

Dr Piotr Machtel✉

Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań

https://doi.org/10.18388/pb.2020_331

✉ autor korespondujący: pmachtel@ibch.poznan.pl

Słowa kluczowe: ryboprzełączniki, bakterie, regulacja ekspresji genów, transkrypcja

Wykaz stosowanych skrótów: AdoCbl – adenozylkobalamina; AqCbl – akwakobalamina; c-di-GMP – cykliczny diguanozynomonofosforan; FMN – mononukleotyd flawinowy; GlcN-6-P – glukozamino-6-fosforan; MRSA – odporne na metycylinę szczepy *Staphylococcus aureus* (ang. methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*); ORF – otwarta ramka odczytu; PreQ1 – prekweozyna 1, PRPP – pirofosforan fosforybozylu; SAH – S-adenozylhomocysteina; SAM – S-adenozynometionina; SD – sekwencja Shine-Dalgarno; TPP – pirofosforan tiaminy; UTR – region nieulagający translacji (ang. untranslated region); VEGF – czynnik wzrostu śródbłonnki naczyniowej A (ang. vascular endothelial growth factor)

STRESZCZENIE

Nieustannie zmieniające się środowisko wymaga od bakterii szybkiej i zdecydowanej odpowiedzi na poziomie komórkowym. Mając do dyspozycji jedynie zasoby jednej komórki, bakterie wykształciły najróżniejsze mechanizmy kontroli ekspresji genów. Wśród nich szczególne miejsce zajmują ryboprzełączniki, sekwencje występujące w transkryptach, mające zdolność bezpośredniego wiązania niskocząsteczkowych metabolitów i wywoływania odpowiedzi regulatorowej. W niniejszej publikacji został przedstawiony aktualny stan wiedzy na temat ryboprzełączników uwzględniając między innymi: mechanizmy działania ryboprzełączników, ich budowa i różnorodność oraz występowanie. A także historia ich odkrycia na początku XXI wieku, oraz aktualne badania, mogące w przyszłości znaleźć praktyczne zastosowania.

WPROWADZENIE

Zdolność do reagowania na zmieniające się warunki życia poprzez regulację ekspresji genów jest fundamentalna dla przetrwania wszystkich żywych organizmów, z bakteriami na czele. Zróżnicowanie mechanizmów regulatorowych pozwala w precyzyjny i dynamiczny sposób reagować na wszelkie zmiany w środowisku naturalnym, poprzez wyciszenie bądź aktywację ekspresji poszczególnych genów i biosyntezę wyspecjalizowanych białek. Szeroki repertuar wyrafinowanych mechanizmów kontroli ekspresji genów wykorzystuje białka. Wyjątkowym mechanizmem są ryboprzełączniki (ang. *riboswitches*). Są to silnie ustrukturyzowane domeny mRNA, zdolne do bezpośredniego wiązania niskocząsteczkowych metabolitów, co w konsekwencji prowadzi do reorganizacji struktury drugorzędowej RNA i zmiany poziomu ekspresji danego genu w układzie *cis*. Kamienie milowe w historii odkrycia ryboprzełączników przedstawia Tabela 1.

RÓŻNORODNOŚĆ I WYSTĘPOWANIE RYBOPRZEŁĄCZNIKÓW

Do dziś odkrytych i eksperymentalnie potwierdzonych jest około 45 różnych klas ryboprzełączników, ze względu na strukturę oraz wiązany przez nie ligand (Tabela 2). Dlatego też niektóre ryboprzełączniki oddziałujące z tym samym ligandem mogą należeć do różnych klas, jak to ma miejsce w przypadku ryboprzełącznika SAM. Do tej pory poznano sześć różnych klas ryboprzełącznika SAM oraz SAM-SAH [32]. Z drugiej zaś strony istnieją ryboprzełączniki o identycznej strukturze różniące się zaledwie jednym nukleotydem w sekwencji aptameru, co wystarczy by całkowicie zmienić specyficzność względem ligandu. Takim przykładem może być ryboprzełącznik guaninowy, który oddziałuje z trzema nukleotydami aptameru: U22, U51, C74, natomiast substytucja C74>U74 powoduje przełączenie specyficzności z guaninę na adeninę [35]. Metabolity, które są rozpoznawane przez poszczególne ryboprzełączniki należą do wielu grup związków chemicznych, takich jak koenzymy (w tym witaminy i ich pochodne), nukleotydy i ich pochodne, cząsteczki sygnałowe, jony, czy też aminokwasy.

Klasy ryboprzełączników różnią się istotnie zarówno frekwencją jak i występowaniem filogenetycznym. Najczęstszym i najpowszechniejszym ryboprzełącznikiem, obecnym w niemal wszystkich liniach bakterii jest ryboprzełącznik TPP. Bioinformatyczna analiza wykazała obecność w metagenomach bakteryjnych niemal 16700 różnych reprezentantów ryboprzełącznika TPP [24]. Bywają też klasy ryboprzełączników niezwykle rzadkie, jak choćby ryboprzełącznik 2'-dG-I, obecny jedynie w czterech kopiach, wyłącznie u bakterii *Mesoplasma florum* [49]. Zróżnicowane jest także wykorzystywanie ryboprzełączników przez różne grupy bakterii. Typ Firmicutes wykorzystuje je bardzo powszechnie, z 13500 reprezentantami należącymi do niemal wszystkich znanych klas ryboprzełączników, natomiast w genomach takich bakterii jak *Chlamydiae* ryboprzełączniki,

Tabela 1. Historia odkrycia ryboprzelączników – kamienie milowe.

Rok	Odkrycie	Odkrywczy	Referencje
1960	Działanie operonu laktozowego kontrolowanego białkiem represora	Jacob F., Jacques Monod.	[1]
1974	Pierwsza struktura drugorzędowa RNA	Gralla J., Steitz J., Crothers D.	[2]
1981	Zjawisko ateunacji u bakterii	Yanofsky C.	[3-5]
1982	Pierwsze funkcjonalne RNA – Rybozomy	Cech T., Altman S.	[6,7]
1990	Zsyntetyzowanie pierwszych aptamerów	Szostak J., Gold L.	[8,9]
1978	Hamowanie biosyntezy witamin, przez produkty końcowe ich szlaków metabolicznych	Kadner J.	[10,11]
1996	Udział niekodujących fragmentów mRNA w wiązaniu ligandów	Webb E., Downs D.	[10,11]
2001	Zmiany strukturalne pod wpływem wiązania ligandu oraz regulacja ekspresji genów	Ravnum S., Andersson D.	[12]
2002	Pierwszy ryboprzelącznik	Ronald Breaker i Evgeny Nudler	[13-15]
2004	Pierwsza struktura krystaliczna ryboprzelącznika	Batey R., Serganov A.	[16, 17]

jako element regulatorowy, występują niezwykle rzadko – zaledwie 8 reprezentantów należących do dwóch klas.

Ryboprzelączniki w przeważającej większości występują u bakterii, jednak niektóre klasy są także charakterystyczne dla innych domen życia. U Archea licznie występuje ryboprzelącznik TPP oraz mniej licznie – fluorkowy. Do 2013 roku uważano, że na tym zamyka się lista ryboprzelączni-

ków u archeonów [64], jednak okazało się, że sporadycznie możemy znaleźć ryboprzelączniki wiążące takie ligandy jak: FMN, Mg²⁺-I i guanidynowy-II. Ryboprzelącznik TPP jest także jedynym znanym ryboprzelącznikiem występującym u eukariotów, zwłaszcza w królestwie roślin i grzybów. 72 takie sekwencje zidentyfikowano u grzybów (np. *Neurospora crassa*, *Aspergillus oryzae*), 23 u roślin wyższych

Tabela 2. Lista znanych klas ryboprzelączników.

