

# Nekodirajuće molekule RNA u bakterijama

---

**Novaković, Marta**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:090440>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-22**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Marta Novaković

# **Nekodirajuće molekule RNA u bakterijama**

Završni rad

Zagreb, 2024.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Marta Novaković

# **Non-coding RNA molecules in bacteria**

Bachelor thesis

Zagreb, 2024.

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu Sveučilišnog prijediplomskog studija Molekularne biologije na Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Ivane Ivančić Baće.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Završni rad

## Nekodirajuće molekule RNA u bakterijama

Marta Novaković

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Molekule RNA u bakterijama obavljaju razne uloge uz to što kodiraju ili pomažu u sintezi proteina. Fokus ovog rada su drugi tipovi molekula RNA: sRNA, riboprekidači i lncRNA, njihove uloge i mehanizmi kojima ih obavljaju. sRNA i riboprekidači dijele sposobnost za regulaciju ekspresije gena inhibicijom na kotranskripcijskoj ili posttranskripcijskoj razini. Dok se sRNA sparuju s ciljnim molekulama mRNA i tako reguliraju njihovu translaciju ili stabilnost, riboprekidači su domene samih mRNA i vezanjem liganda mijenjaju konformaciju, a s njome i ekspresiju gena. lncRNA su rjeđe i slabije istražene, no na otkrivanju njihovih djelovanja se kontinuirano radi i smatra se da obavljaju važne katalitičke i regulatorne uloge. Značaj istraživanja nekodirajućih RNA leži u uvidu koji pružaju u bakterijsku fiziologiju, ali i u potencijalnoj primjeni u jačanju biotehnoloških alata i razvoju novih antibiotika. Rad pruža pregled tri navedene kategorije nekodirajućih RNA u bakterijama i raspona procesa u kojima sudjeluju.

Ključne riječi: prokarioti, riboprekidači, sRNA, lncRNA, OLE RNA, RNA svijet  
(24 stranice, 3 slike, 32 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)  
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Mentor: prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće

# BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Bachelor thesis

## Non-coding RNA molecules in bacteria

Marta Novaković

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

RNA molecules in bacteria perform various functions in addition to coding and assisting in protein synthesis. The focus of this thesis are sRNA molecules, riboswitches and lncRNA molecules, their roles and the mechanisms by which they fulfill them. sRNAs and riboswitches share the ability to regulate gene expression by inhibition at the cotranscriptional or posttranscriptional level. While sRNAs pair with target mRNA molecules and thus regulate their translation or stability, riboswitches are domains of the mRNAs themselves and, by binding ligands, change the mRNA conformation and gene expression together with it. lncRNAs are rarer and less well researched, but the discovery of their functions is continuously being worked on and they are considered to play important catalytic and regulatory roles. The importance of non-coding RNA research lies in the insight they provide into bacterial physiology, but also in their potential application in developing new antibiotics and biotechnological tools. The thesis provides an overview of the three listed categories of non-coding RNAs in bacteria and the range of processes in which they participate.

Keywords: prokaryotes, riboswitches, sRNA, lncRNA, OLE RNA, RNA world  
(24 pages, 3 figures, 32 references, original in: Croatian)  
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. MALE MOLEKULE sRNA</b> .....	2
2.1 UVOD .....	2
2.2 ULOGE .....	4
2.3 MEHANIZMI.....	6
2.4 USPOREDBA S asRNA NA PLAZMIDIMA I U GENOMU: .....	8
2.5 REGULATORNE MREŽE .....	8
<b>3. RIBOPREKIDAČI</b> .....	9
3.1. UVOD .....	9
3.2 STRUKTURA RIBOPREKIDAČA.....	10
3.3 MEHANIZAM DJELOVANJA.....	11
3.4 RAZREDI RIBOPREKIDAČA .....	13
3.5 PORIJEKLO RIBOPREKIDAČA I RNA SVIJET .....	15
<b>4. VELIKE NEKODIRAJUĆE MOLEKULE RNA I OLE RNA</b> .....	16
4.1 lncRNA.....	16
4.2 OLE RNA.....	17
<b>5. ZAKLJUČAK</b> .....	21
<b>6. LITERATURA</b> .....	22
<b>7. ŽIVOTOPIS</b> .....	24

# 1. UVOD

Naziv nekodirajuće RNA (ncRNA od engl. *non-coding*) molekule odnosi se na one molekule RNA čija uloga nije biti kalup za sintezu proteina, već izvršavanje neke druge cjelovite funkcije. Najvažnije za život na Zemlji i stoga najzastupljenije takve molekule su tRNA i rRNA, otkrivene sredinom prošlog stoljeća. Usprkos značaju njihove pozicije u srži mašinerije za prevođenje nasljedne informacije u proteine – ili možda baš zbog nje – tRNA i rRNA u početku su promatrane kao izoliran slučaj umjesto kao pioniri cijelog novog pravca istraživanja RNA. Tek nakon što su uslijedila otkrića eukariotskih snRNA (od engl. *small nuclear*, male nuklearne RNA), snoRNA (od engl. *small nucleolar*, male nukleolarne RNA) i pogotovo miRNA (od engl. *micro* RNA), u korak s razvojem sve naprednijih tehnika sekvenciranja, postalo je jasno da su ncRNA posvuda i da obavljaju najrazličitije uloge. snRNA i snoRNA ključne su u prekrajanju i uređivanju drugih RNA, a miRNA su ukazale na važnost i zastupljenost posttranskripcijske regulacije ekspresije gena kod eukariota. Da je takav tip regulacije efikasan i široko zastupljen i među prokariotima utvrdilo se još kasnije, a danas je to jedno od plodnih područja RNA istraživanja. Bioinformatičke metode ključne su u valu otkrića ncRNA kod prokariota i ustanovljenju njihove važnosti i rasprostranjenosti među raznim arhealnim i bakterijskim rodovima.

Osim ribozima konzerviranih i među prokariotima i eukariotima, kao što je RNaza P, bakterijske ncRNA koje su tema ovog rada mogu se ugrubo podijeliti na bakterijske male RNA (sRNA, od engl. *small*), riboprekidače (engl. *riboswitches*) i velike nekodirajuće RNA (lncRNA, od engl. *long non-coding* RNA). sRNA i riboprekidači sudjeluju u raznolikim staničnim procesima, u prvom redu u utišavanju gena, dok su lncRNA puno šira te po ulogama heterogena kategorija. sRNA su uglavnom *trans*-djelujući regulatorni elementi koji sparivanjem s mRNA metom, prostorno udaljenom od same sRNA, inhibiraju ili aktiviraju njenu translaciju. Najjednostavnije među njima su asRNA (*antisense*) RNA, koje pak djeluju lokalno *in cis* na mRNA prepisanu sa suprotnog lanca DNA. Principi genske regulacije na temelju baznog sparivanja u općenitom smislu su analogni djelovanju miRNA, ali inicijalno procesiranje nakon sinteze i proteinski faktori koji ih vežu jasno opozivaju izravnu usporedbu sa sRNA.

Riboprekidači su s druge strane *cis*-djelujući elementi unutar mRNA koji promjenom strukture inhibiraju ili aktiviraju translaciju iste. Promjena strukture potaknuta je vezanjem specifičnog liganda, često metabolita koji je krajnji produkt metaboličkog puta u kojem riboprekidač sudjeluje.



Pošto proteini u teoriji uopće nisu potrebni da bi riboprekidači obavili svoje uloge, smatra se da bi mogli biti slični ribonukleinskim regulatorima iz drevne prošlosti RNA svijeta.

Zadnja kategorija lncRNA obuhvaća nekodirajuće molekule RNA dulje od 200 nukleotida, u što po veličini ulaze i neki riboprekidači i sRNA, no oni se izdvajaju konzerviranom strukturom i djelovanjem. Naime za lncRNA je karakteristična kompleksna, raskošna tercijska struktura s mnogobrojnim petljama i konzerviranim pozicijama određenih nukleotida koja upućuje na potencijalno odvedeniju ulogu od uvriježenog samoizrezivanja ili baznog sparivanja. Međutim, za veliku većinu otkrivenih lncRNA uloge koje obavljaju ostaju nepoznate, dok su one poznate često nezamjenjive u održavanju stanice na životu (tRNA, rRNA, RNaza P). Malo je vjerojatno da je složenost struktura očuvanih lncRNA redundantna i da nemaju nikakvu značajnu ulogu u bakterijskoj fiziologiji.

U današnje doba metagenomike i sve veće dostupnosti sekvenciranja, nove i zanimljive sekvence i strukture ncRNA se redovito pojavljuju u velikom broju te će njihova uspješna karakterizacija od znanosti zahtijevati kreativnost i pomake u perspektivi. RNA postaje sve značajnija kao primarni izvršitelj bioloških funkcija, a vrijeme kad je ta titula pripadala isključivo proteinima odavno je prošlo. Ovaj rad pruža pregled navedenih skupina bakterijskih nekodirajućih molekula RNA kako bi se dobila čim cjelovitija slika širine djelovanja RNA u svrhu regulacije prokariotskih sustava.

## **2. MALE MOLEKULE sRNA**

### **2.1 UVOD**

Prve nekodirajuće molekule RNA u bakterijama kojih se valja dotaknuti su male regulatorne RNA, često poznate kao molekule sRNA. Radi se o *trans*-djelujućim genetičkim elementima od ~50-400 nt koji na svoje mete uglavnom djelovanje vrše sparivanjem baza na temelju komplementarnosti (Nitzan i sur., 2017). Mete u pitanju su mRNA te se ponajviše radi o transkriptima gena koji se eksprimiraju pod utjecajem stresa ili specifičnih uvjeta rasta. Nekolicina molekula sRNA ima tzv. „housekeeping“ ulogu te su eksprimirane konstitutivno, kao što je 4.5S RNA komponenta SRP (*signal recognition particle*). Osim takvih iznimaka, sve sRNA su regulatorni elementi prisutni u posebnim uvjetima koji na različite načine posttranskripcijski nadziru i mijenjaju gensku ekspresiju duž cijelog genoma. Za njihovo djelovanje često je ključan protein Hfq, koji ih stabilizira ili služi kao sučelje za međudjelovanje između dvije molekule RNA (Nitzan i sur., 2017).

