



**Korelacja struktury i funkcji wybranych fragmentów  
rRNA w regulacji biosyntezy polipeptydu w układzie  
roślinnym**

**Kamilla Bąkowska-Żywicka**

**Praca przedstawiona Radzie Naukowej  
Instytutu Chemii Bioorganicznej  
Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu  
w celu uzyskania stopnia  
doktora nauk chemicznych  
w zakresie biochemii**

**Poznań, 2007**

INSTYTUT CHEMII BICORGANICZNEJ  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK  
ul. Z. Noskowskiego 12/14  
61-704 Poznań, tel. 852-85-03  
REGON 000849327

-2-

D-150

**Składam serdeczne podziękowania  
Promotorowi mojej rozprawy,  
Panu prof. dr hab. Tomaszowi Twardowskiemu  
za wskazanie niezwykle interesującego tematu badań,  
okazaną wyrozumiałość i cenne wskazówki podczas  
powstawania pracy.**

WYDZIAŁ CHEMII  
KATEDRA CHEMII ORGANICZNEJ  
D-150

Praca wykonana przez  
Zdzisława Kozłowskiego  
Pracownia Chemii Organicznej  
Instytut Chemii Organicznej  
Akademia Nauk i Sztuki  
Warszawa

**Pragnę podziękować:**

**Moim Koleżankom z Zespołu Biosyntezy Białka,  
Agacie Tyczewskiej, Marcie Sikorze i Annie Kietrys,**

- za wspaniałą, pełną ciepła atmosferę i twórcze  
dyskusje.

**Pani Krystynie Ludwiczak**

- za okazaną życzliwość.

**Rodzicom i Mężowi**

- za wiarę w moje siły i niezwykle wsparcie.

Pragnę podziękować:

Młoiu Kocubinom z Xapouu Biorzntary Bialia,  
Agnie Tyrcowickiej, Marcie Sikors i Anio Klejty,  
- za wsparcie, pełną ciepła atencję i twórczą  
dyskusję.

Prof. Krystynie L. Rudwickiej  
- za okazaną życzliwość.

Kobroni i Miłowi  
- za wiarę w moje siły i niezwykłe wsparcie.

**Pracę tę dedykuje Filipowi.**



Prace z dziedziny filozofii.

<b>1. WSTĘP .....</b>	<b>4</b>
<b>2. CEL PRACY .....</b>	<b>5</b>
<b>3. WPROWADZENIE.....</b>	<b>6</b>
3.1 STRUKTURA RYBOSOMU EUKARIOTYCZNEGO. ....	7
3.1.1 <i>Struktura małej podjednostki rybosomalnej 40S.</i> .....	9
• Domena 5' 18S rRNA .....	12
• Domena centralna 18S rRNA .....	14
• Domena 3' <i>major</i> 18S rRNA.....	17
• Domena 3' <i>minor</i> 18S rRNA.....	19
• Rozmieszczenie białek rybosomalnych w podjednostce 40S.....	20
3.1.2. <i>Struktura dużej podjednostki rybosomalnej 60S.</i> .....	24
• Domena I L-rRNA .....	29
• Domena II L-rRNA.....	32
• Domena III L-rRNA .....	34
• Domena IV L-rRNA .....	36
• Domena V L-rRNA .....	38
• Domena VI L-rRNA .....	40
• 5S rRNA .....	41
• Rozmieszczenie białek rybosomalnych w podjednostce 60S.....	43
3.1.2 <i>Wpływ jonów metali na stabilność rybosomu.</i> .....	46
3.1.3 <i>Interakcje pomiędzy podjednostkami rybosomalnymi.</i> .....	47
3.2 FUNKCJA RYBOSOMU – BIOSYNTeza BIAŁKA.....	52
3.2.1 <i>Inicjacja procesu biosyntezy białka.</i> .....	52
3.2.2 <i>Elongacja procesu biosyntezy białka.</i> .....	53
• Rozpoznanie mRNA – AA-tRNA poprzez oddziaływanie kodon – antykodon	54
• Utworzenie wiązania peptydowego w rybosomie .....	56
• Przesunięcie tRNA i mRNA wzdłuż rybosomu (translokacja) .....	61
3.2.3 <i>Terminacja procesu biosyntezy białka.</i> .....	66
3.3 ZMIANY KONFORMACYJNE RYBOSOMU PODCZAS BIOSYNTETY BIAŁKA. ....	69
3.3 ANTYSENSOWE OLIGONUKLEOTYDY.....	73
3.3.1 <i>Podstawy strategii antysensu.</i> .....	73
3.3.2 <i>Czynniki warunkujące optymalne działanie antysensowych oligonukleotydów.</i> .....	75
3.3.3 <i>Zastosowanie antysensowych oligonukleotydów.</i> .....	76
3.4 MINI-TRNA.....	80
3.4.1 <i>Budowa i funkcja cząsteczki tRNA.</i> .....	80
3.4.2 <i>Elementy tożsamości cząsteczki tRNA a konstruowanie mini-tRNA.</i> .....	82
• Determinanty cząsteczki tRNA .....	82
• Antydeterminanty cząsteczki tRNA .....	83
• Specyfika struktury przestrzennej cząsteczki tRNA.....	83
3.4.3 <i>Wybrane przykłady zastosowań mini-tRNA.</i> .....	84
<b>4. MATERIAŁY STOSOWANE W PRACY.....</b>	<b>87</b>
4.1. MATERIAŁ ROŚLINNY.....	87
4.2 ODCZYNNIKI STOSOWANE W PRACY.....	87
4.3 BUFORY STOSOWANE W PRACY.....	88

1 WSTĘP ..... 1

2 CEL PRACY ..... 2

3 WPROWADZENIE ..... 3

3.1 STRUKTURA RYBOSOMU BUKARIOTYCZNEGO ..... 7

3.1.1 Struktura wieli podjednostki rybosomalnej 40S ..... 9

- Domena 2' 18S rRNA ..... 12
- Domena cunatna 18S rRNA ..... 14
- Domena 3' region 18S rRNA ..... 17
- Domena 3' minor 18S rRNA ..... 19
- Rozmieszczenie białek rybosomalnych w podjednostce 40S ..... 20

3.1.2 Struktura dużej podjednostki rybosomalnej 60S ..... 24

- Domena I rRNA ..... 29
- Domena II rRNA ..... 32
- Domena III rRNA ..... 34
- Domena IV rRNA ..... 36
- Domena V rRNA ..... 38
- Domena VI rRNA ..... 40
- 23S rRNA ..... 41
- Rozmieszczenie białek rybosomalnych w podjednostce 60S ..... 43

3.1.3 Wpływ jonów metali na stabilność rybosomu ..... 46

3.1.4 Interakcje pomiędzy podjednostkami rybosomalnymi ..... 47

3.2 FUNKCJA RYBOSOMU – BIEŻĄCY BIAŁKA ..... 52

3.2.1 Białka proces białkowy ..... 52

3.2.2 Białka proces białkowy ..... 53

- Rozpoznanie mRNA – AA-rRNA poprzez odciążywanie kodon – antyodon ..... 54
- Utworzenie wiązania peptydowego w rybosomie ..... 56
- Przeniesienie tRNA i mRNA względem rybosomu (translokacja) ..... 61

3.2.3 Terminacja procesu białkowy ..... 66

3.3 ZMIANY KONFORMACYJNE RYBOSOMU PODCZAS BIEŻĄCY BIAŁKA ..... 69

3.3.1 AKTYWNE WŁAŚCIWOŚCI ..... 73

3.3.1.1 Podstawy struktury wiązania ..... 73

3.3.1.2 Czynniki warunkujące efektywne działanie enzymów zwiastujących oligonukleotydów ..... 75

3.3.2 Zastosowanie enzymów zwiastujących oligonukleotydów ..... 76

3.4 MINI-RNA ..... 80

3.4.1 Budowa i funkcja cząstki miRNA ..... 80

3.4.2 Elementy tożsamości cząstki miRNA a konstruowanie mini-RNA ..... 82

- Determinanty cząstki miRNA ..... 82
- Antydeteminanty cząstki miRNA ..... 83
- Specyfika struktury przetwarzanej cząstki miRNA ..... 83

3.4.3 Wyższe przyczyny konstrukcji mini-RNA ..... 84

4 MATERIAŁY STOSOWANE W PRACY ..... 87

4.1 MATERIAŁ KOLEJNY ..... 87

4.2 ODCZYNNIKI STOSOWANE W PRACY ..... 87

4.3 BUFIORY STOSOWANE W PRACY ..... 88

<b>5. METODY STOSOWANE W PRACY.....</b>	<b>93</b>
5.1 IZOLACJA tRNA.....	93
5.2 OCZYSZCZANIE tRNA NA DEAE-CELULOZIE.....	93
5.3. OCZYSZCZANIE tRNA NA BD-CELULOZIE.....	94
5.4 IZOLACJA RYBOSOMÓW 80S Z <i>LUPINUS LUTEUS</i> .....	95
5.5 IZOLACJA FRAKCJI ENZYMATYCZNEJ S100.....	96
5.6 REAKCJA AMINOACYLACJI tRNA.....	96
5.7 PREPARATYWNA REAKCJA AMINOACYLACJI.....	97
5.8 NIEENZYMATYCZNE PRZEKSZTAŁCENIE RYBOSOMÓW W STAN PRETRANSLOKACYJNY.....	97
5.8.1 Obsadzenie rybosomalnego miejsca P przez D-tRNA.....	97
5.8.2 Obsadzenie rybosomalnego miejsca P przez mini-tRNA.....	97
5.8.3 Obsadzenie rybosomalnych miejsc: A przez Phe-tRNA <sup>Phe</sup> i P przez D-tRNA.....	98
5.8.4 Obsadzenie rybosomalnych miejsc: A przez Phe-tRNA <sup>Phe</sup> i P przez mini-tRNA.....	98
5.9 NIEENZYMATYCZNE PRZEKSZTAŁCENIE RYBOSOMÓW W STAN POSTTRANSLOKACYJNY.....	98
5.9.1 Obsadzenie rybosomalnego miejsca P przez Phe-tRNA <sup>Phe</sup> .....	98
5.9.2 Obsadzenie rybosomalnych miejsc: P przez Phe-tRNA <sup>Phe</sup> oraz E przez D-tRNA.....	98
5.9.3 Obsadzenie rybosomalnych miejsc: P przez Phe-tRNA <sup>Phe</sup> oraz E przez mini-tRNA.....	99
5.10 REAKCJA ENZYMATYCZNEGO WIĄZANIA PHE-tRNA <sup>PHE</sup> DO POLI(U) RYBOSOMÓW (RW).....	99
5.11 ZNAKOWANIE OLIGODEOKSYNUKLEOTYDÓW ORAZ MINI-tRNA [ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]-ATP NA KOŃCU 5'.....	99
5.12 REAKCJA HYBRYDYZACJI OLIGONUKLEOTYDÓW DO RYBOSOMÓW 80S.....	100
5.13 REAKCJA HYBRYDYZACJI MIESZANIN OLIGONUKLEOTYDÓW DO RYBOSOMÓW 80S.....	100
5.14 ANALIZA KWASÓW NUKLEINOWYCH W ŻELACH POLIAKRYLAMIDOWYCH.....	101
<b>6. WYNIKI I DYSKUSJA.....</b>	<b>102</b>
6.1 IZOLACJA I OCZYSZCZANIE tRNA <sup>PHE</sup> .....	102
6.2 IZOLACJA RYBOSOMÓW 80S Z <i>L. LUTEUS</i> .....	103
6.3 IZOLACJA FRAKCJI ENZYMATYCZNEJ S-100.....	103
6.4 PREPARATYWNA REAKCJA AMINOACYLACJI tRNA <sup>PHE</sup> .....	104
6.5 ZASTOSOWANIE OLIGONUKLEOTYDÓW ANTYSENSOWYCH I MINI-tRNA DO BADAŃ ZMIAN KONFORMACYJNYCH RYBOSOMU 80S.....	104
6.5.1 Zastosowanie oligonukleotydów antysensowych komplementarnych do wybranych fragmentów 18S rRNA.....	106
• Konserwatywność 18S rRNA.....	106
• Miejsca funkcjonalnie ważne w biosyntezie białka w 18S rRNA.....	110
• Charakterystyka antysensowych oligonukleotydów.....	117
• Specyficzność oddziaływań antysensowych oligonukleotydów z rybosomem 118	
• Znakowanie oligonukleotydów.....	121
• Krzywe wysycenia rybosomów 80S przez antysensowe oligonukleotydy.....	122
• Rezultaty inhibicji biosyntezy białka przez antysensowe oligonukleotydy komplementarne do wybranych fragmentów 18S rRNA.....	126
6.5.2 Zastosowanie cząsteczek mini-tRNA oraz oligonukleotydów antysensowych komplementarnych do wybranych fragmentów 26S rRNA.....	145
• Konserwatywność 26S rRNA.....	145
• Miejsca funkcjonalnie ważne w biosyntezie białka w 26S rRNA.....	150
• Charakterystyka antysensowych oligonukleotydów.....	159
• Specyficzność oddziaływań antysensowych oligonukleotydów z rybosomem 160	
• Znakowanie oligonukleotydów.....	163

93	2. METODY STOSOWANE W PRACY
93	2.1 IZOLACJA rRNA
93	2.2 OCZYSZCZANIE rRNA NA DEAE-CELULOZE
94	2.3 OCZYSZCZANIE rRNA NA HD-Celuloze
95	2.4 IZOLACJA rYBOSOMÓW 80S Z LUBRYK LUBRYL
95	2.5 IZOLACJA FRAKCJI ENZYMATYCZNEJ S100
95	2.6 REAKCJA AMBOWALIZACJI rRNA
97	2.7 PRZEPARATYWNA REAKCJA AMBOWALIZACJI
97	2.8 NIENIETYMATYCZNE PRZEKształACIENIE rYBOSOMÓW W STAN PRZETANSKACYJNY
97	2.8.1 Odsadzenie rybosomalnego międka P przez D-rRNA
97	2.8.2 Odsadzenie rybosomalnego międka E przez mini-rRNA
98	2.8.3 Odsadzenie rybosomalnych międek A przez Phe-rRNA <sup>fm</sup> i P przez D-rRNA
98	2.8.4 Odsadzenie rybosomalnych międek A przez Phe-rRNA <sup>fm</sup> i P przez mini-rRNA
98	2.9 NIENIETYMATYCZNE PRZEKształACIENIE rYBOSOMÓW W STAN POSTTRANSKACYJNY
98	2.9.1 Odsadzenie rybosomalnego międka P przez Phe-rRNA <sup>fm</sup>
98	2.9.2 Odsadzenie rybosomalnych międek P przez Phe-rRNA <sup>fm</sup> oraz E przez D-rRNA
99	2.9.3 Odsadzenie rybosomalnych międek P przez Phe-rRNA <sup>fm</sup> oraz E przez mini-rRNA
99	2.10 REAKCJA ENZYMATYCZNEGO WZAJANIA PHE-rRNA <sup>fm</sup> DO POLU(r) rYBOSOMÓW (RW)
99	2.11 ZŁĄCZANIE OLIGONUKLEOTYDÓW ORAZ MINI-rRNA [T <sup>25</sup> -P]-ATP NA KOŃCU
99	2.12 REAKCJA HYBRYDYZACJI OLIGONUKLEOTYDÓW DO rYBOSOMÓW 80S
100	2.13 REAKCJA HYBRYDYZACJI MIĘSIANIN OLIGONUKLEOTYDÓW DO rYBOSOMÓW 80S
101	2.14 ANALIZA KWASÓW NUKLEIOWYCH W ZŁĄCZACH POLIARYLAMIDOWYCH
102	4. WYNIKI I DYSKUSJA
102	4.1 IZOLACJA OCZYSZCZANEJ rRNA <sup>fm</sup>
103	4.2 IZOLACJA rYBOSOMÓW 80S Z LUBRYL
103	4.3 IZOLACJA FRAKCJI ENZYMATYCZNEJ S100
104	4.4 PRZEPARATYWNA REAKCJA AMBOWALIZACJI rRNA <sup>fm</sup>
104	4.5 ZASTOSOWANIE OLIGONUKLEOTYDÓW KATYZENKOWYCH I MINI-rRNA DO RADAR ZMIAN
104	KONFORMACYJNYCH rYBOSOMÓW 80S
105	4.5.1 Zastosowanie oligonukleotydów antysensownych kompleksujących do wybranych
105	fragmentów 18S rRNA
105	• Kwasetylowanie 18S rRNA
110	• Międka funkcjonalnie ważne w biosyntezie białka w 18S rRNA
117	• Charakterystyka antysensownych oligonukleotydów
118	• Specyficzność oddziaływań antysensownych oligonukleotydów z rybosomem 18S
121	• Zakończanie oligonukleotydów
122	• Kłówe wyłączenie rybosomów 80S przez antysensowne oligonukleotydy
122	• Reaktywność innych biofizycznych białek przez antysensowne oligonukleotydy
125	komplementarne do wybranych fragmentów 18S rRNA
142	4.5.2 Zastosowanie cząsteczek mini-rRNA oraz oligonukleotydów antysensownych
142	komplementarnych do wybranych fragmentów 28S rRNA
142	• Kwasetylowanie 28S rRNA
150	• Międka funkcjonalnie ważne w biosyntezie białka w 28S rRNA
150	• Charakterystyka antysensownych oligonukleotydów
150	• Specyficzność oddziaływań antysensownych oligonukleotydów z rybosomem 18S
153	• Zakończanie oligonukleotydów

---

• Krzywe wysycenia rybosomów 80S przez antysensowe oligonukleotydy .....	163
• Charakterystyka cząsteczek mini-tRNA.....	168
• Wiązanie mini-tRNA do rybosomu .....	169
• Rezultaty inhibicji biosyntezy białka przez antysensowe oligonukleotydy komplementarne do wybranych fragmentów 26S rRNA .....	170
<b>7. WNIOSKI.....</b>	<b>202</b>
• Zmiany konformacyjne rybosomu podczas biosyntezy białka.....	202
• Funkcja wybranych fragmentów rRNA w procesie biosyntezy białka. ....	206
<b>8. STRESZCZENIE.....</b>	<b>208</b>
<b>9. WYKAZ SKRÓTÓW.....</b>	<b>210</b>
<b>10. PIŚMIENNICTWO .....</b>	<b>212</b>
<b>11. WYKAZ RYSUNKÓW I TABEL.....</b>	<b>226</b>
<b>12. DOROBEK NAUKOWY .....</b>	<b>231</b>

163	• Kazywe wyycenia typosomów 80S przez antycyprowe oligonukleotydy
168	• Charakterystyka cząsteczek mini-IRNA
169	• Wiazanie mini-IRNA do typosomu
170	• Rezultaty inhibicji biosyntezy bialka przez antycyprowe oligonukleotydy
170	• Komplementacja do wybranych fragmantów 26S rRNA
202	7. WNIOSKI
202	• Zmiany konformacyjne typosomu podczas biosyntezy bialka
206	• Funkcja wybranych fragmantów rRNA w procesie biosyntezy bialka
208	8. STRESZCZENIE
210	9. WYKAZ SKRÓTÓW
212	10. PIŚMIENNICTWO
228	11. WYKAZ RYSUNKÓW I TABELI
231	12. DOBÓREK NAUKOWY

## 1. WSTĘP

Proces biosyntezy białka jest bardzo skomplikowany i do dziś nie jest w pełni poznany. Najlepiej poznano mechanizm translacji zachodzącej w organizmach prokariotycznych. Ze względu na mniejsze rozmiary oraz mniej skomplikowaną budowę rybosomów prokariotycznych (70S) badania na tym układzie są zdecydowanie łatwiejsze. Poznano już z rozdzielczością atomową budowę poszczególnych podjednostek rybosomalnych [1, 2] jak również strukturę całego rybosomu prokariotycznego [3-6]. Rybosomy eukariotyczne są bardziej złożone i stwarzają więcej trudności w trakcie badań. Dlatego dotychczas udało się określić strukturę krioelektronową rybosomów 80S kilku organizmów [7-11]. Uzyskane w ten sposób dane pozwalają na rozszyfrowanie jedynie morfologii rybosomu 80S.

O ile struktura rybosomu jest dość dobrze poznana, to zbadanie oddziaływań rybosomu z czynnikami biorącymi udział w biosyntezie białka (np. z tRNA) oraz określenie dynamicznych zmian tych oddziaływań podczas poszczególnych etapów translacji, nadal pozostaje wielkim wyzwaniem. Zmiany strukturalne rybosomu mają zasadnicze znaczenie funkcjonalne i regulatorowe podczas biosyntezy białka. Są one istotne dla całego kompleksu zagadnień ekspresji genu. Jedynie dzięki dalszym badaniom nad strukturą i funkcjonowaniem rybosomów możemy zbliżyć się do poznania specyfiki mechanizmu działania rybosomów eukariotycznych.



## I WSTĘP

Praca niniejsza dotyczy badania wpływu zmian w strukturze białka na jego funkcje biologiczne. Wskazano, że zmiany w strukturze białka mogą prowadzić do zaburzeń w jego funkcjonowaniu, co może mieć istotne konsekwencje dla zdrowia człowieka. Wskazano również, że zmiany w strukturze białka mogą być spowodowane przez czynniki zewnętrzne, takie jak promieniowanie jonizujące, czy też czynniki wewnętrzne, takie jak mutacje genetyczne. Wskazano również, że zmiany w strukturze białka mogą być spowodowane przez czynniki zewnętrzne, takie jak promieniowanie jonizujące, czy też czynniki wewnętrzne, takie jak mutacje genetyczne. Wskazano również, że zmiany w strukturze białka mogą być spowodowane przez czynniki zewnętrzne, takie jak promieniowanie jonizujące, czy też czynniki wewnętrzne, takie jak mutacje genetyczne.

## 2. CEL PRACY

Celem wykonanej przeze mnie pracy było określenie funkcji wybranych fragmentów 18S i 26S rRNA w układzie roślinnym, w trakcie etapu wydłużania łańcucha polipeptydowego, ze szczególnym uwzględnieniem korelacji struktury i funkcji tych fragmentów. Jako narzędzie badawcze zastosowałam strategię antysensowych oligodeoksynukleotydów oraz cząsteczki mini-tRNA.

Pierwszym etapem realizacji zamierzonego zadania było zdefiniowanie funkcjonalnie ważnych w roślinnym procesie translacji sekwencji 26S rRNA i 18S rRNA, a zarazem konserwatywnych sekwencyjnie, ze szczególnym uwzględnieniem miejsc oddziałujących z cząsteczką tRNA.

Badania te stały się podstawą do opracowania sekwencji antysensowych oligodeoksynukleotydów (a-DNA), komplementarnych do miejsc ważnych funkcjonalnie w 26S rRNA i 18SrRNA, a zarazem konserwatywnych sekwencyjnie. A-DNA zastosowałam do badań funkcji poszczególnych fragmentów rRNA podczas biosyntezy białka.

Szczególnie interesujące były dla mnie oddziaływania rybosomu z cząsteczką tRNA, które zbadałam z zastosowaniem do tej pory niewykorzystywanych w takich celach cząsteczek mini-tRNA.

1. CIEL PRACY

Coś mi wykonać przez miłe prace było otrzymanie funkcji wyrażonej fragmentem 182 i 202 rRNA w obszarze roślinnym, w naszym celu wydatnie jądnach poliprymarnego, ze szczególnym uwzględnieniem funkcji wewnątrz i funkcji tych fragmentów. Jaka nasza była badawcza zastosowanie naszej najnowszych oligonukleotydów oraz cząstki mini-RNA.

Pierwszym celem naszej zamierzonego zadania było zdefiniowanie funkcjonalnie wrażliwych w roślinnym procesie transkrypcji sekwencji 202 rRNA i 182 rRNA, a następnie konsekwentnych skweśnianie, ze szczególnym uwzględnieniem miejsc oddziaływania z cząstką RNA.

Bardzo to jest się podany do opracowania sekwencji i wrażliwych oligonukleotydów (A-DNA) komplementarnych do miejsc wrażliwych funkcjonalnie w 202 rRNA i 182 rRNA, a także konsekwentnych skweśnianie A-DNA zastosowanie do badań funkcji porównawczych fragmentów rRNA podczas biochemicznych badań.

Specjalnie interesujące były dla mnie oddziaływania tyrozynu z cząstką rRNA, które zbadaliśmy z zastosowaniem do tej pracy niewykorzystywanych w takich celach cząstek mini-RNA.

### 3. WPROWADZENIE

Rybosom jest makrokompleksem komórkowym, składającym się z dwóch różnej wielkości podjednostek. Pomimo wielu podobieństw w mechanizmie biosyntezy białka, istnieją zasadnicze różnice w budowie rybosomów organizmów różnych królestw. Rybosomy bakteryjne charakteryzują się stałą sedymentacji 70S i zbudowane są z dużej podjednostki 50S i małej 30S. Rybosomy eukariotyczne są większe: np. u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* rybosomy sedymentują przy wartości 80S i składają się na nie: duża podjednostka 60S i mała 40S [9]. Każda z podjednostek jest zbudowana z rybosomalnych białek oraz rybosomalnych kwasów nukleinowych (rRNA). Stwierdzono, że u eubakterii *Escherichia coli* 2/3 masy rybosomu stanowią rybosomalne RNA, a 1/3 – rybosomalne białka [12]. Podjednostka 50S tego organizmu zawiera 5S (120 nt) i 23S rRNA (około 2900 nt), natomiast podjednostka 30S zbudowana jest z 16S rRNA (około 1500 nt). Na frakcję białek rybosomalnych składa się 21 różnych białek małej podjednostki i 33 białka dużej. W przypadku rybosomów eukariotycznych, zidentyfikowano około 20-30 dodatkowych białek, a rRNA są dłuższe dzięki insercjom dodatkowych sekwencji w specyficznych regionach. Są to sekwencje wstawione (ang. *expansion segments*, ES). W rybosomach 80S obserwujemy również dodatkową cząsteczkę rRNA – 5,8S rRNA. Wszystkie te trzy fakty sprawiają, że rybosomy eukariotyczne są o ok. 30% większe od prokariotycznych [13].

Zasadniczą funkcją rybosomu jest biosynteza białka. Proces ten jest bardzo skomplikowany i do dziś nie jest w pełni poznany. Widać jednak postępy w badaniach nad rybosomem 80S, mimo iż jest to cząsteczka bardziej złożona od rybosomów prokariotycznych i stwarza więcej trudności w trakcie badań. Poznano struktury rybosomów drożdżowych (*S. cerevisiae*) [9], szczurzych (*Rattus norvegicus*) [7], króliczych (*Oryctolagus cuniculus*) [14], nicienia (*Trypanosoma cruzi*) [11], grzyba (*Thermomyces lanuginosus*) [10], glonu (*Chlamydomonas reinhardtii*) [8] oraz rybosomów izolowanych z linii komórkowych HeLa [15]. Struktury te rozwiązano metodą mikroskopii krioelektronowej, przy rozdzielczości odpowiednio: 35 Å [16], 25 Å [7, 8], 24 Å [17], 21 Å [14], 15 Å [9], 17.3 Å [15] oraz 12 Å [11]. Dane pochodzące z map krioelektronowych pozwalają na rozszyfrowanie jedynie morfologii rybosomu 80S. Nadal nierozwiązana pozostaje jednak struktura krystaliczna rybosomu eukariotycznego, która pozwoliłaby na poznanie jego skomplikowanej budowy z rozdzielczością atomową. Trwają badania zmierzające do rozwiązania struktury krystalicznej rybosomów *Homo sapiens*. Do tej pory uzyskano kryształy rybosomalnego miejsca A skompleksowanego z aminoglikozydami [18]. Podczas porównania struktury krystalicznej 70S

## 2. WYPOWADZENIE

Rybosom jest mikroorganizmem komórkowym składającym się z dwóch rólak (wielkość podjednostek). Ponadto wiele podobieństw w mechanizmie biosyntezy białka istnieją zasadniczo różnice w budowie rybosomów organizmów różnych królestw. Rybosomy bakterijne charakteryzują się stałą kompozycją: 70S i składowane są z dużej podjednostki 50S i małej 30S. Rybosomy eukariotyczne są większe: np. u drożdży zachowującej eukaryotyzm (rybosomy sedimentującej przy wartości 80S i składują się na nie: duża podjednostka 60S i mała 40S [9]). Każda z podjednostek jest zbudowana z rybosomalnych białek oraz rybosomalnych kwasów nukleinowych (rRNA). Świadczy o tym, że u eukariotów zachowującej eukaryotyzm rybosomu stanowi rybosomalne RNA z 18S – rybosomalne białko [12]. Podjednostka 50S tego organizmu zawiera 23 (15S rRNA) oraz 23S rRNA (około 2300 nt), natomiast podjednostka 30S zbudowana jest z 16S rRNA (około 1300 nt). Na każdej białek rybosomalnych składa się 21 różnych białek: małej podjednostki i 23 białek dużych. W przypadku rybosomów eukariotycznych, zbudowanych z około 30-50 białek białek, z rRNA są białka dużych i małych podjednostek (w tym białek) w specyficznych regionach. Są to białka związane (ang. expansion factors, EF). W rybosomach 80S obserwowany również dodatkowy cząsteczek rRNA – 23S rRNA. Ważnym jest tutaj sprawić, że rybosomy eukariotyczne są o ok. 30% większe od prokariotycznych [13].

Zasadniczą różnicą rybosomu jest biosynteza białka. Proces ten jest bardzo skomplikowany i do dziś nie jest w pełni poznany. Widąc jednak potrzeby w badaniach nad rybosomem 80S, mimo iż jest to cząsteczka białek złożona od rybosomów prokariotycznych i tworzą więcej badań w takim zakresie. Poznana struktura rybosomów drożdżowych [2, recenzja] [4], eukariotycznych (Homo sapiens) [5], prokariotycznych (Escherichia coli) [6], nicienia (Typhonozoa traci) [11], grzyba (Thermomyces lanuginosa) [10], glonu (Chlamydomonas reinhardtii) [8] oraz rybosomów izolowanych z linii komórkowych HeLa [13]. Struktury te rozwiązano metodą krystalografii kroczkowej, przy rozdzielczości odpowiednio: 3,5 Å [10], 2,5 Å [17, 8], 3,1 Å [17], 2,1 Å [14], 1,3 Å [12] oraz 1,2 Å [11]. Dane pochodzące z map kroczkowej pozwalają na zasyntezowanie jedynic molekularnej podjednostki 50S. Należy natomiast pamiętać, że chociaż struktura krystaliczna rybosomu eukariotycznego była porównywalna do porównania jego skomplikowanej budowy z rozdzielczością atomową. Tworząc białka zmieniając do rozwiązania struktur krystalicznych rybosomów Homo sapiens. Do tej pory uzyskano krystalizację rybosomalnego nielicz A skomplikowanego z aminoglicybinami [18]. Ważnym jest również, że rybosomy eukariotyczne

z mapami krioelektronowymi 80S obserwuje się wysoką zgodność regionów odpowiadających wspólnemu rdzeniowi rybosomów. W związku z powyższym, w mojej rozprawie, podczas omawiania struktury bądź mechanizmu działania rybosomu eukariotycznego, będę również opierała się na danych dotyczących rybosomu prokariotycznego, które są bardziej szczegółowe i pozwalają na lepsze zrozumienie maszynery biosyntezy białka.

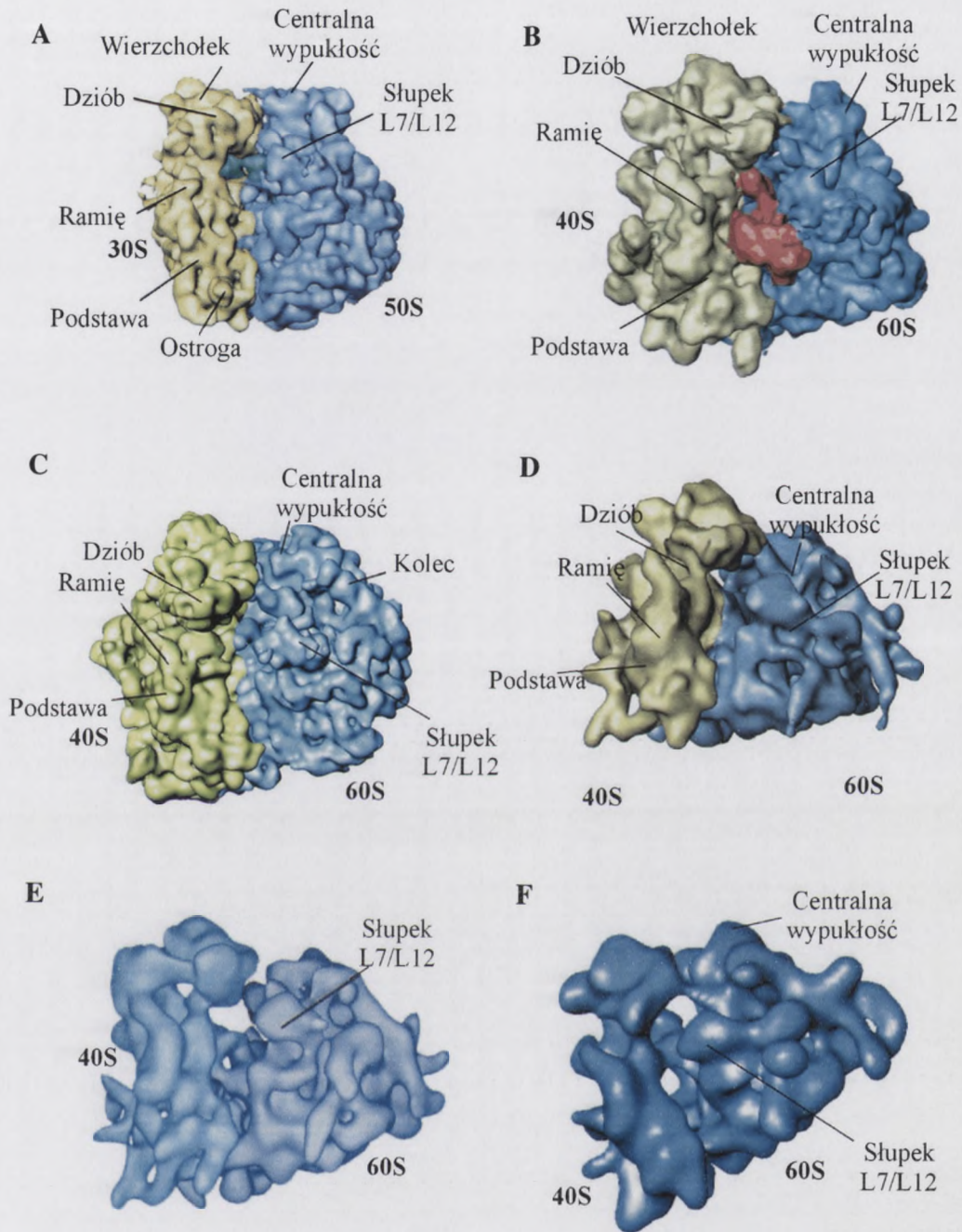
### 3.1 Struktura rybosomu eukariotycznego.

Rybosom eukariotyczny 80S składa się z dwóch podjednostek: małej 40S i dużej 60S. Przy porównaniu struktur rybosomu 80S z różnych gatunków (Rysunek 1) widoczne jest, że rybosom *S. cerevisiae* jest mniejszy i bardziej zaokrąglony niż rybosomy izolowane z *O. cuniculus*, *R. norvegicus* lub komórek ludzkich. Jest to związane z występowaniem dodatkowych gęstości w mapach krio-EM rybosomów ssaczy, które nadają im bardziej trójkątny kształt.

z mapami krajoznawczymi 808 obrazuje się wysoka zgodność regionów odpowiedzialnych w podziale terytorialnym. W związku z powyższym, w mojej opinii, podczas omawiania struktury państwa mechanicznie dzieląc terytorium kulturowe, będą również opierała się na danych dotyczących terytorium politycznego, które są bardziej szczegółowe i pozwalają na lepsze zrozumienie mechanizmów politycznych.

### 3.1 Struktura terytorium kulturowego

Ryżownik terytorialny 808 składa się z dwóch podregionów: mały 402 i duży 802. Przy porównaniu struktury terytorium 808 z terytorium gmin (Ryżownik I) widoczne jest, że terytorium 802 zawiera jest terytorium 7 gmin, co sugeruje, że terytorium 802 jest terytorium izolowane z terytorium 7 gmin. W tym celu, K. Nowakowski (1998) sugeruje, że terytorium 802 jest terytorium izolowane z terytorium 7 gmin. W tym celu, K. Nowakowski (1998) sugeruje, że terytorium 802 jest terytorium izolowane z terytorium 7 gmin. W tym celu, K. Nowakowski (1998) sugeruje, że terytorium 802 jest terytorium izolowane z terytorium 7 gmin.