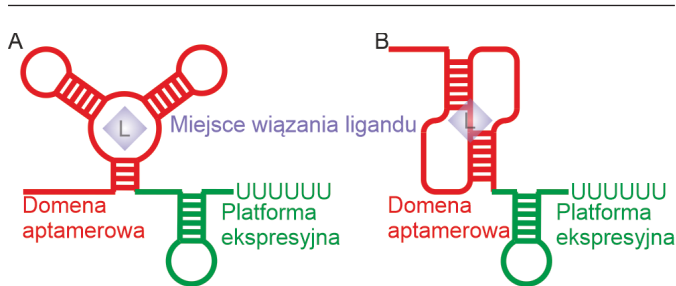
Nr	Grupa	Klasa	Ligand	Reprezentanci	Referencje
1		TPP	Pirofosforan Tiaminy (TPP, B1)	16 690	[15]
2		AboCbl	Adenozylokobalamina (AdoCbl, B12)	14 336	[13]
3		AqCbl	Akwakobalamina (AqCbl)	582	[25]
4		SAM-I	S-adenozylometionina (SAM)	6 749	[26]
5		SAM-IV	S-adenozylometionina (SAM)	732	[27]
6		SAM-I/IV	S-adenozylometionina (SAM)	1 184	[28]
7		SAM-II	S-adenozylometionina (SAM)	6 095	[29]
8		SAM-V	S-adenozylometionina (SAM)	982	[30]
9		SAM-III	S-adenozylometionina (SAM)	936	[31]
10	Koenzymy	SAM-VI	S-adenozylometionina (SAM)	17	[32]
11		SAM/SAH	S-adenozylometionina (SAM), S-adenozylhomocysteina(SAH)	139	[28]
12		SAH	S-adenozylhomocysteina (SAH)	926	[33]
13		FMN	Mononukleotyd flawinowy (FMN, B2)	5 544	[34]
14		FMN Var	Analog mononukleotydu flawinowego (FMN, B2)	2	[35]
15		THF-I	Tetrahydrofolian (THF)	1 433	[36]
16		THF-II	Tetrahydrofolian (THF)	86	[37]
17		Moco	Kofaktor molibdenowy (Moco)	1 021	[38]
18		Wco	Kofaktor wolframowy (Wco, Tuco)	715	[38]

19		ZTP	Rybonukleotyd aminoimidazolokarboksyamidu (ZTP, AICAR)	2 229	[39]
20		c-di-GMP-I	5'-3'-cykliczny di-GMP (c-di-GMP)	6 414	[40]
21	Cząsteczki sygnałowe	c-di-GMP-II	5'-3'-cykliczny di-GMP (c-di-GMP)	1 147	[41]
22		c-AMP-GMP	5'-3'-cykliczny AMP-GMP (c-AMP-GMP)	107	[42]
23		c-di-AMP	5'-3'-cykliczny di-AMP (c-di-AMP)	3 098	[43]
24		ppGpp	Tetrafosforan Guanozyny (ppGpp)	105	[44]
25		Glutaminowy	Glutamina (Gln, Q)	1 567	[45]
26	Aminokwasy	Glicynowy	Glicyna (Gly, G)	7 516	[46]
27		Lizynowy	Lizyna (Lys, K)	4 114	[47]
28		Guaninowy	Guanina (G)	2 334	[48]
29		Adeninowy	Adenina (A)	99	[48]
30		2'-dG-I	2'-deoksyguanozyna (2'-dG)	4	[49]
31		2'-dG-II	2'-deoksyguanozyna (2'-dG)	12	[35]
32	Nukleotydy i pochodne	PreQ ₁ -I	Prekweozyna ₁ (PreQ ₁)	2 387	[50]
33		PreQ ₁ -II	Prekweozyna ₁ (PreQ ₁)	263	[51]
34		PreQ ₁ -III	Prekweozyna ₁ (PreQ ₁)	86	[52]
35		PRPP	Pirofosforan fosforybozylu (PRPP)	257	[53]
36		(d)ADP/(d)CDP	di-fosforany nukleozydów: ADP, dADP, CDP, dCDP	46	[54]
37		Mg ²⁺ -I	Kation magnezu (Mg ²⁺)	971	[55]
38		Mg ²⁺ -II	Kation magnezu (Mg ²⁺)	101	[56]
39	Jony	Ni ²⁺ /Co ²⁺	Kation niklu (Ni ²⁺), Kation kobaltu (Co ²⁺)	491	[57]
40		F ⁻	Anion fluoru (F ⁻)	2 583	[58]
41		Mn ²⁺	Kation manganu (Mn ²⁺)	4 383	[55]
42		glmS	Glukozamino-6-fosforan (GlcN-6-P)	2 126	[59]
43		Azaaromatyczny	Związki azaaromatyczne	743	[60]
44	Inne metabolity	Guanidynowy-I	Guanidyna	867	[61]
45		Guanidynowy-II	Guanidyna	610	[62]
46		Guanidynowy-III	Guanidyna	237	[63]

(np. *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Pinus taeda*), cztery u alg (np. *Chlamydomonas reinhardtii*) i siedem u Protista *Perkinsus marinus*. Uważa się, że ryboprzełączniki nie występują w królestwie zwierząt. Jedynym jak dotąd znanym wyjątkiem to pojedyncza kopia ryboprzełącznika TPP u stulbi *Hydra magnipapillata*. Ponadto pojedyncze kopie ryboprzełącznika wiążącego cykliczne cząsteczki c-di-GMP-I [40] oraz aminokwas glutaminę wykryto w genomach wirusowych [24]. Uważa się, że około 4% genów i operonów bakteryjnych może być kontrolowanych za pośrednictwem ryboprzełączników [65].

Jak dotąd nie są znane żadne ryboprzełączniki występujące u człowieka, chociaż zidentyfikowano sekwencje

RNA zdolne do binarnej zmiany swojej struktury pod wpływem bodźców zewnętrznych. Przykładem takie regulatorowego RNA jest sekwencja zlokalizowana w 3'UTR transkryptu czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego A (VEGF, ang. *vascular endothelial growth factor*) w komórkach szpiku, który reaguje na stres hipoksji oraz interferon γ za pośrednictwem białek odpowiednio hnRNP (ang. *heterogenous nuclear ribonucleoprotein L*) oraz kompleks GAIT (ang. *IFN- γ -activated inhibitor of translation*) [66]. W normalnych warunkach białko hnRNP L ulega degradacji, co umożliwia kompleksowi GAIT przyłączenie się do struktury RNA i blokowanie translacji. Natomiast w warunkach hipoksji białko hnRNP L pozostaje na wysokim poziomie i samo wiąże się do 3'UTR, wy-



Rycina 1. Budowa ryboprzełączników. (A) Ryboprzełączniki z pętlą centralną. (B) Ryboprzełączniki pseudowęzłowe. L - ligand.

kluczając oddziaływanie z kompleksem GAIT. I chociaż zmiana struktury pod wpływem związków chemicznych jest analogiczna jak w przypadku ryboprzełączników (podobnie jak efekt regulatorowy), to jednak zachodzi on w sposób niezależny od stężenia metabolitu będącego rezultatem ekspresji kontrolowanego mRNA, a w odpowiedzi na sygnały pochodzące z zewnątrz pośredniczą białka.

STRUKTURA RYBOPRZEŁĄCZNIKÓW

We wszystkich ryboprzełącznikach możemy wyróżnić dwie funkcjonalnie i strukturalnie odrębne domeny: domenę aptamerową i platformę ekspresyjną (Ryc. 1). Pierwsza z nich jest odpowiedzialna za bezpośrednie interakcje z ligandem. Ze względu na pełnione przez nią funkcje (wiązaną danego metabolitu i jednocześnie dyskryminację pomiędzy podobnymi cząsteczkami), domena ta jest ewolucyjnie zakonserwowana, a zwłaszcza miejsca bezpośredniego oddziaływania z ligandem. W wyniku związania ligandu zmianie konformacyjnej ulega druga, znacznie słabiej zakonserwowana ewolucyjnie część ryboprzełącznika – platforma ekspresyjna, odpowiedzialna za efekt regulatorowy genu, w którym się znajduje.

Ze względu na dominującą strukturę drugorzędową domeny aptamerowej ryboprzełączniki dzielimy na dwa rodzaje: łącznikowe, z pętlą centralną (ang. *junctional*) (Ryc. 1A) oraz pseudowęzłowe (ang. *pseudoknotted*) (Ryc. 1B). Pierwsze z nich są zbudowane z centralnie położonej pętli, od której promieniście rozchodzą się dwuniciowe struktury spinek do włosów. Liczba spinek może się wahać od dwóch dla ryboprzełącznika adeninowego [48] do sześciu dla ryboprzełącznika FMN [67]. Pewne ryboprzełączniki przyjmują alternatywną architekturę, w której pętla centralna jest położona peryferyjnie, a z helisą P1 oddziałuje przez oddalone elementy struktury trzeciorzędowej, czego przykładem może być ryboprzełącznik wiążący THF [68]. Ryboprzełączniki pseudowęzłowe charakteryzują się występowaniem dominującej struktury pseudowęzła tj. struktury, gdzie pętla pierwszej spinki RNA paruje się z ramieniem spinki drugiej, natomiast pętla drugiej spinki z ramieniem pierwszej. Przykładem takiego ryboprzełącznika jest SAM-II [69].

Poszczególne elementy struktury drugorzędowej, takie jak spinki do włosów, pseudowęzły, czy struktury typu *kissing-loop* tworzą kieszeń wiążącą, ściśle dopasowaną

do konkretnego ligandu, co zapewnia wysoką specyficzność i powinowactwo. Miejsce wiązania ligandu najczęściej zlokalizowane jest w pobliżu pętli centralnej lub w środku pseudowęzła. Aptamery ryboprzełączników mogą bardzo istotnie różnić się wielkością. Najmniejszy znany ryboprzełącznik należy do klasy preQ₁-I, zbudowany jest z zaledwie jednej krótkiej spinki tworzącej pseudowęzłowy typu H o długości 34 nt [50]. Największe ryboprzełączniki, takie jak lizynowe [70] czy AdoCbl [71], mogą mieć długość ponad 200 nt.