Regulatorni elementi s kojima se nameće nužna usporedba su eukariotske miRNA. miRNA su kratke jednolančane molekule RNA prisutne kod raznih skupina eukariota, te poput sRNA posttranskripcijski utječu na ekspresiju gena, posebice na njihovo utišavanje. Oba razreda molekula RNA nekodirajuća su i provode gensku regulaciju posredstvom proteinske komponente, koja je kod miRNA RISC (od engl. *RNA-induced silencing complex*, kompleks za utišavanje induciran od strane RNA), a kod sRNA Hfq (Shang i sur., 2023). Prva očita razlika između sRNA i miRNA je u procesiranju, gdje se miRNA sintetizira u obliku velike ukosnice (*hairpin*) koja se cijepa na manje fragmente djelovanjem ribonukleaza kao što je *Dicer*, a ponekad se iz jedne ukosnice može dobiti i više miRNA. sRNA se s druge strane samo prepisuje i uglavnom nema potrebe za procesiranjem prije nego što je spremna za vezanje za Hfq i sparivanje s ciljnom mRNA. Moguće objašnjenje za ovo je stabilnija sekundarna struktura odmah po nastanku prisutna kod mnogih sRNA (Gottesman, 2005). Druga razlika je u mogućim ishodima sparivanja mete i regulatorne RNA. miRNA imaju konzervirani obrazac sparivanja pri kojem potpuna komplementarnost dovodi do degradacije mete, a djelomična komplementarnost do inhibicije translacije, dok se sRNA sparuju uglavnom nesavršeno i mogu uzrokovati i inhibiciju i stimulaciju translacije, a metu mogu stabilizirati ili degradirati. Pozitivna regulacija ekspresije zasad ostaje svojstvena samo prokariotima.

Istraživanje sRNA oduvijek je bilo otežano, pošto tradicionalne metode genetičke analize indukcijom mutacija nisu davale značajne rezultate: delecije gena za sRNA daju nejasne fenotipove koji do izražaja dolaze jedino u specifičnim uvjetima, te je teško bilo jednoznačno odrediti što točno pojedina sRNA radi. Više sreće bilo je u istraživanjima s proteinom Hfq, tj. analizom RNA koja je na njih vezana (Wagner i Romby, 2015). Samo sekvenciranje na temelju komplementarnosti također daje nejasne rezultate, pošto se sRNA koriste ograničenim sparivanjem koje se može pojaviti u različitim domenama (ribosomsko vezno mjesto, kodirajuća sekvenca, 3' UTR -. od eng. *untranslated region* – netranslatirana regija), a moguće je i da sRNA ima više meta kojima je komplementarna. Ako se sekvenca pretražuje na temelju strukturnih elemenata, valja imati na umu da na njih utječu i kofaktori kao što je Hfq. Usprkos svemu tome, postoje konzervirane sekvence koje se nazivaju sekvencama *seed* („sjeme“) i za koje je karakteristično da će one potaknuti bazno sparivanje između sRNA i mete te osigurati stabilizaciju dupleksa. One predstavljaju zajednički element na temelju kojeg je moguće identificirati nove molekule sRNA (Pesceh i sur., 2019). Uz korištenje dubokog sekvenciranja može se pouzdano reći da su sRNA prisutne kod većine velikih bakterijskih skupina te nekoliko vrsta arheja (Wagner i Romby, 2015).

## 2.2 ULOGE

Kao što je već spomenuto, samo iznimke među sRNA konstitutivno su eksprimirane, dok su sve ostale odgovor na različite stresne ili specifične uvjete, kao što su npr. toplinski šok ili ulazak u stacionarnu fazu. Slijede primjeri nekoliko regulatornih uloga koje obavljaju sRNA i uvjeta koji potiču njihovu ekspresiju.

### HOMEOSTAZA ŽELJEZA

U uvjetima ograničene dostupnosti željeza, koje je nužno za normalno funkcioniranje prokariotske stanice, sRNA sudjeluju u održavanju njegove homeostaze. Specifična sRNA koja obavlja tu ulogu zove se RyhB sRNA. Sinteza RyhB RNA je pod kontrolom represora Fur, koji također kontrolira i sintezu nekolicine gena za asimilaciju željeza, na sljedeći način: sinteza je spriječena kad je željezo vezano na represor. Kad je količina željeza smanjena, represor Fur nema što vezati i represija prestaje, a počinje sinteza RyhB RNA koja neizravno utječe na normalizaciju razine željeza u stanici. Ona je sposobna spariti se s mRNA više proteina koji vežu željezo, a ishod tog sparivanja je brza razgradnja njihovih transkripata. Time je onemogućena translacija i samim time sinteza proteina koji bi mogli vezati željezo iz trenutno smanjene zalihe, te je stoga ono dostupnije esencijalnim proteinima (Gottesman, 2005). RhyB RNA djeluje posttranskripcijski i neovisno od signala koji potiču transkripciju gena za Fe-vezujuće proteine, na neposredan način svojstven za sRNA regulaciju.

### QUORUM SENSING

*Quorum sensing* (u daljnjem tekstu QS) mehanizam je međustanične komunikacije kojim bakterije „osjećaju“ gustoću odnosno brojnost bakterija u koloniji. Na temelju QS signala (molekula naziva autoinduktori) one reguliraju ekspresiju gena i koordiniraju ponašanje kao zajednica. Neka od tih ponašanja su stvaranje biofilmova, proizvodnja faktora virulencije i koordinirana bioluminiscencija (Henke i Bassler, 2004). U bakterijama roda *Vibrio* sRNA obavljaju bitnu ulogu u sustavima za QS kao dio dobro koordinirane regulatorne mreže. Kao primjer uzet ću *V. cholerae*, poznatog patogenog pripadnika tog roda. Nekoliko neovisnih sustava za QS udruženo je zajedničkim regulatorom, proteinom LuxO, čije djelovanje ovisi o njegovu stanju fosforilacije. Kada je fosforiliran u uvjetima niske stanične gustoće, aktivira ekspresiju nekoliko sRNA imena Qrr1-4 (*quorum* regulirajuće RNA), čija je meta mRNA proteina HapR, nužnog za sinkroniziranu

ekspresiju gena kontroliranu QS-om. Qrr1-4 ga destabiliziraju i na taj način utišavaju njegovu translaciju. LuxO je defosforiliran u uvjetima visoke stanične gustoće, stoga tada nema aktivacije sRNA i HapR se slobodno translacija te utječe na ekspresiju gena za stvaranje biofilmova i faktore virulencije (Ghandour i Papenfort, 2023; Lenz i sur., 2004; Tu i Bassler, 2007). sRNA u ovom slučaju predstavljaju nezamjenjivu poveznicu između dva koraka regulacije.

## **REGULACIJA TRANSKRIPCISKIH FAKTORA**

sRNA su umrežene u složene regulatorne sustave, gdje transkripcijski faktori (TF) upravljaju njihovom ekspresijom, a mogući su i slučajevi gdje vrijedi suprotno. Jedan od takvih je slučaj sigma faktora RpoS ( $\sigma^S$ ) kod *E. coli*, koji prepoznaje promotore nužne za ulaz u stacionarnu fazu, prilagodbu na smanjenu količinu nutrijenata i druge stresne podražaje. U normalnim uvjetima nema translacije RpoS zbog strukture njegove mRNA koja ometa vezanje ribosoma na njihovo vezno mjesto (RBS, od eng. *ribosome binding site*). U uvjetima koji traže povećanu količinu RpoS (kao što je npr. drastična promjena temperature), prepisuju se molekule sRNA koje sparivanjem s inhibitornom ukosnicom u RpoS RNA poništavaju njeno inhibitorno djelovanje i osiguravaju njegovu translaciju (Gottesman, 2005). Jedna od tih sRNA je DsrA RNA koja se uvelike sintetizira na niskim temperaturama (Repoila i Gottesman, 2003). Ovo je tek jedan od primjera sustava pozitivne regulacije za koju su sRNA u bakterijama sposobne.

## **ODVAJANJE PROTEINA**

Osim djelovanja na molekule mRNA, sRNA imaju još jednu naročitu ulogu. Mogu vezati regulatorne proteine i tako ih odvajati od njihovih meta (eng. *protein sequestering*) ili im blokirati djelovanje. Kao primjer za ovaj mehanizam uzet ću 6S RNA, čija je uloga bila nepoznata do čak 30 godina nakon njenog otkrića iako je široko rasprostranjena među mnogim bakterijskim vrstama. Konačno su istraživanja pokazala da 6S RNA stabilno veže RNA polimerazu sa  $\sigma^{70}$  podjedinicom, odnosno najzastupljeniji oblik RNA polimeraze u eksponencijalnoj fazi rasta (Storz i sur., 2011). Sekundarna struktura svih 6S RNA slična je slobodnom promotoru, te na temelju svojevrsne mimikrije omogućuje nastanak stabilnog kompleksa. Odvajanje  $\sigma^{70}$ -RNAPol vezanjem od strane 6S RNA daje prednost transkripciji slobodnom  $\sigma^S$ -RNAPol, tj. RNA polimerazom sa ranije spomenutim sigma faktorom RpoS za stacionarnu fazu. 6S RNA nakuplja se kad dođe vrijeme za ulazak u stacionarnu fazu te tako regulira koji se geni prepisuju i koji se sigma faktor favorizira.