**Rysunek 1. Struktura rybosomu prokariotycznego 70S i eukariotycznych 80S.**

A - struktura rybosomu 70S *E. coli* [19], kolorami oznaczono: żółtym podjednostkę 30S, niebieskim - podjednostkę 50S, zielonym - tRNA w miejscu P;

B - struktura rybosomu 80S *S. cerevisiae* [9], kolorami oznaczono: żółtym - podjednostkę 40S, niebieskim - podjednostkę 60S, czerwonym - tRNA w miejscu P;

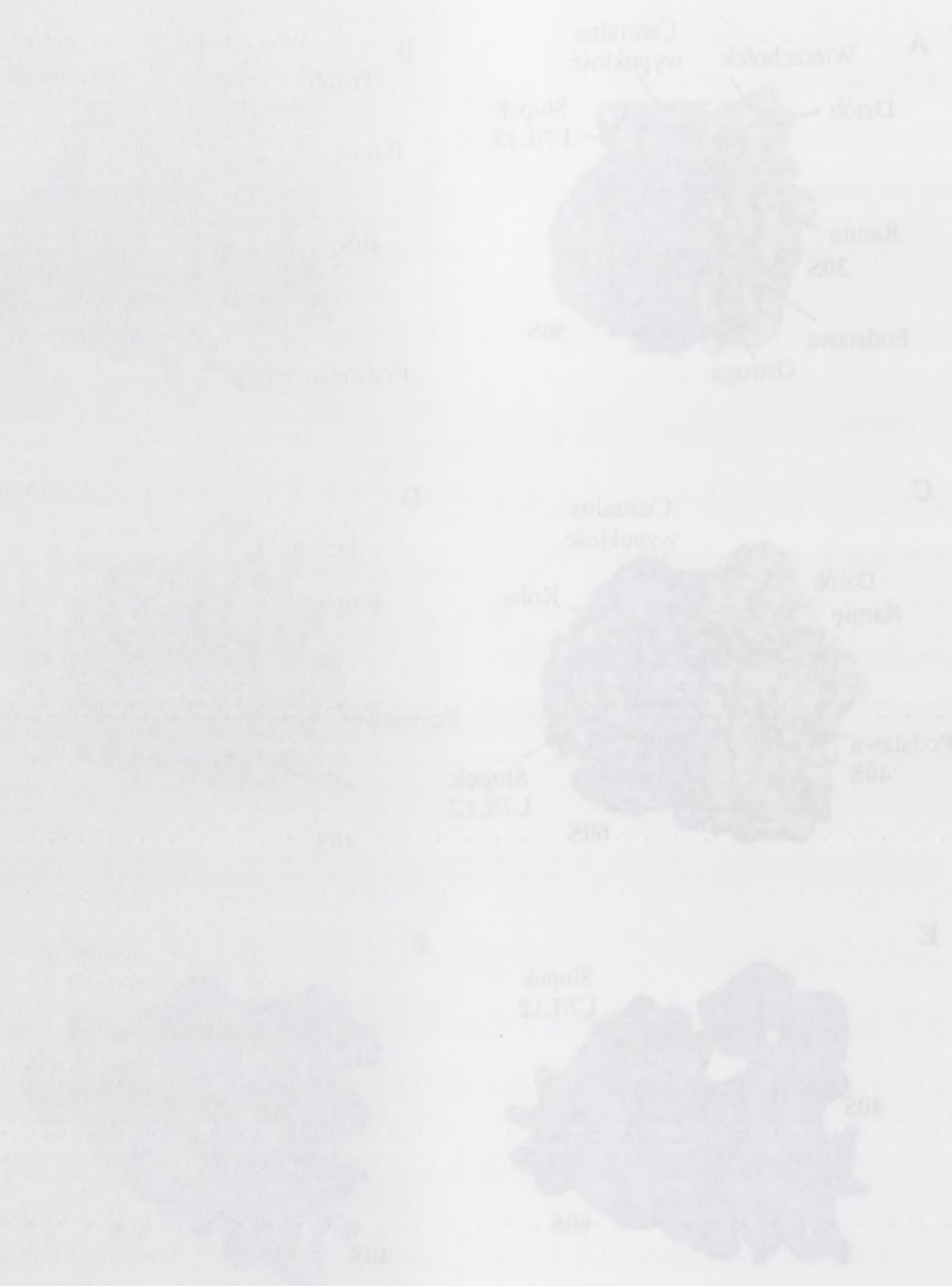
C - struktura rybosomu 80S *T. cruzi* [11], kolorami oznaczono: żółtym podjednostkę 40S, niebieskim - podjednostkę 60S;

D - struktura rybosomu 80S *H. sapiens* [15], kolorami oznaczono: żółtym podjednostkę 40S, niebieskim - podjednostkę 60S;

E - struktura rybosomu 80S *O. cuniculus* [17], kolorami oznaczono: niebieskim - podjednostkę 40S, granatowym - podjednostkę 60S;

F - struktura rybosomu 80S *R. norvegicus* [7], po lewej stronie umieszczono podjednostkę 40S, po prawej - podjednostkę 60S.





Rysunek 1. Struktura i budowa komórki zwierzęcej. A - struktura komórki zwierzęcej (1) - komórka zwierzęca; B - struktura komórki zwierzęcej (2) - komórka zwierzęca; C - struktura komórki zwierzęcej (3) - komórka zwierzęca; D - struktura komórki zwierzęcej (4) - komórka zwierzęca; E - struktura komórki zwierzęcej (5) - komórka zwierzęca; F - struktura komórki zwierzęcej (6) - komórka zwierzęca.

### 3.1.1 Struktura małej podjednostki rybosomalnej 40S.

Podjednostka 40S *S. cerevisiae* zbudowana jest z 18S rRNA długości 1798 nt i 32 białek. 18S rRNA jest u tego organizmu o 256 nt dłuższy niż 16S rRNA *E. coli*, a cały rybosom zawiera o 11 białek więcej [9]. Podjednostka 40S *T. cruzi* jest o 1/3 objętości większa od 40S *S. cerevisiae* [11], a 18S rRNA ma długość 2315 nt. Natomiast 18S rRNA z 40S *Homo sapiens* jest dłuższy jedynie o 71 nt od 18S rRNA *S. cerevisiae* i liczy 1869 nt [15].

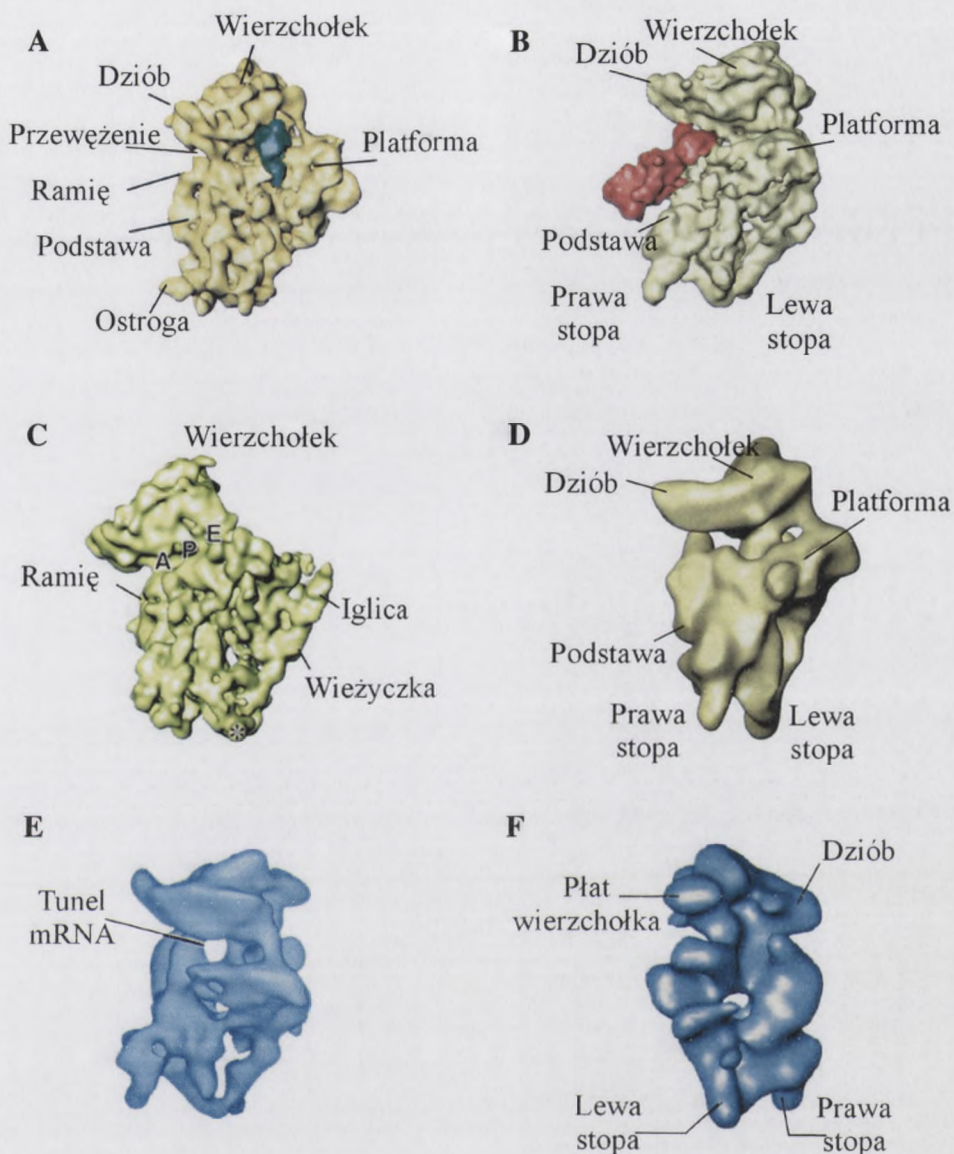
W morfologii podjednostki 40S (Rysunek 2B-F) wyróżniono wierzchołek (ang. *head*), który połączony jest z podstawą (ang. *body*) przez przewężenie (ang. *neck*) w pobliżu platformy (ang. *platform*). Po prawej stronie podstawy znajduje się niewielkie ramię (ang. *shoulder*), pozostające w bliskim kontakcie z wierzchołkiem podjednostki, tworząc szczelinę między tymi elementami; oddziaływanie to jest niezbędne dla stabilności rybosomu. Nad ramieniem obserwowany jest dziób (ang. *beak*). U dołu podstawy znajduje się stopa (ang. *foot*), która w przeciwieństwie do prokariotycznej podjednostki 30S, jest wyraźnie rozdzielona na dwie części: prawą i lewą stopę (ang. *right foot*, *left foot*) [9]. Z tego względu w podjednostce 40S nie obserwowano wystającej helisy RNA nazwanej ostrogą (ang. *spur*), występującej w lewej dolnej części podstawy podjednostki 30S (Rysunek 2A) [2, 20].

Podobnie jak w przypadku 30S, powierzchnia 40S od strony oddziaływania podjednostek jest miejscem funkcjonalnie najważniejszym i odpowiada za tworzenie mostków łączących podjednostki rybosomalne oraz oddziaływanie z mRNA i tRNA.

W strukturze 40S *O. cuniculus* i *R. norvegicus*, opracowanych przy rozdzielczości 24 Å [17], zaobserwowano, że przewężenie pomiędzy ramieniem a tylną częścią podjednostki prowadzi do tunelu tworzącego się u podstawy wierzchołka (Rysunek 2E). Tunel ten prowadzi do centrum dekodującego. Jego lokalizacja poprzez analogię do podjednostek bakteryjnych sugeruje, że może on funkcjonować jako tunel wejścia mRNA.

W strukturze 40S zaobserwowano dodatkowe masy (w porównaniu z 30S, Rysunek 2) w czterech głównych obszarach: (1) u dołu 40S, odpowiedzialne za wydłużenie podjednostki, (2) poniżej platformy, tworzące prawą i lewą stopę, (3) w obrębie dzioba, (4) po zewnętrznej stronie wierzchołka, tworzące płat wierzchołka (ang. *head lobe*). Wszystkie te dodatkowe sekwencje znajdują się na zewnętrznej powierzchni podjednostki. Natomiast rdzeń podjednostki posiada jednakową strukturę zarówno u organizmów pro- jak i eukariotycznych [7, 9, 11, 14, 15, 17].





**Rysunek 2. Struktura małej podjednostki rybosomalnej prokariotycznej 30S i eukariotycznych 40S.**

A - struktura podjednostki 30S *E. coli* [19], kolorem zielonym oznaczono tRNA w miejscu P;

B - struktura podjednostki 40S *S. cerevisiae* [9], kolorem czerwonym oznaczono tRNA w miejscu P;

C - struktura podjednostki 40S *T. cruzi* [11];

D - struktura podjednostki 40S *H. sapiens* [15];

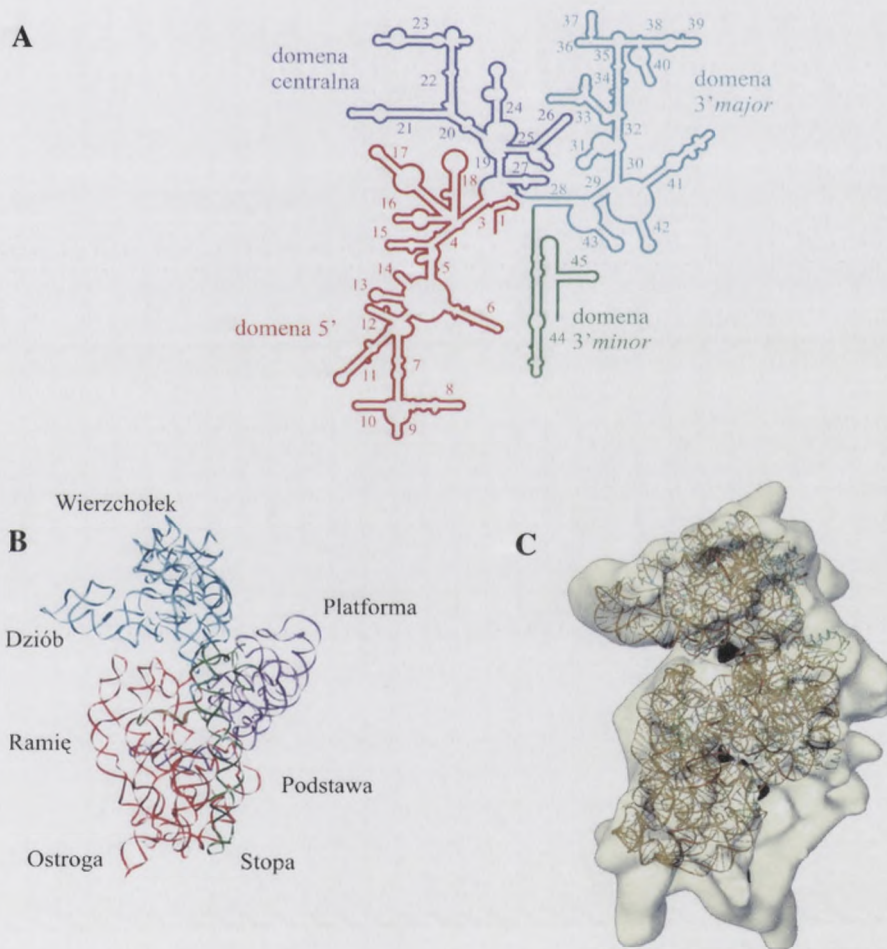
E - struktura podjednostki 40S *O. cuniculus* [17];

F - struktura podjednostki 40S *R. norvegicus* [7].



**Rysunek 2. Struktura małej podjednostki typowej komórki zwierzęcej 30S**  
 1 - komórki zwierzęcej 40S.  
 A - struktura podjednostki 30S E. coli (19S). Jądro, nielipidowy oskórnik iRNA w niekory F.  
 B - struktura podjednostki 40S S. cerevisiae (9S). Jądro, nielipidowy oskórnik iRNA w niekory F.  
 C - struktura podjednostki 40S T. cruzi (11S).  
 D - struktura podjednostki 40S H. sapiens (12S).  
 E - struktura podjednostki 40S O. cunicularis (17S).  
 F - struktura podjednostki 40S A. niger (17S).

W strukturze II-rzędowej 18S rRNA, podobnie jak w 16S rRNA, można wyróżnić cztery domeny: 5', centralną, 3'*major* oraz 3'*minor* [21] i prace tam cytowane]. Podział małego rybosomalnego RNA na domeny wraz z ich lokalizacją w strukturze krystalicznej podjednostki 30S *Thermus thermophilus* [2] przedstawiłam na Rysunku 3 (A, B). Przy porównaniu struktury krystalicznej 16S rRNA i mapy krioelektronowej 40S *H. sapiens* (Rysunek 3C) zauważyć można wysoką zgodność regionów odpowiadających wspólnemu rdzeniowi małej podjednostki [9]. Różnice w uformowaniu strukturalnym 16S i 18S rRNA zostaną omówione dla każdej domeny z osobna.



**Rysunek 3.** Schemat struktury 16S rRNA (A, na podstawie [22]) i lokalizacja w strukturze krystalicznej małej podjednostki rybosomalnej 30S (B, struktura pobrana z [23], numer 1FKA) i 40S (C, na podstawie [15]).

Kolorami (A, B) zaznaczone zostały domeny 16S rRNA: czerwony - 5', fioletowy - centralna, niebieski - 3'*major*, zielony - 3'*minor*.

W strukturze II-...

cały domowy 27, zawiera  
małego tykożomatego 25, 26  
podkości 302 Ykonow  
porównanie struktury 12, 13  
(Krymuk 3C) zawiera 2  
kolejnych malej podkości  
zostają omówione dla każdej



Krymuk 3. Schemat struktury  
kryształowej malej podkości  
1-402 (C, na podstawie [12]).  
Kolumny (A, B) zawierają  
niepełni - 2, wojna, 2, 2

- **Domena 5' 18S rRNA**

Domena 5' (helisy h1 – h18) tworzy podstawę i ramię podjednostki 40S. Dokładne położenie poszczególnych helis poznane zostało z rozdzielczością atomową jedynie u prokariota, dlatego przestawiłam je na przykładzie podjednostki 30S *T. thermophilus* (Rysunek 4; schemat struktury II-rzędowej 16S rRNA pobrany został z [22], numer X07998; koordynaty struktury III-rzędowej pobrane zostały z [23], numer 1FKA).

Domena 5' oddziałuje przede wszystkim z czynnikami elongacyjnymi. Wykazano, że helisa h5 oraz nukleotyd 368 (według numeracji *E. coli*) helisy h15 oddziałują z czynnikiem elongacyjnym EF-Tu (odpowiednik eukariotycznego czynnika EF1) [24]. Natomiast para zasad 57:356 oraz pętla helisy h13 wykazują oddziaływanie z czynnikiem elongacyjnym EF-G (odpowiednik eukariotycznego EF-2) [25, 26]. Wykazano również oddziaływanie z cząsteczką mRNA w obrębie helisy h18 w dwóch miejscach: nukleotyd 532 oddziałuje z mRNA w pozycji +11 [27], a nukleotyd 530 z mRNA w pozycji +12 [28]. Domena 5' oddziałuje również z cząsteczką tRNA w rybosomalnym miejscu A (nukleotyd 530 16S rRNA z nukleotydami 34-36 tRNA) [5]. Stwierdzono, że helisa h6 jest niezwykle ważna podczas asocjacji podjednostek 30S i 50S w celu utworzenia aktywnego rybosomu [29]. Dwa spośród nukleotydów domeny 5' (272 i 343) są zaangażowane w tworzenie mostków między podjednostkami. Problem ten zostanie szerzej omówiony w rozdziale 3.1.3.

W uformowaniu strukturalnym ramienia widoczna jest różnica pomiędzy podjednostkami 30S i 40S. W podjednostce 30S helisa h16 zwinęta jest w kierunku h18 (tworzy się struktura pseudowęzła, por. Rysunek 4), natomiast helisa h17 biegnie równolegle w stosunku do długiej osi podjednostki ku dołowi podstawy [2, 30]. W podjednostce *S. cerevisiae* i ssaków helisa h16 jest obrócona w kierunku boku podjednostki i wystaje ponad powierzchnię rybosomu [9]. Helisa h17 jest krótsza w podjednostce 40S *S. cerevisiae* i zawiera więcej nieregularnych par zasad. Co więcej, poniżej białka S9 następuje ostry zwrot h17, która obraca się w kierunku apikalnej pętli h21. Różnice między podjednostkami 30S i 40S w obrębie ramienia mogą wskazywać na odmienny mechanizm inicjacji translacji u organizmów pro- i eukariotycznych.

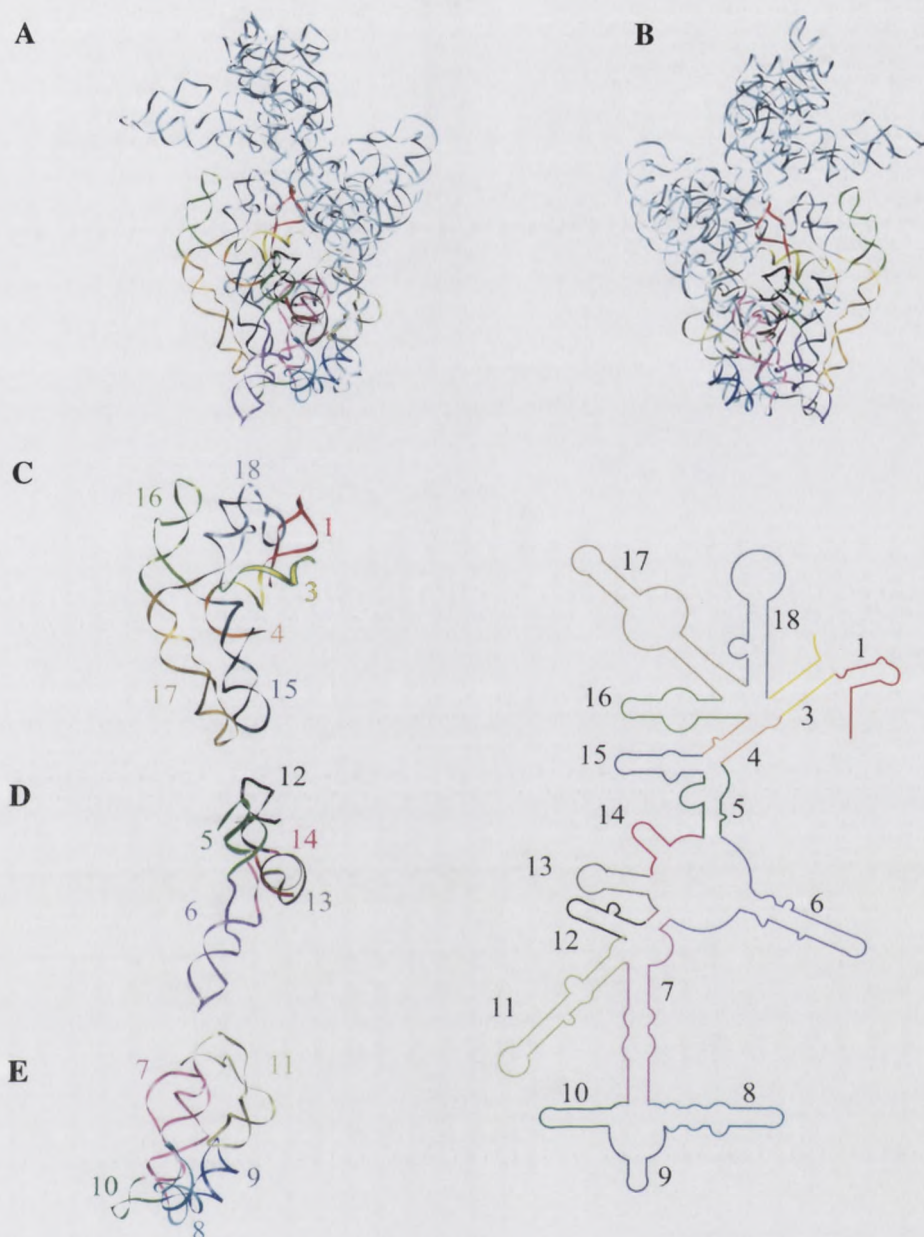


## • Domena 2' 18S rRNA

Domena 2' (helisy H1 – H16) tworzy podstawę i tanię podjednostki 40S. Dośbadane położenie porządkowanych helis zostało ustalone z rozdzielczością atomową jedynie w przypadku helisy H1 (Ryżanek 4; schemat struktury II-trzędowej 16S rRNA pobrany został z [22], numer X07992; koordynaty struktury III-trzędowej pobrane zostały z [23], numer 1FKA).

Domena 2' oddziałuje przede wszystkim z ekspozycją elongacyjną. Wykazano, że helisy H2 oraz nukleotyd 368 (według numeracji E. coli) helisy H12 oddziałują z czynnikiem elongacyjnym EF-Tu (odpowiednik eukariotycznego czynnika EF1) [24]. Namiennik pars zasad 37:356 oraz kilka helis H13 wykazują oddziaływanie z czynnikiem elongacyjnym EF-G (odpowiednik eukariotycznego EF-2) [25, 26]. Wykazano również oddziaływanie z cząsteczką rRNA w obrębie helisy H18 w dwóch miejscach: nukleotyd 232 oddziałuje z rRNA w pozycji +11 [27], a nukleotyd 330 z rRNA w pozycji +12 [28]. Domena 2' oddziałuje również z cząsteczką rRNA w tytonoidalnym miejscu A (nukleotyd 230 16S rRNA z nukleotydami 34–36 rRNA) [2]. Świadczy to helisy H6 jest niezwykle ważna podczas asocjacji podjednostek 30S i 50S w celu utworzenia aktywnego rybosomu [29]. Dwa spośród nukleotydów domeny 2' (232 i 343) są zaangażowane w tworzenie mostków między podjednostkami. Problem ten zostanie szerzej omówiony w rozdziale 3.1.3.

W ułożeniu strukturalnym również widoczna jest różnica pomiędzy podjednostkami 30S i 40S. W podjednostce 30S helisy H6 i H12 zawierają jest w kierunku H18 (tworzy nie strukturalną, por. Ryżanek 4), natomiast helisy H17 biegnie równoległe w kierunku do drugiej osi podjednostki ku dołowi podstawy [2, 36]. W podjednostce 2' czynnika i zasad helisy H10 jest obecna w kierunku boku podjednostki i występuje ponad powierzchnię tytonoidalną [9]. Helisy H17 jest krótsza w podjednostce 40S 2' czynnika i zawiera więcej nieregularnych par zasad. Co więcej, pozycja bialka 59 analogicznie do helisy H17, która opiera się w kierunku bialka 59. Różnica między podjednostkami 30S i 40S w obrębie taniemi mogą wskazywać na odmienne mechanizmy inicjacji translacji u organizmów pro- i eukariotycznych.



**Rysunek 4.** Położenie domeny 5' w strukturze II-rzędowej i III-rzędowej 16S rRNA *T. thermophilus* (struktury pobrane odpowiednio z [22], numer X07998 oraz z [23], numer 1FKA).

Kolorami i numerami zaznaczone zostały poszczególne helisy.

A, C, D, E - widok od strony oddziaływania podjednostek;

B - widok od strony zewnętrznej;

C, D, E - górna, środkowa i dolna część domeny 5' i odpowiadająca im lokalizacja na diagramie struktury II-rzędowej 16S rRNA *T. thermophilus*.

Przy porównaniu domen 5' 18S rRNA i 16S rRNA, zaobserwowano kilka sekwencji wstawionych w strukturze 18S rRNA. Największa sekwencja wstawiona (ES3) ma 120 nukleotydów długości i zlokalizowana jest w helisie h9 w obrębie lewej stopy [11, 14, 15, 31].

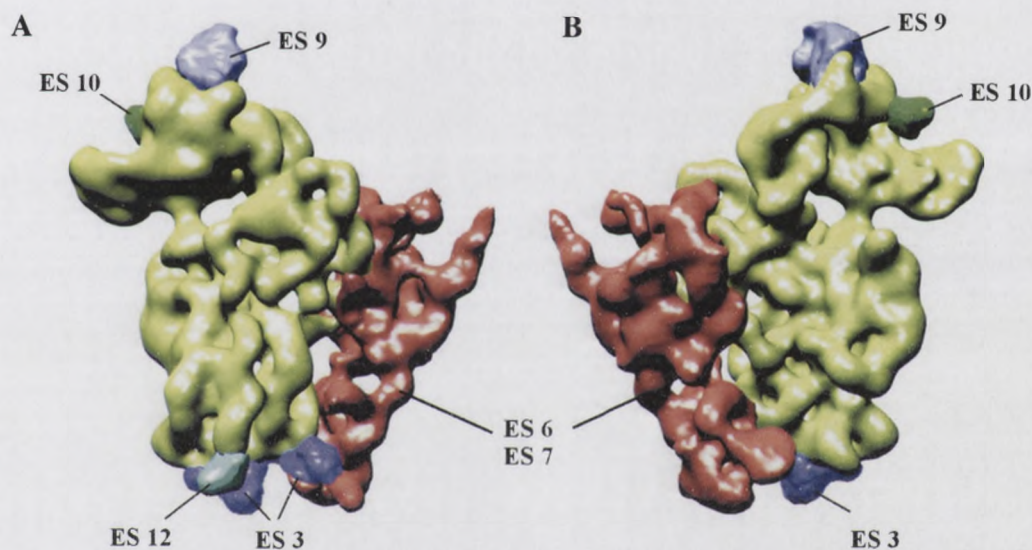


Wykres 4. Polimerizacja domeny 2' w strukturze 18S rRNA. Wykresy A, B, C, D, E przedstawiają różne stany konformacyjne i interakcje z innymi domenami. Wykresy A, C, D, E - widok od strony zewnętrznej; B - widok od strony wewnętrznej; C, D, E - góra, dołek i dolna część domeny 2' z rRNA T i rRNA T interakcją struktur II rRNA T i rRNA T.

Przy porównaniu domeny 2' 18S rRNA z 18S rRNA w strukturze 18S rRNA należy zauważyć, że wstawionych w strukturze 18S rRNA. Najbardziej interesującym jest to, że w strukturze 18S rRNA jest wstawiona jedna z kolumn, która w strukturze 18S rRNA jest wstawiona.

ES3 jest bardzo zróżnicowana pod względem wielkości i sekwencji [32], jednak dane filogenetyczne wskazują na ogólne podobieństwo jej struktury w rybosomach różnych gatunków [22]. Rola jaką może pełnić ES3 pozostaje nadal niewyjaśniona, jednak wykazano występowanie interakcji trzeciorzędowych z inną sekwencją wstawioną, ES6 w rybosomach *S. cerevisiae* [33, 34].

Istnieje również mniejsza insercja (około 20 zasad) w miejscu połączenia helis h7 i h8 (ES2). Natomiast w regionie helis h16 i h17 zaobserwowano delecję 25 zasad. Helisa h8, która w 30S tworzy strukturę palca (ang. *toe*), wraz z helisą h9 ułożone są w podjednostce 40S w obrębie prawej stopy i połączenia z lewą stopą (Rysunek 5).



**Rysunek 5. Struktura małej podjednostki rybosomalnej 40S *T. cruzi* [11] z zaznaczonymi sekwencjami wstawionymi.**

A - widok od strony oddziaływania podjednostek;  
B - widok od strony zewnętrznej.

- **Domena centralna 18S rRNA**

Centralna domena 18S rRNA zawiera helisy h19 – h27 (Rysunek 6). Wykazano, że h27 jest istotna dla przekształceń konformacyjnych rybosomu podczas procesu translacji. Cała domena centralna ma decydujące znaczenie dla wiązania tRNA w miejscu P oraz asocjacji podjednostek [36] i prace tam cytowane]. Opisano 11 pozycji rRNA tej domeny oddziałujących z cząsteczką tRNA, a większość z nich jest skupiona w obrębie helisy h23. Są to: nukleotydy 694 i 711 oddziałujące z parą zasad 20:1 cząsteczki tRNA [37]; nukleotydy 686, 701 i 717 oddziałujące z łodygą antykodonową tRNA w pozycji 47 [38] oraz nukleotyd 693,

ES3 jest bardzo zintensyfikowana pod względem...  
 filogenetyczne wykazują na ogółne podobieństwo...  
 gatunków [23]. Rolą jako model jest ES2...  
 występowanie interakcji przetrzebionych...  
 2. czerwca [22, 24].

Ważnym elementem jest interakcja...  
 (ES2). Należą do regionu...  
 w 302 tworzy strukturę...  
 w obrębie prawej strony i połączenia z lewą...



Rysunek 2. Struktura sieci podziału...  
 ekonomicznej w...  
 A - widok od strony...  
 B - widok od strony...

\* Domena centralna 18S rRNA

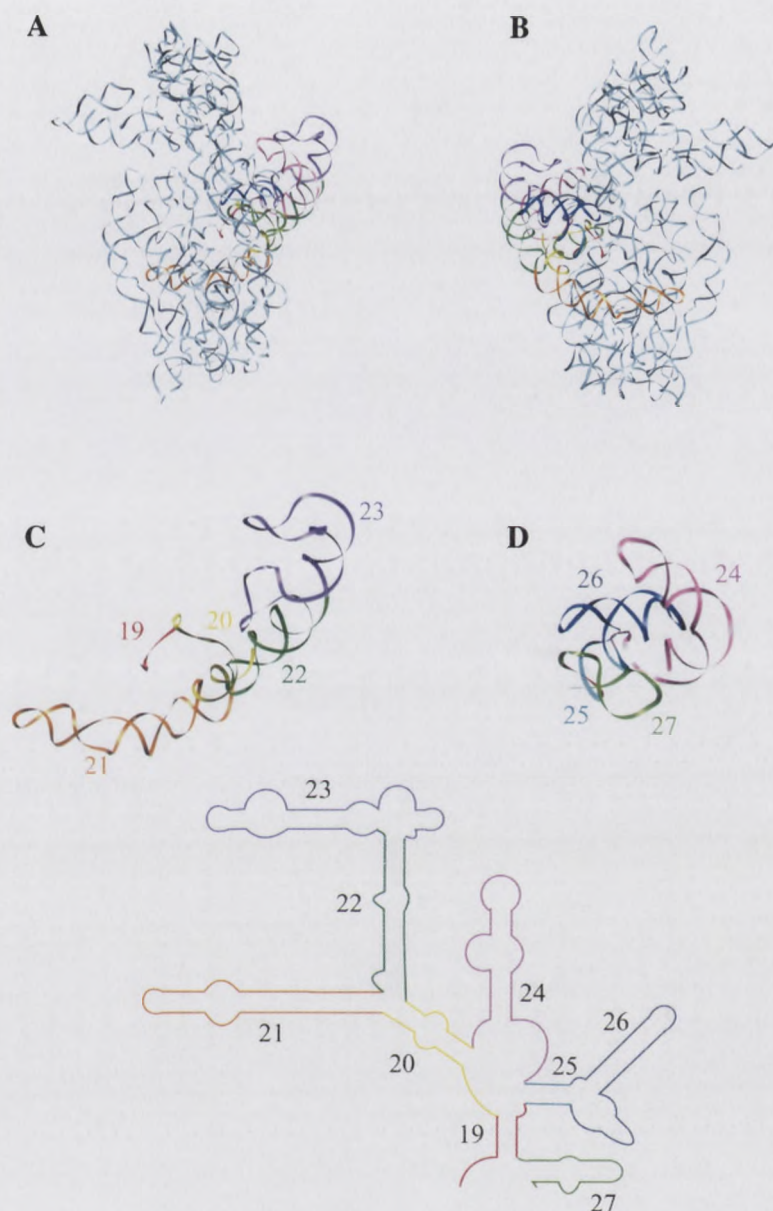
Centralna domena 18S rRNA zawiera...  
 jest istotna dla przetrzebionych...  
 domena centralna nie decyduje...  
 podziałek [36] i przez...  
 oddziaływać z...  
 to: mutacje 694 i 711...  
 701 i 717... x...

który oddziałuje z łodygą antykodonową tRNA w pozycji 32 [39]. Wykazano również interakcje z pętlą antykodonową tRNA w miejscu P (nukleotydy 34 i 39 tRNA oddziałują z nukleotydami 926 i 790 16S rRNA [9]) oraz z cząsteczką tRNA w miejscu A (para zasad 20:1 oddziałuje z nukleotydami 694 i 711 [37]). Nukleotyd 693 16S rRNA oddziałuje z pętlą antykodonową tRNA w miejscu E (pozycje 32 i 37), natomiast nukleotydy 694 i 695 zaangażowane są w oddziaływanie z nukleotydami 38 i 39 tRNA [39]. W rejonie 3' domeny centralnej (nukleotyd 926 helisy h28) znajduje się miejsce oddziaływania z mRNA w pozycji +2 [28]. Domena ta tworzy również cztery konserwatywne miejsca kontaktu z dużą podjednostką. Trzy z nich to mostki typu RNA-RNA, a czwarty to RNA-białko. Problem ten zostanie szerzej omówiony w rozdziale 3.1.3.

Ogólne ułożenie helis domeny centralnej jest bardzo podobne w podjednostkach 30S i 40S. Istnieją jednak różnice, wynikające przede wszystkim z obecności kilku sekwencji wstawionych w 18S rRNA. Helisa h21, która leży po zewnętrznej stronie podstawy 30S, jest rozbudowana w 40S o sekwencję wstawioną ES6, znaną we wszystkich poznanych strukturach rybosomów eukariotycznych. Długość ES6 jest zróżnicowana u różnych organizmów i wynosi od 170 nt u *O. cuniculus* [14] do 504 nt u *T. cruzi* [11]. ES6 znajduje się po zewnętrznej stronie platformy i ze względu na zmienność sekwencji może być podzielona na dwie części. Charakteryzująca się większą zmiennością część 5' ES6 biegnie w kierunku ramienia, równoległe do helisy h21. Natomiast część 3' ES6 wykazuje znaczną konserwatywność [22] i biegnie w kierunku podstawy podjednostki tworząc wraz z ES3 lewą stopę [31, 33, 34]. Po nałożeniu h21 z 30S na strukturę 40S *O. cuniculus* lub *R. norvegicus* widoczne jest, że w podjednostce ssacej, helisa ta zajmuje miejsce wzdłuż lewej stopy i dyskutowanej części podstawy [7, 14].

który oddziałuje z...  
interakcje z...  
nukleotydami 925 i 790...  
oddziałuje z nukleotydami...  
angiotensynowa RNA w...  
związki są w oddziały...  
centralnej (nukleotyd 920...  
pozycji +3 [28].  
podjednostki. Tę...  
zostanie strzeżony...

Ogólne...  
i 402. Istnieje...  
wzrostu w 182 RNA...  
nabudowana w 408...  
strukturach...  
organizmów i...  
po...  
na dwie części...  
zmienną...  
konserwatywność [25] i...  
stopie [31, 32, 34].  
widoczne jest...  
dyktowanej części...



**Rysunek 6. Położenie domeny centralnej w strukturze II-rzędowej oraz III-rzędowej 16S rRNA *T. thermophilus* (struktury pobrane odpowiednio z [22], numer X07998 oraz z [23], numer 1FKA).**

Kolorami i numerami zaznaczone zostały poszczególne helisy.

A, C, D - widok od strony oddziaływania podjednostek;

B - widok od strony zewnętrznej;

C, D - dwie części domeny centralnej i odpowiadająca im lokalizacja na diagramie struktury II-rzędowej 16S rRNA *T. thermophilus*.

W obrębie domeny centralnej 18S rRNA *T. cruzi* wykazano obecność drugiej dużej sekwencji wstawionej, ES7 (insercja 147 nt) w helisie h26 [2, 19, 40]. Część ES7 w połączeniu z fragmentem ES6, tworzy u *T. cruzi* dużą helikalną strukturę, nazwaną przez





Rysunek 8. Potencjał domowy...  
 I. Amplituda potencjału...  
 II. Prędkość...  
 III. Czas...  
 Kolumny i numery...  
 A, C, D - widok od strony...  
 B - widok od strony...  
 C, D - dwie części...  
 II - przedział...  
 III - przedział...  
 Kolumny i numery...

W obszycie domowy...  
 składowej...  
 w połączeniu z fragmentem...