Ryboprzełączniki charakteryzują się bardzo wysokim stopniem specyficzności względem ligandu i potrafią rozróżniać nawet bardzo podobne chemicznie i strukturalnie metabolity. I tak na przykład ryboprzełączniki SAM wiążą ligand ze 100- do 1000-krotnie większym powinowactwem w porównaniu do SAH, która różni się od SAM jedynie brakiem jednej grupy metylowej [72]. Ryboprzełącznik SAH z kolei, wiąże SAH z 1000-krotnie większą skutecznością niż cząsteczkę SAM [33]. Jest to bardzo istotne w tej sytuacji, bowiem w normalnych warunkach komórkowe stężenie SAM jest znacznie większe niż SAH, co w przypadku niższego powinowactwa mogłoby skutkować deregulacją metabolizmu metioniny. Ryboprzełączniki wykazują bardzo wysokie powinowactwo do swojego natywnego metabolitu. Stała wiązania (K_d) większości ryboprzełączników zazwyczaj wykazuje wartości rzędu nM. Jednak w szczególnych przypadkach K_d ryboprzełączników może przyjmować bardzo niskie wartości wynoszące zaledwie 10 pM (np. ryboprzełącznik c-di-GMP-I u *Vibrio cholerae*) [73], po tak wysokie wartości jak 200 μ M (ryboprzełącznika GlcN-6-P) [59].

Wysoki stopień specyficzności jest realizowany z wykorzystaniem różnych strategii. Najprostszą z nich jest dopasowanie kształtu i rozmiaru kieszeni wiążącej do konkretnego ligandu. Ryboprzełącznik glicynowy na przykład formuje tak małą kieszeń wiążącą, że żaden inny aminokwas się nie zmieści w jej wnętrzu, z drugiej strony kieszeń ryboprzełącznika lizynowego naśladuje wydłużony kształt lizyny i choć mniejsze ligandy mieszczą się w kieszeni wiążącej, to nie mogą zrealizować wszystkich oddziaływań niezbędnych do przełączenia struktury RNA [74].

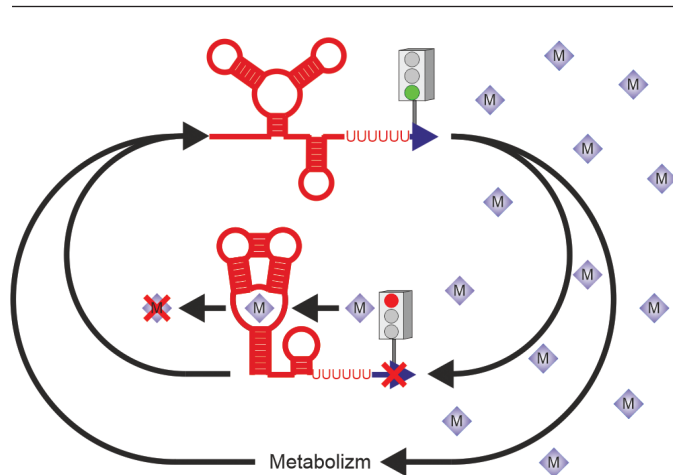
W przypadku białek dla poprawnego wiązania ligand-kieszeń wiążąca bardzo istotne są oddziaływania hydrofobowe, bowiem wiele aminokwasów ma właśnie takie własności. Jednak w przeciwieństwie do białek, RNA zawiera wiele heteroatomów zdolnych do oddziaływań elektrostatycznych czy wodorowych, co sprawia, że udział oddziaływań hydrofobowych jest znikomy. Istotnym jest natomiast fakt, że większość ligandów również zawiera heteroatomy. Dlatego też ligandy oddziałują z aptamerem poprzez kilka typów oddziaływań, takich jak oddziaływania elektrostatyczne, van der Waalsa, warstwowe, oddziaływania jon-dipol i wiązania wodorowe. Nie bez znaczenia jest fakt, że duża część ligandów to pochodne RNA, których zasady azotowe chętnie tworzą wiązania wodorowe z innymi nukleotydami [75].

Ważną kwestią jest rozpoznawanie ujemnie bądź dodatnio naładowanych cząsteczek ligandów. Wiele ligandów zawiera ujemnie naładowane grupy karboksylowe i fosforanowe (TPP, FMN, c-di-GMP). Aby było możliwe skuteczne oddziaływanie z RNA, ładunek ten musi być zneutralizowany. Najczęściej do tego celu wykorzystywany jest kation Mg^{2+} , który to pośredniczy w oddziaływaniach ligand-aptamer, zarówno bezpośrednio, jak i za pośrednictwem cząsteczek wody [75]. Jony Mg^{2+} są także istotne dla poprawnego sfałdowania samej struktury rybo-przełącznika oraz zapewnienia stabilności motywów tworzących kieszeń wiążącą. W niektórych przypadkach Mg^{2+} jest niezbędnym elementem dla poprawnego uformowania się aptameru i pełnienia funkcji regulatorowych. W innych przypadkach Mg^{2+} jedynie wspierają poprawnie sfałdowanie rybo-przełącznika, przesuwając równowagę w kierunku stanu holo (przy podwyższonym stężeniu Mg^{2+} wystarczą niższe stężenia ligandu by uzyskać efekt regulatorowy). Innymi wykorzystywanymi przez rybo-przełączniki jonami mogą być: Mn^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Na^{+} , K^{+} . O ile w niektórych przypadkach różne jony mogą pełnić swoją funkcję zamiennie, to niektóre rybo-przełączniki wymagają konkretnego jonu, jak na przykład K^{+} dla rybo-przełącznika lizynowego [74]. Dodatnio naładowane fragmenty ligandów stanowią bardzo istotną, charakterystyczną cechę, specyficznie rozpoznawaną przez poszczególny rybo-przełącznik. Dodatnio naładowany łańcuch boczny lizyny dopasowuje się do negatywnie naładowanego fragmentu kieszeni wiążącej, natomiast grupa metylowa połączona z atomem siarki nadaje ładunek dodatni cząsteczce SAM, co jest podstawą dyskryminacji pomiędzy SAM i SAH.

Choć w znakomitej większości pojedyncze aptamery wiążą jedną cząsteczkę ligandu, to istnieją także istotne wyjątki od tej reguły. Dotyczy to zwłaszcza niewielkich ligandów, takich jak jony nieorganiczne (Mg^{2+} lub NiCo), THF czy guanidyna. Badania strukturalne wykazały między innymi, że rybo-przełącznik magnezowy wiąże przynajmniej osiem jonów Mg^{2+} , skoncentrowanych w trzech skupiskach, natomiast aptamer NiCo wiąże cztery jony w jednej kieszeni wiążącej [57,76]. Rybo-przełączniki THF i guanidynowy-II, jako że ich ligandy są większe niż jony metali, zawierają dwie kieszenie wiążące metabolit [68,77]. Podejrzewa się, że wiązanie wielu pozwala na kooperatywne działanie rybo-przełącznika [78].

MECHANIZM DZIAŁANIA RYBOPRZEŁĄCZNIKÓW

Większość rybo-przełączników działa na zasadzie sprzężeń zwrotnych ujemnych, tj. w wyniku ekspresji danego mRNA powstaje metabolit (bądź jest aktywnie importowany do wnętrza komórki), który to po osiągnięciu stężenia granicznego zaczyna oddziaływać z domeną aptamerową, co prowadzi do wyciszenia ekspresji tego mRNA (Ryc. 2). W konsekwencji prowadzi to do stabilizacji stężenia tego metabolitu w komórce na optymalnym poziomie. Tego typu szlak regulatorowy jest charakterystyczny dla genów odpowiedzialnych za import, biosyntezę lub metabolizm niezbędnych cząsteczek. Natomiast pozytywna regulacja z udziałem rybo-przełączników wy-

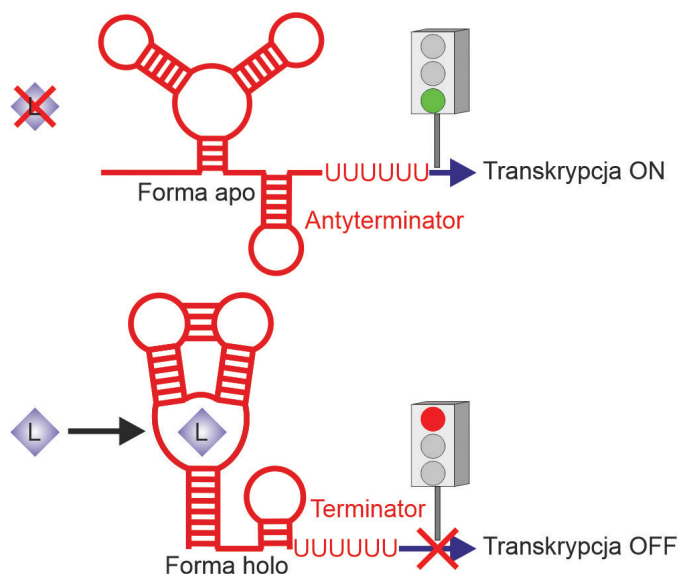


Rycina 2. Sprzężenia zwrotne ujemne z udziałem rybo-przełączników. M - metabolit (ligand).