Uz to, radi svoje specifične strukture 6S RNA sposobna je služiti kao promotor, što je ključno u otpuštanju  $\sigma^{70}$ -RNAPol. Naime, preduvjet za izlazak iz stacionarne faze je povećana koncentracija NTP-ova (nukleozid-trifosfata). U takvim uvjetima RNAPol vezana za 6S RNA prepisuje transkript od oko 14 nukleotida sa 6S RNA „promotora“, nazvan pRNA. Ovo prepisivanje i kompleks pRNA-6S RNA koji nastaje uzrokuju strukturnu promjenu u 6S RNA zbog koje se  $\sigma^{70}$ -RNAPol oslobađa (Wagner i Romby, 2015). Osim primjera odvajanja proteina vezanjem, 6S RNA pokazuje i zanimljiv fenomen molekule koja sadrži kalup za sintezu vlastitog regulatora.

## 2.3 MEHANIZMI

Ranije su opisani primjeri za raznolike i važne uloge koje sRNA mogu obavljati. Mehanizmi kojima to postižu također su raznoliki, ali ipak postoji nekoliko najzastupljenijih kojima se služi većina poznatih sRNA.

### **KOMPETICIJA ZA RIBOSOMSKO VEZNO MJESTO**

Na 5' kraju mRNA mete nalazi se ribosomsko vezno mjesto (RBS), Shine-Dalgarno sekvenca i START kodon. Nužno je da ova domena transkripta bude dostupna ribosomu kako bi translacija mogla nesmetano započeti. Mnoge sRNA vežu se na 5' netranslatiranu regiju (UTR) mRNA blizu RBS-a ili preko njega, što sterički onemogućuje 30S ribosomu vezanje za transkript, te na taj način kompetiraju s ribosomom za to vezno mjesto. sRNA može izravno prekriti Shine-Dalgarno sekvencu ili START kodon, ali zaklanjanje bilo koje regije unutar 55 nukleotida s kojima interagira 30S ribosomska podjedinica dovoljno je za uspješnu inhibiciju translacije. Osim djelovanja same sRNA kao steričke blokade, ona u nekim slučajevima može i dovući protein Hfq na RBS i tako onemogućiti translaciju (Wagner i Romby, 2015). Nakon inhibicije translacije često dolazi do razgradnje mRNA mete, pošto je gola mRNA bez ribosoma osjetljiva na napade endonukleaza. Degradacija mRNA mete može biti i primarni cilj djelovanja sRNA, ali u ovom slučaju znamo da se radi o sekundarnom učinku zato što se potpuna inhibicija translacije postiže i kad se mutira RNaza koja obavlja degradaciju.

### **DEGRADACIJA mRNA METE**

Vezno mjesto za sRNA može se nalaziti i unutar kodirajuće sekvence mRNA, nedovoljno blizu RBS-u da bi utjecala na vezanje ribosoma za metu, a svejedno posljedica njenog djelovanja može biti inhibicija translacije. U tom slučaju radi se o poticanju cijepanja mete određenom RNazom

blizu RNA dupleksa. Primjer takvog djelovanja je MicC sRNA kod roda *Salmonella*, koja se veže na metu u kompleksu s proteinom Hfq i RNazom E i nakon uspješnog vezanja provodi degradaciju mRNA, a u njenom odsustvu i same sRNA (Pfeiffer i sur., 2009).

### **AKTIVACIJA TRANSLACIJE**

Aktivacija translacije je mehanizam pozitivne regulacije kao u ranije opisanom slučaju transkripcijskog faktora RpoS koji se aktivira malom RNA DsrA. Ako je početno stanje određene mRNA inhibicija translacije (OFF) radi strukture u samoj molekuli mRNA koja onemogućuje pristup ribosoma na RBS, „razrješenje“ te strukture vezanjem interferirajuće molekule potaknut će inicijaciju translacije (Gottesman, 2005). Vezati se može sama sRNA, ali i protein Hfq koji na sebi nosi sRNA i onda posreduje u njenom ispravnom sparivanju s metom mRNA.

### **STABILIZACIJA mRNA METE**

Najslabije zastupljen od spomenutih mehanizama također se tiče pozitivne regulacije. Naime, sRNA mogu stabilizirati mRNA na koju se vežu, uglavnom uz posredstvo proteina Hfq, tako što ju štite od endonukleaza (Wagner i Romby, 2015).

### **ULOGA PROTEINA HFQ**

Protein Hfq obavlja središnju ulogu u regulaciji sRNA, pogotovo kod enterobakterija. Radi se o homoheksamernom RNA šaperonu koji dijeli RNA-vezujuće strukturne motive s eukariotskim proteinima Sm, važnim za prekrajanje RNA (Storz i sur., 2011). Koliko je ključan za djelovanje sRNA i koliko su one važne u regulatornim mrežama potvrđuju eksperimenti delecije Hfq, koja rezultira u defektnim i osjetljivim fenotipima. Najznačajnije je njegovo šaperonsko djelovanje: vezanjem sRNA i prenošenjem iste do mRNA on omogućuje njihovu interakciju (Wagner i Romby, 2015). Dva heksamera predstavljaju dva vezna mjesta za RNA, što objašnjava ulogu Hfq kao sučelje sRNA i njihovih meta. Osim toga, on može stabilizirati molekule RNA, poticati RNA-RNA sparivanje, odmotavati regije RNA i dovesti RNazu E s ciljem napada na mRNA i/ili sRNA. Osim sRNA i mRNA meta, Hfq čvrsto veže mnogobrojne druge molekule RNA i uglavnom je zaliha Hfq uvijek zasićena. To znači da se vezane na proteinima Hfq, kojih redovito ima bročano manje nego molekula RNA koje vežu, vjerojatno uvijek nalaze po dvije molekule RNA. Šanse da se sRNA i njena mRNA meta s kojom treba interagirati putem šaperona (odnosno proteina Hfq) nađu na istom

proteinu Hfq tako su znatno više nego u slučaju kad bi u stanici bilo više slobodnih šaperona od molekula RNA (Storz i sur., 2011).

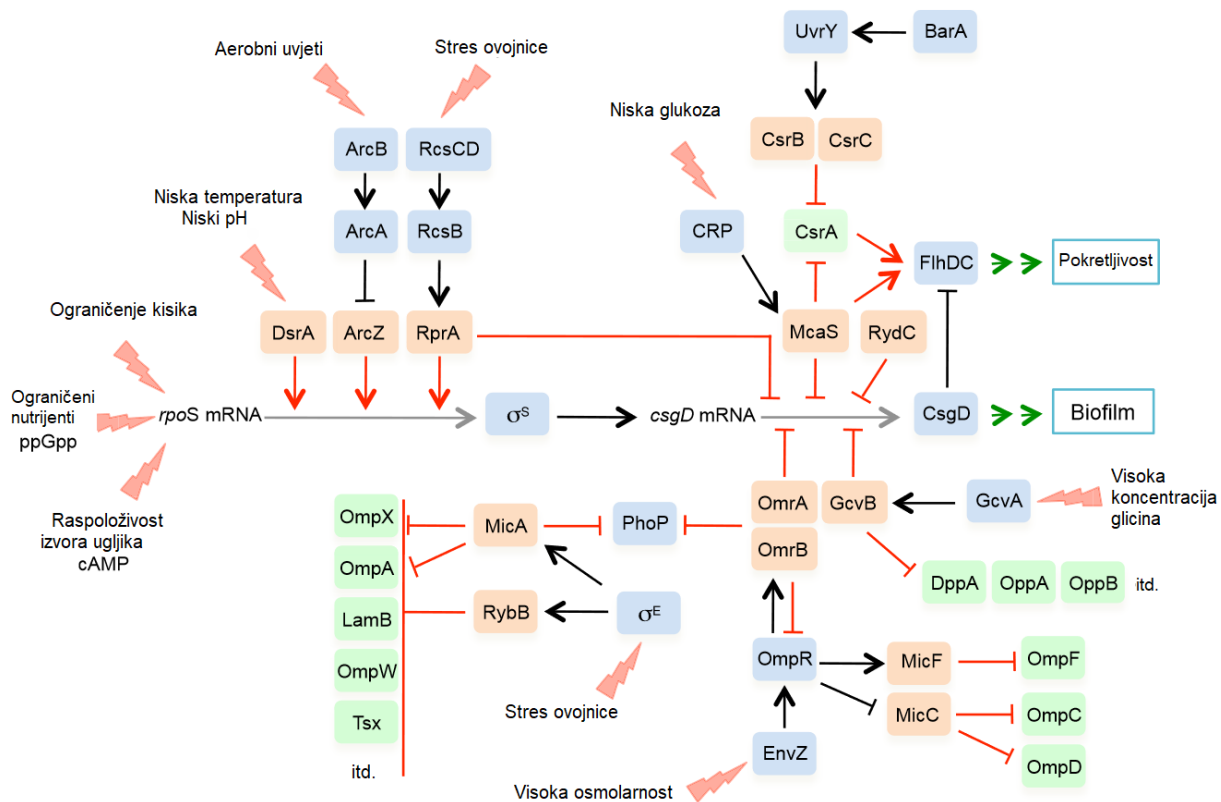
## 2.4 USPOREDBA S asRNA NA PLAZMIDIMA I U GENOMU

Prve male regulatorne molekule RNA otkrivene su u sekvencama plazmida, transpozona i faga, a ne unutar kromosoma. Radilo se o molekulama *antisense* RNA (asRNA, protusmislene RNA), kodiranim na suprotnom lancu DNA od *sense* (smislene) RNA gena na koji djeluju. Dok se sRNA često nalaze udaljene od gena na koji utječu, imaju ograničenu razinu komplementarnosti s metom i stoga mogu djelovati i na nekoliko meta, te im je nerijetko neophodan šaperon Hfq, asRNA potpuno su komplementarne svojim metama i uglavnom neovisne o proteinima (Thomason i Storz, 2010). U desetljećima od prvog otkrića molekule asRNA pronađene su i na bakterijskim kromosomima te je utvrđeno da na različite načine utječu na svoje *sense* gene, pa ću i njih spomenuti u okviru sekcije o molekulama sRNA. Neka od njihovih djelovanja su utišavanje gena za transpozaze, represija sinteze toksičnih proteina te regulacija razine transkripcijskih faktora i faktora virulencije. Ove kromosomske asRNA djeluju istim mehanizmima kao i gore opisane sRNA, s tom razlikom što asRNA zbog svog smještaja u genomu imaju i sposobnost ometanja same transkripcije mete, dok sRNA djeluju posttranskripcijski (Thomason i Storz, 2010). Zasad su istraživanja o kromosomskim asRNA donekle ograničena u odnosu na ona o sRNA, ali kao i sve vrste regulatornih molekula RNA i njih se otkriva sve više i dobivaju na značaju u suvremeno doba bioinformatičkih metoda.