Gao i współpracowników wieżyczką (ang. *turret*), znajdującą się po bocznej stronie 40S, w pobliżu miejsca oddziaływania między podjednostkami (Rysunek 2C oraz Rysunek 5). Wieżyczka ma długość 205 Å i jest najdłuższą strukturą helikalną obserwowaną w rybosomie. Jest ona zakończona ostrą spiralą o długości 50 Å, którą nazwano iglicą (ang. *spire*), znajdującą się w odległości ~130 Å od tunelu wyjścia mRNA. Dolna część wieżyczki skierowana jest ku dołowi podjednostki 40S. Przy końcu ulega ona zagięciu prawie o 90° i bierze udział w tworzeniu mostka z podjednostką 60S. Jest to unikatowy typ połączenia pomiędzy podjednostkami.

Poza wieżyczką, sekwencje wstawione ES6 i ES7 tworzą mniejsze dodatkowe struktury helikalne w podjednostce 40S (por. Rysunek 5). Dokładna rola jaką pełnią te sekwencje wstawione nie jest znana, ale zaproponowano ich udział w rekrutowaniu mRNA do rybosomu [11].

- **Domena 3'*major* 18S rRNA**

Domena 3'*major* (helisy h28 - h43) tworzy wierzchołek podjednostki 40S (Rysunek 7). W jej obrębie można wyróżnić wiele funkcjonalnych fragmentów oddziałujących z cząsteczką tRNA. Stwierdzono, że interakcje te są bardzo podobne u eukariota jak i prokariota [36]. W trzech regionach tej domeny (nukleotydy 1229 i 1230, 966 i 957 oraz 1338 i 1339) występują interakcje z tRNA w miejscu A (odpowiednio, z nukleotydami 28 i 30, 34 i 32 [39] oraz 40 i 41 [2, 19, 40]). Ponadto nukleotydy 30-36 części antykodonowej tRNA w miejscu E oddziałują z następującymi nukleotydami 16S rRNA: 1339, 1340 (pozycje 30, 35, 36 tRNA); 1376, 1378 (pozycja 32 w tRNA); 937 (pozycja 33 w tRNA) oraz 1382 (pozycja 34 w tRNA) [2, 19, 39, 40]. Co więcej, wykazano oddziaływanie tej domeny z czynnikiem elongacyjnym EF-G (nukleotyd 1044 helisy h33) [26, 41]. Natomiast nukleotydy helisy h28 (1052, 1196) i h34 (1395) biorą udział w interakcjach z cząsteczką mRNA w pozycjach: +6, +7 oraz +8 i +9 [28].

Zasadniczą różnicę między podjednostkami prokariotycznymi i eukariotycznymi w domenie 3'*major* stanowi pozycja i kształt dziobu, formowanego przez helisę h33. Pomimo, że h33 u *S. cerevisiae* jest dłuższa, to jednak brak dodatkowej helisy h33a powoduje, że cały ten element rRNA jest mniejszy w rybosomach eukariotycznych [9].

W helisach h39 i h41 stwierdzono występowanie krótkich sekwencji wstawionych u *T. cruzi*, nazwanych odpowiednio ES9 i ES10 [11]. Tworzą one dodatkowe masy w obrębie

Ono i współzawodnicze

podobna miejsc oddziały

Wieszka ma długość 30

Jej ona zakochana w

znajdując się w odleg

skierowana jest ku do

i bierz udział w twor

ponieważ podjęliśmy

Poza wieszka, sek

belknie w podjednost

wstawione nie jest

\* Domena 3' regionu

Domena 3' regionu

W jej opisie można

RNA. Świadczone, że

W trzech regionach

występuje interakcj

oraz 40 i 41 [2, 19, 40].

oddziałują z następu

1376, 1378 (pozycja

RNA) [2, 19, 39, 40].

elementy (pukacz)

(1052, 1190) i 1154 (1395)

+7 oraz +8 i +9 [38].

Znaczniki różnic

w domenie 3' regionu

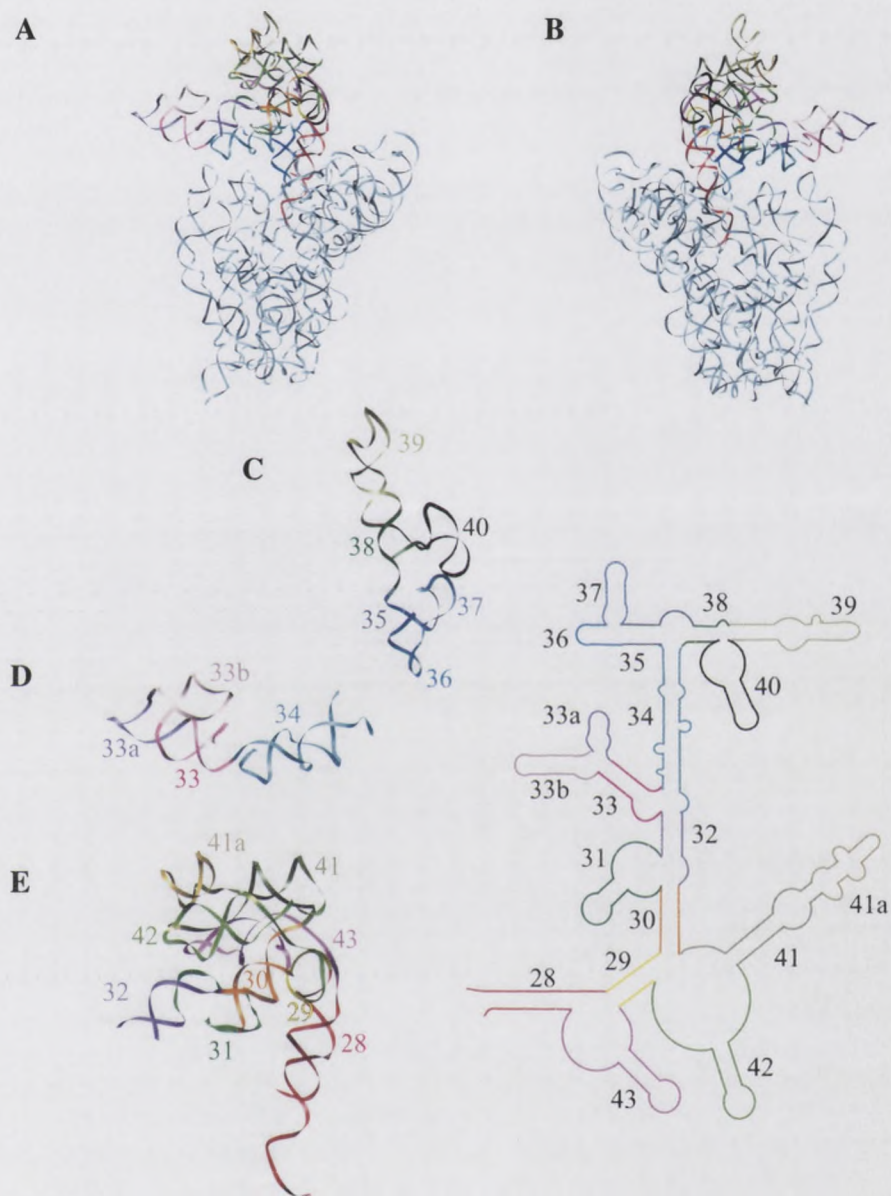
na 135 u 2. coverit

ten element RNA

W belkach 139 i

u 7. oraz, nzwanych

wierzchołka podjednostki (por. Rysunek 5). Insercję 20 nt obserwowano w tym regionie również w przypadku rybosomów *O. cuniculus* [14].



**Rysunek 7. Położenie domeny 3'major w strukturze II-rzędowej oraz III-rzędowej 16S rRNA *T. thermophilus* (struktury pobrane odpowiednio z [22], numer X07998 oraz z [23], numer 1FKA).**

Kolorami i numerami zaznaczone zostały poszczególne helisy.

A, C, D, E - widok od strony oddziaływania podjednostek;

B - widok od strony zewnętrznej;

C, D, E - górna, środkowa i dolna część domeny 3'major i odpowiadająca im lokalizacja na diagramie struktury II-rzędowej 16S rRNA *T. thermophilus*.

A

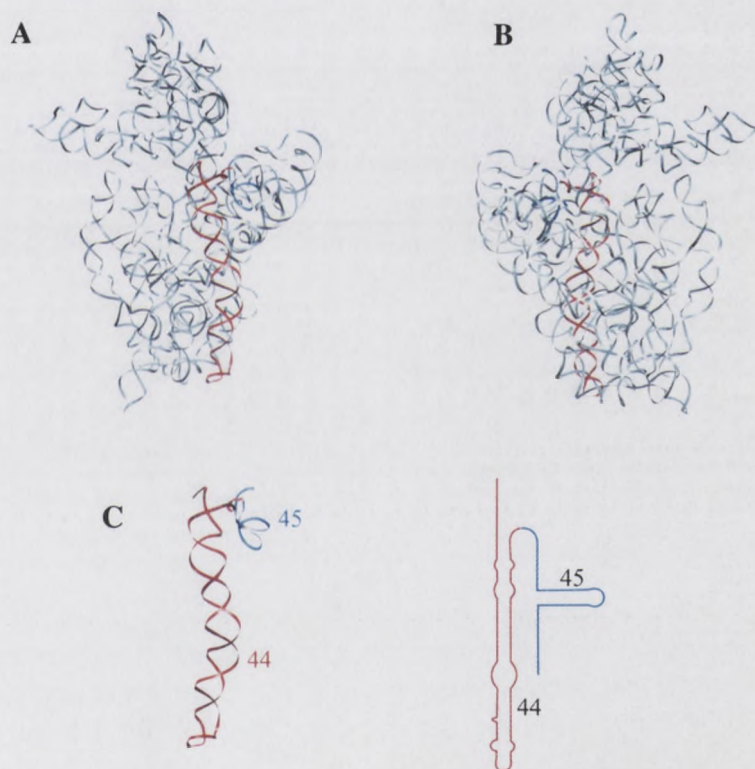
B

C

Wykaz 7. Podane są dane dotyczące  
T. (wartości) w różnych okresach  
IRKA  
Kolejność i nazwa  
A, C, D, E - wartości  
H - wartość od  
C, D, E - dane  
najwyższy

- **Domena 3' minor 18S rRNA**

Domena 3' minor 18S rRNA (Rysunek 8) zawiera dwie helisy: h44 i h45. h44 jest najdłuższą helisą w podjednostce 40S, położoną na zewnątrz powierzchni oddziaływania podjednostek. W rybosomach prokariotycznych zaobserwowano, że helisy h44 i h45 biorą udział w procesie asocjacji podjednostek rybosomalnych [2]. Domena 3' minor, wraz z helisami h27, h18, h34, h1/h2, końcami 3' i 5' oraz centralnym pseudowęzłem tworzą centrum dekodujące, które odpowiada za translację mRNA i tRNA oraz kontrolę wierności oddziaływań kodon - antykodon [30]. Sekwencje 16S rRNA i 18S rRNA wykazują w tym regionie znaczną konserwatywność [22], co jest zgodne z uniwersalnością procesu dekodowania.



**Rysunek 8. Położenie domeny 3' minor w strukturze II-rzędowej oraz III-rzędowej 16S rRNA *T. thermophilus* (struktury pobrane odpowiednio z [22], numer X07998 oraz z [23], numer 1FKA).**

Kolorami i numerami zaznaczone zostały poszczególne helisy.

A, C - widok od strony oddziaływania podjednostek;

B - widok od strony zewnętrznej;

C - domena 3' minor i odpowiadająca jej lokalizacja na diagramie struktury II-rzędowej 16S rRNA *T. thermophilus*.

\* Długość...

Długość...

najbardziej...

podjednostki...

dział w...

belizmi 637...

dekoracje...

odbiły w...

regionie...

dekorowania...

Krynki &...

T. (rozprawy...

1974).

Kolonia (...

A. C. - widok...

B. - widok...

C. - domena...

T. (rozprawy...

Najważniejszą częścią centrum dekodującego jest górna część helisy h44. Fragmenty domeny 3'*minor* w pozycjach 1402 – 1408 i 1492 – 1498 tworzą rybosomalne miejsca A i P wiązania tRNA [5, 30, 42]. W pobliżu regionu dekodującego w helisie h44 (nukleotydy 1492-1493) znajdują się również miejsca interakcji z czynnikiem elongacyjnym EF-Tu [26, 41]. Cząsteczki tRNA w miejscu A oddziałują z obiema helisami domeny 3'*minor*: h44 (nukleotydy 1400, [43]) oraz h45 (nukleotydy 1531 i 1542 [43]). tRNA w miejscu P (nukleotydy 34 i 38) oddziałuje z nukleotydami 1492-1494 helisy h44. Natomiast tRNA w miejscu E (nukleotydy 37 i 38) wykazuje oddziaływanie z nukleotydami 1510 i 1542 [2].

Unikalną cechą prokariotycznego 16S rRNA jest zlokalizowana w końcu 3' sekwencja anty-Shine-Dalgarno, która odpowiada za prawidłowe wiązanie mRNA [44]. Z cząsteczką mRNA oddziałują ponadto nukleotydy 1402 i 1530 w pozycjach odpowiednio -1/-8 oraz +4 [39]. Stwierdzono również, że helisa h44 zarówno 16S rRNA jak i 18S rRNA jest niezwykle ważna podczas asocjacji podjednostek w celu utworzenia aktywnego rybosomu [29]. H44 tworzy mostki z dużą podjednostką rybosomalną aż w pięciu regionach. Problem ten zostanie omówiony szczegółowo w rozdziale 3.1.3.

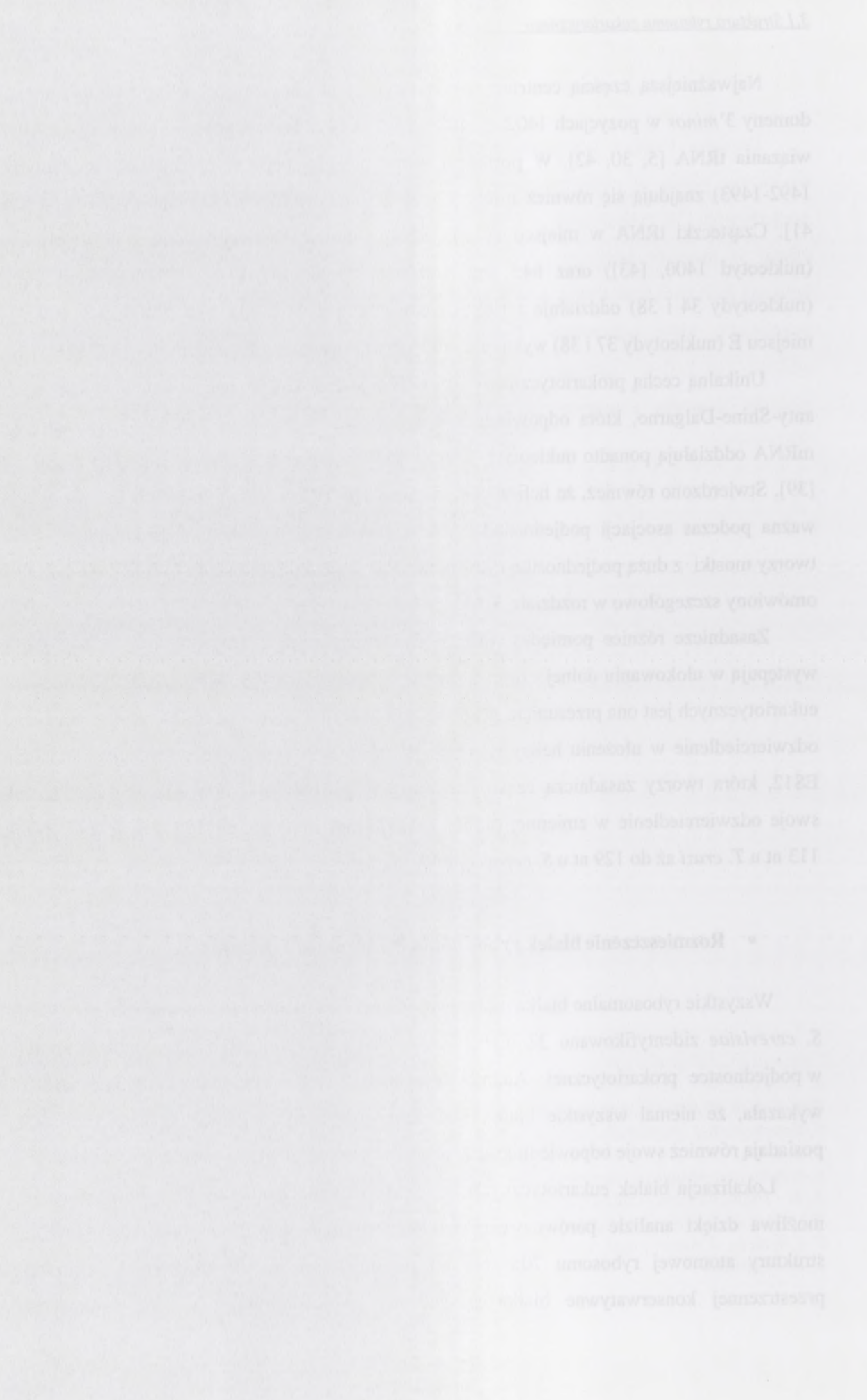
Zasadnicze różnice pomiędzy 18S rRNA *S. cerevisiae* a 16S rRNA *T. thermophilus* występują w ułożeniu dolnej części podstawy podjednostki 40S. W przypadku rybosomów eukariotycznych jest ona przesunięta w stronę ramienia (por. Rysunek 5). Ta różnica ma swoje odzwierciedlenie w ułożeniu helisy h44 [9]. W jej obrębie występuje sekwencja wstawiona ES12, która tworzy zasadniczą część prawej stopy podjednostki 30S. Obecność ES12 ma swoje odzwierciedlenie w zmiennej długości h44, która waha się od 103 nt u *E. coli*, przez 113 nt u *T. cruzi* aż do 129 nt u *S. cerevisiae* [9, 26, 31].

- **Rozmieszczenie białek rybosomalnych w podjednostce 40S.**

Wszystkie rybosomalne białka małej podjednostki występują tylko w jednej kopii. W 40S *S. cerevisiae* zidentyfikowano 32 białka (S0 – S31), z czego tylko 15 posiada homologi w podjednostce prokariotycznej. Analiza sekwencji z wykorzystaniem programu BLAST wykazała, że niemal wszystkie białka podjednostki 40S *S. cerevisiae* (z wyjątkiem S31) posiadają również swoje odpowiedniki u *T. cruzi* [11], co wskazuje na ich zachowawczość

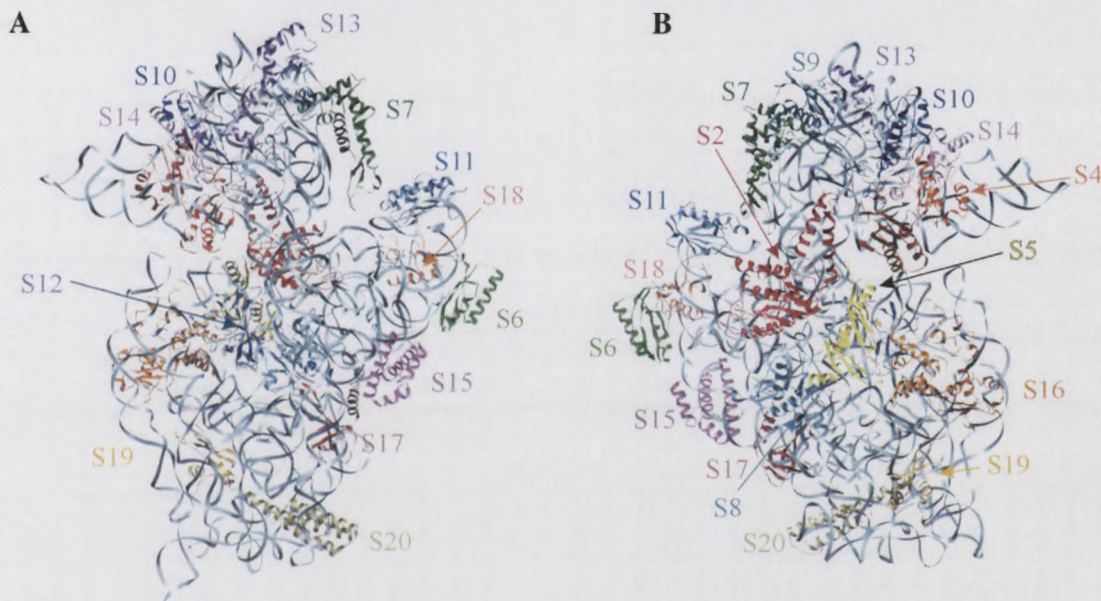
Lokalizacja białek eukariotycznych w strukturze małej podjednostki rybosomalnej jest możliwa dzięki analizie porównawczej istniejących map krio-EM rybosomów 80S oraz struktury atomowej rybosomu 70S. Na tej podstawie można umiejscowić w strukturze przestrzennej konserwatywne białka posiadające swoje homologi w obu królestwach.





Wykres 1. Wykres przedstawiający dane liczbowe i tekstowe. Zawiera kilka tabel i opisów. Niektóre dane są nieczytelne ze względu na niską rozdzielczość, ale można wyodrębnić niektóre wartości i tytuły tabel.

Szczegółową lokalizację białek rybosomalnych przedstawiłam w strukturze krystalicznej podjednostki 30S *T. thermophilus* [2] na Rysunku 9. Podjednostka bakteryjna 30S zawiera 21 białek rybosomalnych (S1 – S21). Tylko jedno białko (S12 u prokariota) jest umiejscowione po stronie oddziaływania podjednostek. Pozostałe białka zlokalizowane zostały po stronie zewnętrznej podjednostki. Stwierdzono również, że większość białek znajduje się w rejonie wierzchołka (domena 3' *major* 18S rRNA) a żadne rybosomalne białko nie oddziałuje z funkcjonalnie ważnym rejonem, domeną 3' *minor*.



**Rysunek 9. Struktura trzeciorzędowa małej podjednostki rybosomalnej 30S (struktura pobrana z [23] numer 1FKA).**

Kolorem jasnoniebieskim zaznaczono 16S rRNA, pozostałymi kolorami – białka.

A - widok od strony oddziaływania podjednostek;

B - widok od strony zewnętrznej.

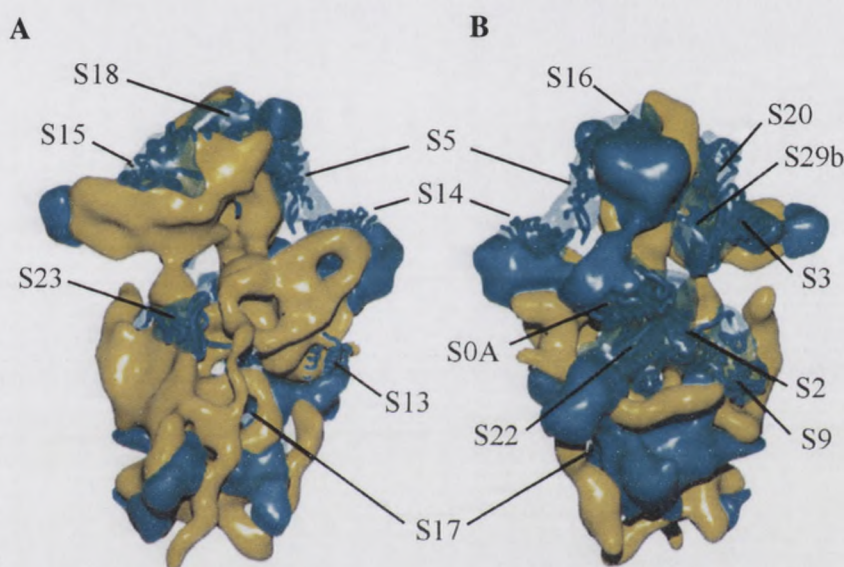
Poza białkami, które posiadają swoje prokariotyczne odpowiedniki, w mapach krio-EM rybosomu *S. cerevisiae* [9] zidentyfikowano osiem regionów z dodatkowymi białkami. Większość z nich położona jest po zewnętrznej stronie podjednostki (Rysunek 10). Dwa zgrupowania białek umieszczone są w rejonie płata wierzchołka oraz wchodzi w skład dziubu, zastępując helisę h33a występującą w 16S rRNA. Kolejny klaster białek znajduje się w górnej części platformy, w rejonie otaczającym białko S14 i oddziałuje z białkiem S5. To oddziaływanie wierzchołka z platformą wyznacza część tunelu wyjścia mRNA.

Rejon 40S otaczający białko S0A jest powiększony w stosunku do jego odpowiednika w podjednostce 30S. Dodatkowe gęstości na mapie krioelektronowej, odpowiadające białkom



znajdują się w pobliżu ES6 helisy h21 18S rRNA oraz w miejscu, gdzie w rybosomach prokariotycznych znajduje się białko S16. Obecność tego drugiego zgrupowania dodatkowych białek, może być odpowiedzialna za różnice w ułożeniu helisy h17 w 18S rRNA i 16S rRNA.

Ostatnie dwa zgrupowania dodatkowych białek znajdują się po stronie oddziaływania podjednostek, na dole prawej i lewej stopy. Klaster białek zlokalizowany w obrębie lewej stopy ma podobną pozycję jak prokariotyczne białko S20, dla którego nie znaleziono homologu eukariotycznego.



**Rysunek 10. Położenie białek w małej podjednostce rybosomu drożdżowego [9].**

Kolorami zaznaczono: żółty - 18S rRNA, niebieski – białka. Białka homologiczne z białkami prokariota przedstawiono jako łańcuchy i oznaczono nazwami. Białka, dla których nie znane są homologi prokariotyczne oznaczono jako dodatkowa masa (kolor niebieski).

A - widok od strony oddziaływania podjednostek;

B - widok od strony zewnętrznej.

W 2004 roku zidentyfikowano dodatkowe białko występujące jedynie w rybosomach eukariotycznych, nazwane RACK1 (ang. *receptor for activated C kinase*) [10]. Służy ono jako rusztowanie dla szerokiej gamy kinaz i receptorów związanych z błonami komórkowymi. Stwierdzono, że w rybosomie białko RACK1 położone jest w sąsiedztwie helis h39 i h40 18S rRNA oraz białka S16. Przypuszcza się, że pełni ono funkcję podczas regulacji inicjacji translacji. Białko RACK1 zostało uwidocznione po raz pierwszy w strukturze krioelektronowej rybosomu *Thermomyces lanuginosus* i okazało się, że jest obecne we wszystkich poznanych dotąd strukturach krio-EM rybosomów eukariotycznych (Rysunek 11). Jedynym wyjątkiem jest podjednostka 40S *T. cruzi*, gdzie nie obserwowano dodatkowej gęstości w miejscu

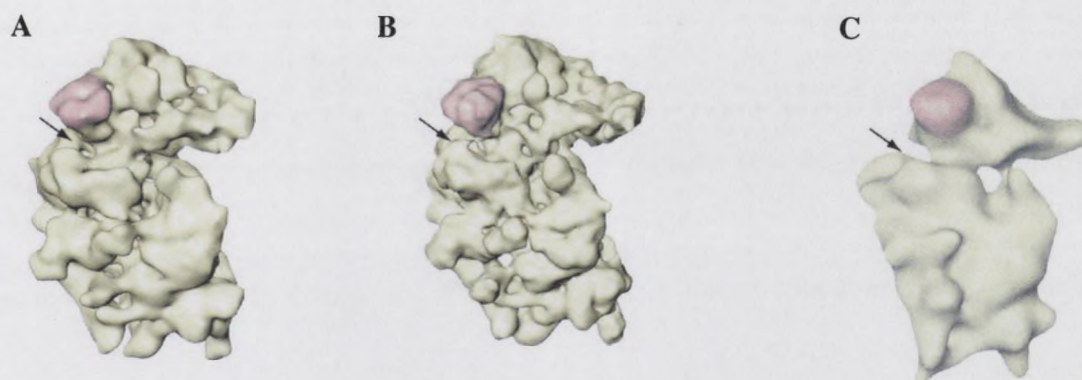
zajdują się w podzwiązku...  
profinitycznych...  
białek może być odpowiedzialne...  
Ostatnio dwa...  
podjednostek, na dole...  
stopy na podobną...  
homologu eukariotycznego.



Wykres 10. Porównanie białek w...  
Kolony zamoczone...  
przebieganie...  
proteiny...  
A - widok od strony...  
B - widok od strony...

W 2004 roku...  
eukariotycznych,...  
nastawienie dla...  
Stwierdzono, że w...  
18S rRNA oraz...  
transkrypcji...  
typom...  
dotąd...  
jest podjednostka...

odpowiadającym białku RACK1. Pomimo to, stwierdzono obecność homologu genu RACK1 w genomie *T. cruzi* [11], co wskazuje na możliwość innego położenia w rybosomie.



**Rysunek 11. Położenie białka RACK1 (zaznaczono kolorem czerwonym) w małej podjednostce rybosomu *T. lanuginosus* (A), *S. cerevisiae* (B) oraz *H. sapiens* (C) [10].** Strzałkami zaznaczono tunel wejścia mRNA.

Pomimo coraz bardziej zaawansowanych badań, dokładna rola jaką pełnią białka rybosomalne została poznana jedynie dla kilku z nich (Tabela 1 na podstawie [12, 45, 46]). Wiadomo, że niektóre białka spełniają ważną funkcję podczas procesu składania podjednostek, natomiast ich udział w procesach pełnionych przez dojrzały rybosom nie jest znany [12]. Przypuszcza się, że białka takie odgrywają rolę w utrzymywaniu stabilności rybosomu (np. białko S16 u prokariota). Ponadto, białka rybosomalne mogą odgrywać rolę w fałdowaniu rRNA, transporcie prekursorów rybosomalnych lub w oddziaływaniu z innymi czynnikami ważnymi w procesie translacji. Sugeruje się również ich udział w procesach kotranslacyjnych, takich jak interakcje z czynnikami fałdowania białek w tunelu wyjścia polipeptydu [47] lub podczas procesu translokacji. Białka rybosomalne mogą mieć również wpływ na ważne dla działania rybosomu funkcje enzymatyczne, np. funkcję helikazy mRNA [48]. Wydaje się również, że białka S6, S9, S13, S17 oraz S20 nie są zasadnicze dla funkcjonowania rybosomu, ponieważ szczepy *E. coli* z usuniętymi genami tych białek wykazywały znaczną przeżywalność.

Funkcje rybosomalnych białek eukariotycznych nie są tak dobrze poznane jak prokariotycznych. Białko S0 oddziałuje z powierzchnią czynnika inicjacyjnego translacji eIF3 [49]. Sądzi się, że bierze ono udział w przyłączaniu eIF3 do małej podjednostki rybosomalnej. Białka S2, S9 i S28 są ważne dla utrzymywania dokładności i wierności procesu translacji. Według najnowszych doniesień, eukariotyczne białka S10, S26, S3, S0, S15 i S2 bezpośrednio uczestniczą w transporcie 18S rRNA podczas procesu jego dojrzewania [47]. Mutacje w białkach S5, S18 i S19 prowadzą do zaburzeń obróbki 18S rRNA, wskutek czego

odpowiadającym białku RACK1. Powinno to świadczyć o bliskości homologii genu RACK1 w genomie T. crassipes, co wskazuje na możliwość innego polowania w rybożenie.



Rysunek 11. Polowanie białka RACK1 (zaznaczono kolorem czerwonym) w małej podjednostce rybozomu T. crassipes (A), T. crassipes (B) oraz H. zoster (C) [19]. Szkalami zaznaczono Janet w skali 100 nm.

Porównano coraz bardziej skomplikowane badania, dochodząc do wniosku, że białka rybozomalne zostały formowane jedynie dla kilku z nich (Tabela 1 na podstawie [12, 42, 46]). Wiadomo, że niektóre białka rybozomalne wrażliwe na działanie podjednostki rybozomu, ich udział w procesie polowania jest bardzo wysoki, rybożenie ma być zmyślny [12]. Przeprowadza się te badania, które dotyczą nie w naszym, ale w innym rybozomie (np. białko 216 u prokariot). Ponadto, białka rybozomalne mogą odgrywać rolę w badaniu rRNA, warunkując polowanie rybozomalnych lub w oddziaływaniu z innymi eksystentami wewnątrz w procesie translacji. Zgodnie z tym, że udział w procesach katalizacyjnych takich jak interakcja z rRNA i białkami rybozomalnymi w trakcie polowania [47] lub podczas procesu translacji. Białka rybozomalne mogą mieć również wpływ na wazę dla działania rybozomu funkcje enzymatyczne, np. funkcje białkowy mRNA [48]. Wykazuje się również, że białka 22, 213, 217 oraz 220 nie są zasadniczo dla funkcjonowania rybozomu, ponieważ części E coli z mutacjami genami tych białek wykazywały znaczący praktyczność.

Funkcje rybozomalnych białek eukariotycznych nie są tak dobrze poznane jak prokariotycznych. Białko 80 odwołuje się do powstania czynnika inicjującego translacji eIF3 [49]. Słuch się że białko ma udział w przystąpieniu eIF3 do małej podjednostki rybozomalnej. Białka 22, 221 i 228 są ważne dla utrzymywania dokładności i wierności procesu translacji. Według najnowszych danych, eukariotyczne białka 210, 220, 221, 213 i 222 bezpośrednio uczestniczą w transporcie 18S rRNA podczas procesu jego dołączania [47]. Mutacje w białkach 22, 213 i 219 prowadzi do zaburzeń odnośki 18S rRNA, wskutek czego

prekursor 18S rRNA (20S rRNA) zostaje zatrzymywany w jądrze komórkowym i nie jest transportowany do cytoplazmy. Natomiast brak S20 prowadzi do zaburzeń obróbki 20S rRNA w cytoplazmie.

Białko	Funkcja
S1	niespecyficzne wiązanie mRNA
S3, S4, S5	tworzą część tunelu wejścia mRNA, możliwe działanie jako helikaza mRNA
S4	utrzymywanie wierności translacji
S7, S11	wiązanie mRNA i tRNA w rybosomalnym miejscu E
S9, S13	interakcje z tRNA w miejscu P
S12	odczytywanie drugiej i trzeciej pozycji kodonu tRNA w miejscu A

Tabela 1. Przykłady eukariotycznych białek małej podjednostki rybosomalnej o znanych funkcjach (na podstawie [12, 45, 46]).

### 3.1.2. Struktura dużej podjednostki rybosomalnej 60S.

Duża podjednostka rybosomalna 60S *S. cerevisiae* zbudowana jest z 25S rRNA (3392 nt), 5,8S rRNA (~120 nt), 5S rRNA i 45 białek (L1 –L45) [9]. Ze względu na to, że 5,8S rRNA jest homologiczny do części 5' 23S rRNA, rRNA dużej podjednostki *S. cerevisiae* jest o 646 nt dłuższy niż bakteryjny 23S rRNA *E. coli* (2904 nt) i 505 nt dłuższy niż archebakteryjny 23S rRNA *H. marismortui* (3045 nt). Drożdżowa podjednostka 60S zawiera 12 rybosomalnych białek więcej niż 50S *E. coli* i 14 białek więcej niż podjednostka *H. marismortui*.

Na morfologię dużej podjednostki składają się cztery podstawowe elementy (Rysunek 12 A-F): podstawa (ang. *body*), stanowiąca dolną część podjednostki oraz trzy wypukłości w górnej części: (1) centralna wypukłość (ang. *central protuberance*) ze zasocjowanym palcem miejsca A (ang. *A-site finger*, ASF; tworzy go helisa H38 L-rRNA), (2) wypukłość L1 (ang. *L1 protuberance*) i (3) słupek białek P, zwany kciukiem, oddziałujący z czynnikami elongacyjnymi. Słupek kwaśnych białek P jest odpowiednikiem wypukłości L7/L12 obecnej u organizmów prokariotycznych [9].



przebieg 18S rRNA (20S rRNA) znacznie przyspieszamy w jądrze komórkowym i nie jest transportowany do cytoplazmy. Natomiast białko 250 prowadzi do rozkładu obrotki 20S rRNA w cytoplazmie.

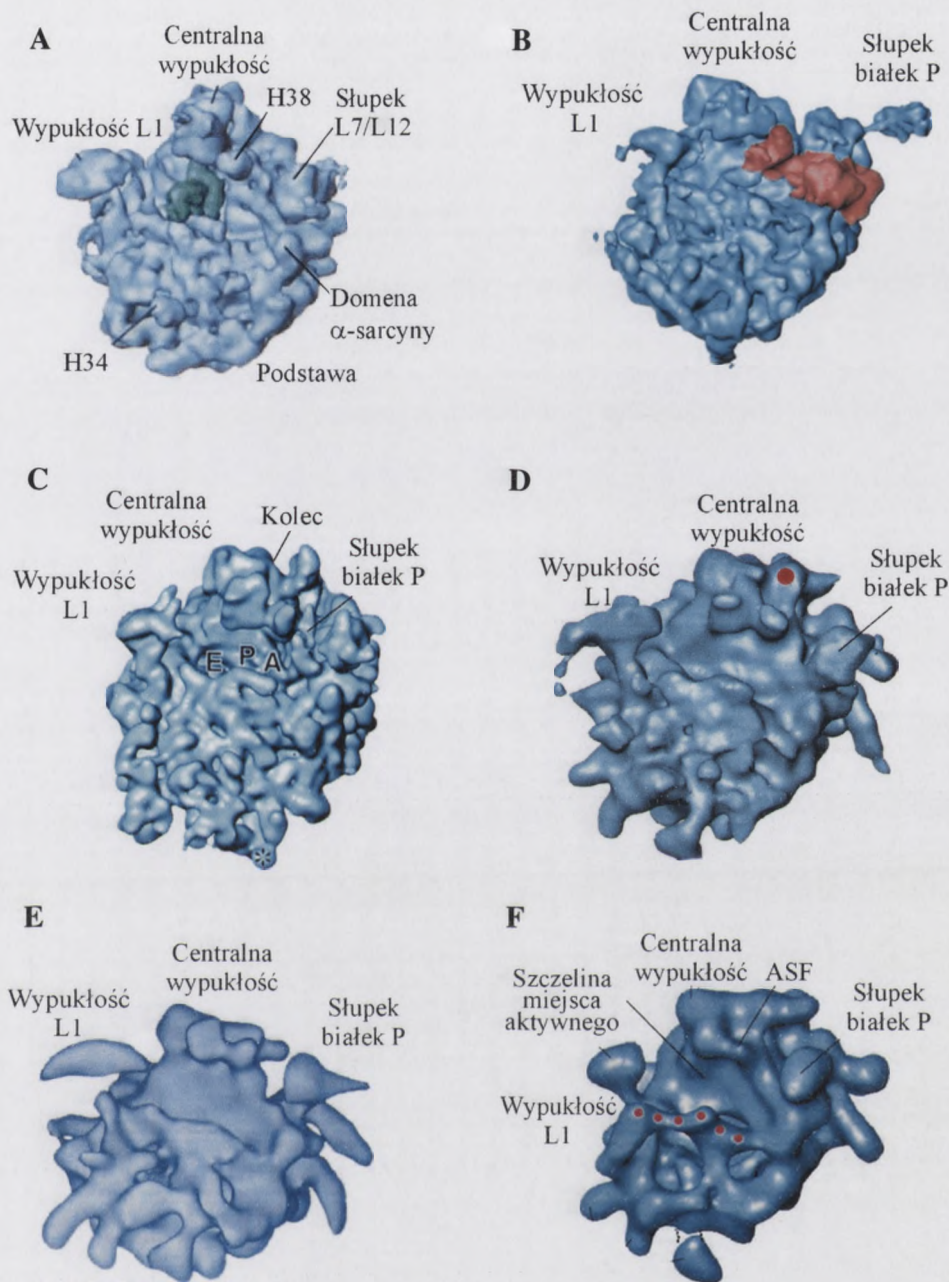
Białko	Funkcja
21	niezdefiniowane białko rRNA
22, 24, 25	tworzą część funkcji wrotka rRNA, możliwe działanie jako białka rRNA
24	organizowanie wrotka rRNA
27, 211	wrotka rRNA i rRNA w rybosomalnym miejscu E
29, 213	interakcja z rRNA w miejscu P
212	odczytywanie drugiej i trzeciej pozycji kodonu rRNA w miejscu A

Tabela 1. Funkcje białek cytoplazmatycznych białek matki podjednostki rybosomalnej o znaczących funkcjach (na podstawie [12, 42, 43]).