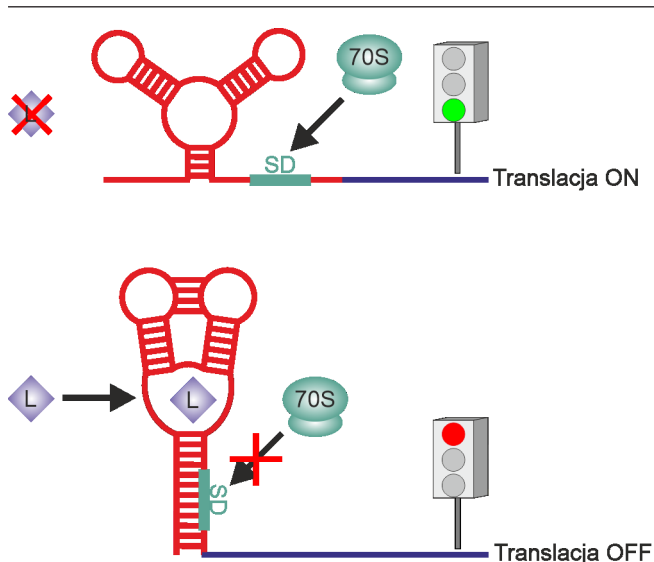
stępuje rzadziej i charakteryzuje geny zaangażowane w degradację lub eksport nadmiernych lub toksycznych związków chemicznych.

RYBOPRZEŁĄCZNIKI PROKARIOTYCZNE

Najbardziej rozpowszechnionym mechanizmem regulacji ekspresji genów przez rybo-przełączniki u prokariotów jest przedwczesna terminacja transkrypcji. Rybo-przełącznik po związaniu ligandu (forma *holo*) przyjmuje alternatywną strukturę spinki terminacyjnej, po której następuje trakt poli-U. W konsekwencji, transkrypcja zostaje przedwcześnie zahamowana i zamiast pełnej długości funkcjonalnego transkryptu powstaje produkt skrócony (Ryc. 3). Obok klasycznej, wewnętrznej terminacji transkrypcji rybo-przełączniki niekiedy wykorzystują także Rho-zależną terminację. Za przykład może posłużyć gen *ribB* u *E. coli* kontrolowany przez rybo-przełącznik FMN. Związanie ligandu powoduje uwolnienie miejsca



Rycina 3. Mechanizm działania rybo-przełączników transkrypcyjnych. L - ligand.



Rycina 4. Mechanizm działania ryboprzełączników translatablejnych. L - ligand, 70S - rybosom bakteryjny, SD - sekwencja Shine-Dalgarno.

wiązania białka Rho, które przemieszczając się wzdłuż nici RNA napotyka RNAP uwalniając niekompletny transkrypt [79].

Innym częstym mechanizmem kontroli ekspresji genów zależnym od ryboprzełączników jest kontrola translacji. W tym wypadku po przyłączeniu ligandu sekwencja Shine-Dalgarno (SD) ulega uwolnieniu bądź sekwestracji w strukturze dwuniciowej, przez co staje się dostępna/niedostępna dla aparatu translacyjnego komórki (Ryc. 4). Przykładem może być pierwszy odkryty ryboprzełącznik AdoCbl zlokalizowany w sekwencji liderowej mRNA *btuB* u *E. coli* kodującej białko transportera witaminy B12. Związanie AdoCbl przed domenę aptamerową powoduje wyciszenie ekspresji tego genu, czyniąc sekwencję SD niedostępną dla rybosomów [13]. Zdarza się, że ten sam ryboprzełącznik, kontrolujący ten sam gen u jednej bakterii kontroluje jego ekspresję przez terminację transkrypcji (*B. subtilis*) a u innego translację oraz stabilność mRNA (*E. coli*) [70].

Zupełnie inny mechanizm kontroli ekspresji jest wykorzystywany przez ryboprzełącznik wiążący glukozamino-6-fosforan (GlcN-6-P) zlokalizowany w genie *glmS* u *B. subtilis* kodującego aminotransferazę GlcN-6-P [59]. Funkcjonuje on jednocześnie jako ryboprzełącznik oraz rybozym, przeprowadzający autokatalityczne cięcie własnej cząsteczki, wykorzystując ligand GlcN-6P jako katalizator. Taki przecięty produkt ulega następnie szybkiej degradacji przez RNazę J. Inne katalityczne ryboprzełączniki po związaniu danego metabolitu przeprowadzają reakcję alternatywnego wycinania intronów w pre-mRNA, przez co z transkryptu zostaje usunięta sekwencja RBS [70].

Ryboprzełączniki mogą także kontrolować splicing. U bakterii *Clostridium difficile* samowycinający się intron grupy I jest sprzężony z ryboprzełącznikiem wiążącym cząsteczkę sygnałową cykliczny diguanozynomonofosforan (c-di-GMP) [41]. W formie *apo* zachodzi wycięcie intronu z użyciem dystalnego miejsca splicingowego, czego rezul-

tatem jest skrócony transkrypt z niekompletnym miejscem SD. Natomiast w formie *holo*, preferowane jest proksymalne miejsce splicingowe połączone z jednoczesnym samowycięciem się krótkiego intronu w taki sposób, że dwie części rozdzielonego wcześniej intronu zostają połączone, co umożliwia powstanie miejsca SD i zajście prawidłowej translacji.

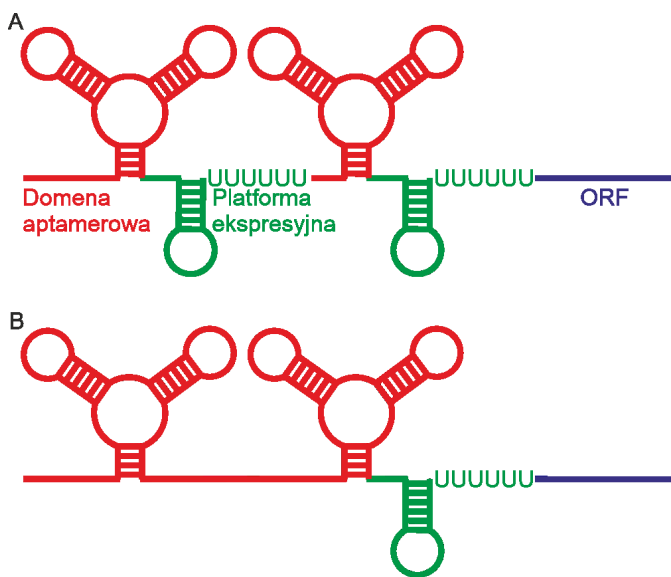
Choć zdecydowana większość ryboprzełączników działa w układzie *cis*, w wyjątkowych przypadkach mogą regulować ekspresję genów w układzie *trans*. U bakterii *Listeria monocytogenes* dwa geny metabolizmu siarki: *sreA* i *sreB* są kontrolowane ryboprzełącznikiem SAM, gdzie w obecności ligandu transkrypt ulega przedwczesnej terminacji [80]. Jak się okazało, te skrócone transkrypty są w dużej mierze komplementarne do sekwencji mRNA genu *prfA* i mogą funkcjonować w sposób analogiczny do sRNA (poprzez interakcje sens-antysens). Takie bezpośrednie oddziaływanie prowadzi do wyciszenia ekspresji *prfA*, który to pełni zróżnicowane funkcje związane z wirulencją bakterii. Takie powiązanie stężenia SAM w komórce z wirulencją ma istotne znaczenie dla *L. monocytogenes*, jako bakterii patogenicznej. Podwyższone stężenie SAM jest sygnałem, że bakteria znalazła się w środowisku obfitującym w składniki odżywcze *ergo* w organizmie człowieka, co stanowi dogodny warunki i może aktywować ekspresję genów wirulencji.

RYBOPRZEŁĄCZNIKI EUKARIOTYCZNE

Na szczególną uwagę zasługuje jedna klasa ryboprzełączników - TPP, której występowanie nie ogranicza się jedynie do domeny Prokaryota. Występuje ona także u eukariotów, takich jak rośliny czy grzyby, a nawet zwierząt niższych. Jak dotąd żadne badania nie potwierdziły obecności ryboprzełączników w genomach zwierząt wyższych, w tym ludzi [81]. Grupa eukariotycznych ryboprzełączników TPP posiada kilka unikatowych cech. W przeciwieństwie do bakteryjnych ryboprzełączników, te eukariotyczne nie występują tylko w 5'UTR, ale także w intronach ORF (u grzybów i zielenic) lub w 3'UTR (rośliny wyższe). Ponadto zamiast kontroli transkrypcji lub translacji, swoje funkcje regulatorowe w komórce pełnią poprzez alternatywny splicing.

