outer membrane by two small regulatory RNAs. *Mol Microbiol* 59, 231-247.
- (107) Guillier, M., and Gottesman, S. (2008) The 5' end of two redundant sRNAs is involved in the regulation of multiple targets, including their own regulator. *Nucleic Acids Res* 36, 6781-6794.
- (108) Franze, M. T., Eoyang, L., and August, J. T. (1968) Factor fraction required for synthesis of bacteriophage Qbeta-RNA. *Nature* 219, 588-&.
- (109) Franze de Fernandez, M. T., Hayward, W. S., and August, J. T. (1972) Bacterial proteins required for replication of phage Q ribonucleic acid. Purification and properties of host factor I, a ribonucleic acid-binding protein. *J Biol Chem* 247, 824-31.
- (110) Miranda, G., Schuppli, D., Barrera, I., Hausherr, C., Sogo, J. M., and Weber, H. (1997) Recognition of bacteriophage Q beta plus strand RNA as a template by Q beta replicase: Role of RNA interactions mediated by ribosomal proteins S1 and host factor. *J Mol Biol* 267, 1089-1103.
- (111) Sun, X. G., Zhulin, I., and Wartell, R. M. (2002) Predicted structure and phyletic distribution of the RNA-binding protein Hfq. *Nucleic Acids Res* 30, 3662-3671.
- (112) Valentin-Hansen, P., Eriksen, M., and Udesen, C. (2004) The bacterial Sm-like protein Hfq: a key player in RNA transactions. *Mol Microbiol* 51, 1525-1533.
- (113) Kajitani, M., Kato, A., Wada, A., Inokuchi, Y., and Ishihama, A. (1994) Regulation of the *Escherichia coli* Hfq gene encoding the host factor for phage QBeta. *J Bacteriol* 176, 531-534.
- (114) Moller, T., Franch, T., Hojrup, P., Keene, D. R., Bachinger, H. P., Brennan, R. G., and Valentin-Hansen, P. (2002) Hfq: a bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA interaction. *Mol Cell* 9, 23-30.
- (115) Geissmann, T. A., and Touati, D. (2004) Hfq, a new chaperoning role: binding to messenger RNA determines access for small RNA regulator. *EMBO J* 23, 396-405.
- (116) Brescia, C. C., Mikulecky, P. J., Feig, A. L., and Sledjeski, D. D. (2003) Identification of the Hfq-binding site on DsrA RNA: Hfq binds without altering DsrA secondary structure. *RNA* 9, 33-43.
- (117) Takada, A., Wachi, M., Kaidow, A., Takamura, M., and Nagai, K. (1997) DNA binding properties of the hfq gene product of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 236, 576-579.
- (118) Azam, T. A., and Ishihama, A. (1999) Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli*: sequence recognition specificity and DNA binding affinity. *J Biol Chem* 274, 33105-33113.
- (119) Tsui, H. C. T., Leung, H. C. E., and Winkler, M. E. (1994) Characterization of broadly pleiotropic phenotypes caused by an Hfq insertion mutation in *Escherichia coli* K12. *Mol Microbiol* 13, 35-49.
- (120) Schumacher, M. A., Pearson, R. F., Moller, T., Valentin-Hansen, P., and Brennan, R. G. (2002) Structures of the pleiotropic translational regulator Hfq and an Hfq-RNA complex: a bacterial Sm-like protein. *EMBO J* 21, 3546-3556.
- (121) Sauter, C., Basquin, J., and Suck, D. (2003) Sm-like proteins in Eubacteria: the crystal structure of the Hfq protein from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 31, 4091-4098.
- (122) Nikulin, A., Stolboushkina, E., Perederina, A., Vassilieva, I., Blaesi, U., Moll, I., Kachalova, G., Yokoyama, S., Vassylyev, D., Garber, M., and Nikonov, S. (2005)

- Structure of pseudomonas aeruginosa Hfq protein. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 61, 141-146.
- (123) Link, T. M., Valentin-Hansen, P., and Brennan, R. G. (2009) Structure of Escherichia coli Hfq bound to polyriboadenylate RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 19286-19291.
- (124) Hermann, H., Fabrizio, P., Raker, V. A., Foulaki, K., Hornig, H., Brahms, H., and Luhrmann, R. (1995) SnRNP Sm proteins share 2 evolutionarily conserved sequence motifs which are involved in Sm protein-protein interactions. *EMBO J* 14, 2076-2088.