### 3.1.2. Struktura białek podjednostki rybosomalnej 60S

Długość podjednostki rybosomalnej 60S 2. czwartej rRNA jest 232 rRNA (232 nt), 2.8S rRNA (-130 nt), 5S rRNA i 4S rRNA (191 nt) wagi 2.8S rRNA jest homologiczna do części 2.3S rRNA rRNA białek podjednostki 2. czwartej jest o 646 nt dłuższy niż białkowy 23S rRNA E. coli (594 nt) i 505 nt dłuższy niż archeobakteryjny 23S rRNA H. marismortui (305 nt). Długość podjednostki 60S zawiera 12 rybosomalnych białek więcej niż 30S E. coli i 14 białek więcej niż podjednostka H. marismortui.

Na morfologię białek podjednostki 60S składają się cztery podstawowe elementy (rysunek 12 A-F): podstawa (ang. foot), stanowiąca dolną część podjednostki oraz trzy wypukłości w górnej części: (1) wypukłość wyprzedzająca (ang. conical protrusion), ze znaczącym polem miejsca A (ang. A-site finger, ASF), tworzący go helisa H38 (rRNA), (2) wypukłość L1 (ang. L1 protrusion) i (3) łopatkę białek E, zwany kciukiem, oddzielający z ekspozycją elongacyjną. Szereg białek białek P jest odpowiedzialnym wypukłości L1/L2 obecny u organizmów prokaryotycznych [9].



**Rysunek 12. Struktura dużej podjednostki rybosomalnej, prokariotycznej 50S i eukariotycznych 60S.**

A - struktura podjednostki 50S *E. coli* [19], kolorem zielonym oznaczono tRNA w miejscu P;

B - struktura podjednostki 60S *S. cerevisiae* [9], kolorem czerwonym oznaczono tRNA w miejscu P;

C - struktura podjednostki 60S *T. cruzi*; A, P, E oznaczają rybosomalne miejsca [11];

D - struktura podjednostki 60S *H. sapiens* [15];

E - struktura podjednostki 60S *O. cuniculus* [17];

F - struktura podjednostki 60S *R. norvegicus* [7]; ASF oznacza palec miejsca A, czerwonymi kropkami oznaczono brzeg szczeliny miejsca aktywnego.

A



B



C



A - *Amelanchier canadensis*  
 B - *Amelanchier canadensis*  
 C - *Amelanchier canadensis*  
 D - *Amelanchier canadensis*  
 E - *Amelanchier canadensis*  
 F - *Amelanchier canadensis*

Przy porównaniu podjednostek 60S *S. cerevisiae* i *T. cruzi* widocznych jest kilka dodatkowych wypukłości w przypadku tego drugiego organizmu [11]. Najbardziej widoczną różnicą jest występowanie dużej helikalnej struktury nazwanej kolcem (ang. *prong*) zlokalizowanej pomiędzy centralną wypukłością a helisą H38. Co interesujące, struktura podobna do kolca zidentyfikowana została w rybosomach *H. sapiens* (oznaczona czerwoną kropką na Rysunku 12D), ale nie znaleziono jej w rybosomach *S. cerevisiae* i prokariotycznych.

W strukturze podjednostki 60S *O. cuniculus* [17] zaobserwowano, że poniżej centralnej wypukłości i ASF, między słupkiem białek P i wypukłością L1 znajduje się konserwatywna szczelina (nazwana również przez Morgana i współpracowników kanionem). Jest to szczelina miejsca aktywnego rybosomu, tj. centrum peptydylotransferazowego (ang. *peptidyltransferase center*, PTC), w którym odbywa się synteza wiązania peptydowego. Brzeg tej szczeliny (oznaczony czerwonymi kropkami na Rysunku 13 F) utworzony jest przez długie cylindryczne fragmenty o średnicy 20-25 Å, co sugeruje, że mogą być one zbudowane z rRNA. U podstawy szczeliny znajduje się tunel wyjścia polipeptydu. Potwierdzeniem roli, jaką może pełnić ten tunel jest fakt, że wyjście z tunelu nakłada się z miejscem występowania centralnego poru tunelu retikulum endoplazmatycznego w kompleksach translokacyjnych. W ten sposób powstawałoby przedłużenie tunelu wyjścia polipeptydu z PTC do retikulum.

Topologia tunelu wyjścia polipeptydu jest silnie konserwatywna. Jego długość wynosi około 100 Å (polipeptyd o takiej długości jest chroniony przed proteolizą). Z dokładniejszych badań rybosomu 70S [50, 51] wiadomo, że tunel jest w znacznej jego części prosty, z wyjątkiem zagięcia 20-35 Å w rejonie PTC (Rysunek 13). Średnica tunelu waha się od 20 Å w najszerszym miejscu do około 10 Å na samym jego początku oraz w odległości 28 Å od miejsca wyjścia. Przekiętna średnica tunelu wynosi 15 Å. Większą część ścian tunelu stanowi rRNA, jednak zidentyfikowano również kilka białek rybosomalnych w jego pobliżu. Są to białka L4, L22 i L39e. Cechą odróżniającą rybosomy 70S od 80S w tym regionie jest fakt, że miejsce wyjścia tunelu z dużej podjednostki rybosomalnej 60S znajduje się w jedynej płaskiej części rybosomu po jego zewnętrznej stronie [7]. Została ona nazwana płaską powierzchnią rybosomu (ang. *flat ribosomal surface*, FRS). Ze względu na istnienie FRS, ogólny zarys rybosomów 80S jest bardziej hemisferyczny w porównaniu ze sferycznym kształtem 70S. Wyjątek stanowią rybosomy *T. cruzi*, w przypadku których podjednostka 60S nie posiada płaskiej powierzchni. Dlatego też rybosomy te kształtem zbliżone są do bakteryjnych.

### Przy porównaniu

dobalających wyprodukowanych różnic jest wystarczająco lokalizowanej pomimo podobna do kolekcji zidentyfikacji krajów na Rysunku 1.1. i praktycznych.

W warunkach podobnych

wywołują i ASZ, między

szacunka (nazwana również

mięsa aktywnego (ang. peptide)

Brzęk tej szacunku (oznaczone

drugie cyfrylicznie trójcyfrowe

RNA. U podstawy szacunku

może być ten sam, jak

centralnego partu tuncu

ten sposób powstałoby

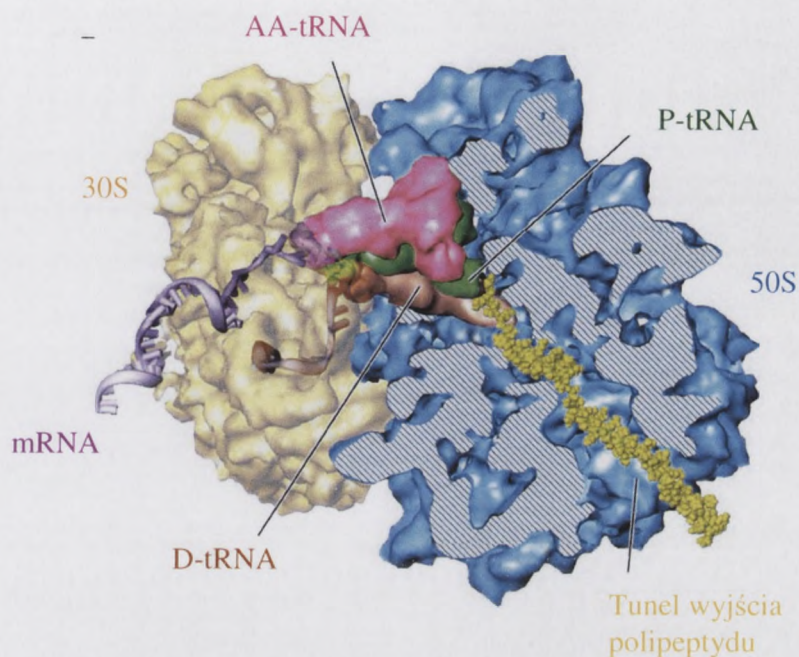
Topologia tuncu wywołuje

około 100 Å (długości) i

badaj typom 702 (100

x wyjątkiem zalicza 20-30

w najszerszym miejscu do

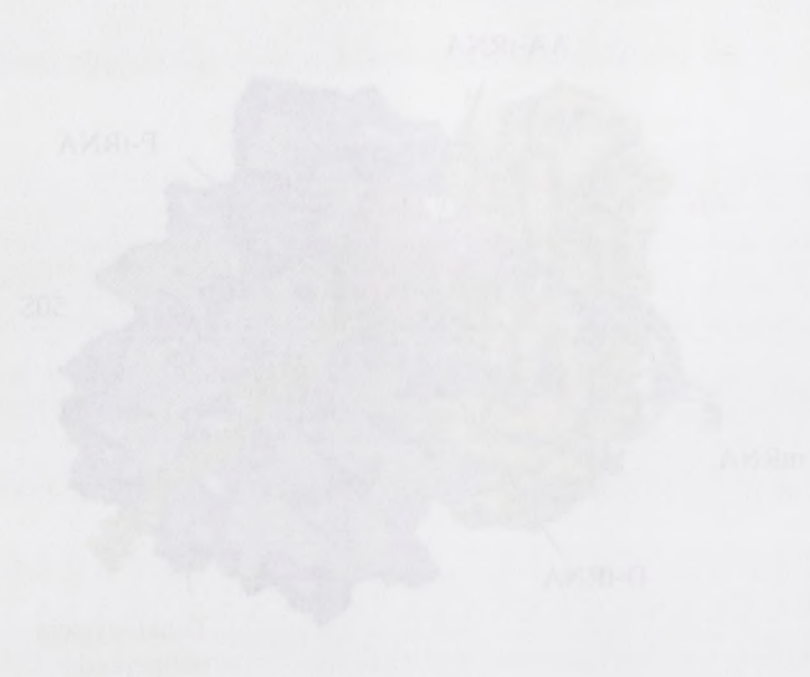


**Rysunek 13. Architektura rybosomu 70S *E. coli*** (na podstawie [52]).

Przedstawiono strukturę krioelektronową rybosomu (podjednostka 30S - kolor pomarańczowy, podjednostka 50S - kolor niebieski) ze zasocjowanymi cząsteczkami: AA-tRNA w miejscu A (kolor różowy), P-tRNA w miejscu P (kolor zielony) i D-tRNA w miejscu E (kolor jasny brązowy). Wmodelowano strukturę krystaliczną cząsteczki mRNA (kolor fioletowy) oraz łańcucha polipeptydowego (kolor jasnobrązowy). Część podjednostki 50S została usunięta w celu ukazania tunelu wyjścia polipeptydu (kolor żółty).

W strukturze II-rzędowej zarówno bakteryjnego jak i eukariotycznego L-rRNA można wyróżnić sześć domen (oznaczane jako I-VI) [1]. W obrębie cząsteczki 5S rRNA wyróżniamy pięć regionów dwuniciowych (oznaczanych jako helisy H I – H V) oraz pięć pętli (oznaczanych jako pętłe A – E) [53]. Sześć domen 23S rRNA wraz z cząsteczką 5S rRNA tworzy skomplikowaną, jednolitą strukturę. W przeciwieństwie do małej podjednostki, domeny 23S rRNA wzajemnie się ze sobą przeplatają. Podział rybosomalnych RNA dużej podjednostki na domeny wraz z ich lokalizacją w strukturze krystalicznej podjednostki 50S *H. marismortui* [1] przedstawiłam na Rysunku 14.

Tak jak w przypadku 40S, po nałożeniu modelu atomowego 50S na mapę krio-EM 60S *H. sapiens* (Rysunek 14D) zauważyć można konserwatywny rdzeń podjednostki. Największe różnice w porównaniu ze strukturą krystaliczną 70S *T. thermophilus* [5] widoczne są w regionie wypukłości L1 oraz L11. Helisy H43 i H44 tworzące wypukłość L11 są przesunięte o 15 Å w kierunku centralnej wypukłości *T. thermophilus*, natomiast helisa H78 jest przesunięta o ponad 30 Å.

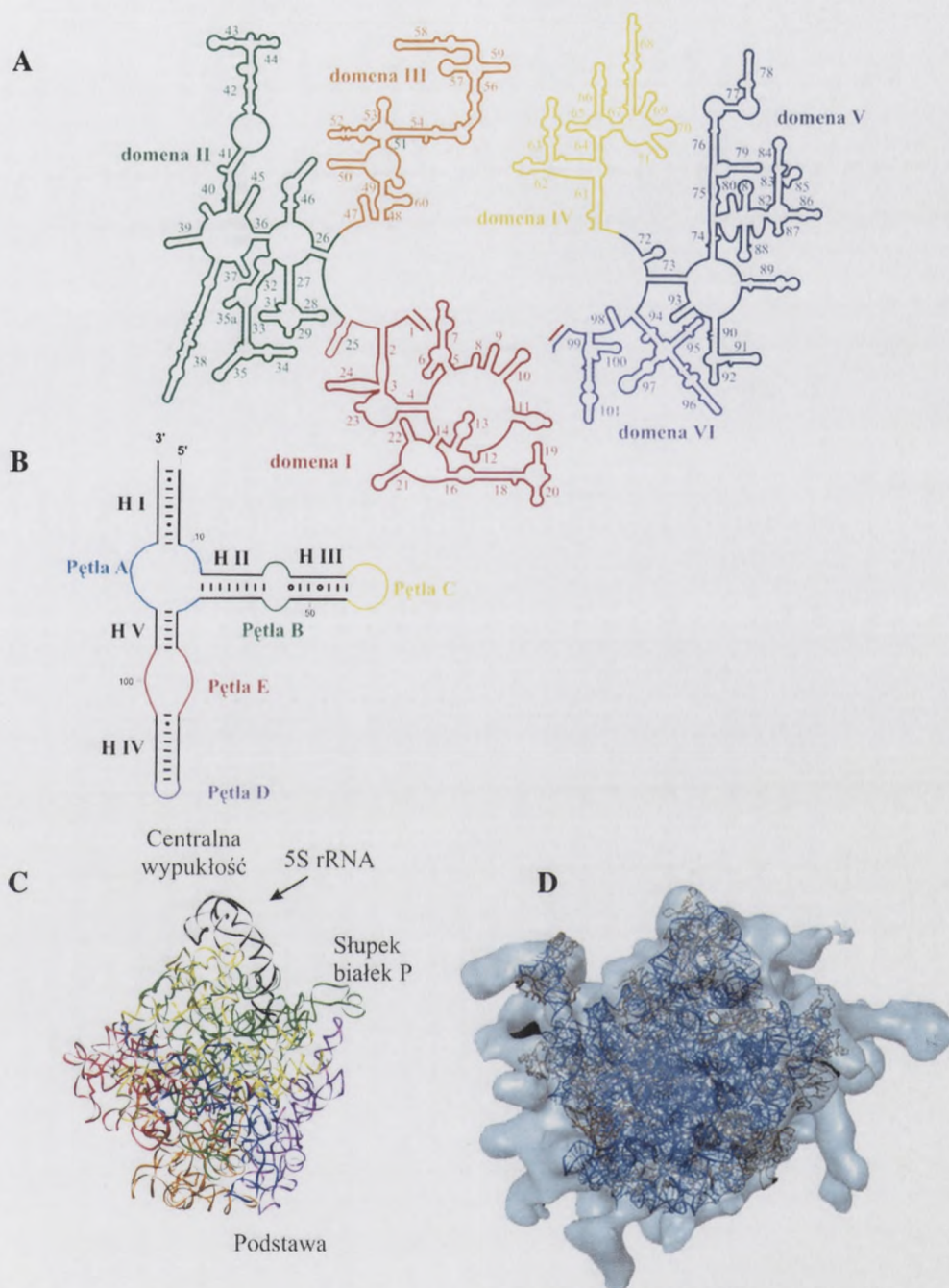


Rysunek 12. Architektura rybosomu 30S E. coli (na podstawie [52]).

Wzrostanie struktur krystalicznych rybosomu (podjednostki 30S - Lator pomarańczowy, podjednostki 50S - kolor niebieski) ze znanymi miejscami wiązania AA-RNA w miejscu A (kolor czerwony), E-RNA w miejscu E (kolor żółty) i P-RNA w miejscu P (kolor zielony) oraz mRNA (kolor czarny) w miejscu E (kolor niebieski). Czarna kropka oznacza miejsce w celu skrzynki polipeptydowej (kolor niebieski). Czerwone kropki oznaczają miejsca wiązania (kolor żółty).

W kontekście II-rzędowej struktury krystalicznej jak i eukaryotycznego L-RNA można wyróżnić sześć domów (oznaczane jako I-VI [1]). W obrębie cząsteczki 23S rRNA wyróżniamy pięć regionów dwunastowych (oznaczanych jako belki H 1 - H 5) oraz pięć pętli (oznaczanych jako pętle A - E) [53]. Sześć domów 23S rRNA wraz z cząsteczką 23S rRNA tworzy skomplikowaną, jednolitą strukturę. W porównaniu do malej podjednostki, domowy 23S rRNA wzrastają nie ze sobą niezależnie. Poziółkocieńskie RNA danej podjednostki na domowy wraz z ich lokalizacją w strukturze krystalicznej podjednostki 30S. W warunkach [1] przedstawiamy na Rysunku 14.

Tak jak w przypadku 50S, po natłoczeniu modelu atomowego 30S na mapę 3D-EM 60S II. etapem (Rysunek 14D) zauważyć można koniecznywywy rządek podjednostki. Najbardziej różnicę w porównaniu ze strukturą krystaliczną 30S T. thermophilus [5] widoczne są w regionie wypukłości L1 oraz L11. Helisy H43 i H44 tworzące wypukłość L11 są szczególnie o 12 Å w kierunku centralnej wypukłości T. thermophilus, natomiast belka H58 jest przesunięta o ponad 30 Å.



**Rysunek 14.** Schemat struktury 23S rRNA (A; struktura pobrana z [22], numer AF034620) i 5S rRNA (B; struktura pobrana z [22], numer AF034620) oraz ich lokalizacja w strukturze krystalicznej dużej podjednostki rybosomalnej 50S (C; struktura pobrana z [23], numer 1FFK) oraz 60S (D; na podstawie [15]).

A, C - kolorami zaznaczone zostały domeny 23S rRNA: czerwony - domena I, zielony - domena II, pomarańczowy - domena III, żółty - domena IV, niebieski - domena V, fioletowy - domena VI; liczby oznaczają numery helis

B - kolorami zaznaczone zostały pętle 5S rRNA: niebieski - pętla A, zielony - pętla B, żółty - pętla C, fioletowy - pętla D, czerwony - pętla E; H I – H V to oznaczenia helis.





rysunki 14. Schematyczny obraz (A) i zdjęcia (B, C, D) kolonii bakterii *Bacillus subtilis* na podłożu krystalicznym (A) i amorficznym (B, C, D).

A, C - kolonia bakterii *Bacillus subtilis* na podłożu krystalicznym - schematyczny obraz i zdjęcie. B - kolonia bakterii *Bacillus subtilis* na podłożu amorficznym - zdjęcie. D - kolonia bakterii *Bacillus subtilis* na podłożu amorficznym - schematyczny obraz.

- **Domena I L-rRNA**

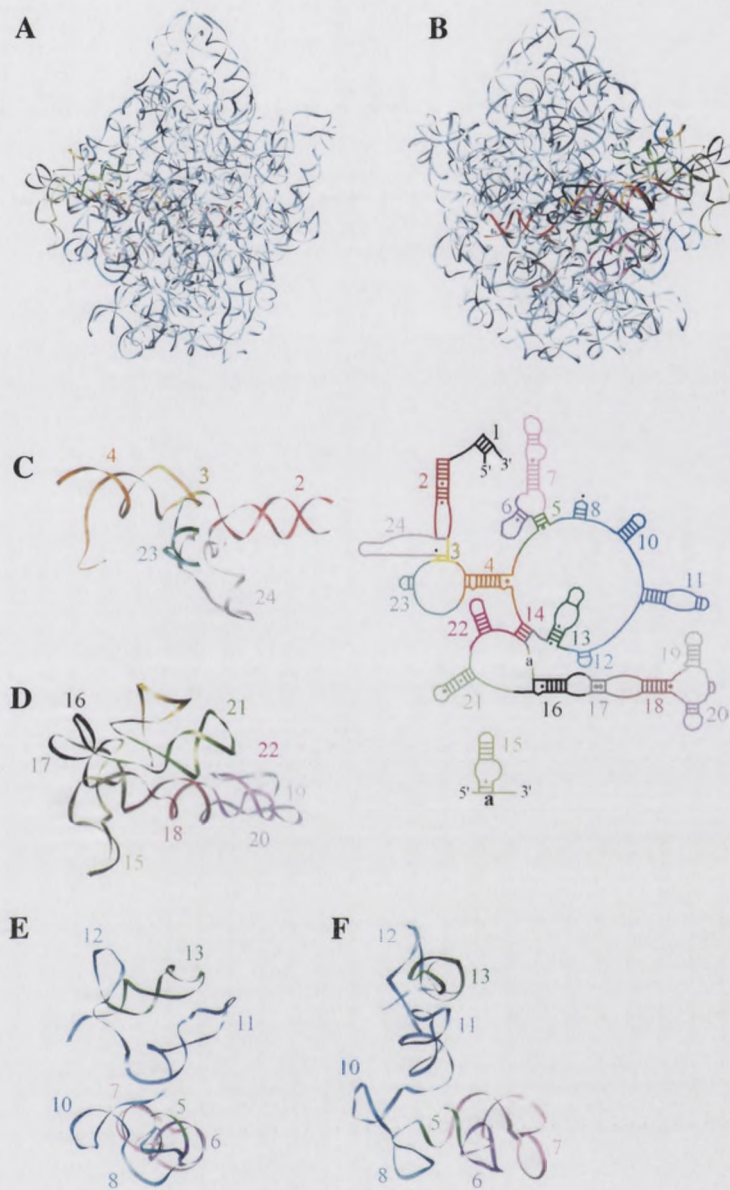
Domena I zbudowana jest z helis H1 – H24 i leży po stronie zewnętrznej podjednostki, poniżej białka L1 [1]. Wąska część tej domeny rozpoczyna się w pobliżu domeny VI, gdzie położone są końce 5' i 3' a następnie rozwija się w strukturę globularną położoną z tyłu, poniżej regionu L1. Dokładne położenie poszczególnych helis tej domeny przestawiłam na schemacie struktury II-rzędowej 23S rRNA *H. marismortui* (struktura pobrana z [22], numer AF034620) oraz w strukturze III-rzędowej podjednostki 50S *H. marismortui* (Rysunek 15, struktura pobrana z [23] numer 1FFK).

Zasadniczą funkcją domeny I jest tworzenie ścian tunelu wyjścia syntetyzowanego przez rybosom polipeptydu, który rozpoczyna się w centrum aktywnym rybosomu w domenie V i przebiegając przez domeny IV, III, II i I, kończy się po zewnętrznej stronie dużej podjednostki rybosomalnej [54]. W obrębie domeny I, w tworzeniu tunelu wyjścia biorą udział nukleotydy 23-37, 53-70, 85-97 oraz 442-517. Domena I oddziałuje ponadto z końcem CCA cząsteczki tRNA w miejscu E (nukleotydy 199 helisy H11 23S rRNA [5]), oraz z sześcioma białkami rybosomalnymi [1, 55]. Helisy H19-H20 silnie oddziałują z białkiem L4, natomiast H2 wraz z H24 - z L22. Oba te białka regulują proces translacji poprzez oddziaływanie z nowo zsyntetyzowanym polipeptydem [12, 45, 46]. Wykazano również, że pary nukleotydowe 194-201, 224-227 oraz 248-257 występujące odpowiednio w helisach H11, H12 i H13 oddziałują z białkiem L15. Zaobserwowano także interakcje między helisami H7 i H19-H20 a białkiem L24 oraz pomiędzy helisami H5-H7 a białkiem L29, dla którego sugeruje się udział w tworzeniu miejsca wiązania SRP (ang. *signal recognition particle*). W strukturze krystalicznej podjednostki 50S *H. marismortui* zaobserwowano także słabe oddziaływania pomiędzy nukleotydami domeny I a białkiem L23 [5].

## • Domains I-IV/A

Domains I zbudowane jest z beta HI - H14 i jest po stronie zewnętrznej podjednostki. Kolejny beta L1 [1]. Wzrosty sąsiadującej domeny rozciągają się w pobliżu domeny VI. Znacząco różni się od 7 i 7' a następnie rozciąga się w strukturę globularną podobną z tymi. Kolejna podjednostka powstaje z beta L1. Kolejna podjednostka powstaje z beta L2, numer sekwencji struktury II-tytułu 322 RNA W. Wzrosty (aminozylowa podjednostka z [22], numer 41034020) oraz w strukturze III-tytułu podjednostki 302 W. Wzrosty (Rybnicki L2, struktura podjednostka z [23] numer 1575).

Zasadniczą funkcją domeny I jest tworzenie ścian tunelu wyjścia syntetyzowanego przez rybosom polipeptydu. Kiedy rozszerza się w kierunku aktywnym rybosomu w domenie V i przemieszcza przez domeny IV, III, II i I. Kiedy się po rozszerzeniu ściany tunelu podjednostki rybosomalnej [24]. W okresie domeny I w tworzeniu tunelu wyjścia białek oraz nukleotydów 23-37, 23-70, 83-97 i 442-517. Domena I oddziałuje ponadto z końcem CCA cząsteczki RNA w miejscu E (nukleotyd 192 beta L1 222 RNA [2]). oraz z sekwencjami białkami rybosomalnymi [1, 25]. Helisy H19-H20 silnie oddziałują z białkami I.A. natomiast H5 oraz H2A - 1122. Ona to białka rybosomalne przyczyniają się do oddziaływania z nowo syntetyzowanym polipeptydem [12, 44, 46]. Wykazano również, że trzy nukleotydowe reszty 194-201, 224-227 oraz 248-251 występują odpowiednio w helisach H11, H12 i H13 oddziałują z białkami I-12. Zbadano również także interakcje między białkami H7 i H19-H20 z białkami L24 oraz kompleksy białek H5-H7 z białkami L29. Dla każdego z nich są białka w tworzeniu miejsca wiązania SRP (ang. signal recognition particle). W strukturze kryształowej podjednostki 302 W. Wzrosty zbadano także silne oddziaływanie pomiędzy nukleotydami domeny I z białkami L23 [2].



**Rysunek 15. Położenie domeny I w strukturze II-rzędowej i III-rzędowej 23S rRNA *H. marismortui* (struktury pobrane odpowiednio z [22], numer AF034620 oraz [23], numer 1FFK).**

Kolorami i numerami zaznaczone zostały poszczególne helisy.

A, C, D, E - widok od strony oddziaływania podjednostek;

B - widok od strony zewnętrznej;

C - F - górna, dolna i środkowa część domeny I oraz odpowiadająca im lokalizacja na diagramie struktury II-rzędowej 23S rRNA *H. marismortui*;

F - rotacja o  $180^\circ$  w lewo w stosunku do E.

W obrębie domeny I rybosomów 80S znaleziono kilka różnic w porównaniu z 70S. Zmiany te są relatywnie niewielkie, ale występują w rejonach funkcjonalnie ważnych, tj. w obrębie helis H7, H18, H19 oraz H20 w rejonie tunelu wyjścia polipeptydu. W strukturze

A

C

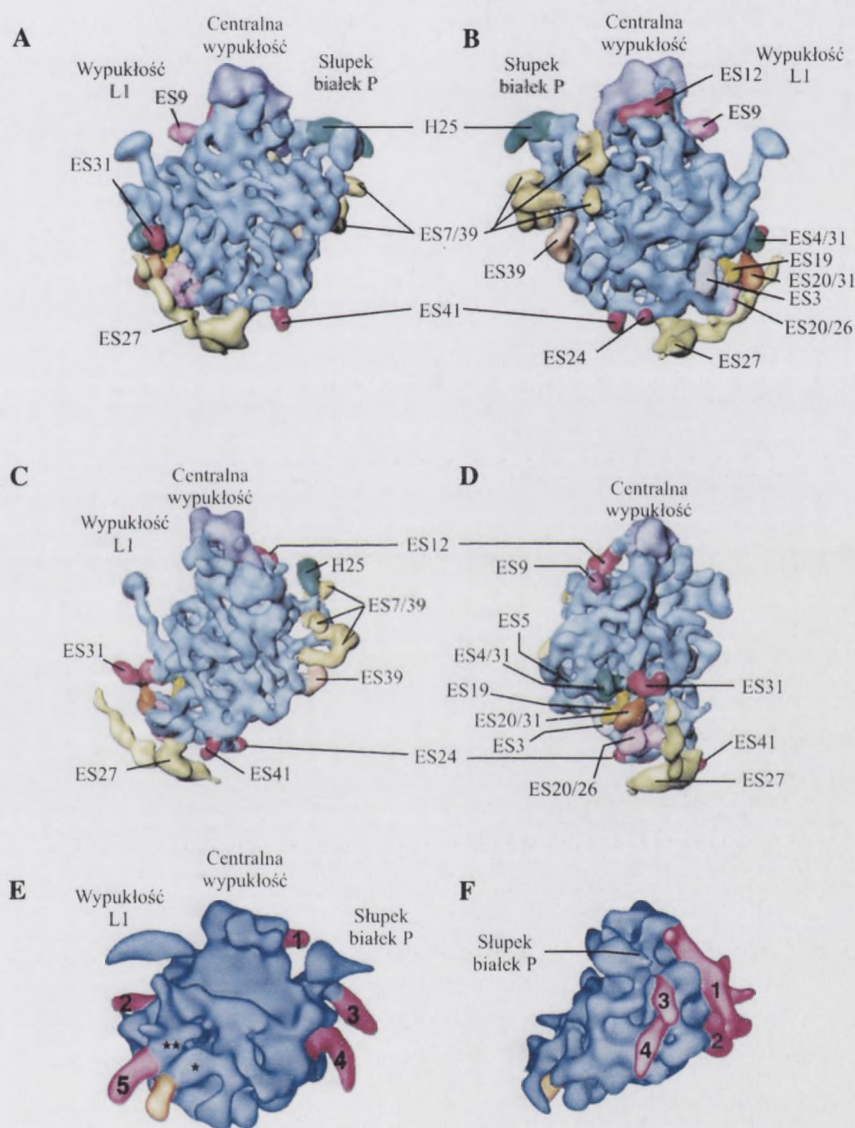
D

E

Rysunek 12. Podstawowe widoki  
 H. surowca (strona 12)  
 IRTK  
 Kolory i numery  
 A, C, D, E - widok od strony  
 B - widok od strony  
 C - F - górna, dolna i  
 strona II-rytuał 12  
 F - oścja o 180° w lewo

W odzie domowa  
 Zmiany to są...  
 odciepie baha H3, H18

rybosomów ssaczych [7, 14, 17] nie obserwowano helisy H1, a w obrębie helis H18 i H19 zauważono dodatkowych 60 nukleotydów. Te sekwencje wstawione nazwano ES4 i ES5. Stwierdzono, że nie występują one oddzielnie, ale tworzą klastry z innymi sekwencjami wstawionymi w innych domenach 25S rRNA (Rysunek 16).



**Rysunek 16.** Sekwencje wstawione w 26S rRNA *S. cerevisiae* [9] oraz *O. cuniculus* [17].

A - D - podjednostka 60S *S. cerevisiae*, widok - odpowiednio, od strony: oddziaływania podjednostek, zewnętrznej, słupka białek P, wypukłości L1;

E - F - podjednostka 60S *O. cuniculus*, widok odpowiednio - od strony oddziaływania podjednostek oraz od strony słupka białek P.

Schemat przedstawia budowę komórki zwierzęcej z etykietami: 1 - błona komórkowa, 2 - błona jądrowa, 3 - błona rybielna, 4 - rybiel, 5 - błona śródrybielna, 6 - rybiel, 7 - błona śródrybielna, 8 - błona jądrowa, 9 - błona komórkowa, 10 - błona śródrybielna, 11 - błona jądrowa, 12 - błona komórkowa, 13 - błona śródrybielna, 14 - błona jądrowa, 15 - błona komórkowa, 16 - błona śródrybielna, 17 - błona jądrowa, 18 - błona komórkowa, 19 - błona śródrybielna, 20 - błona jądrowa, 21 - błona komórkowa, 22 - błona śródrybielna, 23 - błona jądrowa, 24 - błona komórkowa, 25 - błona śródrybielna, 26 - błona jądrowa, 27 - błona komórkowa, 28 - błona śródrybielna, 29 - błona jądrowa, 30 - błona komórkowa, 31 - błona śródrybielna, 32 - błona jądrowa, 33 - błona komórkowa, 34 - błona śródrybielna, 35 - błona jądrowa, 36 - błona komórkowa, 37 - błona śródrybielna, 38 - błona jądrowa, 39 - błona komórkowa, 40 - błona śródrybielna, 41 - błona jądrowa, 42 - błona komórkowa, 43 - błona śródrybielna, 44 - błona jądrowa, 45 - błona komórkowa, 46 - błona śródrybielna, 47 - błona jądrowa, 48 - błona komórkowa, 49 - błona śródrybielna, 50 - błona jądrowa, 51 - błona komórkowa, 52 - błona śródrybielna, 53 - błona jądrowa, 54 - błona komórkowa, 55 - błona śródrybielna, 56 - błona jądrowa, 57 - błona komórkowa, 58 - błona śródrybielna, 59 - błona jądrowa, 60 - błona komórkowa, 61 - błona śródrybielna, 62 - błona jądrowa, 63 - błona komórkowa, 64 - błona śródrybielna, 65 - błona jądrowa, 66 - błona komórkowa, 67 - błona śródrybielna, 68 - błona jądrowa, 69 - błona komórkowa, 70 - błona śródrybielna, 71 - błona jądrowa, 72 - błona komórkowa, 73 - błona śródrybielna, 74 - błona jądrowa, 75 - błona komórkowa, 76 - błona śródrybielna, 77 - błona jądrowa, 78 - błona komórkowa, 79 - błona śródrybielna, 80 - błona jądrowa, 81 - błona komórkowa, 82 - błona śródrybielna, 83 - błona jądrowa, 84 - błona komórkowa, 85 - błona śródrybielna, 86 - błona jądrowa, 87 - błona komórkowa, 88 - błona śródrybielna, 89 - błona jądrowa, 90 - błona komórkowa, 91 - błona śródrybielna, 92 - błona jądrowa, 93 - błona komórkowa, 94 - błona śródrybielna, 95 - błona jądrowa, 96 - błona komórkowa, 97 - błona śródrybielna, 98 - błona jądrowa, 99 - błona komórkowa, 100 - błona śródrybielna.



Klasyfikacja komórek zwierzęcych (zgodnie z [17]).  
 A - D - komórki zwierzęce, różne - odpowiednio, od strony oddziaływania podłoża, rozwijający się blastula, wycięcie L1.  
 E - F - komórki zwierzęce, różne - odpowiednio - od strony oddziaływania podłoża, oraz od strony struktury L1.

• **Domena II L-rRNA**

Domena II jest największą z sześciu domen 23S rRNA i stanowi największy obszar zewnętrznej części podjednostki (Rysunek 17). Zawiera helisy H25 – H46.



**Rysunek 17. Położenie domeny II w strukturze II-rzędowej i III-rzędowej 23S rRNA *H. marismortui* (struktury pobrane odpowiednio z [22], numer AF034620 oraz [23], numer 1FFK).**

Kolorami i numerami zaznaczone zostały poszczególne helisy.

A, C, D, E - widok od strony oddziaływania podjednostek;

B - widok od strony zewnętrznej;

C - E - górna, środkowa i dolna część domeny II oraz odpowiadająca im lokalizacja na diagramie struktury II-rzędowej 23S rRNA *H. marismortui*.