U grzybów, m. in. *Neurospora crassa*, transkrypt genu *NMT1* posiada kilka różnych ramek odczytu [82]. W warunkach niskiego stężenia TPP wycięciu ulega niefunkcjonalna uORF (ang. *upstream ORF*), dlatego też może dojść do prawidłowej ekspresji kompletnej ORF tego genu (alternatywne miejsca splicingowe pozostają ukryte). Natomiast w sytuacji, kiedy TPP jest w komórce obecny, zmiana struktury ryboprzełącznika odblokowuje alternatywne miejsca splicingowe, które są preferencyjnie wybierane przez splicesom, czego skutkiem jest transkrypcja wyłącznie niefunkcjonalnego uORF.

U roślin niższych, takich jak zielenice *Chlamydomonas reinhardtii*, ryboprzełącznik TPP kontrolujący ekspresję genu *THIC* znajduje się w intronie zlokalizowanym w ORF [83]. W środowisku niskiego stężenia TPP wycięciu ulega cały intron wraz z sekwencją ryboprzełącznika. Po związaniu TPP przez ryboprzełącznik ujawniają się dwa alternatywne miejsca splicingowe, co skutkuje retencją fragmentu intronu



Rycina 5. Ryboprzełączniki tandemowe. (A) Dwa niezależne ryboprzełączniki poprzedzające wspólny ORF. (B) Dwie domeny aptamerowe poprzedzające wspólną platformę ekspresyjną. ORF - otwarta ranka odczytu.

wraz z przedwczesnym kodonem stop, skutkującym bio-syntezą niekompletnego i niefunkcjonalnego białka.

Z kolei u roślin wyższych, takich jak *Arabidopsis thaliana*, ryboprzełącznik TPP genu *THIC* jest umiejscowiony w 3'UTR [84]. W warunkach niskiego stężenia TPP miejsce splicingowe pozostaje zamknięte w strukturze dwuniciowej i niedostępne dla splicesomu, dlatego też powstały transkrypt posiada krótki 3'UTR wraz z sygnałem poliadenylacji (poli-A), zapewniający stabilność mRNA. W obecności TPP natomiast, miejsce splicingowe zostaje odsłonięte, co skutkuje usunięciem sygnału poli-A. Taki transkrypt charakteryzuje się zwiększoną podatnością na degradację i zmniejszoną stabilność, przekładając się bezpośrednio na obniżoną produkcję białka. Badania wykazały, że transkrypty z długim 3'UTR, dodatkowo pozbawionym ochronnych właściwości ogona poli-A, są potencjalnym celem dla NMD (ang. *nonsense-mediated decay*) [85].

RYBOPRZEŁĄCZNIKI TANDEMOWE

Ryboprzełączniki mogą także funkcjonować w bardziej skomplikowanych podwójnych układach, jako ryboprzełączniki tandemowe, stanowiące wyrafinowane bramki logiczne. Funkcją takiego rozwiązania ryboprzełączników jest ściślejsza kontrola ekspresji, większy zakres dynamiczny (ang. *dynamic range*) lub zmiana/rozbudowa specyficzności.

W układzie tandemowym mogą także występować całe ryboprzełączniki (dwa aptamery wraz z dwiema platformami ekspresyjnymi), jak to ma miejsce w przypadku ryboprzełączników TPP kontrolujących gen *tenA* u *Bacillus anthracis* (Ryc. 5A) [15]. W tym wypadku dopiero związanie obu aptamerów skutkuje wyłączeniem ekspresji *tenA*. Z kolei ryboprzełącznik glicynowy u *B. subtilis* (ale także u wielu innych bakterii), kontrolujący ekspresję operonu *gcvT*, skła-

da się z dwóch domen aptamerowych, po których występuje wspólna platforma ekspresyjna (Ryc. 5B) [46].

PRAKTYCZNE ZASTOSOWANIE RYBOPRZEŁĄCZNIKÓW

CEL ANTYBIOTYKOTERAPII

Najistotniejszą cechą ryboprzełączników w kontekście antybiotykoterapii jest fakt, iż kontrolują kluczowe dla przeżycia bakterii szlaki metaboliczne [86]. Jednocześnie, mogą być z łatwością zablokowane przez podanie analogów ich natywnych ligandów, które wiążą ryboprzełącznik i wyciszają ekspresję kontrolowanych genów, same natomiast nie są metabolicznie funkcjonalne. Ważną cechą takiego podejścia jest bezpieczeństwo, nie są bowiem jak dotąd poznane żadne ryboprzełączniki występujące u ludzi. Wiele badań w tej dziedzinie przeprowadzono dla ryboprzełącznika wiążącego FMN. Kontroluje on geny biosyntezy i transportu ryboflawiny. FMN stanowi grupę prostetyczną wielu enzymów uczestniczących w reakcjach redoks. rozeoflawina (RoF), wytwarzana przez *Streptomyces davawensis* jest jedynym znanym naturalnym antybiotykiem wycelowanym w ryboprzełącznik [87]. Zaprojektowano inny analog ryboflawiny o lepszych właściwościach antybiotykowych i mniejszej toksyczności, nakierowany na ryboprzełącznik FMN, nazwany 5FDQD [88]. Badania wskazują, że właściwości 5FDQD takie jak K_d , okres półtrwania czy sposób wiązania się do ryboprzełącznika są bardzo podobne do FMN [88]. Właściwości antybakteryjne 5FDQD są porównywalne z wankomycyną, a jednocześnie analizy wykazały, że efekt ten jest uzyskiwany szybciej.

Inny związek o właściwościach bakteriobójczych, którego celem molekularnym jest ryboprzełącznik, Ribocil, zsyntetyzowany został przez firmę Merck & Co [89]. Ribocil wiąże się do ryboprzełącznika FMN genu *ribB* z wysokim powinowactwem wynoszącym 6,6 nM (dla natywnego metabolitu FMN K_d wynosi 1,2 nM). Gen *ribB* jest zaangażowany w biosyntezę ryboflawiny, kofaktora niezbędnego dla przeżycia bakterii. W testach *in vitro* stężenie Ribocil inhibujące wzrost *E. coli* (IC_{50}) wynosiło 0,3 μ M, natomiast MIC (ang. *minimum inhibitory concentration*) wyniósł 2 μ g/ml. Właściwości przeciwbakteryjne zostały wykazane także dla innych patogennych bakterii, takich jak *Pseudomonas aeruginosa* czy *Acinetobacter baumannii* oraz odporne na metycylinę szczepy *Staphylococcus aureus* (MRSA, ang. *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), *Enterococcus faecalis* czy *Streptococcus pyogenes* [90].

RYBOSELEKTORY

Syntetyczne układy ryboprzełączników wraz z odpowiednio dobraną sekwencją kodującą czynnik selekcyjny pozwalają na stworzenie samopolepszającego się układu do produkcji różnego rodzaju metabolitów czy bioproduktów. Tego typu „biologiczne urządzenie” nazywamy ryboselektorem (ang. *riboselector*) [91]. Ryboselektor składa się z dwóch modułów: ryboprzełącznika i genu stanowiącego czynnik selekcyjny. Ryboselektory pozwalają na skuteczną optymalizację szlaków metabolicznych poprzez łączenie wewnątrzkomórkowego stężenia określonego metabolitu

z przeżyciem komórki pod presją selekcyjną. Ryboselektor opracowany przez Yang i współpracowników składał się z represyjnego ryboprzełącznika lizynowego genu *lysC* *E. coli* i markera selekcyjnego *tetA*, zapewniającego jednocześnie odporność na działanie tetracykliny i wrażliwość na toksyczny NiCl_2 [92].

RYBOSENSORY

Biosensor jest urządzeniem analitycznym służącym do wykrywania analitu, które łączy składnik biologiczny z detektorem fizykochemicznym. Istnieje wiele różnorodnych związków biologicznych wykorzystywanych jako elementy rozpoznania, w tym: enzymy, przeciwciała, receptory, RNA, DNA, organelle, tkanki i całe komórki [93]. Rozpoznanie danej cząsteczki zazwyczaj wyzwala uwolnienie sygnału elektrochemicznego lub optycznego zebranego i skwantyfikowanego przez detektor. W 2009 opracowano biosensor wykrywający teofilinę, lek przeciwastmatyczny, którego przedawkowanie może mieć poważne konsekwencje zdrowotne, jak napady padaczki czy zaburzenia rytmu serca. Biosensor ten składał się z domeny aptamerowej wiążącej teofilinę jako czujnik połączonej z końcem 5' sekwencji kodującej GFP, białka zdolnego do emisji sygnału świetlnego (ang. *green fluorescence protein*) [94]. Badania wykazały, że w obecności teofiliny ów biosensor podowuje zależne od dawki wyciszenie ekspresji GFP, osiągając pięciokrotny spadek sygnału przy 1 mM stężeniu teofiliny.