- (125) He, W. H., and Parker, R. (2000) Functions of Lsm proteins in mRNA degradation and splicing. *Curr Opin Cell Biol* 12, 346-350.
- (126) Will, C. L., and Luhrmann, R. (2001) Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 13, 290-301.
- (127) Wilusz, C. J., and Wilusz, J. (2005) Eukaryotic Lsm proteins: lessons from bacteria. *Nat Structl Mol Biol* 12, 1031-1036.
- (128) Sun, X. G., and Wartell, R. M. (2006) Escherichia coli Hfq binds A(18) and DsrA domain II with similar 2 : 1 Hfq(6)/RNA stoichiometry using different surface sites. *Biochemistry* 45, 4875-4887.
- (129) Brennan, R. G., and Link, T. M. (2007) Hfq structure, function and ligand binding. *Current Opinion in Microbiology* 10, 125-133.
- (130) Vecerek, B., Rajkowitsch, L., Sonnleitner, E., Schroeder, R., and Blasi, U. (2008) The C-terminal domain of Escherichia coli Hfq is required for regulation. *Nucleic Acids Res* 36, 133-143.
- (131) Moll, I., Afonyushkin, T., Vytvytska, O., Kaberdin, V. R., and Blasi, U. (2003) Coincident Hfq binding and RNase E cleavage sites on mRNA and small regulatory RNAs. *RNA* 9, 1308-1314.
- (132) Hajnsdorf, E., and Regnier, P. (2000) Host factor Hfq of Escherichia coli stimulates elongation of poly(A) tails by poly(A) polymerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1501-1505.
- (133) Le Derout, J., Folichon, M., Briani, F., Deho, G., Regnier, P., and Hajnsdorf, E. (2003) Hfq affects the length and the frequency of short oligo(A) tails at the 3' end of Escherichia coli rpsO mRNAs. *Nucleic Acids Res* 31, 4017-4023.
- (134) Folichon, M., Arluison, V., Pellegrini, O., Huntzinger, E., Regnier, P., and Hajnsdorf, E. (2003) The poly(A) binding protein Hfq protects RNA from RNase E and exoribonucleolytic degradation. *Nucleic Acids Res* 31, 7302-7310.
- (135) Folichon, M., Allemand, F., Regnier, P., and Hajnsdorf, E. (2005) Stimulation of poly(A) synthesis by Escherichia coli poly(A)polymerase I is correlated with Hfq binding to poly(A) tails. *FEBS J* 272, 454-463.
- (136) Vecerek, B., Moll, I., and Blasi, U. (2005) Translational autocontrol of the Escherichia coli Hfq RNA chaperone gene. *RNA* 11, 976-984.
- (137) Scheibe, M., Bonin, S., Hajnsdorf, E., Betat, H., and Morl, M. (2007) Hfq stimulates the activity of the CCA-adding enzyme. *BMC Mol Biol* 8:92.
- (138) Lee, T., and Feig, A. L. (2008) The RNA binding protein Hfq interacts specifically with tRNAs. *RNA* 14, 514-523.
- (139) Mohanty, B. K., Maples, V. F., and Kushner, S. R. (2004) The Sm-like protein Hfq regulates polyadenylation dependent mRNA decay in Escherichia coli. *Mol Microbiol* 54, 905-920.
- (140) Morita, T., Maki, K., and Aiba, H. (2005) RNase E-based ribonucleoprotein complexes: mechanical basis of mRNA destabilization mediated by bacterial noncoding RNAs. *Genes Dev* 19, 2176-2186.

- (141) Arluison, V., Mura, C., Guzman, M. R., Liquier, J., Pellegrini, O., Gingery, M., Regnier, P., and Marco, S. (2006) Three-dimensional structures of fibrillar Sm proteins: Hfq and other Sm-like proteins. *J Mol Biol* 356, 86-96.
- (142) Mura, C., Kozhukhovskiy, A., Gingery, M., Phillips, M., and Eisenberg, D. (2003) The oligomerization and ligand-binding properties of Sm-like archaeal proteins (SmAPs). *Protein Sci* 12, 832-847.