• Dotsy 11

Dotsy 11

rewrotey ctye

A

C

B

E

Рывок 17. Полюс

В. маршрут (станция)

ИРКЛ

Колонн: маршрут

A, C, D, E - вид от

B - вид от

C - E - для

маршрут B-12000

W strukturze domeny II można wyróżnić trzy wystające elementy, skierowane w stronę płaszczyzny oddziaływania podjednostek [1]. Jeden z nich (zawierający helisy H42 – H44) stanowi rusztowanie wypukłości L7/L12. Fragmenty helis H43 i H44 domeny I (nukleotydy w pozycjach 1051 – 1108) wraz z fragmentem domeny VI i białkami L6, L11, L4 i L7/L12 tworzą centrum GTPazowe rybosomu (ang. *GTPase-associated centre*, GAC) [56, 57]. Centrum to odpowiedzialne jest za wiązanie czynników elongacyjnych (EF-1 i EF-2), czynnika inicjującego IF-2 i czynnika uwalniającego RF3. Wszystkie te czynniki należą do białek wykazujących właściwości GTPazy. Druga wypukłość domeny II to helisa H38, która jest najdłuższą nierozgałęzioną helisą w podjednostce. Rozpoczyna się ona od strony zewnętrznej 50S, zagina pod kątem około  $90^\circ$  i kieruje w stronę małej podjednostki pomiędzy domeną V 23S rRNA a cząsteczką 5S rRNA. Ponadto, nukleotydy 881-883 oraz 898-899 oddziałują odpowiednio z nukleotydami 17-19 pętli DHU oraz nukleotydem 56 pętli T $\Psi$ C cząsteczki tRNA w miejscu A. Trzeci region domeny II (helisy H32 – H35.1) skierowany jest dokładnie w kierunku małej podjednostki. Jego koniec, pętla helisy H34, oddziałuje z helisą h20 i białkiem S15 małej podjednostki, tworząc mostek B4 [1].

Znaczny fragment domeny II tworzy również ściany tunelu wyjścia polipeptydu [50]. Z domeną tą oddziałuje aż 15 rybosomalnych białek dużej podjednostki [1, 55]. Są to białka L1, L3, L4, L6, L9, L10, L11, L13, L15 oraz L30, wykazujące silne oddziaływania z nukleotydami 23S rRNA oraz białka L2, L5, L18 i L12, oddziałujące słabiej z L-rRNA w obrębie tej domeny.

W domenie II 25S rRNA *S. cerevisiae* zidentyfikowano kilka sekwencji wstawionych, które są odpowiedzialne za występowanie dodatkowych wypukłości RNA pod słupkiem białek P [9]. Główna sekwencja wstawiona określana jako ES7 występuje się w helisie H25. Insercję tę obserwowano również w rybosomach ssaczycy jako wydłużony kołec (Rysunek 6E, F), prawdopodobnie utworzony przez dwuniciowe rRNA o długości powyżej 400 nt [7, 14, 17]. W przypadku podjednostki 50S *R. norvegicus* insercja ta ma 760 nt długości, a u *H. sapiens* jest dłuższa aż o 655 nukleotydów niż ES7 *S. cerevisiae* [15]. Mniejsza część tej dodatkowej sekwencji znajduje się poniżej słupka białek P, natomiast większa część tworzy strukturę w kształcie litery V po zewnętrznej stronie podjednostki 60S.

Dwie mniejsze insercje, ES9 oraz ES12, ulokowane są z tyłu wypukłości centralnej (Rysunek 16B) [7, 9]. ES9 ma długość około 30-50 nukleotydów u *R. norvegicus*. ES12 jest insercją w helisie H38, która jest związana z tworzeniem mostka między podjednostkami oraz wykazuje interakcje z ASF. W przypadku rybosomów *R. norvegicus*, insercja ta ma 90 nukleotydów długości. ES12 biegnie z tyłu centralnej wypukłości w kierunku L1. Przypuszcza

W strukturze domeny II można wyróżnić trzy regiony: pierwszy, składający się z sekwencji 1081-1108 oraz z fragmentu domeny VI i białka L1, L2 i L3; drugi, składający się z sekwencji 1109-1136 oraz z fragmentu domeny VII i białka L4, L5 i L6; trzeci, składający się z sekwencji 1137-1164 oraz z fragmentu domeny VIII i białka L7, L8 i L9. W regionie pierwszym znajdują się dwa regiony: pierwszy, składający się z sekwencji 1081-1108 oraz z fragmentu domeny VI i białka L1, L2 i L3; drugi, składający się z sekwencji 1109-1136 oraz z fragmentu domeny VII i białka L4, L5 i L6. W regionie drugim znajdują się dwa regiony: pierwszy, składający się z sekwencji 1137-1164 oraz z fragmentu domeny VIII i białka L7, L8 i L9; drugi, składający się z sekwencji 1165-1192 oraz z fragmentu domeny IX i białka L10, L11 i L12. W regionie trzecim znajdują się dwa regiony: pierwszy, składający się z sekwencji 1193-1220 oraz z fragmentu domeny X i białka L13, L14 i L15; drugi, składający się z sekwencji 1221-1248 oraz z fragmentu domeny XI i białka L16, L17 i L18. W regionie pierwszym znajdują się dwa regiony: pierwszy, składający się z sekwencji 1081-1108 oraz z fragmentu domeny VI i białka L1, L2 i L3; drugi, składający się z sekwencji 1109-1136 oraz z fragmentu domeny VII i białka L4, L5 i L6. W regionie drugim znajdują się dwa regiony: pierwszy, składający się z sekwencji 1137-1164 oraz z fragmentu domeny VIII i białka L7, L8 i L9; drugi, składający się z sekwencji 1165-1192 oraz z fragmentu domeny IX i białka L10, L11 i L12. W regionie trzecim znajdują się dwa regiony: pierwszy, składający się z sekwencji 1193-1220 oraz z fragmentu domeny X i białka L13, L14 i L15; drugi, składający się z sekwencji 1221-1248 oraz z fragmentu domeny XI i białka L16, L17 i L18.

Znaczący fragment domeny II tworzy również krótki fragment białka L1, L2 i L3, który jest odpowiedzialny za wiązanie z RNA. W regionie pierwszym znajdują się dwa regiony: pierwszy, składający się z sekwencji 1081-1108 oraz z fragmentu domeny VI i białka L1, L2 i L3; drugi, składający się z sekwencji 1109-1136 oraz z fragmentu domeny VII i białka L4, L5 i L6. W regionie drugim znajdują się dwa regiony: pierwszy, składający się z sekwencji 1137-1164 oraz z fragmentu domeny VIII i białka L7, L8 i L9; drugi, składający się z sekwencji 1165-1192 oraz z fragmentu domeny IX i białka L10, L11 i L12. W regionie trzecim znajdują się dwa regiony: pierwszy, składający się z sekwencji 1193-1220 oraz z fragmentu domeny X i białka L13, L14 i L15; drugi, składający się z sekwencji 1221-1248 oraz z fragmentu domeny XI i białka L16, L17 i L18.

W domenie II 235 RNA 2. Wykazuje ono podobieństwo do białka L1, L2 i L3, które jest odpowiedzialne za wiązanie z RNA. W regionie pierwszym znajdują się dwa regiony: pierwszy, składający się z sekwencji 1081-1108 oraz z fragmentu domeny VI i białka L1, L2 i L3; drugi, składający się z sekwencji 1109-1136 oraz z fragmentu domeny VII i białka L4, L5 i L6. W regionie drugim znajdują się dwa regiony: pierwszy, składający się z sekwencji 1137-1164 oraz z fragmentu domeny VIII i białka L7, L8 i L9; drugi, składający się z sekwencji 1165-1192 oraz z fragmentu domeny IX i białka L10, L11 i L12. W regionie trzecim znajdują się dwa regiony: pierwszy, składający się z sekwencji 1193-1220 oraz z fragmentu domeny X i białka L13, L14 i L15; drugi, składający się z sekwencji 1221-1248 oraz z fragmentu domeny XI i białka L16, L17 i L18.

Dwie inne sekwencje, E27 i E28, znajdują się w regionie pierwszym. E27 ma długość 30-50 nukleotydów i jest odpowiedzialna za wiązanie z RNA. E28 ma długość 30-50 nukleotydów i jest odpowiedzialna za wiązanie z RNA. W regionie pierwszym znajdują się dwa regiony: pierwszy, składający się z sekwencji 1081-1108 oraz z fragmentu domeny VI i białka L1, L2 i L3; drugi, składający się z sekwencji 1109-1136 oraz z fragmentu domeny VII i białka L4, L5 i L6. W regionie drugim znajdują się dwa regiony: pierwszy, składający się z sekwencji 1137-1164 oraz z fragmentu domeny VIII i białka L7, L8 i L9; drugi, składający się z sekwencji 1165-1192 oraz z fragmentu domeny IX i białka L10, L11 i L12. W regionie trzecim znajdują się dwa regiony: pierwszy, składający się z sekwencji 1193-1220 oraz z fragmentu domeny X i białka L13, L14 i L15; drugi, składający się z sekwencji 1221-1248 oraz z fragmentu domeny XI i białka L16, L17 i L18.

się, że działa jako podpora, która wraz z cząsteczką 5S rRNA może brać udział w zazębieniu się zmian konformacyjnych tych fragmentów rybosomu, które oddziałują z domenami T $\Psi$ C i DHU tRNA w miejscach A i P. Apikalna pętla ES12 wykazuje interakcje z białkiem wiążącym 5S RNA (L15) w obrębie sekwencji specyficznej w tym białku jedynie dla eukariota.

Dodatkową wypukłość przypominającą palec (oznaczoną jako 4 na Rysunek 16E, F) obserwowano w tylnej części podjednostki *O. cuniculus* pod słupkiem białek P. Jest to insercja ES15 w helisie H45. Jest ona zbudowana z fragmentów rRNA o długości około 100 nt. Insercję w tym samym rejonie, długości 125 nukleotydów zaobserwowano również w rybosomach *R. norvegicus*, gdzie zidentyfikowano dodatkowych 90 nukleotydów również w obrębie helisy H29 [7]. Natomiast w strukturze podjednostki 60S *T. cruzi* i *H. sapiens* zidentyfikowano dużą helikalną strukturę, nazwaną kolcem, która występuje pomiędzy centralną wypukłością a helisą H38 po zewnętrznej stronie podjednostki (Rysunek 12 C, D) [11].

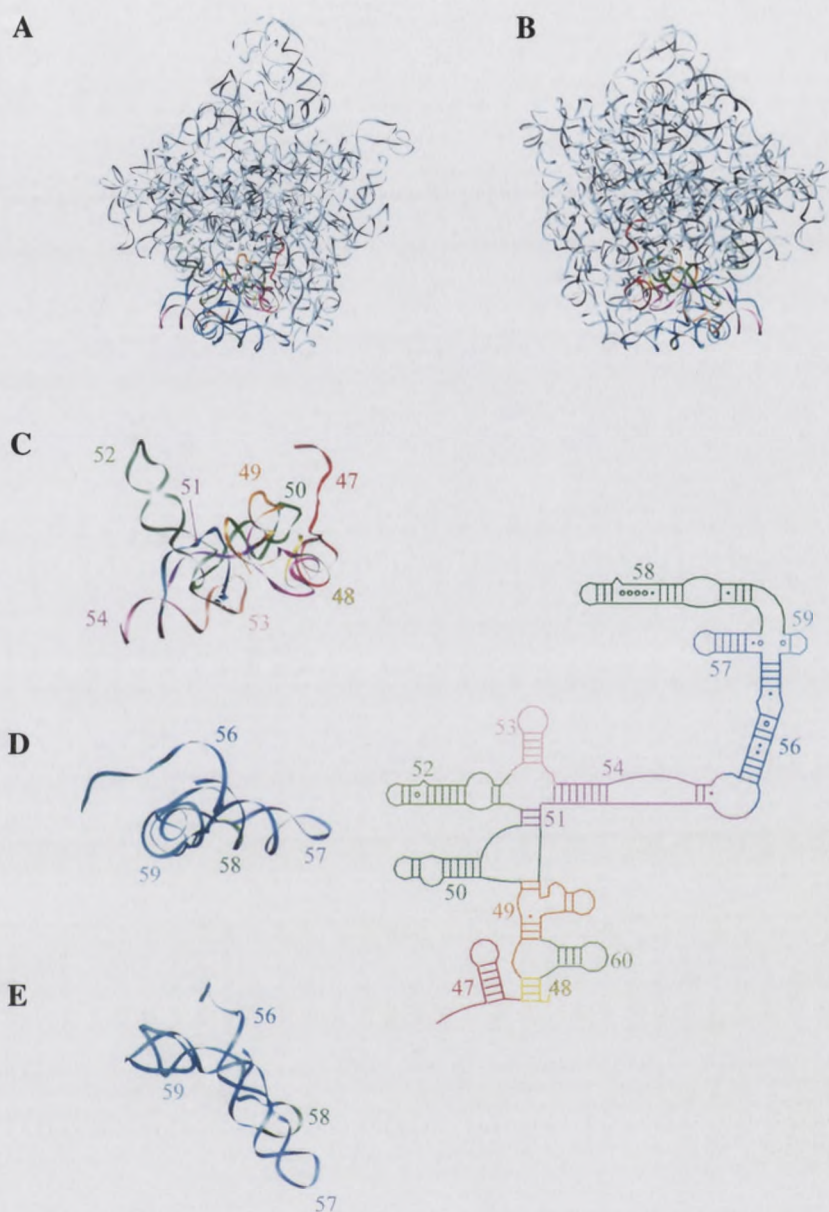
- **Domena III L-rRNA**

Domena III jest zwartą, globularną domeną, składającą się z helis H47 – H60 [1]. Zajmuje ona spodnią lewą część dużej podjednostki (Rysunek 18). Kształtem przypomina czteroramienną gwiazdę, której wierzchołki stanowią helisy: H48, H52, H57 i H58. Najbardziej rozległe oddziaływania domeny III mają miejsce z fragmentami domen I, IV i VI.

Strukturę domeny III stabilizują oddziaływania z czterema białkami, tj. z L2, L3, L22 oraz L23 [1]. Najistotniejszym fragmentem są nukleotydy 1262-1621, które tworzą tunel wyjścia polipeptydu [50].

W obrębie domeny III zidentyfikowano dwie sekwencje wstawione w rybosomach ssaczych [14]. Występują one w helisach H52 (35 dodatkowych nukleotydów) oraz H54 (insercja 40 nukleotydów).





**Rysunek 18. Położenie domeny III w strukturze II-rzędowej i III-rzędowej 23S rRNA *H. marismortui* (struktury pobrane odpowiednio z [22], numer AF034620 oraz [23], numer 1FFK).**

Kolorami i numerami zaznaczone zostały poszczególne helisy.

A, C, D, E - widok od strony oddziaływania podjednostek;

B - widok od strony zewnętrznej;

C, D, E - dolna, górna i środkowa część domeny III oraz odpowiadająca im lokalizacja na diagramie struktury II-rzędowej 23S rRNA *H. marismortui*;

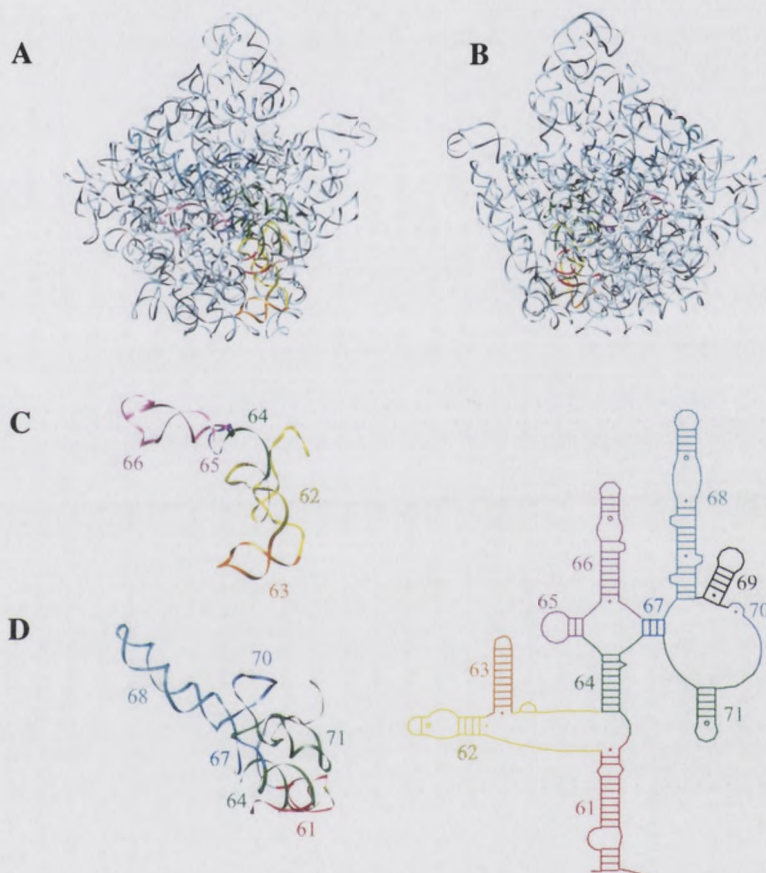
E - rotacja o  $90^\circ$  w prawo w stosunku do D.



B - rozmiar i kształt komórki mięśniowej w różnych częściach serca  
 C, D, E - różnica w budowie naczyń krwionośnych w zależności od rodzaju krwi i odległości od serca  
 F - różnica w budowie naczyń krwionośnych w zależności od rodzaju krwi i odległości od serca

- **Domena IV L-rRNA**

Domena IV zbudowana jest z helis H61 – H71. Zajmuje ona większą część płaszczyzny podjednostki 50S, która oddziałuje z 30S (Rysunek 19) [1]. Tworzy ona duży przekątny płat płaskiej powierzchni rybosomu i łączy się z domenami III i V po zewnętrznej stronie rybosomu.



**Rysunek 19. Położenie domeny IV w strukturze II-rzędowej i III-rzędowej 23S rRNA *H. marismortui* (struktury pobrane odpowiednio z [22], numer AF034620 oraz [23], numer 1FFK; w helisie H69 brak nukleotydów w pozycjach 1952-1963).**

Kolorami i numerami zaznaczone zostały poszczególne helisy.

A, C-D - widok od strony oddziaływania podjednostek;

B - widok od strony zewnętrznej;

C, D - dolna i górna część domeny IV oraz odpowiadająca im lokalizacja na diagramie struktury II-rzędowej 23S rRNA *H. marismortui*.

Helisy H67 – H71 stanowią najważniejszą część domeny IV i formują brzeg szczeliny miejsca aktywnego (por. Rysunek 12F). Jest to jeden z niewielu regionów 23S rRNA, który nie jest stabilizowany przez białka rybosomalne. Stwierdzono również interakcje helisy H69 położonej w centralnym miejscu brzegu szczeliny z pętlą DHU cząsteczki tRNA zajmującej



• Domena IV

Domena IV...  
podjednostki 30S...  
plazmid powierzchniowy...  
rybosom.

A

C

D

Ryzyk 19. Istotne...  
B. nurkowat...  
w białku Hb...  
kolony i...  
A, C, D - widok od strony...  
E - widok od strony...  
C, D - doina i gona...  
II. rdzowej 132 rRNA...

Holizy Hb7 -...  
niższa...  
jest stabilizowany...  
potencji w...

zarówno miejsce A (nukleotydy 11 i 12 tRNA oddziałują z nukleotydami 1914 i 1915 23S rRNA; nukleotydy 25 i 26 tRNA oddziałują z nukleotydami 1913 i 1914 23S rRNA [5]), jak i miejsce P (nukleotydy 12 i 13 tRNA oddziałują z nukleotydami 1908 i 1909 23S rRNA; nukleotydy 25 i 26 tRNA oddziałują z nukleotydami 1922 i 1923 23S rRNA). W interakcjach z cząsteczką tRNA zajmującą rybosomalne miejsce P biorą również udział nukleotydy w pozycjach: 1916, 1918, 1926 oraz 1924. Oddziaływania te występują zarówno w rybosomach 80S [9] jak i 70S [5, 19]. Helisa H69 oddziałuje również z helisą h44 16S rRNA tworząc mostek między podjednostkami 40S i 60S. Fakt ten może mieć znaczący wpływ na dynamikę translacji, a szczególnie na sam mechanizm translokacji cząsteczek tRNA [9]. Pięć spośród nukleotydów helisy H68 jest zaangażowanych w oddziaływania z łodygą akceptorową cząsteczki tRNA w rybosomalnym miejscu E [5, 58]. Ponadto, część akceptorowa cząsteczki tRNA w miejscu A jest stabilizowana poprzez interakcje z nukleotydami 1942 i 1943 helisy H71 [5].

W obrębie całej domeny IV, jedynie nukleotydy 1654-1660 oraz 1992-2000 helisy H61 wykazują oddziaływania z białkiem rybosomalnym L3, helisa H66 wiąże białko L2, a helisa H62 odpowiada za interakcje z białkiem L14 [5, 55].

W helisie H63 domeny IV zidentyfikowano dużą insercję (560 nukleotydów w rybosomach ssaczych, [17]) nazwaną ES27. Helisa H63 zajmuje dolną część podjednostki 60S w płaszczyźnie między podjednostkami i biegnie od strony słupka białek P do wypukłości L1. ES27 umiejscowiona jest po stronie L1 podjednostki (por. Rysunek 16 A-D). W strukturze rybosomów ssaczych jest ona widoczna jako wydłużony kolec (oznaczony jako 2 na Rysunku 17E, F) a w rybosomach *S. cerevisiae* przyjmuje charakterystyczną strukturę helikalną [9]. Struktura ta nie jest widoczna w podjednostce 60S *T. lanuginosus*, co wskazuje na jej niską zachowawczość [31]. ES27 najprawdopodobniej odgrywa rolę w regulowaniu dostępu czynników biorących udział w biosyntezie białka do tunelu wyjścia polipeptydu [59]. W przypadku rybosomów ssaczych zaobserwowano również delecję 15 nukleotydów w obrębie helisy H68 [17].

1.1. Zmiany w...  
zarówno miejsc...  
332 rRNA; noś...  
jak i miejsc P (m...  
nubiozidy 22 i 24...  
z częścią rRNA...  
w pozycjach 19...  
w rybosomach 80S...  
tworząc model...  
dynamik transla...  
spórów nubi...  
części rRNA w...  
rRNA w miejsc...  
H71 [5].  
W odnie...  
wyznaczyć oddzia...  
1182 odnośn...  
W helisie 163...  
rybosomach...  
w płaszczyźnie...  
E237 zmiesz...  
rybosomów...  
Rysunek 17E, F) ...  
helikalną [9]. Stru...  
na jej niżej...  
dotyczy czynn...  
W przypadku...  
w odnie helisy 163 [10].

- **Domena V L-rRNA**

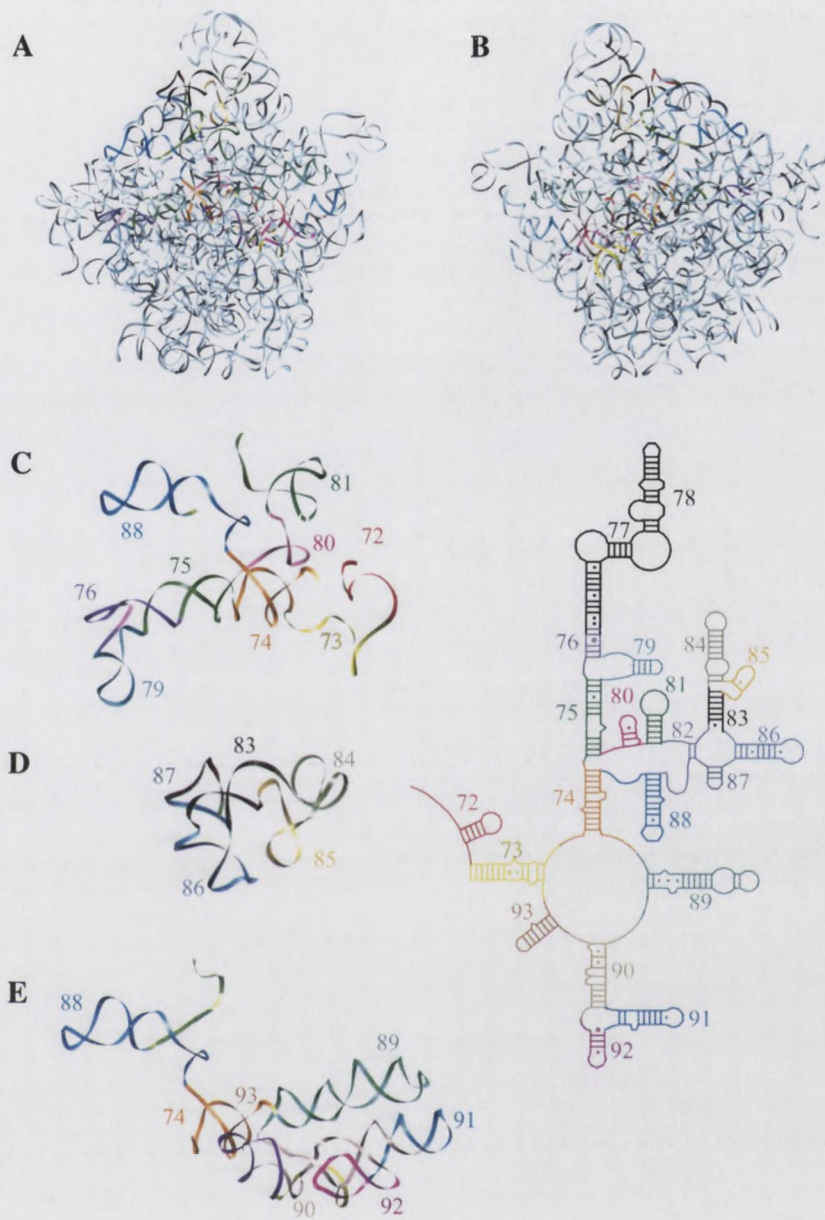
Domena V, zawierająca helisy H72 – H93, jest umiejscowiona pomiędzy domenami IV i II (Rysunek 20). Centralna pętla domeny V, którą otaczają helisy H74, H89, H90, H93 i H73 stanowi centrum peptydylotransferazowe (PTC), którego funkcją jest synteza wiązania peptydowego oraz uwalnianie utworzonego polipeptydu z peptydylo-tRNA podczas terminacji translacji [1]. Domenę V można podzielić na trzy strukturalne regiony. Pierwszy rozpoczyna się helisą H75 i tworzy miejsce wiązania białka L1. Drugi zawiera helisy H80 – H88, położony jest między cząsteczką 5S rRNA i domeną II. Trzeci region (helisy H89 – H93) rozciąga się w kierunku domeny VI i pomaga stabilizować miejsce wiązania czynników elongacyjnych na rybosomie [24]. Wykazano, że helisy H80 i H93 23S rRNA są zaangażowane w oddziaływania z końcem CCA cząsteczek tRNA zajmujących rybosomalne miejsca P i E, natomiast nukleotydy tworzące helisę H89 silnie oddziałują z pętlą TΨC oraz końcem CCA cząsteczki tRNA w miejscu A [5, 9, 60-63].

W domenie V znaleziono kilka niewielkich sekwencji wstawionych. W helisie H78 obserwowano ES30 w rybosomach ssaczyc [17] i *H. sapiens* [11]. Stwierdzono, że ma ona długość 30-50 nukleotydów i jest odpowiedzialna za dodatkową masę w strukturze rybosomów w dolnej części podjednostki od strony wypukłości L1 (ES30 przedstawiona jest jako 5 na Rysunku 16E, F). Dodatkowa sekwencja około 65 nukleotydów (ES31) znajduje się w helisie H79. Stwierdzono, że w związku z obecnością ES31 w podjednostce *S. cerevisiae*, helisa H79 wykazuje interakcje z domenami I i III [9]. Ponadto H79 ułożona jest warstwowo nad helisą H76, która z kolei stanowi podstawę wypukłości L1. Takie ułożenie helis może mieć wpływ na duże zmiany konformacyjne w obrębie wypukłości L1 w rybosomie *S. cerevisiae*. Co więcej, ES31 bierze udział w tworzeniu mostka między podjednostkami.

• Działanie V-Li-RNA

Działanie V, zawierające belki H12 - H19, jest umiejscowione pomiędzy domenami IV i II (Rysunek 2b). Członiczą częścią domeny V, którą tworzą belki H14, H18, H19, H23 i H25 stanowi centrum peptydylotransferazy (PTC), którego funkcją jest synteza wiązania peptydowego oraz uwolnienie uwolnionego polipeptydu z peptydylo-RNA podczas terminacji translacji (1). Działanie V można podzielić na trzy subdomaine regiony. Pierwszy rozpoczyna się belką H12 i tworzy miejsce wiązania belki L1. Drugi zawiera belki H18 - H19, położony jest między cząstką 32 rRNA i domeną II. Trzeci region (belki H18 - H19) tworzy się w licznych domenach VI i pomaga stabilizować miejsce wiązania cząsteczek elongacyjnych na rybosomie (24). Wykazano, że belki H18 i H19 32 rRNA są zaangażowane w oddziaływanie z końcem CCA cząsteczki rRNA związanych rybosomów miejsca P i E, natomiast nakładający tworząc belki H18 i H19 silnie oddziałują z belką TPC oraz końcem CCA cząsteczki rRNA w miejscu A (2, 25-27).

W domenie V zachodzą kilka niezależnych sekwencji wiązaniowych. W belce H12 utworzono E231 w globularnej sekwencji [15]. Stwierdzono, że ten obszar wiąże 30-50 nukleotydów i jest odpowiedzialny za dodatkową masę w strukturze rybosomów w dolnej części podjednostki od strony wyjątkowej L1 (E230) przedstawionej (patrz także 2 na Rysunku 10E, F). Lokalizacja sekwencji około 65 nukleotydów (E231) znajduje się w belce H19. Stwierdzono, że w sekwencji obszar E231 w podjednostce 2 tworzy belkę H19 wyjątkowo intensywnie z domeną I i II (9). Belka H19 natomiast jest warunkowo nad belką H16, która z kolei stanowi podjednostkę wyjątkową L1. Także miejsce belki może mieć wpływ na duże zmiany konformacyjne w obszarze wyjątkowej L1 w rybosomie 2, tworząc Co-wielkość E231 bierze udział w tworzeniu miejsca wiązania podjednostkami.



**Rysunek 20. Położenie domeny V w strukturze II-rzędowej i III-rzędowej 23S rRNA *H. marismortui* (struktury pobrane odpowiednio z [22], numer AF034620 oraz [23], numer 1FFK; brak nukleotydów 137-236 stanowiących helisy H77, H78 i fragment H76).**

Kolorami i numerami zaznaczone zostały poszczególne helisy.

A, C, D, E - widok od strony oddziaływania podjednostek;

B - widok od strony zewnętrznej;

C, D, E - górna, dolna i środkowa część domeny V oraz odpowiadająca im lokalizacja na diagramie struktury II-rzędowej 23S rRNA *H. marismortui*.

A

Handwritten notes in the upper right quadrant, possibly including a date or reference number.

C

Handwritten notes in the middle right quadrant, including a date '10. 10. 10.' and other illegible text.

D

Handwritten notes in the lower middle right quadrant.

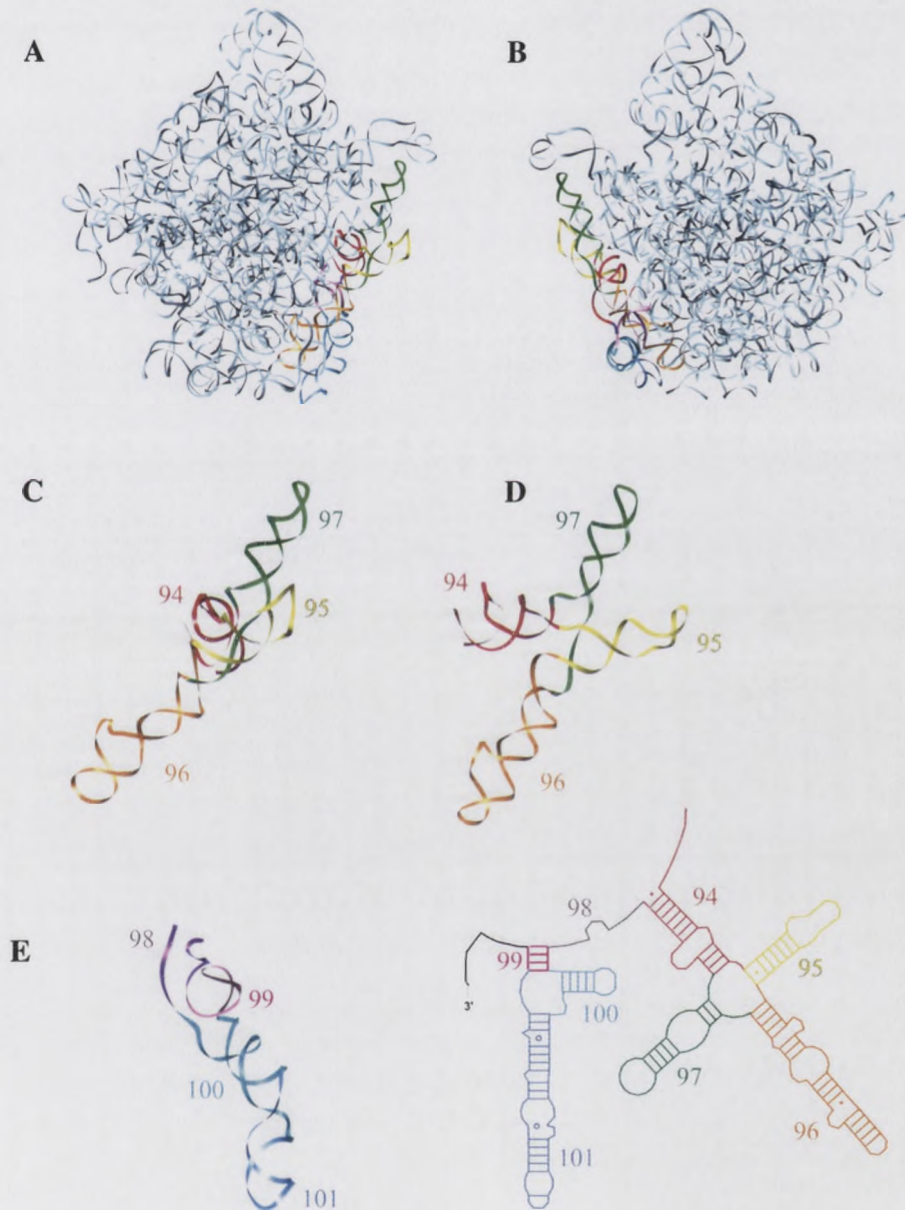
E

Handwritten notes in the lower right quadrant.

Handwritten notes at the bottom of the page, including a date '10. 10. 10.' and other illegible text.

- **Domena VI L-rRNA**

Najmniejsza z domen L-rRNA, domena VI, zbudowana jest z helis H94 – H101 i tworzy dużą część powierzchni podjednostki bezpośrednio poniżej słupka białek P [1]. Domena ta kształtem przypomina literę X (por. Rysunek 21 D).



**Rysunek 21.** Położenie domeny VI w strukturze II-rzędowej i III-rzędowej 23S rRNA *H. marismortui* (struktury pobrane odpowiednio z [22], numer AF034620 oraz [23], numer 1FFK).

Kolorami i numerami zaznaczone zostały poszczególne helisy.

A, C, D, E - widok od strony oddziaływania podjednostek;

B - widok od strony zewnętrznej;

C, D, E - górna i dolna część domeny VI oraz odpowiadająca im lokalizacja na diagramie struktury II-rzędowej 23S rRNA *H. marismortui*

D - rotacja o 90° w lewo w stosunku do C.



### Domena VI i RNA

Wskazywana jest domena VI, zbudowana jest z helix H24 - H101 i tworzy ona część powstającą podobnie jak w przypadku innych domen VI (Domena ta została przypisana literze X (patrz Rysunek 31 D)).



Rysunek 31. Domena domeny VI w strukturze II-trybony i III-trybony 13S RNA. B - widok od strony przeciwniej powstającej podobnie jak w przypadku innych domen VI (Domena ta została przypisana literze X (patrz Rysunek 31 D)). C, D, E - domena i jej część domeny VI oraz odpowiednio III i IV trybony 13S RNA. D - widok od strony przeciwniej powstającej podobnie jak w przypadku innych domen VI (Domena ta została przypisana literze X (patrz Rysunek 31 D)). E - widok od strony przeciwniej powstającej podobnie jak w przypadku innych domen VI (Domena ta została przypisana literze X (patrz Rysunek 31 D)).

Najbardziej interesującym fragmentem tej domeny jest pętla sarcyny-rycyny (ang. *sarcin-ricin loop*, SRL), którą kształtuje helisa H95. Nazwa SRL związana jest z bliskością: (1) miejsca w L-rRNA podlegającego selektywnej depurynacji przez grupę roślinnych białkowych rybotoksyn określanych mianem RIP (ang. *ribosome inactivating protein*), takich jak rycyna; (2) miejsca cięcia L-rRNA przez endorybonukleazy, których przedstawicielem jest  $\alpha$ -sarcyna. Stwierdzono, że rybosomy ulegają całkowitej inaktywacji po hydrolizie tylko jednego wiązania fosfodiestrowego w tej pętli [64]. SRL jest zasadnicza dla wiązania czynnika uwalniającego RF3, czynników elongacyjnych EF-G (nukleotydy 2655 i 2659-2663 [24, 65]) i EF-Tu (nukleotydy 2654-2665 [25, 66]) oraz czynnika inicjującego IF-2 [67].

W domenie VI występują dwie zasadnicze insercje, wpływające na odmienny wygląd rybosomów 80S w porównaniu z 70S (Rysunek 16). Są to: ES39, długości 200 nukleotydów, w helisie H98 oraz ES41 – długości 20 nt w H101. O ile sekwencja wstawiona ES41 ma zachowawczy charakter w rybosomach eukariotycznych [9, 15, 17], to w przypadku ES39 obserwowano różnice w ułożeniu strukturalnym tej sekwencji w rybosomach *S. cerevisiae* i *T. lanuginosus* [31]. Stwierdzono, że jedna z helis ES39 przybiera kształt palca w tylnej części podjednostki 60S *S. cerevisiae* i kieruje się do wyjścia tunelu polipeptydu. W rybosomach *T. lanuginosus* ta część ma zasadniczo odmienną strukturę. Ulega ona rotacji o 45° od wyjścia tunelu polipeptydu i w ten sposób znajduje się w bliskim sąsiedztwie klastra białek L4/L18/L32. Podobną pozycję ES39 obserwowano w strukturach krioelektronowych rybosomów *H. sapiens* [26], *Triticum vulgare* [68] i *Trypanosoma brucei* [11].