Inne podejście zaprezentowali naukowcy z Cornell University w Nowym Jorku [95]. Domeny aptamerowe różnych ryboprzełączników (TPP, adeninowy, guaninowy, SAM) sprzężono z 84-nukleotydowym aptamerem Spinach, który strukturalnie imituje białko GFP [96], co pozwala na równie wydajnie wiązanie fluoroforów podobnych do tych natywnie wiązanych przez GFP, takich jak DFHBI. Tego typu fluorofory wykazują właściwości fluorescencyjne tylko po związaniu przez aptamer Spinach. Przyłączenie odpowiedniego ligandu powoduje emisję sygnału świetlnego. Użytkany konstrukt charakteryzuje się zbliżoną specyficznością i powinowactwem jak naturalny ryboprzełącznik TPP o EC_{50} równym 9 μM oraz K_d równym 600 nM. Cały konstrukt osiągnął wysoką wydajnością i czułość, powodując 16-krotny wzrost fluorescencji przy komórkowym stężeniu TPP 100 μM .

INDUKOWALNE UKŁADY KONTROLI EKSPRESJI

Opracowano nowe oraz zoptymalizowano dotychczasowe syntetyczne aptamery: teofilinowy, tetrametylorodaminowy, dopaminowy, tyroksynowy, 2,4-dinitrotoluenowy. Metodami inżynierii genetycznej udało się stworzyć indukowany układ kontroli ekspresji genów u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Z wykorzystaniem aptamerów tetracyklinowych i neomycynowych kontrolujących skanowanie rybosomu udało się osiągnąć poziom indukcji odpowiednio sześć- i siedmiokrotnym [97,98]. Podobne układy udało się stworzyć także w organizmach roślinnych [99] i wirusowych [100].

GENETYCZNIE MODYFIKOWANE WIRUSY ONKOLITYCZNE

Badacze z zespołu Nettelbeck'a z Niemieckiego Centrum Badań nad Rakiem w Heidelbergu zaprojektowali dwa genetycznie zmodyfikowane onkolityczne wirusy: adenowirus (AdV) i wirus odry (MeV), których geny znajdują się pod kontrolą ryboprzełącznika wiążącego teofilinę [100]. Konstrukty te powstały przez połączenie dwóch ryboprzełączników o właściwościach autokatalitycznych, umieszczonych na końcu 5' i 3' odpowiednich genów (E1A u AdV i glikoproteiny F u MeV). W warunkach normalnych geny ulegają ekspresji, a replikacja i infekcyjność wirusa pozostaje bez zmian. Natomiast po dodaniu do środowiska teofiliny ryboprzełącznik ulega aktywacji, a z transkryptu zostaje wycięty odpowiedni ORF. Badania wykonane na AdV wykazały 200-krotnie obniżoną produkcję białka E1A. Eksperyment przeprowadzony z użyciem komórek SK-MEL-28 (komórki czerniaka złośliwego) wykazał dużą skuteczność antynowotworową wirusa (przeżywalność komórek wynosiła 10%). Jednocześnie, po podaniu teofiliny przeżywalność wzrastała do 80%, w sposób zależny od dawki. Zmodyfikowany MeV także wykazywał skuteczne działanie *in vivo* w odpowiedzi na teofilinę, powodując 11- i 6-krotny spadek produkcji wirionów, odpowiednio w Verocells i SK-MEL-28.

PODSUMOWANIE

Przez blisko 20 lat badań nad ryboprzełącznikami przekonaaliśmy się, jak ciekawy i różnorodny jest świat ryboprzełączników. Ich reprezentanci występują we wszystkich królestwach życia, od najprostszych bakterii po zwierzęta. Były najprawdopodobniej obecne u zarania życia i w niemal niezmienionej formie znajdziemy je także u współczesnych organizmów. Dzięki swojej oszczędnej formie powalają na regulację ekspresji genów w niezwykle prosty sposób, nie tracą przy tym na precyzji i wydajności. 45 dotąd poznanych klas ryboprzełączników rozpoznają szerokie spektrum różnego rodzaju cząsteczek. Zdecydowana większość z nich to niezbędne dla przetrwania komórki metabolity jak pochodne witamin, aminokwasów czy nukleotydów. A ryboprzełączniki pełnią centralną rolę w kontroli ich metabolizmu i biosyntezy. Właściwości ryboprzełączników sprawiają, że są one aktualnie obiektem niezwykle interesujących i obiecujących badań, zwłaszcza tych skupionych na ich praktycznym wykorzystaniu.

PIŚMIENNICTWO

1. Jacob F, Perrin D, Sanchez C, Monod J (1960) Operon: a group of genes with the expression coordinated by an operator. *C R Biol* 250: 1727-9
2. Gralla J, Steitz JA, Crothers DM (1974) Direct physical evidence for secondary structure in an isolated fragment of R17 bacteriophage mRNA. *Nature* 248(445): 204-8
3. Yanofsky C (1981) Attenuation in the control of expression of bacterial operons. *Nature* 289(5800): 751-8
4. Lee F, Squires CL, Squires C, Yanofsky C (1976) Termination of transcription *in vitro* in the *Escherichia coli* tryptophan operon leader region. *J Mol Biol* 103(2): 383-93
5. Bronson MJ, Squires C, Yanofsky C (1973) Nucleotide sequences from tryptophan messenger RNA of *Escherichia coli*: the sequence corre-