## 2.5 REGULATORNE MREŽE

Veliko područje istraživanja regulacije ekspresije gena nekodirajućim RNA u bakterijama su regulatorne mreže. Odgovor na pitanje kako se pojedina sRNA uklapa u složene sustave regulacije koji organizme održavaju u homeostazi ili im pomažu preživjeti stresne uvjete nikada nije jednoznačan, ali je svakako zanimljiva polazna točka za raspravu i razmišljanje. Pošto su sRNA, kao i transkripcijski faktori, *trans*-djelujući elementi, također mogu djelovati na jednu ili više meta, povezivati lokalne u globalne regulatorne mreže i obratno. Djelomični takav prikaz regulatornih mreža nalazi se u nastavku (**Slika 1.**), neke od čijih su komponenti spomenute ranije u tekstu (RpoS, CsrA), kao ilustracija složenosti međudjelovanja više razina regulacije. Transkripcijski faktori mogu utjecati na prepisivanje sRNA, a onda sRNA posttranskripcijski mogu potaknuti ekspresiju ili represiju određenih transkripcijskih faktora. Proučavanje svih tih učinaka zajedno imajući na

umu širu sliku komplicirano je, ali daje nezamjenjive uvide u djelovanje sveukupne genske ekspresije kao jedinstvenog sustava.



**Slika 1.** Odabrani dio regulatornih mreža kod *Escherichije coli/Salmonelle*. Na slici su prikazani utjecaji okolišnih uvjeta koje bakterija doživljava preko osjetljivih sustava prijenosa signala (simbol munje) i kaskada regulacije koje pokreću; izostavljeni su koraci i sudionici radi jednostavnosti. Aktivacija djelovanjem TF prikazano je crnim, a sRNA crvenim strelicama, dok je inhibicija prikazana crtama na mjestu glave strelice istih boja. Plavo obojeni su TF i sigma faktori, narančasto sRNA, zeleno proteini mete regulacije. Preuzeto i prilagođeno iz (Wagner i Romby, 2015).

### 3. RIBOPREKIDAČI

#### 3.1. UVOD

Sljedeća bitna kategorija regulatornih molekula RNA su riboprekidači (*riboswitches*). Radi se o *cis*-djelujućim genetičkim elementima, što znači da se nalaze na istoj molekuli RNA na koju utječu, i najčešće ih se može pronaći u 5' UTR mRNA. Njihova posebnost leži u činjenici da ne trebaju proteine ni za jedan korak svog djelovanja, pa ni kao šaperone. Svoj učinak na ekspresiju gena ili



druge procese riboprekidači ostvaruju tako što vežu specifične ligande koji utječu na promjenu njihove konformacije; ta strukturna promjena je pokretač djelovanja riboprekidača. Osim posttranskripcijski (poput sRNA), riboprekidači mogu djelovati i za vrijeme transkripcije pošto se nalaze upravo na molekuli mRNA koja se prepisuje (Barrick i Breaker, 2007). Široko su rasprostranjeni među bakterijama, ali pronađeni su i među biljkama i gljivama, gdje pokazuju znatno manju raznolikost (Tucker i Breaker, 2005).

## 3.2 STRUKTURA RIBOPREKIDAČA

Dok molekule sRNA uglavnom djeluju na osnovi sparivanja s metom i/ili posredstvom šaperona Hfq da bi izvršile svoju ulogu, za riboprekidače ključna je njihova struktura. Za uspješno djelovanje svaki riboprekidač mora moći prvo prepoznati molekulu liganda koji je signal za konformacijsku promjenu, a zatim odgovoriti na taj signal i promijeniti konformaciju s ciljem obavljanja određene uloge. Stoga se strukturno riboprekidači dijele na aptamer i ekspresijsku platformu (Barrick i Breaker, 2007).

Aptamer je visoko strukturirana domena kompleksnog uzorka smatanja koja služi kao vezno mjesto za ligand. S obzirom na složenost strukture i visoku selektivnost za pojedini ligand, aptameri su konzervirani među mnogim organizmima te se na temelju razlika među njihovim sekvencama riboprekidači smještaju u odvojene razrede (Barrick i Breaker, 2007). Spadaju među genetičke elemente s evolucijski najočuvanijim sekvencama uopće (McCown i sur., 2017).

Ekspresijska platforma je pak visoko varijabilna regija nizvodno od aptamera. Ona ima sposobnost prepoznati je li ligand vezan na aptamer i ako jest, provesti konformacijsku promjenu koja se prevodi u promjenu u ekspresiji gena (Barrick i Breaker, 2007). Ekspresijske platforme nisu evolucijski očuvane poput aptamera pošto obavljaju različitu ulogu; umjesto uske selektivnosti za jedan metabolit tj. ligand one moraju promijeniti obrazac smatanja, a svaka takva promjena ima drugačiji utjecaj na gensku ekspresiju. Dapače, ona može utjecati i na više procesa u isto vrijeme, ovisno o potrebi određenog riboprekidača.

S obzirom na to da različiti razredi riboprekidača prepoznaju kemijski različite metabolite, nema jedinstvenog mehanizma za njihovo prepoznavanje. Većina aptamera tvori uski vezni džep za svoj određeni metabolit i ostvaruje gotovo savršenu komplementarnost s njim, prepoznajući većinu njegovih funkcijskih grupa tako da je vrlo mali udio površine liganda izložen okolini (Serganov i

Nudler, 2013). Neki riboprekidači nemaju toliko uske vezne džepove i ostavljaju i do pola površine metabolita izložene okolini, kao što je tetrahidrofolatni riboprekidač. Također je moguće da sadrže bipartitne vezne džepove koji nakon vezanja liganda prilagode konformaciju da bi ga čvršće vezali i stabilizirali aptamer u tom stanju, što je slučaj kod tiamin-pirofosfat riboprekidača (TPP) (Serganov i Patel, 2012).

### 3.3 MEHANIZAM DJELOVANJA

Riboprekidači najčešće sudjeluju u utišavanju gena, npr. inhibicijom transkripcije ili translacije. Nerijetko su geni pod kontrolom riboprekidača upravo geni za biosintezu metabolita koji je ujedno i ligand tog riboprekidača, te je na taj način uspostavljen elegantan mehanizam povratne sprege. Riboprekidač veže krajnji produkt metaboličkog puta koji regulira i utišava ga u slučaju da produkta ima previše (Barrick i Breaker, 2007).

Terminacija transkripcije riboprekidačem može biti, kao i bez njega, intrinzična ili Rho-ovisna. U prvom slučaju nastaje terminacijska ukosnica na kojoj bi RNA polimeraza zastala i oslobodila se nove molekule mRNA. Riboprekidač kontrolira taj događaj tako što ovisno o vezanju liganda može nastati antiterminacijska ukosnica, koja će osigurati da se transkripcija odvije do kraja. Ako se radi o ON riboprekidaču, vezanje liganda osigurava nastanak antiterminacijske ukosnice i nesmetanu transkripciju. Ako se pak radi o OFF riboprekidaču, što je mnogo zastupljeniji slučaj, antiterminacijska ukosnica je prirodno prisutna u mRNA i unutar nje se nalaze bazni parovi potrebni za stvaranje terminacijske ukosnice; vezanje liganda uzrokuje narušavanje strukture antiterminatora, baze terminacijske ukosnice se oslobađaju i transkripcija je prekinuta (Barrick i Breaker, 2007). U slučaju Rho-ovisne terminacije, riboprekidač omogućuje proteinu Rho terminaciju transkripcije tek u slučaju kad je ligand vezan na aptamer.

Inhibicija translacije se kao i kod sRNA postiže tako što se ribosomu onemogućuje pristup njegovom veznom mjestu. Najjednostavniji mehanizam je odvajanje RBS-a unutar ukosnice ekspresijske platforme. Osim toga, RBS se može nalaziti unutar aptamerske domene te tako vezanje liganda inhibira translaciju bez potrebe za djelovanjem ekspresijske platforme. Isto kao i u slučaju terminacije transkripcije, početno stanje riboprekidača može biti ON ili OFF, te stoga vezanje liganda može potaknuti zaklanjanje RBS-a ili njegovo oslobađanje (Breaker, 2012).