- (143) Arluison, V., Mutyam, S. K., Mura, C., Marco, S., and Sukhodolets, M. V. (2007) Sm-like protein Hfq: Location of the ATP-binding site and the effect of ATP on Hfq-RNA complexes. *Protein Sci* 16, 1830-1841.
- (144) Wassarman, K. M. (2007) 6S RNA: a regulator of transcription. *Mol Microbiol* 65, 1425-1431.
- (145) Gruber, T. M., and Gross, C. A. (2003) Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu Rev Microbiol* 57, 441-466.
- (146) Wassarman, K. M., and Storz, G. (2000) 6S RNA regulates E. coli RNA polymerase activity. *Cell* 101, 613-623.
- (147) Hindley, J. (1967) Fractionation of ³²P labelled ribonucleic acids on polyacrylamide gels and their characterization by fingerprinting. *J Mol Biol* 30, 125-&.
- (148) Trotochaud, A. E., and Wassarman, K. M. (2005) A highly conserved 6S RNA structure is required for regulation of transcription. *Nat Struct Mol Biol* 12, 313-319.
- (149) Wassarman, K. M., and Saecker, R. M. (2006) Synthesis-mediated release of a small RNA inhibitor of RNA polymerase. *Science* 314, 1601-1603.
- (150) Gildehaus, N., Neusser, T., Wurm, R., and Wagner, R. (2007) Studies on the function of the riboregulator 6S RNA from E. coli: RNA polymerase binding, inhibition of in vitro transcription and synthesis of RNA-directed de novo transcripts. *Nucleic Acids Res* 35, 1885-1896.
- (151) Liu, M. Y., Gui, G. J., Wei, B. D., Preston, J. F., Oakford, L., Yuksel, U., Giedroc, D. P., and Romeo, T. (1997) The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in Escherichia coli. *J Biol Chem* 272, 17502-17510.
- (152) Weilbacher, T., Suzuki, K., Dubey, A. K., Wang, X., Gudapaty, S., Morozov, I., Baker, C. S., Georgellis, D., Babitzke, P., and Romeo, T. (2003) A novel sRNA component of the carbon storage regulatory system of Escherichia coli. *Mol Microbiol* 48, 657-670.
- (153) Romeo, T. (1998) Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Mol Microbiol* 29, 1321-1330.
- (154) Dubey, A. K., Baker, C. S., Romeo, T., and Babitzke, P. (2005) RNA sequence and secondary structure participate in high-affinity CsrA-RNA interaction. *RNA* 11, 1579-1587.
- (155) Babitzke, P., and Romeo, T. (2007) CsrB sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins. *Curr Opin Microbiol* 10, 156-163.
- (156) Novick, R. P., Ross, H. F., Projan, S. J., Kornblum, J., Kreiswirth, B., and Moghazeh, S. (1993) Synthesis of Staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J* 12, 3967-3975.
- (157) Benito, Y., Kolb, F. A., Romby, P., Lina, G., Etienne, J., and Vandenesch, F. (2000) Probing the structure of RNAIII, the Staphylococcus aureus agr regulatory RNA, and identification of the RNA domain involved in repression of protein A expression. *RNA* 6, 668-679.
- (158) Huntzinger, E., Boisset, S., Saveanu, C., Benito, Y., Geissmann, T., Namane, A., Lina, G., Etienne, J., Ehresmann, B., Ehresmann, C., Jacquier, A., Vandenesch, F. O., and

- Romby, P. (2005) Staphylococcus aureus RNAlII and the endoribonuclease III coordinately regulate spa gene expression. *EMBO J* 24, 824-835.
- (159) Morfeldt, E., Taylor, D., Vongabain, A., and Arvidson, S. (1995) Activation of alpha-toxin translation in Staphylococcus aureus by the trans encoded antisense RNA, RNAlII. *Embo J* 14, 4569-4577.
- (160) Klinkert, B., and Narberhaus, F. (2009) Microbial thermosensors. *Cell Mol Life Sci* 66, 2661-2676.
- (161) Blouin, S., Mulhbachter, J., Penedo, J. C., and Lafontaine, D. A. (2009) Riboswitches: ancient and promising genetic regulators. *Chembiochem* 10, 400-416.
- (162) Gopalan, V., Vioque, A., and Altman, S. (2002) RNase P: variations and uses. *J Biol Chem* 277, 6759-6762.