#### • 5S rRNA

Najmniejszym komponentem dużej podjednostki, obecnym we wszystkich rybosomach, jest 5S rRNA. Jest to cząsteczka o długości około 120 nukleotydów i masie ok. 40 kDa [53]. Pomimo tego, że znana jest struktura trzeciorzędowa zarówno nieskompleksowanego 5S rRNA [69-71], poszczególnych syntetycznych helis tej cząsteczki [72-75] a także w rybosomie, którego 5S rRNA stanowi nierozłączną część [1, 5, 9, 76], (Rysunek 14C oraz Rysunek 22B), dokładna rola jaką pełni cząsteczka 5S rRNA w procesie translacji pozostaje niewyjaśniona. Sugeruje się, że może ona działać jako przekaźnik sygnału pomiędzy centrum peptydylotransferazowym rybosomu a domeną II L-rRNA odpowiedzialną za proces translokacji [53, 77, 78]. Inna proponowana funkcja 5S rRNA miałaby polegać na utrzymywaniu stabilności dużej podjednostki rybosomalnej [78]. Funkcjonalna ważność cząsteczki 5S rRNA została wykazana u *E. coli*, gdzie delecja więcej niż jednego genu

Najbardziej

niezależnie

(1) miejsca

białkowych

jak i innych

związanych

jednego

uwzględniając

EP-Tu

W

tytułach

licznie

zachowuje

obserwacja

1. T.

części

tytułach

43°

dyktando

tytułach

42

Najbardziej

jest 25 RNA

Pomimo

[69-71]

tego 25 RNA

dotyczy

Sugeruje

peptydylotransferazy

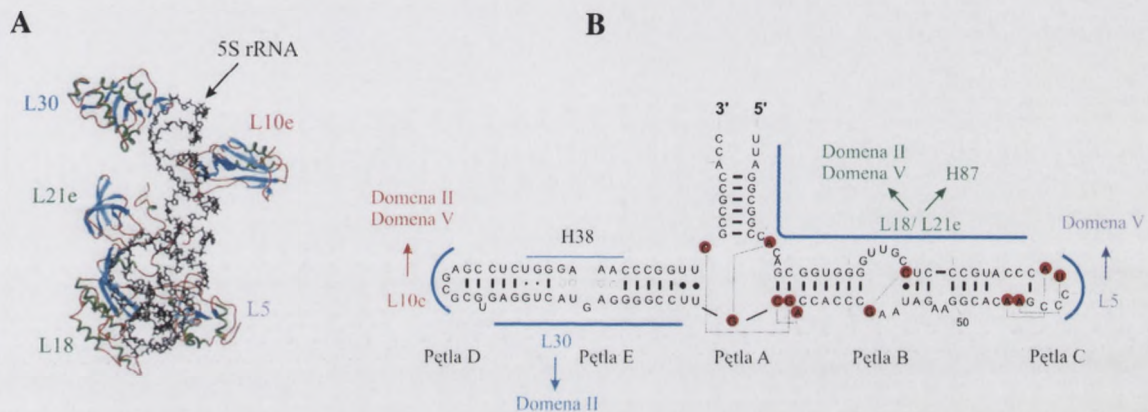
transkrypcji

utrzymywania

człeczki 25 RNA

kodującego 5S rRNA skutkowało osłabieniem szybkości wzrostu bakterii [79]. Wykazano również, że natywna cząsteczka 5S rRNA jest naturalnym leadzymem, który tnie specyficznie inne cząsteczki RNA w obecności jonów ołowiu. Aktywność leadzemu 5S rRNA może być ważnym aspektem toksyczności ołowiu w żywych komórkach [80].

Na strukturę 5S rRNA składa się pięć helis: (I-V), dwie pętle apikalne (C, E), dwie pętle wewnętrzne (B, D) oraz region zawiasowy (A), zorganizowane w splot trzech helis. Strukturę II-rzędową 5S rRNA przedstawia Rysunek 14B oraz Rysunek 22B.



#### Rysunek 22. 5S rRNA.

A – struktura III-rzędowa 5S rRNA w krysztale podjednostki 50S *H. marismortui* wraz z oddziałującymi białkami (na podstawie [53]);

B - struktura II-rzędowa 5S rRNA *H. marismortui*, pobrana z [22], numer AF034620.

Interesującą cechą helisy H I jest obecność tandemowo ułożonych par G·U stabilizowanych przez trzy cząsteczki wody, które pośredniczą w interakcjach między nukleotydami i rekompensują w ten sposób brak bezpośrednich oddziaływań wodorowych [72]. Helisa H II 5S rRNA stanowi miejsce wiązania białek rybosomalnych i czynnika transkrypcyjnego IIIA (TFIIIA). Konserwatywnym regionem w tej helisie jest wypełnienie jednego nukleotydu [74], które prawdopodobnie służy jako miejsce wiązania białek [81]. Helisa H III zawiera dwa lub trzy wypełnione nukleotydy w części 3', które są wysoce konserwatywne zarówno u prokariota jak i eukariota. Jednak to jakie nukleotydy są wypełnione, oraz regiony otaczające je, różnią się u różnych organizmów. W przypadku 5S rRNA *Xenopus laevis*, dwie wypełnione adenozyne są zasadnicze dla wysoce specyficznego wiązania białka rybosomalnego L5 [73, 82]. Adenozyne te są ułożone w małej bruzdzie helisy RNA i ułożone są powyżej sąsiadującej od strony 3' adenozyne [83]. Interesującą cechą helisy H IV jest struktura rzadkiej pary zasad G·C, która przyjmuje chwiejną konformację (ang. *wobble-like*) jako rezultat protonacji cytozyny. Ta para zasad jest stabilizowana przez

Wynikami badań nad rolą RNA 22S w procesie transkrypcji i translacji w organizmach eukariotycznych, w tym w organizmach wyższych, jest to, że RNA 22S jest obecna w cytoplazmie i jądro, a jej funkcja jest związana z procesem transkrypcji i translacji. W szczególności, RNA 22S jest obecna w kompleksach transkrypcyjnych i translacyjnych, a jej obecność jest niezbędna dla prawidłowego przebiegu tych procesów.

W niniejszym artykule przedstawiamy wyniki badań nad rolą RNA 22S w procesie transkrypcji i translacji w organizmach eukariotycznych. Wyniki te sugerują, że RNA 22S jest obecna w kompleksach transkrypcyjnych i translacyjnych, a jej obecność jest niezbędna dla prawidłowego przebiegu tych procesów.



Rysunek 1. Struktura RNA 22S i jej interakcje z białkami. A - schemat budowy RNA 22S z podziałem na regiony funkcyjne. B - schemat interakcji RNA 22S z białkami uczestniczącymi w transkrypcji i translacji.

Wyniki te sugerują, że RNA 22S jest obecna w kompleksach transkrypcyjnych i translacyjnych, a jej obecność jest niezbędna dla prawidłowego przebiegu tych procesów. W szczególności, RNA 22S jest obecna w kompleksach transkrypcyjnych i translacyjnych, a jej obecność jest niezbędna dla prawidłowego przebiegu tych procesów.

cząsteczki wody oraz interakcje RNA-RNA [84]. Ponadto w helisie H IV występuje motyw tandemowo ułożonych par G·U, w którym guanozyny są ułożone warstwowo, jednak po przeciwnych stronach nici [85]. W strukturze krystalicznej pętli D 5S rRNA *Thermus flavus* wykazano, że pętla ta wykazuje charakterystyczne cechy konserwatywnej klasy pętli czteronukleotydydowych 5'-GNRA-3' [86]. W strukturze tej, guanina z końca 5' pętli D (G87) oddziałuje z adeniną z końca 3' poprzez dwa wiązania wodorowe. Natomiast C88 oraz G89 są zwrócone w kierunku wody i nie tworzą wiązań wodorowych z żadnymi innymi nukleotydami. W organizmach prokariotycznych, pętla E jest miejscem wiązania rybosomalnego białka L25 [87]. W strukturze tej pętli zaobserwowano wiele niekanonicznych par zasad [88, 89]. Najbardziej widoczną różnicą w cząsteczce 5S rRNA między eukariota i archebakteria a eubakteria jest struktura pętli E. W przypadku eubakteria obie nici tworzące tą wewnętrzną pętlę są równej długości, natomiast u eukariota pętla od strony 5' jest dłuższa o jeden nukleotyd. W rezultacie tworzy się jednonukleotydydowe wypętlenie. Ponadto u tych organizmów, struktura pętli E wykazuje bardzo duże podobieństwo do motywu strukturalnego znalezionej w domenie sarcyny-rycyny L-rRNA [90-92].

- **Rozmieszczenie białek rybosomalnych w podjednostce 60S**

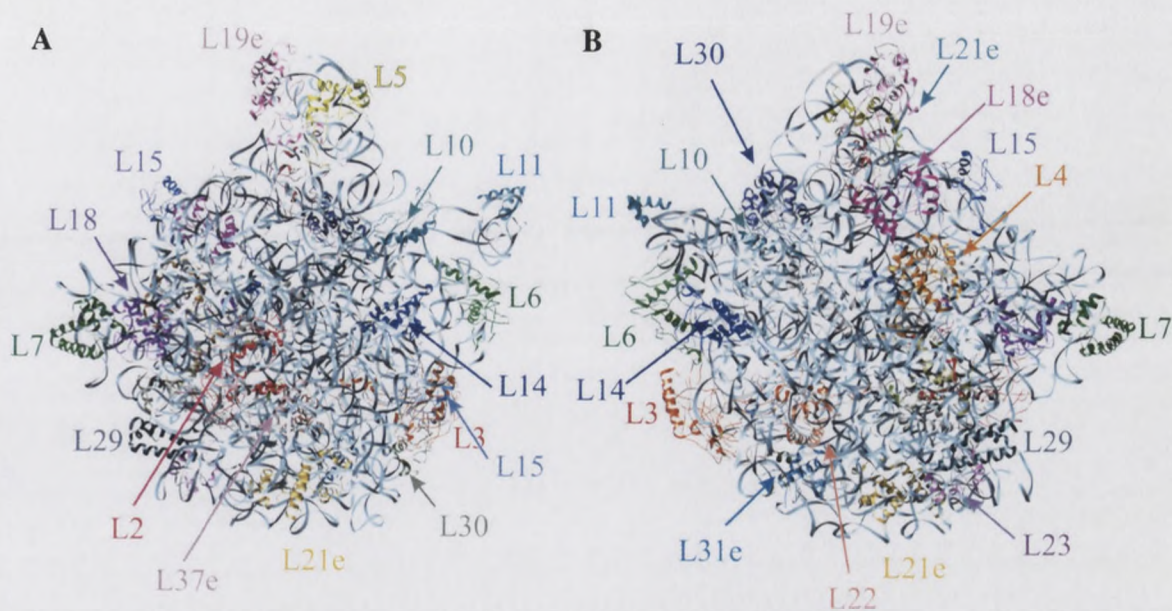
W strukturze dużej podjednostki rybosomalnej 60S *S. cerevisiae* zidentyfikowano 45 białek, z czego 28 posiada swoje homologi w organizmach prokariotycznych [9], a 19 jest konserwatywnych we wszystkich trzech królestwach organizmów żywych [12]. Szczegółową lokalizację białek rybosomalnych przedstawiłam w strukturze krystalicznej podjednostki 50S *H. marismortui* na Rysunku 23.

Podjednostka bakteryjna 50S zawiera 36 białek rybosomalnych. Stwierdzono, że płaszczyzna 60S między podjednostkami jest bardzo uboga w białka [12]. Natomiast tunel wejścia mRNA, miejsce przyłączania czynników elongacyjnych w obrębie wypukłości L7/L12 oraz wyjście tunelu mRNA jest zbudowane głównie z rybosomalnych białek (Rysunek 23).

czynniki wagi...  
 podstawowe...  
 przeciwnych...  
 wykazano...  
 czynniki...  
 oddziały...  
 zwrócić...  
 W organizm...  
 [87]. W...  
 Najbardziej...  
 substancja...  
 pełni...  
 naskórek...  
 organizm...  
 zastoje...

• *Wzrost i rozwój*

W struktur...  
 białek...  
 konstru...  
 lokaliz...  
 H. mam...  
 Podjed...  
 płaszczy...  
 wejścia...  
 oraz w...



**Rysunek 23. Struktura III-rzędowa dużej podjednostki rybosomalnej 50S (struktura pobrana z [23] numer 1FFK).**

Kolorem jasnoniebieskim zaznaczono 23S rRNA, pozostałymi kolorami - białka.

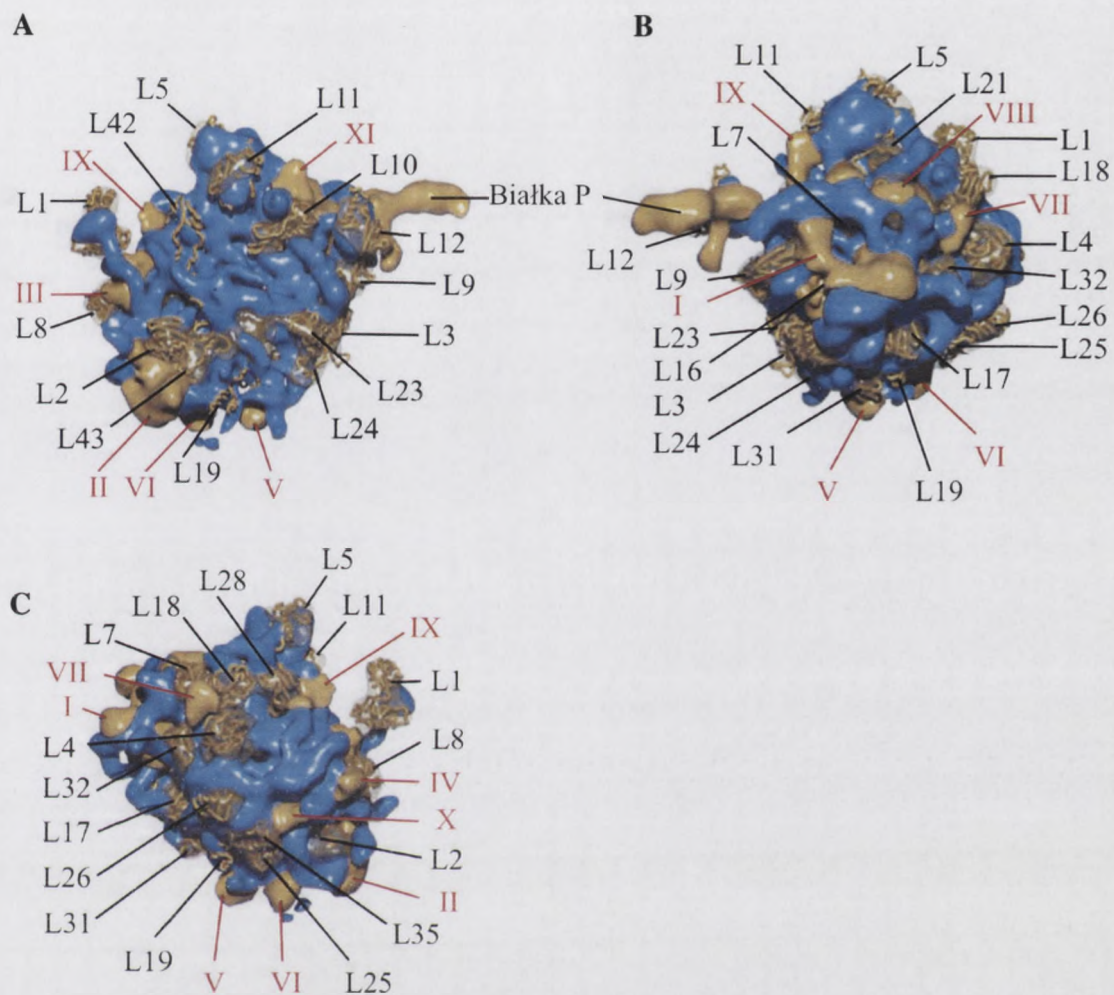
A - widok od strony oddziaływania podjednostek;

B - widok od strony zewnętrznej.

Poza białkami, które posiadają swoje prokariotyczne odpowiedniki, w mapach krio-EM rybosomu *S. cerevisiae* [9] zidentyfikowano dwanaście regionów z dodatkowymi białkami. Stwierdzono, że większość z nich położona jest po zewnętrznej stronie podjednostki (Rysunek 24). Duże zgrupowanie białek wchodzące w skład rozciągniętego słupka zostało zidentyfikowane jako kompleks  $P0(P1/P2)_2$  [93], odpowiednik bakteryjnego kompleksu  $L10(L7/L12)_4$ . Słupek ten ma inną orientację u *S. cerevisiae* niż u organizmów prokariotycznych (Rysunek 12A). Co interesujące, słupek białek  $P0/P1/P2$  posiada boczny płat, który ulokowany jest w bliskiej odległości od N-końcowej domeny białka L12. Dokładnie w tej pozycji występują w rybosomach eukariotycznych interakcje z czynnikiem elongacyjnym EF2. Oddziaływania takie nigdy nie były obserwowane w przypadku kompleksów  $70S \bullet EF-G$  *E. coli* (czynnik elongacyjny EF-G spełnia tę samą funkcję u prokariota jak czynnik elongacyjny EF-2 u eukariota). Podstawą tej specyficznej i unikatowej interakcji białek P z EF-2 jest możliwość dyskryminacji białek P między czynnikami: EF-G i EF-2.







**Rysunek 24. Położenie białek w dużej podjednostce rybosomu *S. cerevisiae* [9].**

Kolorami zaznaczono: niebieski - 25S rRNA, pomarańczowy - białka. Białka homologiczne z białkami prokariota przedstawiono jako łańcuchy i oznaczono nazwami. Białka, dla których nie znane są homologie prokariotyczne przedstawiono jako dodatkowa masa i oznaczono cyframi rzymskimi.

A - widok od strony oddziaływania podjednostek;

B - widok od strony słupka białek P;

C - widok od strony wypukłości L1.

Podobnie jak w przypadku małej podjednostki rybosomalnej, dokładna rola białek poznana została jedynie w kilku przypadkach (Tabela 2). Białka L1 oraz L16/L27 mogą brać udział w, odpowiednio, uwalnianiu i wiązaniu cząsteczki tRNA do rybosomu [12]. Białka L4 i L22, które położone są w tunelu wejścia mRNA, warunkują odporność na antybiotyki makrolidowe. Ponadto sugeruje się oddziaływanie L22 z nowoutworzonym łańcuchem peptydowym i regulację syntezy poszczególnych białek. Sugeruje się również wpływ L9 na stabilność cząsteczki tRNA oraz ruch mRNA. Wykazano również negatywny wpływ mutacji w obrębie genu kodującego białko L9 na efektywność procesu translacji.

A



C



Rysunek 3A. ...

Kolana ...

...

...

... A - widok od strony ...

... B - widok od strony ...

... C - widok od strony ...

... jak w ...

...

... udział w ...

... L22, ...

... malinowoc. ...

...

...

...

...

...

...

Białko	Funkcja
L5	oddziaływanie z tRNA w miejscu P oraz 5S rRNA
L9	wpływ na efektywność biosyntezy białka
L11	sugerowany udział w procesie translokacji
L16 (L10e)	prawidłowe umiejscowienie domeny akceptorowej tRNA w miejscu A oraz P; oddziaływanie z czynnikiem odzyskującym rybosomu (ang. <i>ribosome recycling factor</i> , RRF)
L4/L22	regulacja translacji poprzez oddziaływanie z nowosyntetyzowanym polipeptydem
L23/L24	obecne w tunelu wyjścia polipeptydu
L27	oddziaływanie z domeną akceptorową tRNA w miejscu P oraz z RRF
L29	ulokowane w sąsiedztwie tunelu wyjścia polipeptydu; sugeruje się udział w tworzeniu miejsca wiązania cząsteczki SRP (ang. <i>signal recognition particle</i> , SRP)

Tabela 2. Przykłady rybosomalnych białek dużej podjednostki eukariotycznej o znanych funkcjach (na podstawie [12, 45, 46]).

### 3.1.2 Wpływ jonów metali na stabilność rybosomu.

Dla prawidłowego fałdowania i utrzymywania stabilności dużych molekuł zbudowanych z kwasów nukleinowych, a w szczególności z RNA, niezbędne są jedno- i dwuwartościowe jony metali. Wiadomo, że zarówno struktura jak i funkcja rybosomu jest silnie uzależniona od obecności jonów metali, a w szczególności jonów magnezu  $Mg^{2+}$ , sodu  $Na^+$  oraz potasu  $K^+$ . Jony  $Mg^{2+}$  pełnią funkcję w neutralizowaniu ujemnie naładowanych reszt fosforanowych szkieletu RNA. Natomiast jony  $K^+$  oraz  $Na^+$  mają udział w stabilizacji struktury trzeciorzędowej RNA. Dla przykładu, asocjacja *in vitro* małej i dużej podjednostki rybosomalnej w celu utworzenia aktywnego rybosomu silnie zależy od stężenia jonów  $Mg^{2+}$  [94]. Zbyt małe stężenie jonów  $Mg^{2+}$  podczas wzrostu *E. coli* powoduje zmniejszenie ilości powstających rybosomów. Na tej podstawie możemy wnioskować o funkcjonalnej ważności jonów  $Mg^{2+}$  dla składania i strukturalnej integralności rybosomów. Inne rybosomalne funkcje, na które wpływ mają jony  $Mg^{2+}$  to zależna od poli(U) polimeryzacja fenyloalaniny, wiązanie polinukleotydów do rybosomów oraz przyłączanie rybosomów do membrany retikulum endoplazmatycznego. O znaczeniu jonów  $K^+$  dla struktury i funkcji rybosomu może świadczyć całkowite i nieodwracalne zahamowanie aktywności rybosomów oraz znaczne rozfałdowanie ich struktury obserwowane w przypadku braku jonów  $K^+$  w ich otoczeniu. Co interesujące, zaobserwowano, że rybosomy *E. coli* ulegają dysocjacji na podjednostki pod wpływem wysokich stężeń  $K^+$ . Dzieje się to prawdopodobnie dlatego, że jony  $K^+$  konkurują

Symbol	Opis
E1	oddziaływanie z DNA w miejscu P oraz 5S rRNA
E2	wpływ na efektywność translacji białka
E3	sugerowany udział w procesie translacji
E4 (E10)	prawdopodobnie oddziaływanie z domeną aktywności RNA w miejscu A oraz P; oddziaływanie z cytozolem oddziaływanie z cytozolem (ang. cytoplasmic fractionation, RRF)
E5-E7	regulacja translacji poprzez oddziaływanie z nowozakładzowanymi polipeptydami
E8-E10	obecność w miejscu wyjścia polipeptydu
E11	oddziaływanie z domeną aktywności RNA w miejscu P oraz z RRF
E12	nieobecność w miejscu wyjścia polipeptydu; sugeruje się udział w tworzeniu miejsca wiązania cząsteczki SRP (ang. signal recognition particle, SRP)

Tabela 2. Funkcje rybosomalnych białek (ang. ribosomal proteins) w transporcie białek (ang. protein transport) (zob. [11, 12, 13]).

### 3.1.2. Wpływ jonów metali na stabilność rybosomu

Do prawidłowego funkcjonowania i utrzymania stabilności dużych molekuł zbudowanych z kwasów nukleinowych, a w szczególności z RNA, niezbędne są jony dwuwartościowe i jony metali. W badaniach nad rolą jonów metali jak i jonów rybosomu jest silnie uzależniona od obecności jonów metali, a w szczególności jonów magnezu  $Mg^{2+}$ , sodu  $Na^+$  oraz potasu  $K^+$ . Jony  $Mg^{2+}$  pełnią funkcję w neutralizowaniu ujemnie naładowanych reszt fosforanowych w RNA. Niezależnie od jony  $K^+$  oraz  $Na^+$  mają udział w stabilizacji struktury trójwymiarowej RNA. Dla przykładu, stopnie do wina mały i duży podjednostki rybosomalnej A oraz B, w których rybosomu silnie zależy od wystętu jonów  $Mg^{2+}$  [94]. Zbyt małe stężenie jonów  $Mg^{2+}$  podczas wzrostu E. coli powoduje kumulację błędnie powstających rybosomów. Dla tej przyczyny można wnioskować o funkcjonowanie wadliwych jonów  $Mg^{2+}$  dla stabilizacji i architektury integralności rybosomu. Inne rybosomalne funkcje, na które wpływ mają jony  $Mg^{2+}$  to zależność od pol(U) polimerazy (ang. poly(U) polymerase), wiązanie polinukleotydów do rybosomu oraz przyłączenie rybosomów do matrycy koloidalnej cytoplazmatycznej. O znaczeniu jonów  $K^+$  dla struktury i funkcji rybosomu można wnioskować z obserwacji i molekularnych badań rybosomów oraz znaczących zmian w ich strukturalnym i molekularnym zachowaniu w przypadku braku jonów  $K^+$  w ich otoczeniu. Co interesujące, zachowanie, że rybosomy E. coli niegdy dysocjują na podjednostki pod wpływem wysokiej energii  $K^+$ . Dzieje się to prawdopodobnie dlatego, że jony  $K^+$  konkurują

z jonami  $Mg^{2+}$  o miejsca wiązania na powierzchni rybosomu, które są absolutnie wymagane do asocjacji podjednostek.

W strukturze krystalicznej podjednostki 50S *H. marismortui* zidentyfikowano 116 jonów  $Mg^{2+}$  oraz 88 jednowartościowych kationów, które wiążą się głównie do rRNA [94]. Stężenie tych jonów jest najwyższe w regionach silnie konserwatywnych we wszystkich królestwach organizmów. Prawie połowa wszystkich jonów  $Mg^{2+}$  oraz jedna trzecia jonów  $K^+$  oddziałuje z centrum peptydylotransferazowym w domenie V L-rRNA oraz z regionami konserwatywnymi w domenie II i IV w pobliżu domeny V.

Najczęstszym motywem wiążącym jony metali w L-rRNA są helikalne wypętlenia lub połączenia między helisami, które przerywają ciągi adenozyiny oddziałujące warstwowo. Jony jednowartościowe oddziałujące z rybosomem mogą być podzielone na cztery klasy, w zależności od miejsc ich wiązania: (1) jony, które wiążą się do dużej bruzdy helisy RNA, (2) jony, które wiążą się wyłącznie do białek rybosomalnych, (3) jony, które wiążą się w regionach pomiędzy rybosomalnymi białkami a RNA, oraz (4) jony, które wiążą się do określonych motywów strukturalnych RNA. Najczęstszym miejscem wiązania jednowartościowych jonów metali w L-rRNA są guanozyny, często w kontekście strukturalnym chwiejnej pary G-U, z którą oddziałuje warstwowo para zasad G-C.

Istnieją dwie główne drogi, poprzez które jony metali mogą stabilizować III- lub IV-rzędową strukturę dużej podjednostki rybosomalnej. Po pierwsze, jony metali mogą wpływać pośrednio na interakcje trzeciorzędowe w 23S rRNA poprzez lokalną stabilizację struktury drugorzędowej rRNA. Jony metali znajdują się w płaszczyznach pomiędzy niezależnie sfaldowanymi segmentami RNA jak i w płaszczyznach pomiędzy rybosomalnymi białkami i RNA. W ten sposób mogą bezpośrednio wpływać na strukturę III- i IV-rzędową RNA.

### **3.1.3 Interakcje pomiędzy podjednostkami rybosomalnymi.**

Prawidłowy proces biosyntezy białka wymaga komunikacji między małą i dużą podjednostką rybosomalną. Dla przykładu, sygnały z centrum dekodującego małej podjednostki do centrum peptydylotransferazowego dużej podjednostki mogą być przekazywane przez ligandy, które oddziałują z oboma regionami (np. poprzez cząsteczki tRNA) lub poprzez mostki spajające dwie podjednostkami. Zatem struktura i dynamika

W anizotropii

Mg<sup>2+</sup> oraz 88

tych jonów jest

organizmów. W

centrum, pędy

konstruujemy

Najczęściej

pojemna między

jednowartościowa

w zależności od

(2) jony, które

w regionach

do obszarów

jednowartościowej

anizotropii

temperatura

IV-rzędowa

wzrost podlega

stanowi drugą

niezależnie

białkami i RNA

RNA

RNA

RNA

RNA

RNA

RNA

RNA

RNA

RNA

RNA

RNA

RNA

RNA

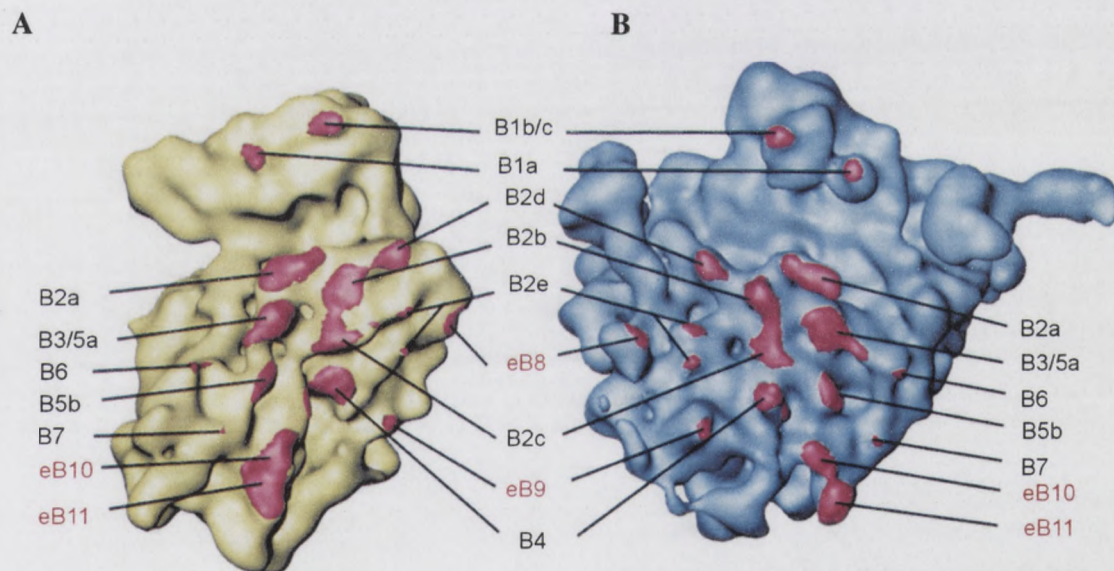
RNA

RNA

mostków międzypodjednostkowych są niezwykle ważne dla zrozumienia mechanizmu biosyntezy białka.

Metodą mikroskopii krioelektronowej określono położenie 13 mostków w rybosomach *E. coli* (B1a - B1c, B2a - B2e, B3, B4, B5a - B5b i B6) [19]. Natomiast z użyciem metod rentgenograficznych określono dokładne położenie mostków łączących podjednostki rybosomu 70S *T. thermophilus* [5]. Na podstawie analizy porównawczej map krio-EM rybosomów eukariotycznych stwierdzono, że wszystkie mostki zidentyfikowane u organizmów prokariotycznych mają swoje odpowiedniki w rybosomach 80S. Ta znacząca konserwatywność obrazuje funkcjonalną ważność mostków spinających podjednostki rybosomu. Większość oddziaływań między podjednostkami to kontakty RNA-RNA, jednak zidentyfikowano również kilka mostków RNA-białko oraz jeden mostek białko-białko.

W strukturze rybosomu *S. cerevisiae* uzyskanej z rozdzielczością 15 Å uwidoczniiono mostki eB1-eB7, które mają swoje odpowiedniki bakteryjne, oraz nowe mostki eB8 - eB11, charakterystyczne wyłącznie dla rybosomów eukariotycznych (Rysunek 25).



**Rysunek 25. Umieszczenie mostków między podjednostkami 40S i 60S w rybosomie 80S *S. cerevisiae*.** (na podstawie [9])

Mała podjednostka 40S (A) oraz duża podjednostka 60S (B) ukazane zostały od strony oddziaływania podjednostek. Mostki między podjednostkami oznaczono kolorem czerwonym. Mostki występujące u prokariota oznaczono B1-B7, dodatkowe mostki występujące jedynie u eukariota oznaczono eB8-eB11 i opisano kolorem czerwonym (patrz również Tabela 5).

Dwa mostki, B1a i B1b, łączą wierzchołek podjednostki 40S z centralną wypukłością podjednostki 60S. Pętla apikalna helisy H38 25S rRNA (palec miejsca A, ASF) oddziałuje z białkiem S15 podjednostki 40S tworząc mostek B1a (Tabela 3) [9]. W przypadku rybosomów



metod biofizycznych w celu określenia mechanizmu działania...

W celu określenia mechanizmu działania... wykorzystano...

Wzrost temperatury... zmniejsza...



Kryształ 55. Budowa trójwymiarowa... (opis szczegółowy)

Dwa modele... (dalszy opis)

70S, białkowym komponentem tego mostka jest S13. Ta różnica między elementami tworzącymi mostek B1a u pro- i eukariota wydaje się być zależna od gatunku z dwóch zasadniczych powodów. Po pierwsze, białko S13 występuje w innej pozycji w rybosomach pro- i eukariotycznych. Po drugie, w przypadku *T. thermophilus* nie występuje C-terminalne wydłużenie tego białka, oddziałujące z tRNA w miejscu P u eukariota. W górnej części rybosomu *O. cuniculus* [17] również znaleziono słabe oddziaływanie (nazwane eB1) pomiędzy wierzchołkiem małej podjednostki a centralną wypukłością podjednostki 60S. Oddziaływanie to jest znacznie słabsze niż analogiczny mostek B1a u prokariota.

Drugi z mostków łączących wierzchołek 40S z centralną wypukłością 60S to B1b, jedyny mostek utworzony wyłącznie przez oddziaływanie białek rybosomalnych. Są to białka: S18 małej podjednostki i L11 dużej podjednostki.

Większość mostków, które łączą główną część podjednostki 60S z podstawą i platformą podjednostki 40S leży w przybliżeniu wzdłuż trzech równoległych linii, biegnących z górnej do dolnej części podjednostek [9]. Mostki leżące na linii najbliższej ramienia 40S lub słupka białek P 60S to: B2a, B3, B5a, B5b, eB10 i eB11 (Rysunek 25). Mostki B2a, B3 i B5b utworzone są przez oddziaływania między małymi bruzdami helisy h44 18S rRNA i helisami domeny IV 25S rRNA. W strukturze rybosomu 80S *O. cuniculus* zidentyfikowano również mostki B2a i B3 (nazwane EB2 i EB3) w obrębie szczeliny miejsca aktywnego [17]. B2 łączy górną część szczeliny miejsca aktywnego podjednostki 60S z platformą małej podjednostki. Jest on tworzony przez oddziaływania helisy H69 L-rRNA z końcem helisy h44 18S rRNA. Natomiast mostek B3 łączy ścianę szczeliny miejsca aktywnego z punktem położonym bezpośrednio poniżej mostka B2 w regionie platformy [17]. Mostek B5a powstał dzięki oddziaływaniom pomiędzy helisą h44 18S rRNA i białkiem L23 podjednostki 60S.

Kierując się w dół hipotetycznej linii łączącej te mostki, znajdujemy dodatkowe mostki eB10 i eB11, które są najsilniejszymi oddziaływaniami w rybosomie *S. cerevisiae*. eB10 utworzony jest przez oddziaływanie RNA-RNA pomiędzy helisami h11 18S rRNA i H65 25S rRNA. Sugeruje się również udział specyficznego dla eukariota białka w tworzeniu tego mostka, co tłumaczyłoby dlaczego ta interakcja nie jest obserwowana w rybosomach prokariotycznych. eB11 jest utworzony przez oddziaływania między helisą h9 18S rRNA i sekwencją wstawioną w helisie H101 25S rRNA.

Helisa h44 18S rRNA ulega zagięciu w strukturze rybosomu w kierunku ramienia podjednostki 40S i bierze przez to udział w tworzeniu lewej stopy, charakterystycznej wyłącznie dla rybosomów 80S [9]. To zagięcie znajduje się mniej więcej w pozycji mostka B5b. Nieco poniżej znajduje się kolejny mostek, który powstał poprzez oddziaływania helisy

tworzący...  
zasadniczych...  
pro- i...  
wydane...  
tytuł...  
wzrost...  
to jest...  
Dzięki...

może...  
ma...  
W...  
pod...  
do...  
dział...  
niw...  
formy...  
modeli...  
główna...  
jest...  
Historia...  
bezp...  
odbi...

Kierując...  
EB10...  
niw...  
255...  
mostka...  
prok...  
i...  
Hollis...  
pod...  
wylicz...  
B5b...

h44 18S rRNA. Jest to mostek B7. Partnerem w tym oddziaływaniu jest białko L24 podjednostki 60S. Mostek B7 został wcześniej znaleziony w rybosomie 70S *T. thermophilus* [5], gdzie nazwano go mostkiem B6. Białko L24 nie posiada homologu w rybosomach 70S, dlatego sądzi się, że mostek B6 może być u *T. thermophilus* tworzony przez analogiczne białko. Kontakt ten został przypisany białku L19 u prokariota [5].

MOSTEK	TYP	40S		60S	
		Komponent	Przybliżona pozycja	Komponent	Przybliżona pozycja
eB1a	białko-RNA	S15	12	H38	889
eB1b/c	białko-białko	S18		L11	
eB2a	RNA-RNA	h44	1408/1493	H69	1910-1920
eB2b	RNA-RNA	h24	784/800	H68	1847
	RNA-RNA	h45	1515		1939-1941
eB2c	RNA-RNA	h27	899	H62	1693
		h24	771	H67	1832
eB2d	RNA-RNA	h23	702	H68	1848/1895
eB2e	RNA-białko	h22	671	L2	
	RNA-białko	h23	713	L2 L43	
eB3	RNA-RNA	h44	1420/1481	H71	1948/1960
eB4	RNA-RNA	h11	247	H34	711/720
	RNA-RNA	h20	583/761	H34	716
	białko-RNA	S13		H34	716
eB5a	RNA-białko	h44	1422 bb	L23	
eB5b	RNA-RNA	h44	1428/1472	H62	1689/1704
eB6	RNA-białko	h14	343	L23	
eB7	RNA-białko	h44	1446	L24	47
eB8	białko-RNA	Sx		H79	sekw. wstawiona
eB9	białko-białko	Sx		Lx	
	RNA-białko	h21	sekw. wstawiona		
eB10	RNA-RNA	h11	272	H63	1713/1747
	białko-RNA	Sx			
eB11	RNA-RNA	h9	187	H101	sekw. wstawiona
	białko-RNA	Sx			

Tabela 3. Mostki między podjednostką 40S a 60S (na podstawie [9]).