Postoje druge mete djelovanja riboprekidača osim kanonskog *in cis* djelovanja na mRNA. U patogenoj bakteriji *Listeria monocytogenes* riboprekidač koji veže vitamin B<sub>12</sub> prepisuje se ne kao dio mRNA već kao dio *antisense* RNA AspocR (*antisense* PocR) (Mellin i sur., 2013). PocR, čiju ekspresiju AspocR utišava, transkripcijski je faktor koji pod utjecajem 1,2-propandiola aktivira ekspresiju nizvodnih gena *pdu*. Geni *pdu* pak služe za katabolizam propandiola, za što je vitamin B<sub>12</sub> nužan kao kofaktor. U odsustvu propandiola nema ekspresije gena za njegov katabolizam, a u slučaju da je on prisutan bez nužnih kofaktora (npr. vitamina B<sub>12</sub>), kaskada aktivacije blokira se već u prvom koraku, kod PocR, kako bi maksimalna razina ekspresije bila u optimalnim uvjetima za katabolizu. Princip regulacije je sljedeći: ako se ligand B<sub>12</sub> veže na riboprekidač, on zaustavlja transkripciju *aspocR* prije nego se ona prepíše kao funkcionalna asRNA i spriječi ekspresiju *pocR*, te PocR pokreće katabolizu propandiola. Ako pak nema dovoljno B<sub>12</sub> da bi se vezao za aptamer riboprekidača, *aspocR* se prepisuje u potpunosti i nema translacije PocR (Mellin i sur., 2013). Ovo predstavlja zanimljiv primjer združenog djelovanja dvije različite vrste regulacije malim molekulama RNA te *in trans* djelovanja riboprekidača. Još jedno područje djelovanja riboprekidača koje dosad nije spomenuto su RNA termometri. Kao i ostali riboprekidači, nalaze se u 5' UTR mRNA, ali ograničeni su na gene za virulenciju ili toplinski šok (eng. *heat shock*). Na niskim temperaturama, njihova tercijarna struktura zaklanja ribosomsko vezno mjesto i nema translacije mRNA na kojoj se nalaze. Na visokoj pak temperaturi tercijarna struktura više nije dovoljno stabilna da bi spriječila vezanje ribosoma i translacija je slobodna započeti. Termometri gena za virulenciju aktiviraju se na 37 °C, što je signal da se bakterija nalazi u pogodnom domaćinu, a termometri gena za toplinski šok na još višim temperaturama (Righetti i Narberhaus, 2014). Ovi riboprekidači ne vežu ligand u konvencionalnom smislu, već temperatura izravno utječe na njihovu strukturu, bez posredstva aptamera.

## TANDEM RIBOPREKIDAČI

Najjednostavniji riboprekidači sastoje se, kao što je spomenuto, od aptamera i ekspresijske platforme. Nije međutim neobično da se pojave u složenijem obliku. Takvi se nazivaju „tandem“ riboprekidačima i uglavnom se sastoje od dva aptamera i jedne ekspresijske platforme. Najrasprostranjeniji primjer su riboprekidači koji vežu glicin, a koji se u većini slučajeva sastoje od dva aptamera. Vezanje glicina kao liganda u tom je slučaju kooperativno i stoga je „prekidač“ u pitanju osjetljiviji na male promjene u koncentraciji liganda. U ostalim razredima riboprekidača tandem struktura i djelovanje nisu zastupljeni, iako postoje. U vrsti *Bacillus clausii* pronađen je

tandem riboprekidač s aptamerima za dva različita liganda, koji neovisno jedan od drugoga kontroliraju transkripciju jednog zajedničkog gena, na taj način ostvarujući sustav koji odgovara na dva različita metabolička signala i ujedinjuje ih u jednoznačno djelovanje na ekspresiju gena (Sudarsan i sur., 2006).

### 3.4 RAZREDI RIBOPREKIDAČA

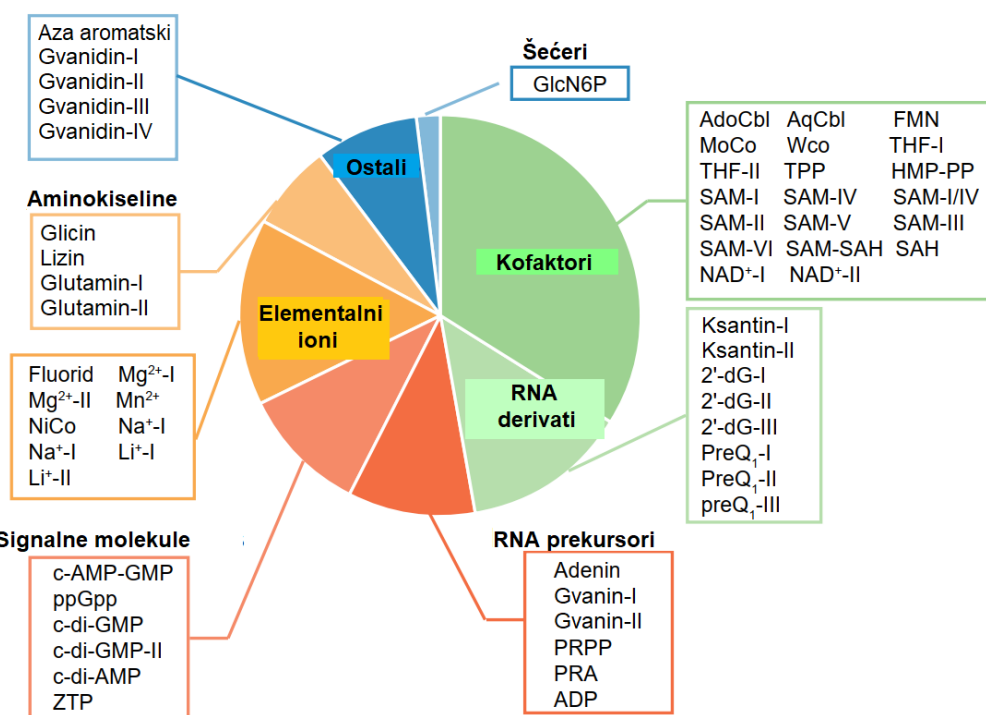
Riboprekidači se dijele na razrede s obzirom na sličnosti u sekvencama njihovih aptamera, odnosno po ligandima koje vežu. Ukupan broj danas poznatih razreda je preko 55, a novi se stalno otkrivaju (Salvail i Breaker, 2023). Međutim, nekoliko je najzastupljenijih skupina koje vrijedi spomenuti, te su grafički prikazane na **Slici 2**. Od 7 razreda koji se najčešće pojavljuju u prirodi (McCown i sur., 2017), 5 ih je koji vežu koenzime s RNA osnovom kao što su TPP, vitamin B<sub>12</sub> tj. adenzilkobalamin (AdoCbl) i S-adenozil metionin (SAM), kojeg vežu čak dva od spomenutih sedam razreda. Ova distribucija je značajna jer se smatra da su ovi koenzimi ili neki blisko srodni bili prisutni u vremenu prije proteina, odnosno u RNA svijetu (Breaker, 2012), o čemu će više riječi biti kasnije. U slučaju mutacije u veznom džepu za određeni ligand, može doći do promjene u selektivnosti te do vezanja sekundarnog liganda, ako je dovoljno sličan originalnom. Tako je moguće da riboprekidač TPP, koji u prirodi snažno veže TPP (tiamin pirofosfat) i slabije TMP (tiamin monofosfat), počne vezati i tiamin (vitamin B<sub>1</sub>), nefosforiliranu varijantu liganda.

Nadalje, postoji nekoliko razreda riboprekidača čiji su ligandi elementarni ioni, uglavnom kationi kao što su Mg<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> te u jednom slučaju fluoridni anion (McCown i sur., 2017). Ovi riboprekidači često služe kao senzori za previsoke koncentracije pojedinih iona koje za stanicu mogu biti toksične, a to vrijedi i za fluoridni riboprekidač. Zanimljivo je što usprkos negativnim nabojima u lancu RNA aptamer uspijeva stvoriti visoko selektivni vezni džep za isto tako negativno nabijeni F<sup>-</sup>, a k tome se radi o uvelike raširenoj pojavi, prisutnoj u mnogim skupinama bakterija te više vrsta arheja. Može se zaključiti da se radi o drevnom, dobro očuvanom mehanizmu odgovora na štetne razine fluorida koji se pokazao evolucijski pouzdanim.

Ligandi za riboprekidače mogu biti i aminokiseline, ali trenutno su poznate samo tri: lizin, glicin i glutamin. Jedno od objašnjenja zašto su riboprekidači koji odgovaraju na razine aminokiselina rijetki je postojanje RNA elemenata T-box, još jednog primjera RNA regulacije. Ovi elementi nalaze se u 5' UTR gena za aminoacil-tRNA sintetaze te gena za sintezu i transport aminokiselina. Svaka T-box RNA veže se samo za antikodon svoje tRNA, a jedine tRNA sa slobodnim

antikodonom su one koje nemaju vezanu aminokiselinu. Na taj način stanica neizravno procjenjuje količinu dostupnih aminokiselina, pošto vezanje tRNA na T-box RNA mijenja ekspresiju gena (McCown i sur., 2017).

Ligandi ostalih razreda riboprekidača uglavnom su RNA derivati, RNA prekursori ili signalne molekule nukleotidne osnove kao što su c-di-AMP i c-AMP-GMP. Jedini ligandi koji su potpuno nepovezani s RNA molekulama su glukozamin-6-fosfat, gvanidin i aza aromatski spojevi, zadnje od kojih veže riboprekidač *yjdB* RNA, iako još nije precizno utvrđeno o kojim se spojevima radi (Salvail i Breaker, 2023).



**Slika 2.** Prikaz zastupljenosti eksperimentalno potvrđenih razreda riboprekidača i popis njihovih zasada poznatih liganda. Preuzeto i prilagođeno iz (Salvail i Breaker, 2023).