- sponding to the amino-terminal region of the first polypeptide specified by the operon. *Proc Natl Acad Sci* 70(8): 2335-9
6. Kruger K, Grabowski PJ, Zaug AJ, Sands J, Gottschling DE, Cech TR (1982) Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell* 31(1): 147-57
 7. Guerrier-Takada C, Gardiner K, Marsh T, Pace N, Altman S (1983) The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* 35(3 Pt 2): 849-57
 8. Ellington AD, Szostak JW (1990) In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 346(6287): 818-22
 9. Tuerk C, Gold L (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 249(4968): 505-10
 10. Kadner RJ (1978) Repression of synthesis of the vitamin B12 receptor in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 136(3): 1050-7
 11. Webb E, Febres F, Downs DM (1996) Thiamine pyrophosphate (TPP) negatively regulates transcription of some thi genes of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 178(9): 2533-8
 12. Ravnum S, Andersson DI (2001) An adenosyl-cobalamin (coenzyme-B12)-repressed translational enhancer in the cob mRNA of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microb* 39(6): 1585-94
 13. Nahvi A, Sudarsan N, Ebert MS, Zou X, Brown KL, Breaker RR (2002) Genetic control by a metabolite binding mRNA. *Chem Biol* 9(9):1043
 14. Mironov AS, Gusarov I, Rafikov R, Lopez LE, Shatalin K, Kreneva RA, et al. (2002) Sensing small molecules by nascent RNA: a mechanism to control transcription in bacteria. *Cell* 111(5): 747-56
 15. Winkler W, Nahvi A, Breaker RR (2002) Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature* 419(6910): 952-6
 16. Batey RT, Gilbert SD, Montange RK (2004) Structure of a natural guanine-responsive riboswitch complexed with the metabolite hypoxanthine. *Nature* 432(7015): 411-5
 17. Serganov A, Yuan YR, Pikovskaya O, Polonskaia A, Malinina L, Phan AT, et al. (2004) Structural basis for discriminative regulation of gene expression by adenine- and guanine-sensing mRNAs. *Chem Biol* 11(12): 1729-41
 18. Bock LC, Griffin LC, Latham JA, Vermaas EH, Toole JJ (1992) Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature* 355(6360): 564-6
 19. Miranda-Rios J, Navarro M, Soberon M (2001) A conserved RNA structure (thi box) is involved in regulation of thiamin biosynthetic gene expression in bacteria. *Proc Natl Acad Sci* 98(17): 9736-41
 20. Kil YV, Mironov VN, Gorishin I, Kreneva RA, Perumov DA (1992) Riboflavin operon of *Bacillus subtilis*: unusual symmetric arrangement of the regulatory region. *Mol General Genet* 233(3): 483-6
 21. Nou X, Kadner RJ (1998) Coupled changes in translation and transcription during cobalamin-dependent regulation of *btuB* expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 180(24): 6719-28
 22. Gelfand MS, Mironov AA, Jomantas J, Kozlov YI, Perumov DA (1999) A conserved RNA structure element involved in the regulation of bacterial riboflavin synthesis genes. *Trends Genet* 15(11): 439-42
 23. Nou X, Kadner RJ (2000) Adenosylcobalamin inhibits ribosome binding to *btuB* RNA. *Proc Natl Acad Sci* 97(13): 7190-5
 24. McCown PJ, Corbino KA, Stav S, Sherlock ME, Breaker RR (2017) Riboswitch diversity and distribution. *RNA* 23(7): 995-1011
 25. Nahvi A, Barrick JE, Breaker RR (2004) Coenzyme B12 riboswitches are widespread genetic control elements in prokaryotes. *Nucl Acids Res* 32(1): 143-50
 26. Winkler WC, Nahvi A, Sudarsan N, Barrick JE, Breaker RR (2003) An mRNA structure that controls gene expression by binding S-adenosylmethionine. *Nat Struct Biol* 10(9): 701-7
 27. Weinberg Z, Regulski EE, Hammond MC, Barrick JE, Yao Z, Ruzzo WL, et al. (2008) The aptamer core of SAM-IV riboswitches mimics the ligand-binding site of SAM-I riboswitches. *RNA* 14(5): 822-8
 28. Weinberg Z, Wang JX, Bogue J, Yang J, Corbino K, Moy RH, et al. (2010) Comparative genomics reveals 104 candidate structured RNAs from bacteria, archaea, and their metagenomes. *Genom Biol* 11(3): R31
 29. Tucker BJ, Puskarz I, et al. (2005) Evidence for a second class of S-adenosylmethionine riboswitches and other regulatory RNA motifs in alpha-proteobacteria. *Genom Biol* 6(8) :R70
 30. Poiata E, Meyer MM, Ames TD, Breaker RR (2009) A variant riboswitch aptamer class for S-adenosylmethionine common in marine bacteria. *RNA* 15(11): 2046-56
 31. Fuchs RT, Grundy FJ, Henkin TM (2006) The S(MK) box is a new SAM-binding RNA for translational regulation of SAM synthetase. *Nat Struct Mol Biol* 13(3): 226-33
 32. Mirihana Arachchilage G, Sherlock ME, Weinberg Z, Breaker RR (2018) SAM-VI RNAs selectively bind S-adenosylmethionine and exhibit similarities to SAM-III riboswitches. *RNA Biol* 15(3): 371-8
 33. Wang JX, Lee ER, Morales DR, Lim J, Breaker RR (2008) Riboswitches that sense S-adenosylhomocysteine and activate genes involved in coenzyme recycling. *Mol Cell* 29(6): 691-702
 34. Winkler WC, Cohen-Chalamish S, Breaker RR (2002) An mRNA structure that controls gene expression by binding FMN. *Proc Natl Acad Sci* 99(25): 15908-13
 35. Weinberg Z, Nelson JW, Lunse CE, Sherlock ME, Breaker RR (2017) Bioinformatic analysis of riboswitch structures uncovers variant classes with altered ligand specificity. *Proc Natl Acad Sci* 114(11): E2077-E85
 36. Ames TD, Rodionov DA, Weinberg Z, Breaker RR (2010) A eubacterial riboswitch class that senses the coenzyme tetrahydrofolate. *Chem Biol* 17(7): 681-5
 37. Chen X, Mirihana Arachchilage G, Breaker RR (2019) Biochemical validation of a second class of tetrahydrofolate riboswitches in bacteria. *RNA* doi: 10.1261/rna.071829.119
 38. Regulski EE, Moy RH, Weinberg Z, Barrick JE, Yao Z, Ruzzo WL, et al. (2008) A widespread riboswitch candidate that controls bacterial genes involved in molybdenum cofactor and tungsten cofactor metabolism. *Mol Microb* 68(4): 918-32
 39. Kim PB, Nelson JW, Breaker RR (2015) An ancient riboswitch class in bacteria regulates purine biosynthesis and one-carbon metabolism. *Mol Cell* 57(2): 317-28
 40. Sudarsan N, Lee ER, Weinberg Z, Moy RH, Kim JN, Link KH, et al. (2008) Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP. *Science* 321(5887): 411-3
 41. Lee ER, Baker JL, Weinberg Z, Sudarsan N, Breaker RR (2010) An allosteric self-splicing ribozyme triggered by a bacterial second messenger. *Science* 329(5993): 845-8
 42. Nelson JW, Sudarsan N, Phillips GE, Stav S, Lunse CE, McCown PJ, et al. (2015) Control of bacterial exoelectrogenesis by c-AMP-GMP. *Proc Natl Acad Sci* 112(17):5389-94
 43. Nelson JW, Sudarsan N, Furukawa K, Weinberg Z, Wang JX, Breaker RR (2013) Riboswitches in eubacteria sense the second messenger c-di-AMP. *Nat Chem Biol* 9(12):834-9
 44. Sherlock ME, Sudarsan N, Breaker RR (2018) Riboswitches for the alarmone ppGpp expand the collection of RNA-based signaling systems. *Proc Natl Acad Sci* 115(23):6052-7
 45. Ames TD, Breaker RR (2011) Bacterial aptamers that selectively bind glutamine. *RNA Biol* 8(1):82-9
 46. Mandal M, Lee M, Barrick JE, Weinberg Z, Emilsson GM, Ruzzo WL, et al. (2004) A glycine-dependent riboswitch that uses cooperative binding to control gene expression. *Science* 306(5694): 275-9
 47. Sudarsan N, Wickiser JK, Nakamura S, Ebert MS, Breaker RR (2003) An mRNA structure in bacteria that controls gene expression by binding lysine. *Genes Devel* 17(21):2688-97
 48. Mandal M, Boese B, Barrick JE, Winkler WC, Breaker RR (2003) Riboswitches control fundamental biochemical pathways in *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Cell* 113(5): 577-86
 49. Kim JN, Roth A, Breaker RR (2007) Guanine riboswitch variants from *Mesoplasma florum* selectively recognize 2'-deoxyguanosine. *Proc Natl Acad Sci* 104(41): 16092-7