Mostki B2b, B2c oraz B4 leżą wzdłuż środkowej linii wyznaczającej ułożenie mostków w rybosomie 80S (Rysunek 25). B2b i B2c są uformowane przez interakcje RNA-RNA, w które zaangażowana jest domena IV 25S rRNA [9]. W tworzeniu mostka B2b biorą udział helisy h24 oraz 3'-końcowa helisa 18S rRNA, h45. Mostek B2c jest tworzony przez helisę h27 18S rRNA. B4 został wcześniej zidentyfikowany u *T. thermophilus* [5] jako kontakt między białkiem małej podjednostki S13 oraz helisą H34 23S rRNA. W przypadku *S. cerevisiae*

18S rRNA jest to model B1 kontamin w tym oddziaływanie jest blisko L34 podjednostki 60S. Model B3 został wcześniej zbadany w rybosomie 70S T. thermophilus [5], gdzie również są modelami B6. Blisko L34 nie posiada homologu w rybosomach 70S, dlatego nigdy nie został B6 model B6c a T. thermophilus tworzy przez analogiczne blisko. Kontakt ten został przegany blisko L19 u prokariot [5].

MODEL	TYP	60S		60S
		Komponent	Przypisanie	
6B1a	blisko-RNA	212	L3	1980
6B1b	blisko-bliisko	218	L3	1980
6B2a	RNA-RNA	192	L19	1970-1975
6B2b	RNA-RNA	184	L19	1970
6B2c	RNA-RNA	187	L19	1970-1971
6B3a	RNA-RNA	187	L19	1973
6B3b	RNA-RNA	187	L19	1973
6B3c	RNA-RNA	187	L19	1973
6B3d	RNA-RNA	187	L19	1973
6B3e	RNA-RNA	187	L19	1973
6B3f	RNA-RNA	187	L19	1973
6B3g	RNA-RNA	187	L19	1973
6B3h	RNA-RNA	187	L19	1973
6B3i	RNA-RNA	187	L19	1973
6B3j	RNA-RNA	187	L19	1973
6B3k	RNA-RNA	187	L19	1973
6B3l	RNA-RNA	187	L19	1973
6B3m	RNA-RNA	187	L19	1973
6B3n	RNA-RNA	187	L19	1973
6B3o	RNA-RNA	187	L19	1973
6B3p	RNA-RNA	187	L19	1973
6B3q	RNA-RNA	187	L19	1973
6B3r	RNA-RNA	187	L19	1973
6B3s	RNA-RNA	187	L19	1973
6B3t	RNA-RNA	187	L19	1973
6B3u	RNA-RNA	187	L19	1973
6B3v	RNA-RNA	187	L19	1973
6B3w	RNA-RNA	187	L19	1973
6B3x	RNA-RNA	187	L19	1973
6B3y	RNA-RNA	187	L19	1973
6B3z	RNA-RNA	187	L19	1973
6B4	RNA-RNA	187	L19	1973
6B5	RNA-RNA	187	L19	1973
6B6	RNA-RNA	187	L19	1973
6B7	RNA-RNA	187	L19	1973
6B8	RNA-RNA	187	L19	1973
6B9	RNA-RNA	187	L19	1973
6B10	RNA-RNA	187	L19	1973
6B11	RNA-RNA	187	L19	1973

Tabela 1. Modeli między podjednostkami 60S a 60S nie podawane [9].

Model B2b, B2c oraz b4 jest w pełni zbadany i nie występują istotne niedokończoności. Model B2a (przez 1973 B2b i B2c są utworzone przez interakcje RNA-RNA, które są zbadane w 1973 B2b i B2c). W tworzeniu modelu B2b błąd jest blisko L34 oraz T. thermophilus blisko L34. Model B2c jest tworzony przez blisko L34 i 18S rRNA. B4 został wcześniej zbadany w T. thermophilus [5] jako kontakt między podjednostkami 212 oraz blisko L19 232 rRNA. W przypadku 6. eukariotów blisko L34 jest to model B1 kontamin w tym oddziaływanie jest blisko L34 podjednostki 60S. Model B3 został wcześniej zbadany w rybosomie 70S T. thermophilus [5], gdzie również są modelami B6. Blisko L34 nie posiada homologu w rybosomach 70S, dlatego nigdy nie został B6 model B6c a T. thermophilus tworzy przez analogiczne blisko. Kontakt ten został przegany blisko L19 u prokariot [5].

mostek ten jest również tworzony przez S13 i H34, jednak wydaje się angażować również dodatkowe interakcje H43 z helisami h10 i h11 18S rRNA.

Trzecia linia wyznaczająca położenie mostków od strony L1 podjednostki 60S zawiera mostki B2d, B2e oraz eB9 (Rysunek 25). B2d jest tworzony w wyniku oddziaływań h23 18S rRNA w części platformy 40S oraz małą bruzdą helisy H68 domeny IV 25S rRNA. B2e został wcześniej zidentyfikowany w rybosomach *E. coli* [19] jako mostek B8. B2e jest kontaktem typu RNA-białko a częścią białkową jest L2. Wykazano, że obecność białka L2 jest zasadnicza dla rybosomów 70S *E. coli* podczas asocjacji podjednostek 30S i 50S [95]. W przypadku *S. cerevisiae*, również białko L43 wydaje się brać udział w tym kontakcie, a komponentem pochodzącym z podjednostki 40S są u tego organizmu helisy h22 i h23 18S rRNA. Mostek eB9 jest tworzony przez komponenty, które są nieobecne w rybosomach 70S. Sugeruje się, że jest to białko specyficzne dla podjednostki 60S eukariota oraz sekwencja wstawiona w 18S rRNA.

Po najbardziej zewnętrznej stronie powierzchni oddziaływania podjednostek znajdują się dwa mostki, B6 oraz eB8 (Rysunek 25). B6 jest kontaktem między helisą h14 18S rRNA i białkiem L23 60S [9]. W strukturze rybosomu *O. cuniculus* mostek ten zlokalizowano w dolnej części powierzchni oddziaływania podjednostek [17]. Natomiast mostek eB8 jest ulokowany nieco poniżej wypukłości L1 [9, 17] i tworzony jest przez interakcje między białkiem specyficznym dla eukariotycznych 40S i sekwencją wstawioną w helisie H79 25S rRNA. Ze względu na to, że H79 ułożona jest warstwowo nad helisą H76 tworzącą wypukłość L1, mostek eB8 może odrywać ważną funkcję w kontrolowaniu zmian konformacyjnych na dużą skalę, które mają miejsce w obrębie wypukłości L1.

mostek ten jest

dobutkow...

Trzeci...

mosto B&B...

rRNA w części...

wyciętej rDNA...

typo rRNA-d...

dla rRNA-d...

2. cyklicz...

podobny...

EB9 jest...

to jest to...

w 18S rRNA

Po...

dwu...

Lubian...

w dolnej...

biolowy...

diab...

25S rRNA...

wyq...

kont...

### 3.2 Funkcja rybosomu – biosynteza białka.

Zasadniczą funkcją rybosomu jest biosynteza białka. Rybosom pełni również funkcje w innych procesach w komórce, takich jak fałdowanie białek. U organizmów eukariotycznych, rybosom jest również związany z procesem transportu przez pory jądrowe.

#### 3.2.1 Inicjacja procesu biosyntezy białka.

Inicjacja procesu translacji jest złożonym procesem, w którym cząsteczka inicjatorowego tRNA (Met-tRNA<sub>i</sub>) oraz podjednostki rybosomalne 40S i 60S są składane przy udziale czynników inicjatorowych (ang. *eukaryotic initiation factors*, eIFs) w rybosom 80S. Proces ten obejmuje kilka etapów, wśród których wyróżniamy [96]:

- 1) Selekcję inicjatorowego tRNA z puli elongacyjnych cząsteczek tRNA przez eIF2 oraz wiązanie kompleksu potrójnego eIF2/GTP/Met-tRNA<sub>i</sub>. W ten sposób utworzony zostaje kompleks preinicjatorowy 43S (ang. *preinitiation complex*, PIC). Reakcja ta jest stymulowana przez czynniki eIF1, eIF1A, eIF3 i eIF3 zarówno *in vitro* [97-100] jak i *in vivo* [101-103].
- 2) Wiązanie 43S do mRNA. Najczęściej następuje poprzez wstępne rozpoznanie struktury kapu (m<sup>7</sup>G) na końcu 5' mRNA przez eIF4E, który jest częścią składową czynnika eIF4F. Po tym następuje wiązanie 43S w bliskiej odległości od kapu. Drugorzędowa struktura mRNA w miejscu wiązania jest rozplataną przy udziale eIF4F, eIF4A oraz eIF4B [97].
- 3) Przesuwanie kompleksu 43S wzdłuż cząsteczki mRNA od miejsca wiązania w regionie 5'UTR (region nie ulegający translacji, ang. *untranslated region*) w kierunku kodonu inicjatorowego. Kodonem tym jest najczęściej pierwszy tryplet o sekwencji AUG poniżej 5'UTR, w odległości zazwyczaj -50 do -100 nt od kapu [96]. Utworzony zostaje kompleks preinicjatorowy 48S, w którym kodon inicjatorowy mRNA jest związany poprzez parowanie z antykodonem cząsteczki inicjatorowej tRNA.

W przesuwaniu kompleksu 43S wzdłuż mRNA biorą udział czynniki eIF1, eIF1A i eIF4F (co stwierdzono w układzie ludzkim, [104]) a także eIF5 (w komórkach *S. cerevisiae*, [98, 102, 105]). Krytycznym etapem selekcji kodonu start jest dysocjacja czynnika eIF1 wspomagana przez eIF1A [100].

- 4) Hydroliza GTP związanego z eIF2. Etap ten jest stymulowany przez eIF5 [106, 107].

Kompleks GDP/eIF2 ulega oddysocjowaniu [97].



### 3.2. Funkcja rybosomu – biosynteza białka

Zasadniczą funkcją rybosomu jest biosynteza białka. Rybosom pełni również funkcję w innych procesach w komórce, takich jak badanie błędnego. U organizmów eukariotycznych, rybosom jest również związany z procesem transportu białka poza jądro.

#### 3.2.1. Inicjacja procesu biosyntezy białka

Inicjacja procesu biosyntezy jest pierwszym etapem w łańcuchu biosyntezy białka. RNA (mRNA) jest podłączony do rybosomu na 40S i 60S za pośrednictwem czynnika inicjacyjnego (eIF). Proces ten rozpoczyna się od przyłączenia czynnika inicjacyjnego (eIF) do mRNA. Proces ten rozpoczyna się od przyłączenia czynnika inicjacyjnego (eIF) do mRNA.

1) Selekcja inicjacyjnego kompleksu 43S (eIF4E, eIF4G, eIF4A, eIF4B, eIF4D, eIF4F, eIF5, eIF5B, eIF6, eIF7, eIF8, eIF9, eIF10, eIF11, eIF12, eIF13, eIF14, eIF15, eIF16, eIF17, eIF18, eIF19, eIF20, eIF21, eIF22, eIF23, eIF24, eIF25, eIF26, eIF27, eIF28, eIF29, eIF30, eIF31, eIF32, eIF33, eIF34, eIF35, eIF36, eIF37, eIF38, eIF39, eIF40, eIF41, eIF42, eIF43, eIF44, eIF45, eIF46, eIF47, eIF48, eIF49, eIF50, eIF51, eIF52, eIF53, eIF54, eIF55, eIF56, eIF57, eIF58, eIF59, eIF60, eIF61, eIF62, eIF63, eIF64, eIF65, eIF66, eIF67, eIF68, eIF69, eIF70, eIF71, eIF72, eIF73, eIF74, eIF75, eIF76, eIF77, eIF78, eIF79, eIF80, eIF81, eIF82, eIF83, eIF84, eIF85, eIF86, eIF87, eIF88, eIF89, eIF90, eIF91, eIF92, eIF93, eIF94, eIF95, eIF96, eIF97, eIF98, eIF99, eIF100).

2) Wzrost 43S do mRNP. Inicjacyjny kompleks 43S przemieszcza się wzdłuż mRNA w kierunku 5' końca. Po przyłączeniu czynnika inicjacyjnego (eIF) do mRNA, kompleks 43S przemieszcza się wzdłuż mRNA w kierunku 5' końca. Po przyłączeniu czynnika inicjacyjnego (eIF) do mRNA, kompleks 43S przemieszcza się wzdłuż mRNA w kierunku 5' końca.

3) Rozbudowanie kompleksu 43S do kompleksu 80S. Kompleks 43S przemieszcza się wzdłuż mRNA w kierunku 5' końca. Po przyłączeniu czynnika inicjacyjnego (eIF) do mRNA, kompleks 43S przemieszcza się wzdłuż mRNA w kierunku 5' końca. Po przyłączeniu czynnika inicjacyjnego (eIF) do mRNA, kompleks 43S przemieszcza się wzdłuż mRNA w kierunku 5' końca.

4) Hydroliza GTP związanej z eIF2. eIF2 jest związany z eIF2GTP. Hydroliza GTP związanej z eIF2 prowadzi do uwolnienia eIF2GDP. eIF2GDP jest uwolniony z eIF2GTP. Hydroliza GTP związanej z eIF2 prowadzi do uwolnienia eIF2GDP. eIF2GDP jest uwolniony z eIF2GTP.

5) Kompleks GTP jest uwolniony z eIF2. eIF2GTP jest uwolniony z eIF2GDP. eIF2GDP jest uwolniony z eIF2GTP. eIF2GDP jest uwolniony z eIF2GTP.

5) Uwolnienie pozostałych czynników z kompleksu 48S oraz przyłączanie podjednostki 60S, co wymaga obecności eIF5B [108]. Utworzony zostaje rybosom 80S z cząsteczką Met-tRNA<sub>i</sub> przyłączoną w miejscu P.

Podczas procesu inicjacji translacji, wymagana jest obecność oddzielnie występujących podjednostek 40S i 60S [97]. Dlatego też po każdym cyklu biosyntezy białka, rybosomy 80S muszą zostać uwolnione z cząsteczki mRNA jako oddzielne podjednostki, chronione przed ponownym niespecyficznym zasocjowaniem. Pomimo tego, że mechanizm postterminacyjnego odzyskiwania nie jest do końca poznany u eukariota, sugeruje się udział eIF3 oraz eIF1A w zapobieganiu reasocjacji wolnych podjednostek 40S i 60S oraz w dysocjacji rybosomów 80S.

### 3.2.2 Elongacja procesu biosyntezy białka.

Ponad czterdzieści lat temu Watson i Crick zaproponowali pierwszy mechanizm biosyntezy peptydu w rybosomie, postulując istnienie dwóch miejsc: A – do którego przyłącza się tRNA niosący aminokwas (AA-tRNA) oraz P – w którym zlokalizowany jest peptydylo-tRNA (P-tRNA). Zgodnie z tym modelem, związanie kolejnego AA-tRNA uwalnia deacylowany tRNA, natomiast na rybosomie znajduje się P-tRNA [109]. Klasyczny model dwumiejscowy został zastąpiony przez model trójmiejscowy wraz z odkryciem rybosomalnego miejsca E (miejsce wyjścia, ang. *exit site*) przez Nierhaua i współpracowników [110]. W 1990 roku Nierhaus opisał model, w którym postulował większą liczbę miejsc aktywnych w rybosomie i bardziej złożone mechanizmy translacji. Jest to allosteryczny trójmiejscowy model translacji (ang. *allosteric three-site model*) [111, 112]. Charakteryzuje się on obecnością w rybosomie zawsze dwóch cząsteczek tRNA, znajdujących się w odmiennych stanach translacyjnych. W stanie pretranslokacyjnym, w miejscu A znajduje się AA-tRNA, natomiast w miejscu P znajduje się P-tRNA. W stanie posttranslokacyjnym obsadzone są również dwa miejsca i są to: miejsce P przez P-tRNA oraz miejsce E przez deacylowany tRNA (D-tRNA). Drugą charakterystyczną cechą modelu trójmiejscowego jest wzajemne allosteryczne oddziaływanie między miejscami A i E. Zgodnie z definicją allosterii, następuje zmiana struktury cząsteczki (w tym przypadku fragmentu rybosomu) powodująca zmianę powinowactwa do ligandu (czyli do tRNA). W przypadku procesu elongacji efekt allosterii objawia się tym, że AA-tRNA zmienia strukturę rybosomu obniżając powinowactwo

3.3.3

W 1990 roku Michael...  
w tym samym czasie...  
translacji (ang. alternative splicing)...  
w tym samym czasie...  
translacyjnych...  
nazwami w miejscu...  
również dwa miejsca...  
(D-RNA) Dwa...  
alternatywnie od...  
tymczasem struktury...  
powinowały do...  
opinała się...  
dwumiejscowy...  
decydowały RNA...  
peptydo-RNA D-RNA...  
nie RNA...  
biogenetyczny...  
między E (miejsce...  
translacji i...  
z tym samym i...  
W 1990 roku Michael...  
w tym samym czasie...  
translacyjnych...  
nazwami w miejscu...  
również dwa miejsca...  
(D-RNA) Dwa...  
alternatywnie od...  
tymczasem struktury...  
powinowały do...  
opinała się...

deacylowanego tRNA do miejsca E i odwrotnie, jeżeli deacylowany tRNA zlokalizowany jest w miejscu E, to w miejscu A występuje obniżone powinowactwo do AA-tRNA. Dzięki dowodom wskazującym na istnienie dwóch dodatkowych hybrydowych miejsc wiązania, A/P oraz P/E [113-115] oraz więcej niż jednego miejsca E zaproponowano istnienie kilku (siedmiu lub więcej) miejsc wiązania tRNA na rybosomie oraz udokładniony model elongacji biosyntezy białka. W głównych założeniach modelu stanu hybrydowego (ang. *hybrid-site model*), w rybosomie podczas elongacji istnieją stany pośrednie, w których dwa końce tRNA mogą znajdować się w różnych miejscach podjednostek. Oznacza to, że tRNA może równocześnie zajmować na przykład miejsce A w podjednostce 30S i miejsce P podjednostki 50S, tj. antykodon tRNA oddziałuje z kodonem mRNA w miejscu A małej podjednostki, podczas gdy koniec akceptorowy znajduje się w miejscu P dużej podjednostki. Taki stan może powstać na skutek przechylenia się cząsteczek tRNA lub ruchu podjednostki 50S względem podjednostki 30S.

W trakcie elongacji łańcucha polipeptydowego w rybosomie mają miejsce trzy zasadnicze procesy [21]:

- rozpoznanie mRNA – AA-tRNA poprzez oddziaływanie kodon – antykodon,
- utworzenie wiązania peptydowego,
- przesunięcie tRNA i mRNA wzdłuż rybosomu (translokacja).

- **Rozpoznanie mRNA – AA-tRNA poprzez oddziaływanie kodon – antykodon**

Podczas pierwszego etapu elongacji, następuje przyłączenie AA-tRNA do rybosomalnego miejsca A, w procesie zależnym od GTP, katalizowanym przez czynnik elongacyjny eEF1 [116]. Czynnik eEF1 (podobnie jak jego prokariotyczny odpowiednik, EF-Tu) składa się z trzech domen [117]. Domena I, nazywana też domeną G', zbudowana jest z ok. 200 aminokwasów u prokariota i odpowiedzialna jest za wiązanie GTP lub GDP. U organizmów eukariotycznych, stwierdzono, że domena G' posiada duże sekwencje wstawione, jednak żadna z nich nie wpływa zasadniczo na funkcjonowanie czynnika. Pozostałe domeny, II i III, są zbudowane z ok. 100 reszt aminokwasowych i przybierają kształt  $\beta$ -baryłki.

eEF1 tworząc kompleks potrójny z GTP i AA-tRNA (Rysunek 26 A), ochrania przed hydrolizą wiązanie estrowe i dostarcza AA-tRNA do rybosomalnego miejsca A [21] i prace tam cytowane]. W miejscu tym zachodzi dwuetapowa selekcja AA-tRNA zależna od kodonu:

decydującego BRNA o...  
 w miejscu E2 to w...  
 dowodem występują...  
 oraz PVE [113-115] oraz...  
 lub więcej) między...  
 biochemiczny białka. W...  
 model), w...  
 mogą znajdować się...  
 równocześnie zajmują...  
 202, w...  
 podczas gdy...  
 powstał na skutek...  
 profidantki 302

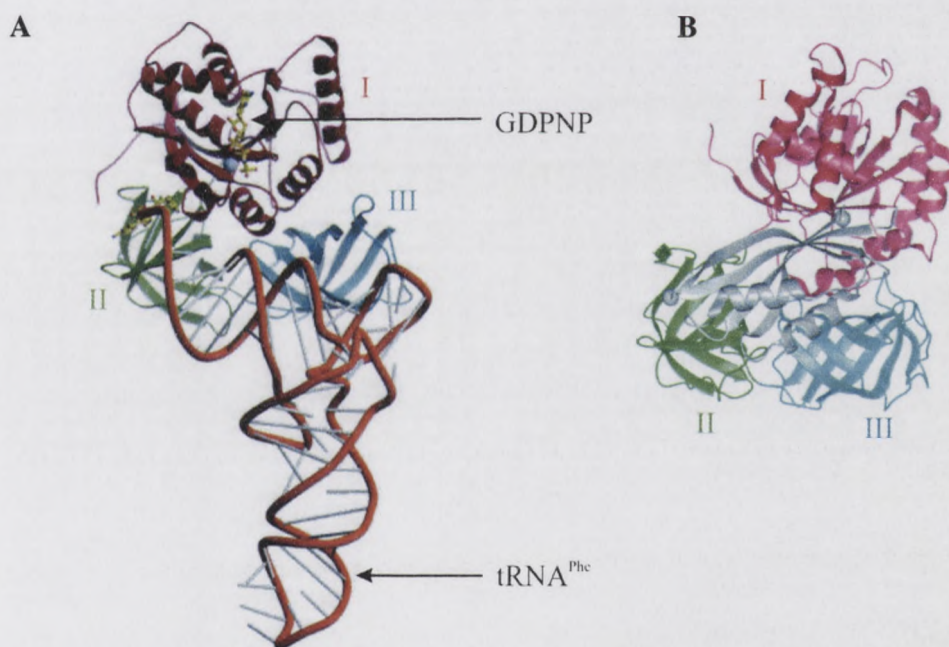
W

- rozpoznanie mRNA -
- utworzenie wiązania...
- przesłanie RNA...

\* Rozpoznanie...

Podczas pierwszego...  
 cytoplazmatycznego...  
 elongacyjny eRF1 [115]...  
 eRF-1) składa się z...  
 z ok. 300 aminokwasów...  
 U organizmów...  
 wtawione, jedną...  
 Porozdzielone domeny, II i III...  
 2-bazylki.  
 eRF1 tworzą...  
 hydrolyzując...  
 tam cyrowanie. W...

(a) wstępna selekcja przed hydrolizą GTP związanego z eEF1 (ang. *initial selection*) oraz (b) selekcja korekcyjna po hydrolizie eEF1/GTP, ale przed utworzeniem wiązania peptydowego (ang. *proofreading*) [116]. Podczas pierwszego etapu selekcji, kompleks potrójny eEF1/GTP/AA-tRNA tworzy labilny wstępny kompleks inicjatorowy z rybosomem. Ten etap przebiega niezależnie od sekwencji kodonu mRNA [118]. Następujące po nim rozpoznanie odpowiedniego kodonu przez antykodon AA-tRNA powoduje stabilizację kompleksu potrójnego przez oddziaływanie AA-tRNA z mRNA w centrum dekodującym rybosomu. Tworzenie stabilnego kompleksu jest preferowane kiedy w pozycji 37 antykodonu cząsteczki tRNA znajduje się reszta purynowa [119]. Stwierdzono również, że formowanie dupletu kodon-antykonon prowadzi do zmian konformacyjnych w regionach małej podjednostki rybosomalnej, gdzie występują konserwatywne reszty A1492, A1493 oraz G530 [42].



**Rysunek 26. Struktura czynnika elongacyjnego EF1.** (na podstawie [117])

A – struktura kompleksu potrójnego EF-Tu/GDPNP/AA-tRNA z *T. aquaticus*.

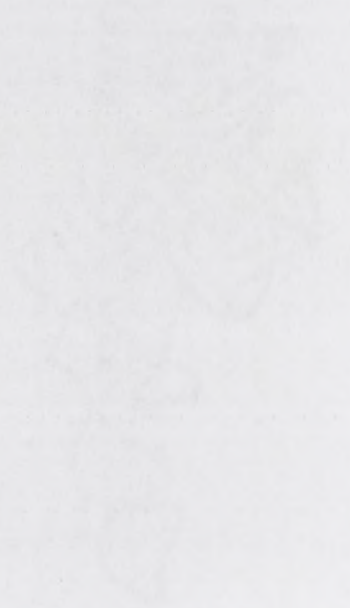
GDPNP – niehydrolizowalny analog GTP. Cyframi oznaczono domeny czynnika elongacyjnego (I, II, III).

B – struktura czynnika elongacyjnego eEF1 *S. cerevisiae*. Cyframi oznaczono domeny czynnika elongacyjnego (I, II, III). Kolorem szarym przedstawiono fragment katalityczny czynnika wymieniającego nukleotyd (eEF1B $\alpha$ ).

Oddziaływanie kodon-antykonon jest sygnałem aktywującym centrum GTPazowe rybosomu ze związanym kompleksem eEF1/GTP/AA-tRNA, w wyniku czego ma miejsce hydroliza GTP. W wyniku tej reakcji powstają GDP oraz nieorganiczny fosforan Pi. Lokalne

G250 (42)

A



III

B - mierzona

stężenie

wynikające

z

oddziaływania

tybionu na

hydrolyz GTP

zmiany strukturalne w centrum dekodującym powodują na tym etapie globalne zmiany podjednostki 40S, która przybiera bardziej zamkniętą konformację [120]. Badania z użyciem techniki smFRET (ang. *single molecule fluorescence energy transfer*) sugerują, że AA-tRNA przyjmuje bardziej otwartą konformację niż w poprzednich stanach [115]. Ramię antykodonowe AA-tRNA w rybosomie ulega reorientacji poprzez pochylenie się fragmentu cząsteczki tRNA na złączeniu ramienia antykodonowego i DHU w pozycjach 44, 45 i 26 [25]. W przypadku eEF1 również obserwowano zmiany konformacyjne na tym etapie elongacji. Występują one w obrębie domeny G' i prowadzą do otwarcia hydrofobowej kieszeni eEF1 prowadzącej do katalitycznej reszty histydyny His84 [121].

Po hydrolizie GTP następuje uwolnienie AA-tRNA z kompleksu eEF1/GDP. Koniec aminoacylowy cząsteczki AA-tRNA jest więc zdolny do przesunięcia się do centrum peptydylotransferazowego podjednostki 50S, aby mogło dojść do syntezy wiązania peptydowego w rybosomie.

- **Utworzenie wiązania peptydowego w rybosomie**

Kataliza wiązania peptydowego ma miejsce w centrum peptydylotransferazowym rybosomu (PTC). Na podstawie badań struktury atomowej dużej podjednostki rybosomalnej *H. marismortui* stwierdzono, że miejsce aktywne rybosomu jest zbudowane wyłącznie z rRNA – tworzą je nukleotydy centralnej pętli domeny V 23S rRNA [1, 2, 5]. Podobną strukturę miejsca aktywnego obserwowano również w przypadku *Deinococcus radiourans* [76]. W tych obszarach dużej podjednostki występują wysoce konserwatywne sekwencje L-rRNA zarówno w rybosomach pro- jak i eukariotycznych, co świadczy o ich zasadniczej funkcji w procesie translacji i o tym, że proces ten przebiega w ten sam sposób w rybosomach 70S i 80S. Z domeną V 23S rRNA oddziałuje 15 białek (Rysunek 27A). Najbliżej PTC znajdują się rybosomalne białka L2, L3, L4 i L10e, które penetrują szkielet domeny V 23S rRNA i kierują swe nieglobularne „ogony” w kierunku PTC [50]. Jednakże ze struktury krystalicznej podjednostki 50S *H. marismortui* można wnioskować, że nawet najbliższe z białek nie znajduje się w takiej odległości do centrum aktywnego PTC, aby mogło pełnić aktywną funkcję jako katalizator w reakcji syntezy wiązania peptydowego (Rysunek 27B). Dzięki tym odkryciom można jednoznacznie wnioskować, że to 23S rRNA odgrywa główną rolę w katalizowaniu reakcji polimeryzacji reszt aminokwasowych w rybosomie. Można też sądzić, że białka rybosomalne pełnią rolę stabilizującą, utrzymując odpowiednią strukturę trzeciorzędową domeny V 23S rRNA, warunkującą jej aktywność [21 i prace tam cytowane]. Dzięki temu

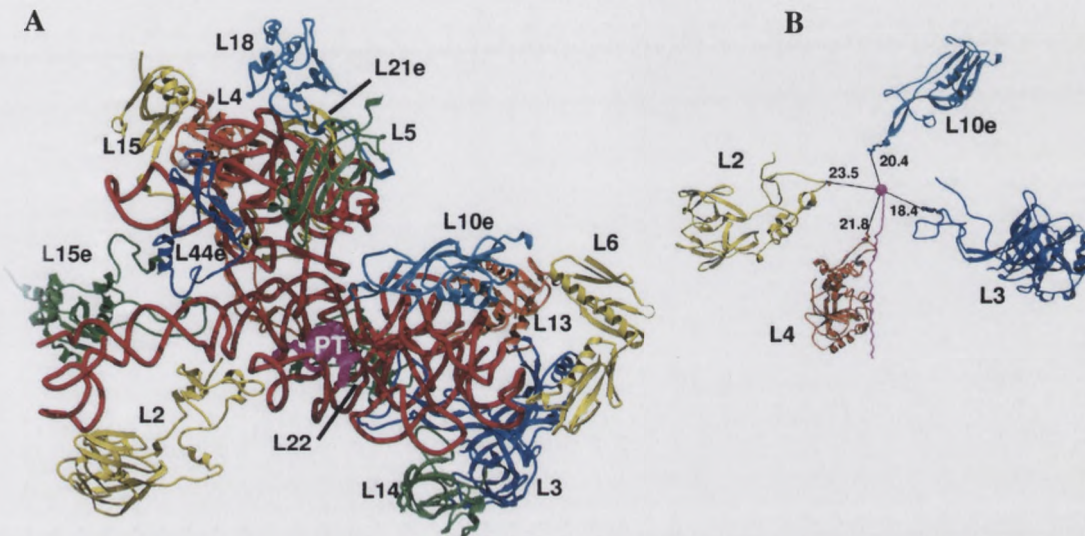


zmiany struktury...  
 podjednostki 402...  
 techniki...  
 przynajmniej...  
 anizotropowe...  
 cząsteczki...  
 W przypadku...  
 Wyjątkiem...  
 prowadzącej...  
 Po hydro...  
 aminocyslaw...  
 polipeptyd...  
 polipeptydowego...

• Historia...

Kamień...  
 rybosomu (P...  
 II. warstwow...  
 - tworze...  
 miejsca...  
 obszarach...  
 w rybosomach...  
 transkrypcji...  
 domena V...  
 rybosomalne...  
 zwoje...  
 podjednostki...  
 znajduje...  
 funkcję...  
 odrycia...  
 katalizowania...  
 białka...  
 domeny V...

możemy umieścić rybosom, dający początek wszystkim białkowym enzymom, na liście naturalnie występujących rybozymów.



**Rysunek 27. Białka rybosomalne znajdujące się najbliżej PTC.** (na podstawie [50])

A - struktura III-rzędowa fragmentu domeny V 23S rRNA (kolor czerwony) i oddziałujące z nią białka (pozostałe kolory);

B - miejsce aktywne rybosomu z usuniętą cząsteczką rRNA. Zaznaczono najbliższe białka i odległości (w Å) do centrum aktywnego.

W sercu PTC znajduje się pięć wysoce konserwatywnych reszt: A2451, U2506, U2585, C2452 i A2602 (numeracja wg. *E.coli*) [122-124].

Połączenie aminokwasów kowalencyjnym wiązaniem peptydowym zachodzi między grupą  $\alpha$ -aminową AA-tRNA znajdującego się w miejscu A rybosomu a grupą karboksylową P-tRNA w miejscu P (Rysunek 28). W pierwszym etapie grupa  $\alpha$ -NH<sup>3+</sup> aminokwasu z AA-tRNA ulega deprotonacji i tworzy się nukleofilowa grupa NH<sub>2</sub> (etap 1). pKa tej grupy wynosi około 8. Proton pochodzący z tego etapu jest najprawdopodobniej przyjmowany przez cząsteczkę wody. Następnie ma miejsce atak nukleofilowy grupy  $\alpha$ -aminowej AA-tRNA na elektrofilową grupę karbonylową P-tRNA (etap 2). Ta reakcja prowadzi do utworzenia wstępnie protonowanego związku przejściowego, który poprzez deprotonację (etap 3) tworzy związek pośredni - węgiel o tetraedrycznym układzie wiązań. Rozpad związku przejściowego (etap 4), zainicjowany przez oddanie protonu na atom tlenu, prowadzi do powstania produktów reakcji, tj. D-tRNA w miejscu P oraz P-tRNA niosącego dodatkowy aminokwas (+1 aa) w miejscu A.



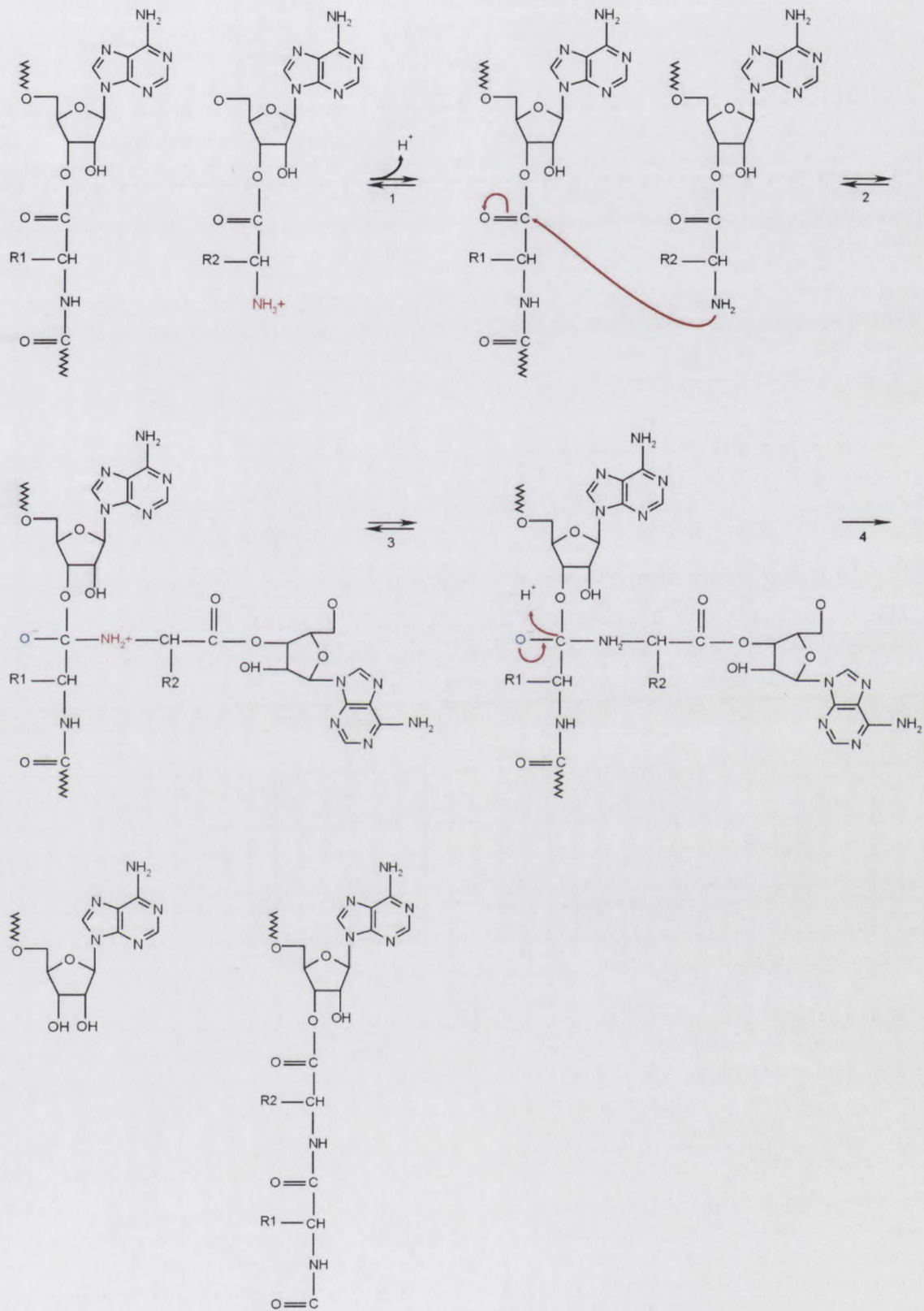
Research in the field of...  
A - ...  
B - ...

Work in progress...  
[2345] ...

step 1...  
P-RNA...

2 AA-RNA...  
Wound of...  
Cranial...

Electrolyte...  
Weight...  
Twisted...  
[gap]...  
teach...  
w migan...



**Rysunek 28. Mechanizm syntezy wiązania peptydowego.** (zmodyfikowane według [125])

- 1 - deprotonacja grupy  $\text{NH}_3^+$ ;
- 2 - atak nukleofilowy grupy  $\text{NH}_2$  AA-tRNA na grupę  $\text{C}=\text{O}$  P-tRNA;
- 3 - deprotonacja związku przejściowego;
- 4 - utworzenie produktów reakcji.



Figure 2. Effect of storage temperature on the survival of *S. aureus* in milk. 1 - 4°C; 2 - 10°C; 3 - 15°C; 4 - 20°C.

Substraty do utworzenia wiązania peptydowego, tj. aminoacylo-tRNA (AA-tRNA) w rybosomalnym miejscu A i peptydylo-tRNA (P-tRNA) w miejscu P, muszą znajdować się w odpowiedniej orientacji. Za jej przybranie odpowiedzialne są specyficzne interakcje między cząsteczką tRNA a 23S rRNA i białkami rybosomalnymi małej i dużej podjednostki [126]. Usytuowanie cząsteczki P-tRNA w miejscu P jest stabilizowane głównie poprzez oddziaływanie nukleotydów C74 i C75 tRNA z resztami zasad G2253 i G2252 23S rRNA, ulokowanymi w tzw. pętli P. Zasadnicze znaczenie mają również interakcje między A76 i A2450-C2501, tworzącymi tzw. motyw *A-minor* [50, 127]. Cząsteczka AA-tRNA zawdzięcza odpowiednie umiejscowienie w miejscu A, przede wszystkim interakcjom nukleotydu C75 z G2553 pętli A 23S rRNA oraz oddziaływaniom typu *A-minor* między A76 a U2506-G2583 [50, 128].