Uz gore navedene postoje i mnogi kandidati za riboprekidače čiji broj neprestano raste zahvaljujući bioinformatičkim metodama istraživanja. Takvi elementi čija sekvenca daje naslutiti da bi se moglo raditi o riboprekidaču, ali ligandi koje bi vezali ostaju nepoznati, nazivaju se „siročad“, odnosno *orphan* riboprekidačima. Obično se tu radi o ligandima čija je uloga nepoznata ili je proces koji reguliraju slabo istražen. Riboprekidači c-di-AMP i Mn<sup>2+</sup> neki su od primjera *orphan* riboprekidača čiji su ligandi naknadno otkriveni te su dali novu perspektivu na procese u kojima sudjeluju.

Pridruživanje odgovarajućih liganda *orphan* riboprekidačima tako nerijetko omogućuje bolje razumijevanje liganda, uloge koju obavljaju ili oboje (McCown i sur., 2017).

Sekvenciranje genoma često daje *orphan* riboprekidače kojima je teško otkriti ligand. Također, što je više novih riboprekidača otkriveno, to je teže pronaći nove: rjeđi i odvedeniji riboprekidači, te oni koji su slabije konzervirani, prisutni samo u određenim uvjetima ili iznimke od dosad poznatih znanja o funkcioniranju riboprekidača lako izmaknu bioinformatičkim pretraživanjima. Danas se kandidati za nove riboprekidače najčešće otkrivaju korištenjem komparativne analize sekvenci kojom se pronadu regije čije su strukture i sekvence konzervirane kroz više vrsta. Potencijalni ligandi pretpostavljaju se na temelju uloge gena kandidata te se ispituje sposobnost RNA kandidata da ih veže, a onda i da utječe na ekspresiju gena (Salvail i Breaker, 2023).

### 3.5 PORIJEKLO RIBOPREKIDAČA I RNA SVIJET

Posebno zanimljiva dimenzija riboprekidača otkriva se ako ih promatramo kao ostatke drevnih sustava regulacije iz RNA svijeta, prije evolucije mašinerije za sintezu proteina. Naime, višestruko je dokazano da su aptameri većinom sasvim neovisni od bilo kakvih proteinskih faktora da bi uspješno vezali ligande, a postoje i ekspresijske platforme koje kontroliraju gene bez suradnje s proteinima. Zajedno s činjenicom da su ligandi povezani s RNA među najčešćima u prirodi, a među njima su česti koenzimi za koje se smatra da potječu iz RNA svijeta, doima se jednostavno zaključiti kako su riboprekidači ostaci RNA svijeta i prozor u mehanizme održavanja života u tom inače znanosti teško dohvatljivom vremenu. Naravno, odgovor nije tako jednoznačan i valja uzeti u obzir mnogo okolnosti što se tiče današnjih, preživjelih riboprekidača. Njihova široka rasprostranjenost među bakterijama ukazuje na to da ih nije bilo evolucijski isplativo zamijeniti proteinima koji bi obavljali iste uloge. Osim ideje da su bili prisutni još prije nego što je DNA prevladala kao genetička informacija postoji još mogućih razloga za ovu rasprostranjenost; mogli su biti prisutni kod zadnjeg bakterijskog zajedničkog pretka (LBCA, od eng. *Last Bacterial Common Ancestor*), koji ipak potječe iz post-RNA svijeta. Mogli su se lateralnim prijenosom gena proširiti kao efikasni mehanizmi kontrole genske ekspresije, a moglo je doći i do ponovljene evolucije svojstva u nekoliko različitih rodova. Istina vjerojatno leži u sintezi svih navedenih saznanja i još nepoznatih činjenica o riboprekidačima i nekodirajućim RNA, te su neke od današnjih skupina riboprekidača starije, a neke mlađe od pojave proteina. Osim riboprekidača, i

razni ribozimi su kandidati za molekule RNA opstale kao trag drevne prošlosti u kojoj se nasljeđivanje genetičke informacije odvijalo bez sudjelovanja proteinskih faktora (Breaker, 2012).

## 4. VELIKE NEKODIRAJUĆE MOLEKULE RNA I OLE RNA

### 4.1 lncRNA

U dosadašnjem tekstu bavili smo se kratkim nekodirajućim molekulama RNA, no to nisu jedine RNA koje obavljaju razne regulatorne i druge uloge. Velikim nekodirajućim RNA (lncRNA, od eng. *long non-coding* RNA) smatraju se one nekodirajuće molekule RNA čija je sekvenca dulja od 200 nukleotida, a može dosegnuti i preko 500. Rjeđe su u odnosu na sRNA i riboprekidače, ali one koje su poznate obavljaju osnovne zadaće u stanici, kao što su rRNA, RNaza P i tmRNA (od eng. *transfer-messenger* RNA) - svaka od navedenih RNA ima nezamjenjivu ulogu u procesima pripreme za translaciju i translacije. Osim toga, sve bakterijske ncRNA dulje od 350 nukleotida poznatog djelovanja obavljaju svojevrsnu katalizu ili su dio katalitičkog kompleksa (Harris i Breaker, 2018).

Uzet ću kao primjer RNazu P, u bakterijama dugu oko 400 nukleotida. Radi se o visoko konzerviranom ribonukleoproteinu, čija je katalitička srž RNA, a prate ju strukturne proteinske podjedinice. Najbitnija njena uloga je procesiranje 5' krajeva prekursora tRNA. Evolucijski je očuvana ne samo među prokariotima i eukariotima, nego i u plastidima i mitohondrijima, te se stoga smatra drevnim ribozimom koji bi mogao biti opstao iz RNA svijeta (Ellis i Brown, 2009).

tmRNA pak ima drugačiju ulogu. Kao što joj ime kaže, djeluje i kao prijenosna (*transfer*) i kao glasnička (*messenger*) RNA, a najznačajnija posljedica tog djelovanja je „*ribosome rescue*“, odnosno oslobađanje ribosoma koji su zapeli ili zaostali u procesu translacije. Zastupljena je kod bakterija, ali pojavljuje se i u plastidnim genomima eukariota. Aktivnošću prijenosa prvo veže zastali ribosom, a onda glasničkom aktivnošću na kraj rastućeg peptidnog lanca prenosi peptid ssrA, tj. služi kao kalup za njegovu translaciju. Peptid ssrA je signal za terminaciju translacije te nakon toga razgradnju proteazama, kako potencijalno krivo translatirani i nedovršeni protein ne bi napravio štetu u stanici. U tom smislu tmRNA djeluje kao sustav za kontrolu kvalitete pri sintezi proteina bakterijske stanice, a opisani proces naziva se trans-translacija (Janssen i Hayes, 2012).

Osim spomenutih postoji još mnogo ribozima otkrivenih u bakterijama, a najčešća njihova uloga je samoizrezivanje (eng. *self-cleavage*) (Harris i Breaker, 2018). Takvi su uglavnom strukturno manje složeni i kraći od 350 nukleotida. Bioinformatičke metode ubrzale su proces otkrivanja novih ncRNA svih skupina, pa tako i lncRNA. Novi razredi lncRNA otkrivaju se uspoređujući sekvence i utvrđujući razinu konzerviranosti te proučavanjem pretpostavljenih sekundarnih struktura. Otkriveno je preko 20 razreda ncRNA koje su duže od 200 nukleotida, a čije djelovanje je nepoznato. S obzirom na kompleksnost strukturnih motiva velikog broja njihovih predstavnika i konzerviranost i veličinu njihovih sekvenci, nije vjerojatno da obavljaju jednostavne zadatke kao što je samoizrezivanje, bazno sparivanje s drugim RNA ili vezanje proteinskih faktora; moguće je da će se raditi o molekulama koje imaju katalitičku aktivnost, sudjeluju u genskoj regulaciji na neki način ili obavljaju uloge dosad nezabilježene kod RNA (Harris i Breaker, 2018).

Kao primjer vrijedi spomenuti GOLLD (eng. *Giant, Ornate, Lake- and Lactobacillales Derived*) RNA. Značaj joj leži u veličini i složenosti pretpostavljene tercijarne strukture. Prosječno se sastoji od preko 800 nukleotida; jedine po broju nukleotida duže ncRNA dosad poznate u bakterijama su 16S i 23S rRNA, čije sekvence prelaze 1000 nukleotida. Svi predstavnici ovog razreda otkriveni su metodama metagenomike, a često se mogu naći i u bakteriofagima, što ukazuje da njena nepoznata uloga možda donosi prednosti i za njih i za domaćina. Osim nje, neki od najznačajnijih primjera su HEARO (eng. *HNH Endonuclease-Associated RNA and ORF*) i OLE (eng. *Ornate, Large, Extremophilic*) RNA, koja je jedina za koju postoje naznake otkrića moguće uloge te će se njome pozabaviti u nastavku teksta (Harris i Breaker, 2018).