50. Roth A, Winkler WC, Regulski EE, Lee BW, Lim J, Jona I, et al. (2007) A riboswitch selective for the queuosine precursor preQ1 contains an unusually small aptamer domain. *Nat Struct Mol Biol* 14(4): 308-17
51. Meyer MM, Roth A, Chervin SM, Garcia GA, Breaker RR (2008) Confirmation of a second natural preQ1 aptamer class in Streptococcaceae bacteria. *RNA* 14(4): 685-95
52. McCown PJ, Liang JJ, Weinberg Z, Breaker RR (2014) Structural, functional, and taxonomic diversity of three preQ1 riboswitch classes. *Chem Biol* 21(7): 880-9
53. Sherlock ME, Sudarsan N, Stav S, Breaker RR (2018) Tandem riboswitches form a natural Boolean logic gate to control purine metabolism in bacteria. *eLife* doi: 10.7554/eLife.33908
54. Sherlock ME, Sadeeshkumar H, Breaker RR (2019) Variant Bacterial Riboswitches Associated with Nucleotide Hydrolase Genes Sense Nucleoside Diphosphates. *Biochemistry* 58(5): 401-10
55. Barrick JE, Corbino KA, Winkler WC, Nahvi A, Mandal M, Collins J, et al. (2004) New RNA motifs suggest an expanded scope for riboswitches in bacterial genetic control. *Proc Natl Acad Sci* 101(17): 6421-6
56. Park SY, Cromie MJ, Lee EJ, Groisman EA (2010) A bacterial mRNA leader that employs different mechanisms to sense disparate intracellular signals. *Cell* 142(5): 737-48 *subMed Central PMCID: PMC2967377*.
57. Furukawa K, Ramesh A, Zhou Z, Weinberg Z, Vallery T, Winkler WC, et al. (2015) Bacterial riboswitches cooperatively bind Ni(2+) or Co(2+) ions and control expression of heavy metal transporters. *Mol Cell* 57(6):1088-98
58. Baker JL, Sudarsan N, Weinberg Z, Roth A, Stockbridge RB, Breaker RR (2012) Widespread genetic switches and toxicity resistance proteins for fluoride. *Science* 335(6065): 233-5
59. Winkler WC, Nahvi A, Roth A, Collins JA, Breaker RR (2004) Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme. *Nature* 428(6980): 281-6
60. Li S, Hwang XY, Stav S, Breaker RR (2016) The yjdB riboswitch candidate regulates gene expression by binding diverse azaaromatic compounds. *RNA* 22(4): 530-41
61. Nelson JW, Atilho RM, Sherlock ME, Stockbridge RB, Breaker RR (2017) Metabolism of Free Guanidine in Bacteria Is Regulated by a Widespread Riboswitch Class. *Mol Cell* 65(2): 220-30
62. Sherlock ME, Malkowski SN, Breaker RR (2017) Biochemical Validation of a Second Guanidine Riboswitch Class in Bacteria. *Biochemistry* 56(2): 352-8
63. Sherlock ME, Breaker RR (2017) Biochemical Validation of a Third Guanidine Riboswitch Class in Bacteria. *Biochemistry* 56(2): 359-63
64. Sun EI, Leyn SA, Kazanov MD, Saier MH, Jr., Novichkov PS, Rodionov DA (2013) Comparative genomics of metabolic capacities of regulons controlled by cis-regulatory RNA motifs in bacteria. *BMC Genom* 14: 597
65. Lunse CE, Schmidt MS, Wittmann V, Mayer G (2011) Carba-sugars activate the glmS-riboswitch of *Staphylococcus aureus*. *ACS Chem Biol* 6(7): 675-8
66. Ray PS, Jia J, Yao P, Majumder M, Hatzoglou M, Fox PL (2009) A stress-responsive RNA switch regulates VEGFA expression. *Nature* 457(7231): 915-9
67. Serganov A, Huang L, Patel DJ (2009) Coenzyme recognition and gene regulation by a flavin mononucleotide riboswitch. *Nature* 458(7235): 233-7
68. Trausch JJ, Ceres P, Reyes FE, Batey RT (2011) The structure of a tetrahydrofolate-sensing riboswitch reveals two ligand binding sites in a single aptamer. *Structure* 19(10): 1413-23
69. Gilbert SD, Rambo RP, Van Tyne D, Batey RT (2008) Structure of the SAM-II riboswitch bound to S-adenosylmethionine. *Nat Struct Mol Biol* 15(2): 177-82
70. Caron MP, Bastet L, Lussier A, Simoneau-Roy M, Masse E, Lafontaine DA (2012) Dual-acting riboswitch control of translation initiation and mRNA decay. *Proc Natl Acad Sci* 109(50):E3444-53
71. Cheng J, Poduska B, Morton RA, Finan TM (2011) An ABC-type cobalt transport system is essential for growth of *Sinorhizobium meliloti* at trace metal concentrations. *J Bacteriol* 193(17): 4405-16
72. Lim J, Winkler WC, Nakamura S, Scott V, Breaker RR (2006) Molecular-recognition characteristics of SAM-binding riboswitches. *Angew Chemie* 45(6): 964-8
73. Smith KD, Lipchock SV, Ames TD, Wang J, Breaker RR, Strobel S (2009) Structural basis of ligand binding by a c-di-GMP riboswitch. *Nat Struct Mol Biol* 16(12):1218-23
74. Serganov A, Huang L, Patel DJ (2008) Structural insights into amino acid binding and gene control by a lysine riboswitch. *Nature* 455(7217): 1263-7
75. Peselis A, Serganov A (2014) Themes and variations in riboswitch structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1839(10): 908-18
76. Dann CE, 3rd, Wakeman CA, Sieling CL, Baker SC, Irnov I, Winkler WC (2007) Structure and mechanism of a metal-sensing regulatory RNA. *Cell* 130(5): 878-92
77. Huang L, Wang J, Lilley DMJ (2017) The Structure of the Guanidine-II Riboswitch. *Cell Chem Biol* 24(6):695-702
78. Peselis A, Gao A, Serganov A (2015) Cooperativity, allostery and synergism in ligand binding to riboswitches. *Biochimie* 117:100-9
79. Hollands K, Proshkin S, Sklyarova S, Epshtein V, Mironov A, Nudler E, et al. (2012) Riboswitch control of Rho-dependent transcription termination. *Proc Natl Acad Sci* 109(14): 5376-81
80. Loh E, Dussurget O, Gripenland J, Vaitkevicius K, Tiensuu T, Mandin P, et al. (2009) A trans-acting riboswitch controls expression of the virulence regulator PrfA in *Listeria monocytogenes*. *Cell* 139(4): 770-9
81. Li S, Breaker RR (2013) Eukaryotic TPP riboswitch regulation of alternative splicing involving long-distance base pairing. *Nucl Acids Res* 41(5):3 022-31
82. Cheah MT, Wachter A, Sudarsan N, Breaker RR (2007) Control of alternative RNA splicing and gene expression by eukaryotic riboswitches. *Nature* 447(7143):497-500
83. Croft MT, Moulin M, Webb ME, Smith AG (2007) Thiamine biosynthesis in algae is regulated by riboswitches. *Proc Natl Acad Sci* 104(52): 20770-5
84. Wachter A, Tunc-Ozdemir M, Grove BC, Green PJ, Shintani DK, Breaker RR (2007) Riboswitch control of gene expression in plants by splicing and alternative 3' end processing of mRNAs. *Plant Cell* 19(11): 3437-50
85. Kertesz S, Kerenyi Z, Merai Z, Bartos I, Palfy T, Barta E, et al. (2006) Both introns and long 3'-UTRs operate as cis-acting elements to trigger nonsense-mediated decay in plants. *Nucl Acids Res* 34(21): 6147-57
86. Blount KF, Breaker RR (2006) Riboswitches as antibacterial drug targets. *Nat Biotech* 24(12): 1558-64
87. Lee ER, Blount KF, Breaker RR (2009) Roseoflavin is a natural antibacterial compound that binds to FMN riboswitches and regulates gene expression. *RNA Biol* 6(2): 187-94
88. Blount KF, Megyola C, Plummer M, Osterman D, O'Connell T, Aristoff P, et al. (2015) Novel riboswitch-binding flavin analog that protects mice against *Clostridium difficile* infection without inhibiting cecal flora. *Antimicrob Agent Chemother* 59(9): 5736-46
89. Howe JA, Wang H, Fischmann TO, Balibar CJ, Xiao L, Galgoci AM, et al. (2015) Selective small-molecule inhibition of an RNA structural element. *Nature* 526(7575): 672-7
90. Wang H, Mann PA, Xiao L, Gill C, Galgoci AM, Howe JA, et al. (2017) Dual-Targeting Small-Molecule Inhibitors of the *Staphylococcus aureus* FMN Riboswitch Disrupt Riboflavin Homeostasis in an Infectious Setting. *Cell Chem Biol* 24(5): 576-88
91. Yang J, Seo SW, Jang S, Shin SI, Lim CH, Roh TY, et al. (2013) Synthetic RNA devices to expedite the evolution of metabolite-producing microbes. *Nat Comm* 4: 1413
92. Jang S, Yang J, Seo SW, Jung GY (2015) Riboselector: riboswitch-based synthetic selection device to expedite evolution of metabolite-producing microorganisms. *Methods Enzymol* 550: 341-62
93. Han K, Liang Z, Zhou N (2010) Design strategies for aptamer-based biosensors. *Sensors* 10(5): 4541-57
94. Jo JJ, Shin JS (2009) Construction of intragenic synthetic riboswitches for detection of a small molecule. *Biotech Lett* 31(10): 1577-81

95. You M, Litke JL, Jaffrey SR (2015) Imaging metabolite dynamics in living cells using a Spinach-based riboswitch. *Proc Natl Acad Sci* 112(21): E2756-65
96. Paige JS, Wu KY, Jaffrey SR (2011) RNA mimics of green fluorescent protein. *Science* 333(6042): 642-6
97. Suess B, Hanson S, Berens C, Fink B, Schroeder R, Hillen W (2003) Conditional gene expression by controlling translation with tetracycline-binding aptamers. *Nucl Acids Res* 31(7): 1853-8
98. Weigand JE, Sanchez M, Gunnesch EB, Zeiher S, Schroeder R, Suess B (2008) Screening for engineered neomycin riboswitches that control translation initiation. *RNA* 14(1): 89-97
99. Verhounig A, Karcher D, Bock R (2010) Inducible gene expression from the plastid genome by a synthetic riboswitch. *Proc Natl Acad Sci* 107(14): 6204-9
100. Ketzer P, Kaufmann JK, Engelhardt S, Bossow S, von Kalle C, Hartig JS, et al. (2014) Artificial riboswitches for gene expression and replication control of DNA and RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci* 111(5): E554-62

The ample world of riboswitches

Piotr Machtel✉

Institute of Bioorganic Chemistry Polish Academy of Sciences, Poznań, Poland

✉corresponding Author: pmachtel@ibch.poznan.pl

Key words: riboswitches, bacteria, gene expression regulation, transcription

ABSTRACT

Constantly changing environment requires bacteria to respond quickly and decisively at the cellular level. Notwithstanding, bacteria operate with a limited set of resources restricted to a single cell at their disposal. The natural effect of this state of things for bacteria was a development of a variety of different mechanisms for gene expression control. Among them, riboswitches, defined as sequences present in transcripts with their ability of direct binding low-molecular metabolites and inducing a regulatory response, are considered to be one of the most interesting mechanism of gene regulation. In this publication, there is presented current state of knowledge concerning riboswitches, including such aspects as: mechanisms of action of riboswitches, their structure and diversity as well as their distribution. Furthermore, the history of their discovery at the beginning of the 21st century, and current research that may find future, practical applications.