- (163) Herskovits, A. A., Bochkareva, E. S., and Bibi, E. (2000) New prospects in studying the bacterial signal recognition particle pathway. *Mol Microbiol* 38, 927-939.
- (164) Gillet, R., and Felden, B. (2001) Emerging views on tmRNA-mediated protein tagging and ribosome rescue. *Mol Microbiol* 42, 879-885.
- (165) Withey, J. H., and Friedman, D. I. (2003) A salvage pathway for protein synthesis: tmRNA and trans-translation. *Annu Rev Microbiol* 57, 101-123.
- (166) Rolle, K., Zywicki, M., Wyszko, E., Barciszewska, M. Z., and Barciszewski, J. (2006) Evaluation of the dynamic structure of DsrA RNA from E. coli and its functional consequences. *J Biochem* 139, 431-438.
- (167) Kierzek, E. (2009) Binding of short oligonucleotides to RNA: Studies of the binding of common RNA structural motifs to isoenergetic microarrays. *Biochemistry* 48.
- (168) Walter, A. E., Turner, D. H., Kim, J., Lyttle, M. H., Muller, P., Mathews, D. H., and Zuker, M. (1994) Coaxial stacking of helices enhances binding of oligoribonucleotides and improves predictions of RNA folding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9218-9222.
- (169) Diamond, J. M., Turner, D. H., and Mathews, D. H. (2001) Thermodynamics of three-way multibranch loops in RNA. *Biochemistry* 40, 6971-6981.
- (170) Burkhardt, C., and Zacharias, M. (2001) Modelling ion binding to AA platform motifs in RNA: a continuum solvent study including conformational adaptation. *Nucleic Acids Res* 29, 3910-3918.
- (171) Cate, J. H., Gooding, A. R., Podell, E., Zhou, K. H., Golden, B. L., Kundrot, C. E., Cech, T. R., and Doudna, J. A. (1996) Crystal structure of a group I ribozyme domain: Principles of RNA packing. *Science* 273, 1678-1685.
- (172) Fratzczak, A., Kierzek, R., and Kierzek, E. (2009) LNA-modified primers drastically improve hybridization to target RNA and reverse transcription. *Biochemistry* 48, 514-516.
- (173) Kaur, H., Wengel, J., and Maiti, S. (2008) Thermodynamics of DNA-RNA heteroduplex formation: effects of locked nucleic acid nucleotides incorporated into the DNA strand. *Biochemistry* 47, 1218-1227.
- (174) Levin, J. D., Fiala, D., Samala, M. F., Kahn, J. D., and Peterson, R. J. (2006) Position-dependent effects of locked nucleic acid (LNA) on DNA sequencing and PCR primers. *Nucleic Acids Res* 34;20, e142.
- (175) Ballantyne, K. N., van Oorschot, R. A. H., and Mitchell, R. J. (2008) Locked nucleic acids in PCR primers increase sensitivity and performance. *Genomics* 91, 301-305.
- (176) Veedu, R. N., Vester, B., and Wengel, J. (2008) Polymerase chain reaction and transcription using locked nucleic acid nucleotide triphosphates. *J Am Chem Soc* 130, 8124-8125.

- (177) Kaur, H., Wengel, J., and Maiti, S. (2007) LNA-modified oligonucleotides effectively drive intramolecular-stable hairpin to intermolecular-duplex state. *Biochem Biophys Res Commun* 352, 118-122.
- (178) Sugimoto, N., Nakano, S., Katoh, M., Matsumura, A., Nakamuta, H., Ohmichi, T., Yoneyama, M., and Sasaki, M. (1995) Thermodynamic parameters to predict stability of RNA/DNA hybrid duplexes. *Biochemistry* 34, 11211-11216.
- (179) Stoscheck, C. M. (1990) Quantitation of protein. *Method Enzymol* 182, 50-68.
- (180) Bernacchi, S., Ennifar, E., Toth, K., Walter, P., Langowski, J., and Dumas, P. (2005) Mechanism of hairpin-duplex conversion for the HIV-1 dimerization initiation site. *J Biol Chem* 280, 40112-40121.
- (181) Liu, J. M., Bittker, J. A., Lonshteyn, M., and Liu, D. R. (2005) Functional dissection of sRNA translational regulators by nonhomologous random recombination and in vivo selection. *Chem Biol* 12, 757-767.