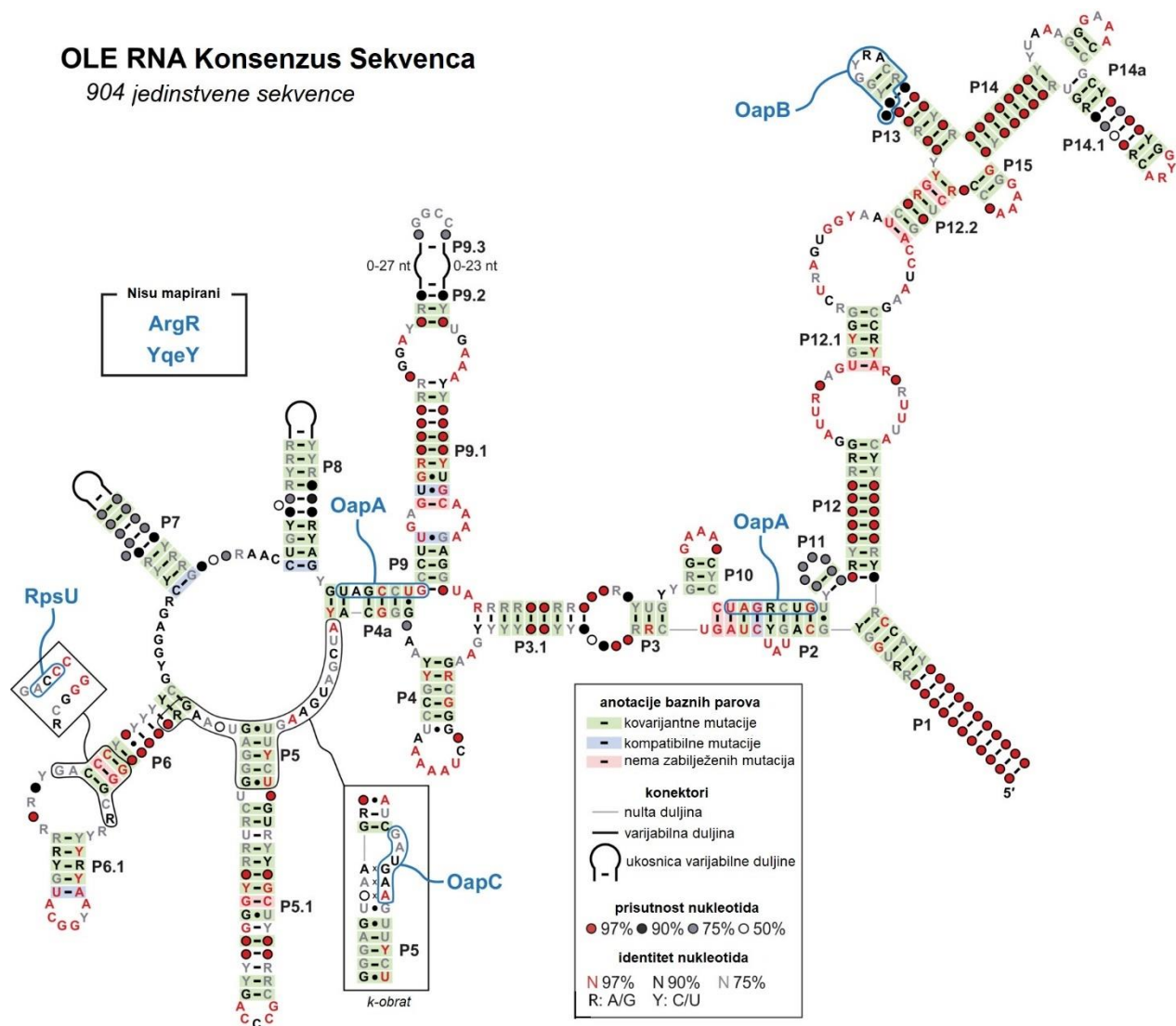
## 4.2 OLE RNA

OLE RNA opisana je 2006. godine u rodu *Firmicutes*, bez naznaka koja bi joj bila moguća uloga. S vremenom je također otkrivena u halofilnim bakterijama, a na kraju i u metagenomu ljudskog crijeva (Breaker i sur., 2023). Sastoji se od oko 600 nukleotida, od kojih je 90% konzervirano među svim predstavnicima OLE RNA (Block i sur., 2011). Kao i GOLLD RNA, sastoji se od mnogo ukosnica i zamršenih petlji koji navode na zaključak da OLE ima složenu tercijarnu strukturu ključnu za obavljanje zasad još nepoznate uloge. Radi se o jednoj od najkompleksnijih trenutno poznatih ncRNA u bakterijama s visokim stupnjem konzerviranosti, te je njena konsenzus sekvenca prikazana na **Slici 3**.



## OLE RNA Konzensus Sekvenca

904 jedinstvene sekvence



**Slika 3** Konzensus sekvenca OLE RNA. Plavim slovima i crtama naznačeni su proteini i mjesta njihovog vezanja na OLE RNA. Preuzeto i prilagođeno iz (Breaker i sur., 2023).

Osim same sekvence i strukture OLE RNA, konzerviran je i raspored gena koji okružuju gen *ole*. Veliki operon unutar kojeg se nalazi često osim nje sadrži i gene povezane sa sljedećim procesima: popravkom DNA, metabolizmom koenzima, regulacijom transkripcije i biosintezom izoprenoida (Breaker i sur., 2023). Obično geni koji su u istom operonu sudjeluju u istim ili bar sličnim metaboličkim putevima, a ovi procesi koji naizgled nemaju uske veze jedan s drugim ne pomažu odgonetnuti ulogu ove velike RNA. Osim navedenih, operon također sadrži gen za protein OapA, transmembranski protein čija se predviđena struktura sastoji od četiri zavojnice, a koji trenutno nema homologije s proteinima poznate uloge. Specifično veže OLE RNA te se smatra da djeluje

kao dimer, vežući po dvije molekule OLE. U prisustvu OapA, OLE RNA se lokalizira na staničnoj membrani, što je rijetka pojava kod molekula RNA (Block i sur., 2011).

Modelni organizam za proučavanje OLE RNA je *Halalkalibacterium halodurans*, prije poznata kao *Bacillus halodurans* (Joshi i sur., 2022). Početne hipoteze o ulozi OLE RNA zasnovane su na istraživanjima s *H. halodurans*, na čemu su također izgrađena trenutna razmišljanja o temi. S obzirom na to da je OLE RNA zastupljena u eksponencijalnom rastu, ali nije esencijalna, znanstvenici su pokušali utvrditi postoje li uvjeti u kojima delecija gena *ole* daje osjetljive fenotipe. Prvi koji se takvim pokazao je izlaganje stanica visokim dozama kratkolančanih alkohola (Wallace i sur., 2012). Pošto je u prisustvu proteina OapA lokalizirana na membrani, pojavila su se razmišljanja da bi OLE mogla imati ulogu u stabilizaciji membrane pri zaštiti od alkoholom uzrokovanog stresa. Međutim, ta bi uloga svakako bila više primjerena djelovanju proteina. Kasnije je otkriveno da sojevi s deletiranim genom *ole* imaju još nekoliko osjetljivih fenotipa: u uvjetima stresa zbog hladnoće (Wallace i sur., 2012), promjene koncentracije magnezija ili kad su bakterijama dostupni samo alternativni izvori ugljika (Lyon i sur., 2024). Kao i kod naizgled nepovezanih gena koji dijele operon s *ole*, čini se da ni ovi fenotipi nemaju puno zajedničkog, ili u najmanju ruku ne upućuju na jedinstvenu ulogu OLE. Stoga je nedavno razvijena nova hipoteza – da je OLE RNA ključ općenitijeg sustava za odgovor na stres kod bakterija (Breaker i sur., 2023). Kao što je ranije spomenuto, uzevši u obzir strukturu i veličinu OLE, bilo bi u najmanju ruku neobično da se ne radi o nekoj vrsti ribozima. Osim OapA, otkrivena su još dva proteina koji vežu OLE i formiraju tzv. OLE ribonukleoproteinski kompleks (OLE RNP): OapB i OapC, te i oni kao i prethodna otkrića u području umjesto da suze raspon mogućih OLE uloga samo još više kompliciraju mrežu procesa u kojima bi mogla sudjelovati.

Kod sisavaca postoji serin/treonin kinaza imena mTOR (od eng. *mechanistic Target of Rapamycin*), čvorište signalnih puteva za stanični rast i proliferaciju koje ostvaruje koordinaciju istih s okolišnim uvjetima (Saxton i Sabatini, 2017). Radi širine raspona uloga koje mTOR obavlja ključnih za održanje fiziološke ravnoteže stanice, pojavila se teorija da bi OLE RNP mogao obavljati sličnu ulogu kod bakterija. mTORC1 (eng. *mTOR Complex 1*) kontrolira aktivnost više transkripcijskih faktora, koju također može potaknuti stanični stres nezavisno od njega. Preko njega se obrađuje mnogo signala iz okoliša i iz stanice, kao što su razine kisika ili aminokiselina pri kontroli biogeneze ribosoma. To je samo jedna od uloga mTORC1 koja se poklapa s ulogama gena konzerviranih u *ole* operonu. Ostali geni iz istog operona također se daju usporediti s raznolikim

djelovanjima mTORC1 (Breaker i sur., 2023). Iako se definitivna uloga OLE RNA još uvijek ne zna, lako je moguće da bude slična onome što ova teorija pretpostavlja: složena struktura, geni koji ju redovito prate u operonu i zasad neshvatljiva jedinstvena uloga upućuju da bi se zaista moglo raditi o višefunkcionalnoj molekuli važnoj za prilagodbu stanice na stres i različite vanjske uvjete. Ima puno obećavajućeg prostora za istraživanje lncRNA i ne možemo isključiti da će konačno utvrđivanje gdje se neke od njih uklapaju u regulatorne mreže biti na svoj način revolucionarno ili barem otvoriti nove horizonte istraživanju regulatornih RNA u bakterijama.

## 5. ZAKLJUČAK

Molekule RNA u bakterijama imaju mnogo uloga uz to što kodiraju za proteine. Djelovanje najčešće ostvaruju preko regulacije ekspresije gena, te su na taj način sposobne izvršavati zadatke u najrazličitijim procesima unutar bakterijske stanice i njenog metabolizma. sRNA su kratke molekule RNA koje baznim sparivanjem s mRNA metom inhibiraju vezanje ribosoma, a najčešće djeluju *in trans* na transkripte neovisno o svojoj poziciji u genomu. To im također omogućuje da budu svojevrsno raskršće djelovanja s transkripcijskim faktorima i ostalim razinama regulacije, pošto mogu djelovati na više meta. Riboprekidači pak djeluju *in cis* na molekulu mRNA na kojoj se i nalaze; vežu ligand i mijenjaju konformaciju te tako inhibiraju transkripciju i translaciju. Oba tipa navedenih RNA sposobna su za pozitivnu regulaciju, iako je to rjeđe slučaj. Na kraju imamo duge nekodirajuće RNA, lncRNA, kojih je mnogo otkriveno u zadnjim desetljećima, ali mnogima uloga ostaje nepoznata. Najdalje se dospjelo s istraživanjima OLE RNA, za koju znamo da je na neki način značajna u prilagodbi na stresne uvjete kod ekstremofilnih bakterija, a pretpostavlja se da bi mogla biti od velikog značaja u nekom novom, još neotkrivenom sustavu stresnog odgovora. Gledajući zajedno sve ove aktivnosti RNA, postaje sasvim jasno kako su molekule RNA sposobne za mnogo više nego li se vjerovalo u doba postavljanja centralne dogme molekularne biologije. Kako se otkrivaju novi razredi nekodirajućih molekula RNA, pogotovo onih teže dostupnih za uzorkovanje, manje konzerviranih, čiji delecijски mutanti ne daju jasne fenotipe, znanstvenici će nailaziti na sve više iznimaka, sve dok ih ne bude toliko da daju novo pravilo. Osim uvida u detalje genske regulacije, nekodirajuće RNA također mogu dati nove mete za proizvodnju antibiotika te inovativne alate za buduća istraživanja. Uz bolje razumijevanje sadašnjosti i budućnosti, lako je moguće da će nam pružiti nezamjenjiv pogled u daleku prošlost, kao potomci samoreplicirajućih molekula RNA svijeta koje su možda obavljale slične uloge kao proteini danas, a bez kojih današnji svijet ne bi mogao postojati.

## 6. LITERATURA

- Barrick, J.E., Breaker, R.R., 2007. The distributions, mechanisms, and structures of metabolite-binding riboswitches. *Genome Biol.* 8, R239. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-11-r239>
- Block, K.F., Puerta-Fernandez, E., Wallace, J.G., Breaker, R.R., 2011. Association of OLE RNA with bacterial membranes via an RNA–protein interaction. *Mol. Microbiol.* 79, 21–34. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07439.x>
- Breaker, R.R., 2012. Riboswitches and the RNA world. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a003566. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003566>
- Breaker, R.R., Harris, K.A., Lyon, S.E., Wencker, F.D.R., Fernando, C.M., 2023. Evidence that OLE RNA is a component of a major stress-responsive ribonucleoprotein particle in extremophilic bacteria. *Mol. Microbiol.* 120, 324–340. <https://doi.org/10.1111/mmi.15129>
- Ellis, J.C., Brown, J.W., 2009. The RNase P family. *RNA Biol.* 6, 362–369. <https://doi.org/10.4161/rna.6.4.9241>
- Ghandour, R., Papenfort, K., 2023. Small regulatory RNAs in *Vibrio cholerae*. *microLife* 4, uqad030. <https://doi.org/10.1093/femsml/uqad030>
- Gottesman, S., 2005. Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria. *Trends Genet. TIG* 21, 399–404. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2005.05.008>
- Harris, K.A., Breaker, R.R., 2018. Large Noncoding RNAs in Bacteria. *Microbiol. Spectr.* 6, 6.4.01. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.RWR-0005-2017>
- Henke, J.M., Bassler, B.L., 2004. Three parallel quorum-sensing systems regulate gene expression in *Vibrio harveyi*. *J. Bacteriol.* 186, 6902–6914. <https://doi.org/10.1128/JB.186.20.6902-6914.2004>
- Janssen, B.D., Hayes, C.S., 2012. The tmRNA ribosome-rescue system. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 86, 151–191. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386497-0.00005-0>
- Joshi, A., Thite, S., Karodi, P., Joseph, N., Lodha, T., 2022. Corrigendum: *Alkalihalobacterium elongatum* gen. nov. sp. nov.: An Antibiotic-Producing Bacterium Isolated From Lonar Lake and Reclassification of the Genus *Alkalihalobacillus* Into Seven Novel Genera. *Front. Microbiol.* 13.
- Lenz, D.H., Mok, K.C., Lilley, B.N., Kulkarni, R.V., Wingreen, N.S., Bassler, B.L., 2004. The small RNA chaperone Hfq and multiple small RNAs control quorum sensing in *Vibrio harveyi* and *Vibrio cholerae*. *Cell* 118, 69–82. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.009>
- Lyon, S.E., Wencker, F.D.R., Fernando, C.M., Harris, K.A., Breaker, R.R., 2024. Disruption of the bacterial OLE RNP complex impairs growth on alternative carbon sources. *PNAS Nexus* 3, pgae075. <https://doi.org/10.1093/pnasnexus/pgae075>
- McCown, P.J., Corbino, K.A., Stav, S., Sherlock, M.E., Breaker, R.R., 2017. Riboswitch diversity and distribution. *RNA N. Y. N* 23, 995–1011. <https://doi.org/10.1261/rna.061234.117>
- Mellin, J.R., Tiensuu, T., Bécavin, C., Gouin, E., Johansson, J., Cossart, P., 2013. A riboswitch-regulated antisense RNA in *Listeria monocytogenes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 13132–13137. <https://doi.org/10.1073/pnas.1304795110>

Nitzan, M., Rehani, R., Margalit, H., 2017. Integration of Bacterial Small RNAs in Regulatory Networks. *Annu. Rev. Biophys.* 46, 131–148. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-070816-034058>

Peschek, N., Hoyos, M., Herzog, R., Förstner, K.U., Papenfort, K., 2019. A conserved RNA seed-pairing domain directs small RNA-mediated stress resistance in enterobacteria. *EMBO J.* 38, e101650. <https://doi.org/10.15252/embj.2019101650>

Pfeiffer, V., Papenfort, K., Lucchini, S., Hinton, J.C.D., Vogel, J., 2009. Coding sequence targeting by MicC RNA reveals bacterial mRNA silencing downstream of translational initiation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 840–846. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1631>

Repoila, F., Gottesman, S., 2003. Temperature Sensing by the *dsrA* Promoter. *J. Bacteriol.* 185, 6609–6614. <https://doi.org/10.1128/JB.185.22.6609-6614.2003>

Righetti, F., Narberhaus, F., 2014. How to find RNA thermometers. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4, 132. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00132>

Salvail, H., Breaker, R.R., 2023. Riboswitches. *Curr. Biol.* 33, R343–R348. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2023.03.069>

Saxton, R.A., Sabatini, D.M., 2017. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* 168, 960–976. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.004>

Serganov, A., Nudler, E., 2013. A Decade of Riboswitches. *Cell* 152, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.024>

Serganov, A., Patel, D.J., 2012. Metabolite Recognition Principles and Molecular Mechanisms Underlying Riboswitch Function. *Annu. Rev. Biophys.* 41, 343–370. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-101211-113224>

Shang, R., Lee, S., Senavirathne, G., Lai, E.C., 2023. microRNAs in action: biogenesis, function and regulation. *Nat. Rev. Genet.* 24, 816–833. <https://doi.org/10.1038/s41576-023-00611-y>

Storz, G., Vogel, J., Wassarman, K.M., 2011. Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers. *Mol. Cell* 43, 880–891. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.08.022>

Sudarsan, N., Hammond, M.C., Block, K.F., Welz, R., Barrick, J.E., Roth, A., Breaker, R.R., 2006. Tandem riboswitch architectures exhibit complex gene control functions. *Science* 314, 300–304. <https://doi.org/10.1126/science.1130716>

Thomason, M.K., Storz, G., 2010. Bacterial antisense RNAs: how many are there, and what are they doing? *Annu. Rev. Genet.* 44, 167–188. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102209-163523>

Tu, K.C., Bassler, B.L., 2007. Multiple small RNAs act additively to integrate sensory information and control quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Genes Dev.* 21, 221–233. <https://doi.org/10.1101/gad.1502407>

Tucker, B.J., Breaker, R.R., 2005. Riboswitches as versatile gene control elements. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15, 342–348. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2005.05.003>

Wagner, E.G.H., Romby, P., 2015. Small RNAs in bacteria and archaea: who they are, what they do, and how they do it. *Adv. Genet.* 90, 133–208. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2015.05.001>

Wallace, J.G., Zhou, Z., Breaker, R.R., 2012. OLE RNA protects extremophilic bacteria from alcohol toxicity. *Nucleic Acids Res.* 40, 6898–6907. <https://doi.org/10.1093/nar/gks352>

## 7. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 2002. godine u Zagrebu. Osnovnoškolsko obrazovanje završila sam u Osnovnoj školi braće Radića u Kloštar Ivaniću paralelno uz osnovno glazbeno obrazovanje u Osnovnoj glazbenoj školi „Milka Trnina“ u Ivanić-Gradu. 2017. godine upisala sam V. gimnaziju u Zagrebu koju sam završila 2021. godine. Tijekom srednjoškolskog obrazovanja sudjelovala sam na državnim natjecanjima iz engleskog jezika gdje sam 2019. osvojila prvo, a 2021. treće mjesto. Po završetku gimnazije upisujem Prijediplomski studij Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Kao članica Udruge studenata biologije – BIUS sudjelujem u radu Sekcije za ptice te sam 2024. godine uspješno položila BirdID tečaj norveškog sveučilišta Nord za područje Hrvatske.