Nadal otwarte pozostaje pytanie, czy oprócz odpowiedniej orientacji substratów, rybosom wymaga innych czynników do katalizy syntezy wiązania peptydowego. Pochodząca z wczesnych badań hipoteza o tym, że jedna z grup chemicznych rybosomalnego RNA może mieć aktywny udział w tym procesie jest w sprzeczności z późniejszymi eksperymentami. Obecnie istnieje kilka koncepcji mechanizmu syntezy wiązania peptydowego, z których dwie są najlepiej poparte dowodami eksperymentalnymi. Jedna z nich zakłada, że siła katalityczna rybosomu jest związana z redukcją entropii reakcji, natomiast inna przedstawia możliwość uczestniczenia jednej z grup chemicznych substratów w reakcji syntezy.

Według proponowanego w 2000 r. przez Nissena i Steitza założenia, za aktywność katalityczną odpowiedzialny jest wysoce konserwatywny nukleotyd (A2451 u *E. coli*, A2486 u *H. marismortui*), znajdujący się najbliżej reagujących grup [50, 129]. Według tej hipotezy, następuje oderwanie protonu przez N3 A2451 z reszty  $\alpha$ -aminowej aminokwasu z AA-tRNA, w wyniku czego następowałby nukleofilowy atak grupy  $\alpha$ -aminowej na atom węgla grupy karbonylowej P-tRNA. Uprotonowany N3 A2451 mógłby brać udział w stabilizacji utworzonego związku pośredniego, poprzez wiązanie wodorowe z oksyanionem O<sup>-</sup>. Proton zostałby następnie przekazany z N3 na koniec 3' deacylowanego tRNA, związanego w miejscu P, zaraz po odłączeniu od niego nowo utworzonego peptydu. W ten sposób powstawałyby produkty reakcji, tj. D-tRNA w miejscu P oraz P-tRNA z dodatkowym aminokwasem w miejscu A.

Pomimo tego, że model ten ma swoje uzasadnienie, pochodzące z wczesnych badań biochemicznych z wykorzystaniem rybosomów *E. coli* [130, 131], okazało się, że rola nukleotydu A2451 w katalizowaniu syntezy wiązania peptydowego nie jest jednoznaczna. Przeprowadzone w 2001 r. przez dwie grupy badaczy eksperymenty wykazały, że mutacje

W tym celu należy przede wszystkim zwrócić uwagę na...

W ramach projektu przewidziano następujące zadania:

1. Wykonanie analizy stanu obecnych rozwiązań...

2. Opracowanie koncepcji nowego systemu...

3. Realizacja prototypu systemu...

4. Wdrożenie systemu i przeprowadzenie testów...

5. Szkolenie użytkowników...

6. Monitorowanie działania systemu i ewaluacja...

W ramach projektu przewidziano następujące zadania:

1. Wykonanie analizy stanu obecnych rozwiązań...

2. Opracowanie koncepcji nowego systemu...

3. Realizacja prototypu systemu...

4. Wdrożenie systemu i przeprowadzenie testów...

5. Szkolenie użytkowników...

6. Monitorowanie działania systemu i ewaluacja...

nukleotydu A2451 nie hamują syntezy wiązania peptydowego *in vitro* [132, 133]. Ponadto stwierdzono, że wprowadzenie chemicznych modyfikacji zasady w pozycji 2451 (które eliminowały możliwość tworzenia wiązania wodorowego atomów azotu N1 lub N3 adeniny), a nawet całkowita delecja zasady, ma jedynie marginalny wpływ na tworzenie wiązania peptydowego [134]. Natomiast grupa 2'-OH rybozy w pozycji 2451 wydaje się pełnić ważną rolę w katalitycznej aktywności PTC i ułatwia transpeptydację najprawdopodobniej poprzez koordynację atakującej grupy  $\alpha$ -aminowej. Konserwatywny nukleotyd A2451 może zatem pełnić rolę w odpowiednim umiejscowieniu grupy 2'-hydroksylowej rybozy [135].

Ponadto, w 2004 r. Sievers i współpracownicy przeprowadzili serię eksperymentów, aby sprawdzić, czy rybosom działa na zasadzie chemicznej katalizy, czy też synteza wiązania peptydowego jest uzależniona tylko od przyjęcia odpowiedniej pozycji przez substraty w PTC [136]. W tym celu porównano parametry kinetyczne rybosomalnej reakcji tworzenia wiązania peptydowego i niekatalitycznej reakcji modelowej. Okazało się, że w przeciwieństwie do większości białkowych enzymów, zwiększenie szybkości reakcji w rybosomie odbywa się wyłącznie przez obniżanie entropii aktywacji, a ta pochodzi z prawidłowego ułożenia cząsteczek AA-tRNA i P-tRNA. Rezultaty te są potwierdzeniem tezy, że rybosom zwiększa szybkość reakcji syntezy wiązania peptydowego głównie poprzez odpowiednią orientację substratów.

Brano również pod uwagę możliwość udziału poszczególnych grup chemicznych cząsteczek tRNA w tworzeniu wiązania peptydowego. Barta i współpracownicy zaproponowali w 2002 roku model, według którego grupa 2'-OH A76 tRNA w miejscu P bierze bezpośredni udział w tworzeniu wiązania peptydowego. W modelu tym, atakowi nukleofilowemu grupy  $\alpha$ -aminowej tRNA w miejscu A na elektrofilowy atom węgla tRNA w miejscu P, towarzyszy zachodzące równoległe tworzenie wiązania wodorowego. W wiązaniu tym donorem jest grupa  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> a akceptorem tlen w pozycji 2' rybozy tRNA w miejscu P. Jednocześnie zachodzi migracja protonu z grupy 2'-OH na atom 3'-O. Reakcje te prowadzą do utworzenia produktów: D-tRNA w miejscu P i P-tRNA w miejscu A. Stwierdzono również, że grupa 2'-OH rybozy tRNA w miejscu P jest jedyną funkcjonalną grupą chemiczną w bliskim sąsiedztwie miejsca aktywnego rybosomu [50], której usunięcie powoduje wystarczający wpływ na szybkość transpeptydacji, aby brać pod uwagę jej udział w katalizowaniu tej reakcji. Stwierdzono również, że niezwykle ważna dla tworzenia wiązania peptydowego jest grupa 2'-OH rybozy reszty w pozycji A2451 23S rRNA. Bierze ona udział w tworzeniu sieci wiązań wodorowych w miejscu aktywnym rybosomu i oddziałuje z grupą 2'-OH rybozy tRNA w miejscu P. Substytucja 2'-OH rybozy reszty w pozycji A2451 przez



Wskazano, że w reakcji z  $\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{H}^+$  następuje eliminacja grupy  $\text{OH}$  z 2-ohydroksy-1,2,3-trioxoluenu, co prowadzi do powstania 2,3-dioxoluenu. Wskazano również, że w reakcji z  $\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{H}^+$  następuje eliminacja grupy  $\text{OH}$  z 2-ohydroksy-1,2,3-trioxoluenu, co prowadzi do powstania 2,3-dioxoluenu.

Wskazano, że w reakcji z  $\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{H}^+$  następuje eliminacja grupy  $\text{OH}$  z 2-ohydroksy-1,2,3-trioxoluenu, co prowadzi do powstania 2,3-dioxoluenu. Wskazano również, że w reakcji z  $\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{H}^+$  następuje eliminacja grupy  $\text{OH}$  z 2-ohydroksy-1,2,3-trioxoluenu, co prowadzi do powstania 2,3-dioxoluenu.

Wskazano, że w reakcji z  $\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{H}^+$  następuje eliminacja grupy  $\text{OH}$  z 2-ohydroksy-1,2,3-trioxoluenu, co prowadzi do powstania 2,3-dioxoluenu. Wskazano również, że w reakcji z  $\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{H}^+$  następuje eliminacja grupy  $\text{OH}$  z 2-ohydroksy-1,2,3-trioxoluenu, co prowadzi do powstania 2,3-dioxoluenu.

Wskazano, że w reakcji z  $\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{H}^+$  następuje eliminacja grupy  $\text{OH}$  z 2-ohydroksy-1,2,3-trioxoluenu, co prowadzi do powstania 2,3-dioxoluenu. Wskazano również, że w reakcji z  $\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{H}^+$  następuje eliminacja grupy  $\text{OH}$  z 2-ohydroksy-1,2,3-trioxoluenu, co prowadzi do powstania 2,3-dioxoluenu.

atom wodoru prowadziła do zahamowania aktywności centrum peptydylotransferazowego [134, 137]. Potwierdzenie tego modelu dostarczyły wyniki Strobla i współpracowników [138-140], struktury krystaliczne PTC ze związanym analogiem stanu przejściowego [141], a także eksperymenty opierające się na metodach dynamiki molekularnej (ang. *molecular dynamics*, MD) i pomiarach energii półempiryczną metodą wiązań walencyjnych (ang. *empirical valence bond*, EVB) [142, 143].

- **Przesunięcie tRNA i mRNA wzdłuż rybosomu (translokacja)**

Po utworzeniu wiązania peptydowego, w rybosomie znajdują się produkty reakcji, czyli deacylowany tRNA w miejscu P oraz peptydylo-tRNA w miejscu A. Rybosomalne miejsce A musi zostać zwolnione, aby mogła związać się kolejna cząsteczka aminoacylo-tRNA. Następuje wówczas przesunięcie tRNA i mRNA wzdłuż rybosomu, proces zwany translokacją. Najlepiej udokumentowany i potwierdzony licznymi badaniami biochemicznymi i strukturalnymi jest model, w którym podczas dynamicznego procesu elongacji, występują stany hybrydowe cząsteczek tRNA (model stanu hybrydowego, omówiony w poprzednim podrozdziale). Według tego modelu [113], translokacja zachodzi w dwóch etapach. W pierwszym etapie, który następuje spontanicznie po reakcji syntezy wiązania peptydowego, końce akceptorowe D-tRNA i P-tRNA przesuwają się wzdłuż dużej podjednostki rybosomalnej z miejsc P i A do miejsc, odpowiednio, E i P. Końce antykodonowe tRNA nadal pozostają związane z małą podjednostką. W rezultacie, cząsteczki tRNA zajmują stany hybrydowe P/E oraz A/P (Rysunek 29E). W drugim etapie translokacji, który jest zależny od czynnika elongacyjnego eEF2 (EF-G u prokariota), następuje destabilizacja oddziaływań kodon/antykodon [144], wskutek czego końce antykodonowe obu cząsteczek tRNA przesuwają się względem małej podjednostki z miejsc P i A do miejsc, odpowiednio, E i P (Rysunek 29F). W rezultacie, po translokacji D-tRNA zajmuje w rybosomie miejsce E (stan E/E), natomiast P-tRNA zajmuje miejsce P (stan P/P). Kompleks eEF2/GDP ulega uwolnieniu z rybosomu, który jest gotowy na ponowny cykl elongacyjny (Rysunek 29G).

atom wodoru...

[134, 137] P...

[40] ...

eksperymenty...

MD) i pomiar...

bond, EVB)...

• P...

Po m...

deacylowany RNA...

musi zostać...

Następnie...

Najpierw...

strukturalny...

stanu hydr...

podobnie...

pięćdziesiąt...

kończąc...

cytozom...

pozostaje...

hydrodowe...

czynnik...

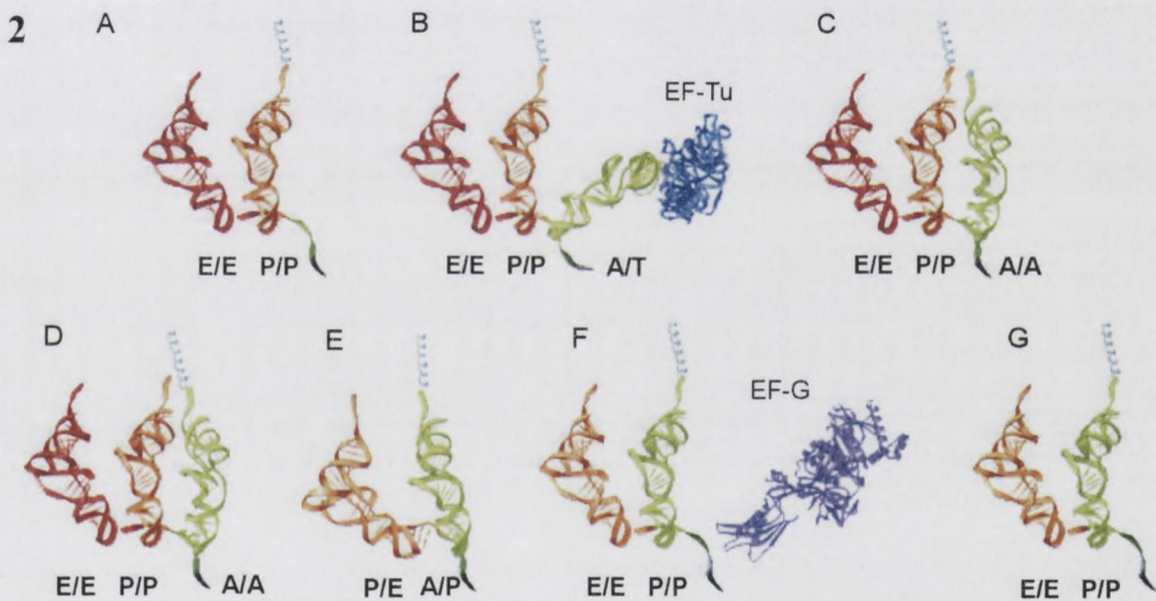
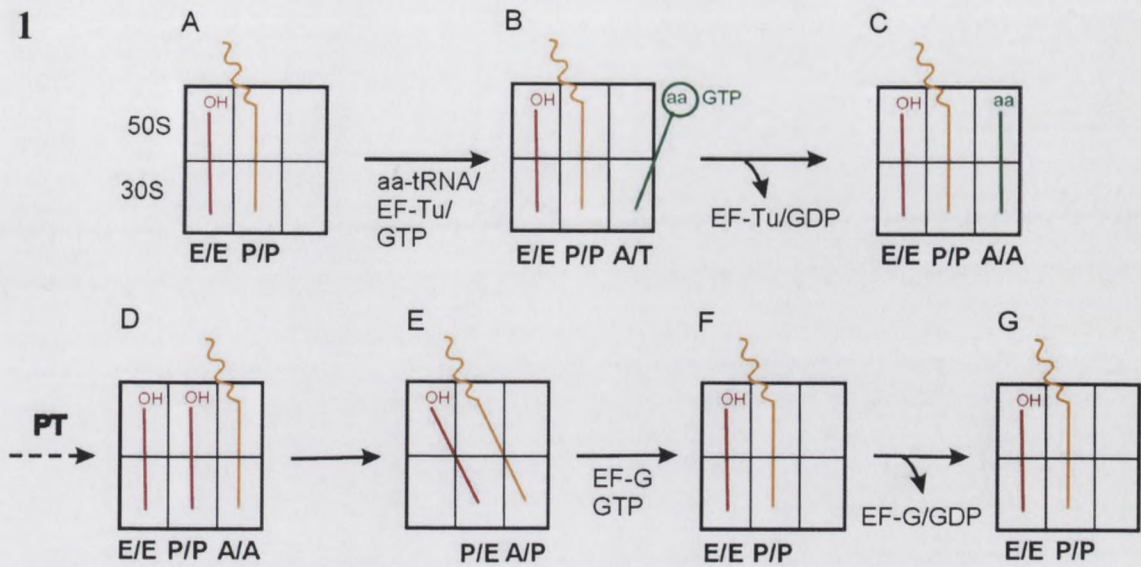
kodon/ant...

się wzię...

W rezult...

P-RNA...

który jest...



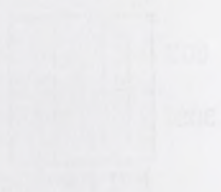
**Rysunek 29. Translokacja tRNA podczas elongacji biosyntezy białka (na podstawie [145]).**

1 - Schemat przedstawiający główne etapy cyklu translokacji (A-G) według modelu hybrydowego. Rybosom jest przedstawiony jako kwadrat i podzielony na podjednostki 50S i 30S oraz na miejsca A, P i E. tRNA przedstawiono jako linie pionowe. PT oznacza transfer reszty peptydylowej.

2 - Trójwymiarowy obraz głównych etapów cyklu translokacji według modelu hybrydowego (A-G jak w 1).

Translokacja cząsteczek tRNA w podjednostce 60S zachodzi dzięki różnemu powinowactwu określonych miejsc rybosomu do poszczególnych stanów chemicznych końca akceptorowego tRNA. Miejsce A w dużej podjednostce rybosomalnej jest specyficzne dla grupy aminoacylowej, miejsce P – dla grupy peptydylowej, natomiast miejsce E dla wolnego,

1



D



1



D



BE - PIP

Rysunek 20. (a) Schemat reakcji polimerazy RNA. (b) Schemat reakcji polimerazy RNA z dodatkiem inhibitora. (c) Schemat reakcji polimerazy RNA z dodatkiem inhibitora i E. RNA. (d) Schemat reakcji polimerazy RNA z dodatkiem inhibitora i E. RNA w 1).

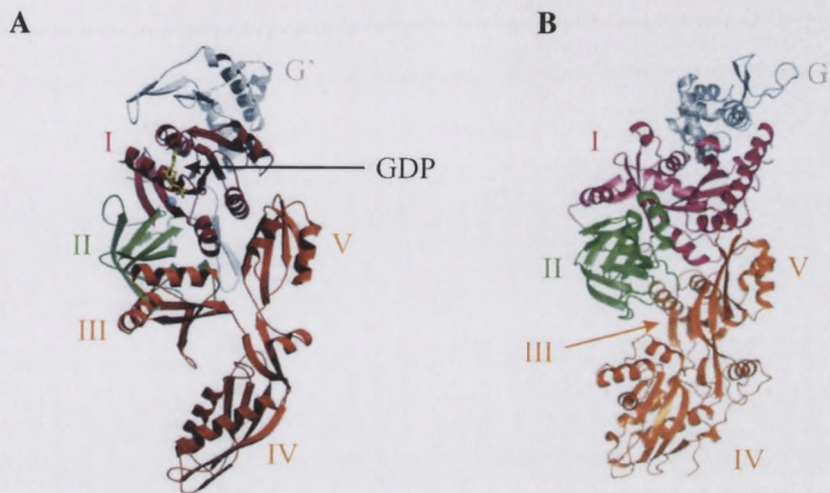
Tabela 1. Wyniki pomiarów aktywności polimerazy RNA w obecności inhibitora i E. RNA. Wyniki przedstawiono w postaci średniej i błędów standardowych.

deacylowanego końca 3' cząsteczki tRNA. Dlatego też, kiedy AA-tRNA po utworzeniu wiązania peptydowego staje się P-tRNA, energetycznie faworyzowane jest przesunięcie tej cząsteczki do miejsca P. Natomiast kiedy P-tRNA staje się D-tRNA, powinowactwo tej cząsteczki do miejsca E dostarcza energii niezbędnej do translokacji. W obu przypadkach, niezbędna energia jest ostatecznie dostarczana z chemicznego etapu reakcji syntezy wiązania peptydowego.

Translokacja cząsteczek tRNA w obrębie podjednostki 40S jest bardziej skomplikowana. Po pierwsze, przemieszczanie się cząsteczek tRNA między rybosomalnymi miejscami A, P i E w małej podjednostce musi być skoordynowane z przesuwaniem się cząsteczki mRNA wzdłuż rybosomu [146]. Po drugie, do translokacji wymagana jest obecność czynnika elongacyjnego eEF2 (EF-G u prokariota) oraz energii w postaci GTP. Podczas każdego przesunięcia tRNA/mRNA do kolejnego miejsca w rybosomie zużywana jest jedna cząsteczka GTP [147]. Mechanizm molekularny katalitycznej aktywności eEF2/EF-G pozostaje nadal niewyjaśniony [26]. Struktura czynnika prokariotycznego EF-G w kompleksie z GDP (Rysunek 30A), [117, 148] przypomina kształtem strukturę kompleksu EF-Tu/GTP/AA-tRNA (Rysunek 26A), dlatego też zaproponowano, że przyłączanie EF-G do rybosomu następuje na zasadzie podobieństwa strukturalnego do kompleksu potrójnego. Zjawisko takie nosi nazwę mimikry molekularnej. Zaproponowano, że następuje przyłączenie domeny IV EF-G do miejsca A, co skutkuje wypchnięciem cząsteczki AA-tRNA do miejsca P lub/i zajęcie miejsca A zapobiega ponownemu przesuwaniu cząsteczki tRNA z miejsca P [25, 26, 145, 149]. Najnowsze badania wykazują, że czynnik elongacyjny EF-G charakteryzuje się niską mobilnością podczas translokacji [147]. Mniej informacji jest dostępnych na temat eukariotycznego czynnika eEF2, jednak zarówno jego struktura krystaliczna [150] jak i model wiązania do rybosomu rozwiązany metodami mikroskopii krioelektronowej [151] wskazują na wiele podobieństw w stosunku do EF-G. Czynnik eEF2 zbudowany jest z 6 domen: I, G', II, III, IV i V [117]. Domeny I oraz II wykazują homologię do domen I i II czynnika elongacyjnego eEF1. Jednak w eEF2 występuje duża insercja między tymi domenami, która stabilizuje powierzchnię między nimi. Stwierdzono, że domena I ściśle oddziałuje z dużą podjednostką rybosomalną, natomiast domena II z małą podjednostką. Konformacja domen czynnika eEF2 ulega również dynamicznym zmianom podczas katalizy procesu translokacji [25, 148, 152]. Zasadniczą różnicą eEF2 w stosunku do EF-G jest struktura domeny IV, która jest dużo większa w przypadku eukariotycznego czynnika i co za tym idzie, jej struktura mniej przypomina helisę antykodonową cząsteczki tRNA (Rysunek 30B). Ta obserwacja stawia więc



znak zapytania przy koncepcji mimikry molekularnej, wysuniętej na podstawie podobieństwa czynnika prokariotycznego do kompleksu potrójnego.



**Rysunek 30. Struktura czynnika elongacyjnego EF2 (na podstawie [117]).**

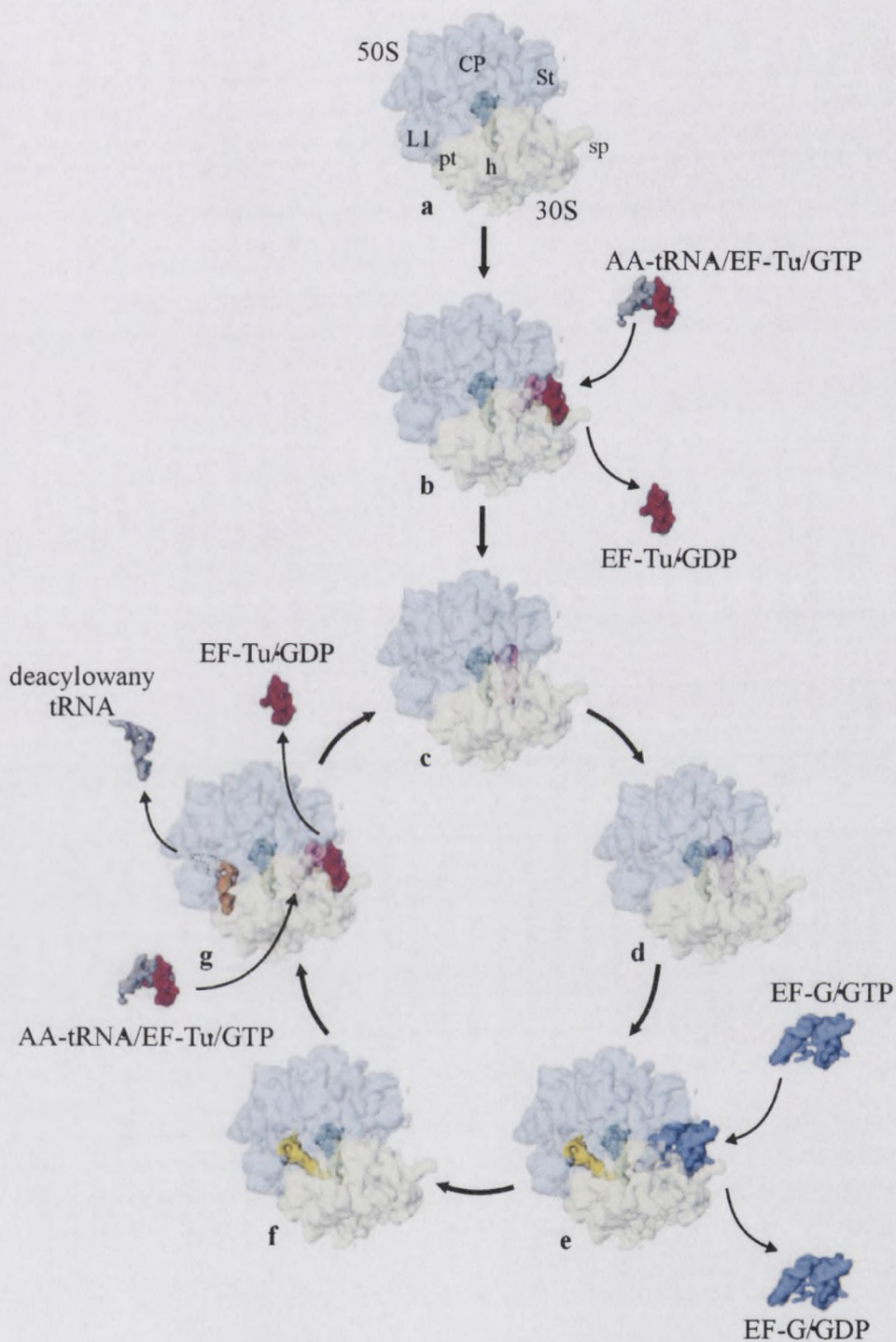
A – Struktura kompleksu czynnika prokariotycznego EF-G/GDP *T. thermophilus*. Cyframi oznaczono domeny czynnika elongacyjnego (I, II, III, IV, V, G').

B – Struktura czynnika eukariotycznego eEF2 *S. cerevisiae*. Cyframi oznaczono domeny czynnika elongacyjnego (I, II, III, IV, V, G').

Podsumowując, w cyklu elongacyjnym procesu biosyntezy białka, mają miejsce następujące zdarzenia [152]: Z kompleksem inicjacyjnym, w którym rybosom zawiera tRNA w miejscu P (Rysunek 31a) oddziałuje kompleks AA-tRNA/EF-Tu/GTP. Kompleks wiąże się do rybosomu w miejscu A/T (Rysunek 31b). Po hydrolizie GTP do GDP i oddysocjowaniu EF-Tu od rybosomu, tRNA przesuwa się w miejsce A i rybosom osiąga stan pretranslokacyjny (Rysunek 31c). Po spontanicznej syntezie wiązania peptydowego koniec CCA tRNA w miejscu A przesuwa się na miejsce  $A_{\text{pep}}$  (Rysunek 31d). Do rybosomu przyłącza się kompleks EF-G/GTP powodując translokację tRNA z miejsc  $A_{\text{pep}}$  i P do P i E (Rysunek 31e). Oddysocjowanie EF-G z rybosomu po hydrolizie GTP do GDP pozostawia rybosom w stanie posttranslokacyjnym (Rysunek 31f). Wówczas rybosom jest gotowy do przyjęcia kolejnego aminoacylo-tRNA do miejsca A. Podczas rozpoczęcia kolejnego cyklu elongacyjnego, kiedy obsadzone jest miejsce A, tRNA z miejsca E przesuwa się na miejsca E2 (Rysunek 31g) i dopiero z tego miejsca opuszcza rybosom.







**Rysunek 31. Sekwencja zdarzeń cyklu elongacyjnego w rybosomie 70S. (na podstawie [152]).** Kolorami oznaczono: żółtym transparentnym - podjednostkę 30S, niebieskim transparentnym - podjednostkę 50S, różowym - tRNA w miejscu A, fioletowym - tRNA w miejscu A<sub>pep</sub>, zielonym - tRNA w miejscu P, żółtym - tRNA w miejscu E, brązowym - tRNA w miejscu E2, czerwonym - EF-Tu, niebieskim - EF-G. Oznaczenia literowe: h - wierzchołek, pt - platforma, sp - ostroga, L1 - wypukłość L1, CP - centralna wypukłość, St - słupek L7/L12.

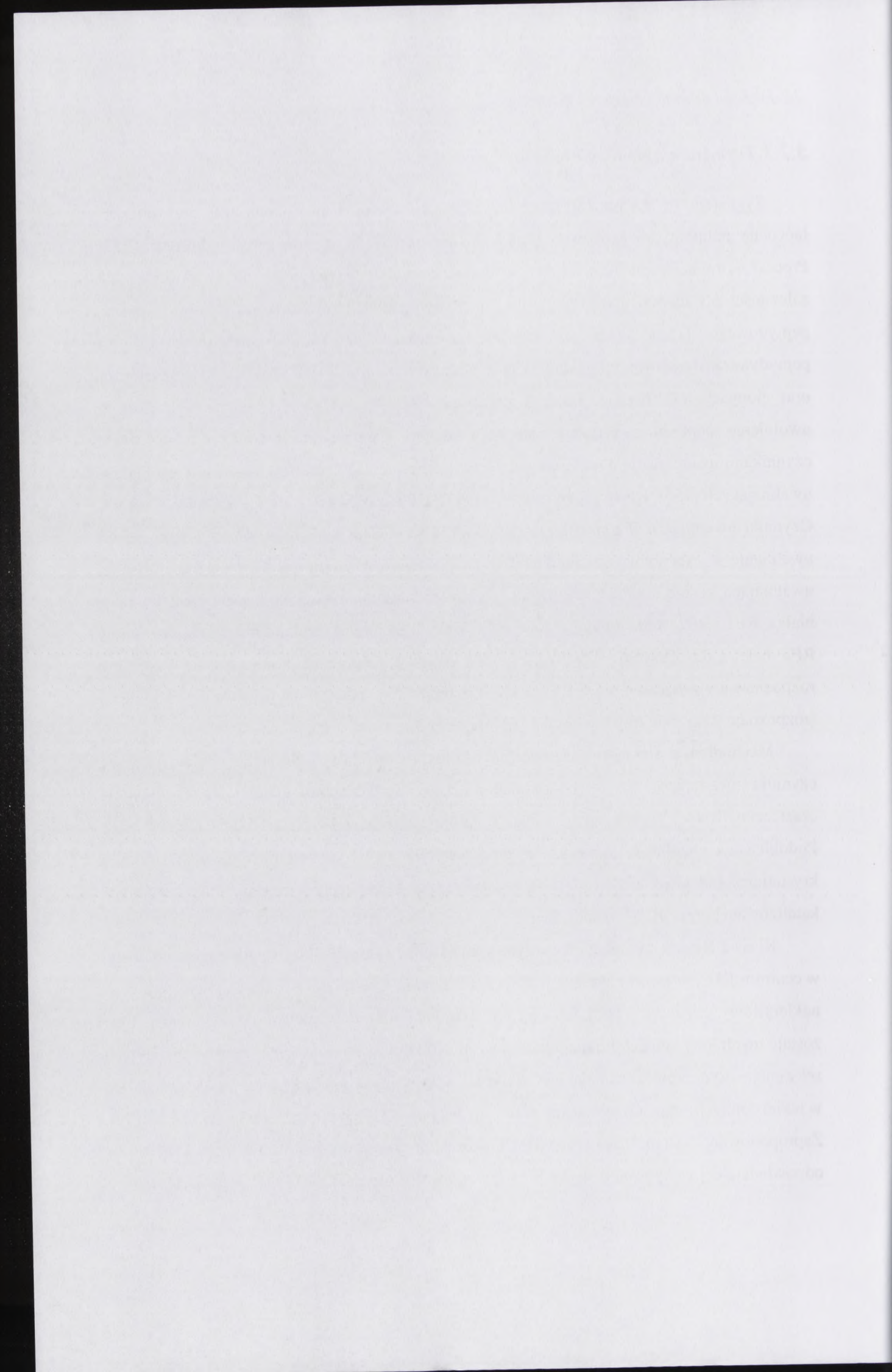


### 3.2.3 Terminacja procesu biosyntezy białka.

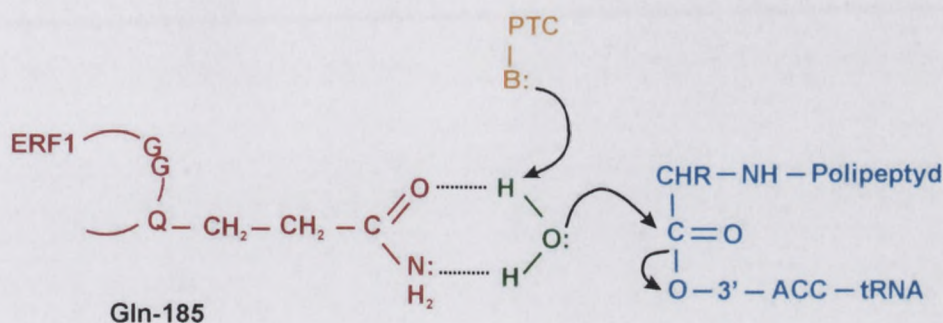
Sygnalem do terminacji procesu biosyntezy białka i uwolnienia nowoutworzonego łańcucha polipeptydowego jest wystąpienie kodonu STOP w miejscu A rybosomu [153]. Proces terminacji jest uniwersalny a podobne profile wrażliwości na antybiotyki oraz zależności pH dwóch reakcji: hydrolizy peptydylo-tRNA (P-tRNA) oraz syntezy wiązania peptydowego [154] świadczą, że obie te reakcje są katalizowane przez centrum peptydylotransferazowe rybosomu (PTC). Jednak funkcjonowanie PTC podczas terminacji oraz elongacji jest znacząco inne. W przeciwieństwie do tworzenia wiązania peptydowego, uwolnienie peptydu z P-tRNA jest bezpośrednio wspomagane przez białka nazywane czynnikami uwalniającymi (ang. *release factors*, RF) oraz GTP. Istnieją dwie klasy czynników uwalniających [155]. Klasa I rozpoznaje kodon STOP w mRNA i katalizuje hydrolizę P-tRNA. Czynniki uwalniające II klasy nie są specyficzne względem kodonów mRNA i wspomagają uwalnianie z rybosomu czynników RF1 w procesie zależnym od GTP [155]. Czynniki uwalniające zostały scharakteryzowane po raz pierwszy u prokariota, gdzie dwa podobne białka, RF1 i RF2, funkcjonują jako czynniki klasy I, natomiast strukturalnie niespokrewniony RF3 należy do klasy II. Obydwa czynniki klasy I rozpoznają kodon UAA; UAG jest rozpoznawany wyłącznie przez RF1, a UGA przez RF2. U eukariota występują czynniki eRF1 (rozpoznaje wszystkie trzy kodony STOP) oraz eRF3.

Mechanizm molekularny dekodowania kodonu stop oraz uwalniania polipeptydu przez czynniki uwalniające nie jest do końca poznany. Strukturalnie, klasa I RF przypomina cząsteczkę tRNA. Wyniki wielu badań sugerują istnienie zjawiska mimikry molekularnej. Podobieństwo ogólnego kształtu RF do cząsteczki tRNA potwierdza również struktura krystaliczna ludzkiego eRF1 [153]. Na podstawie tych badań zaproponowano model terminacji katalizowanej przez RF (Rysunek 32).

Klasa I RF ma za zadanie koordynowanie i odpowiednie usytuowanie cząsteczki wody w centrum PTC, w tej samej pozycji co grupa aminowa cząsteczki AA-tRNA. Następuje atak nukleofilowy cząsteczki wody na wiązanie estrowe P-tRNA w miejscu P. W wyniku tego zostaje uwolniony łańcuch polipeptydowy z P-tRNA. Stwierdzono również, że konserwatywna sekwencja czynników uwalniających klasy I, GGQ (glicyna-glicyna-glutamina) znajduje się w takiej pozycji, że można sugerować jej bezpośredni udział w terminacji [156-159]. Zaproponowano zatem, że reszta Gln-185 uczestniczy w koordynowaniu cząsteczki wody odpowiedzialnej za hydrolizę wiązania estrowego P-tRNA w PTC [153, 157, 160-162]. Jednak



prace z wykorzystaniem mutacji nie potwierdzają bezpośredniego uczestnictwa sekwencji GGQ w katalizowaniu reakcji uwalniania peptydu [163, 164].



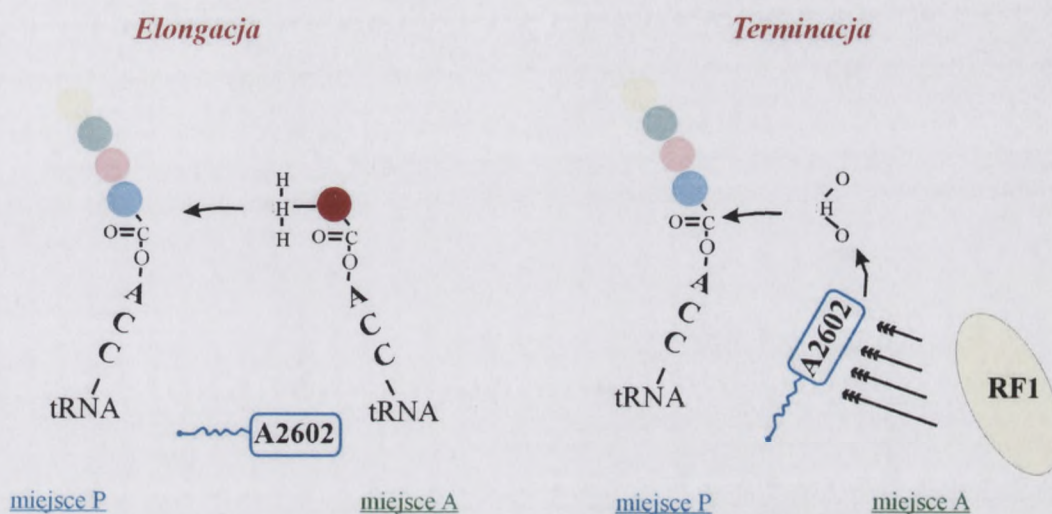
**Rysunek 32. Model terminacji translacji katalizowany przez RF.** (na podstawie [153]).

Kolorami oznaczono: czerwonym – eRF1, zielonym – cząsteczkę wody, niebieskim – P-tRNA, pomarańczowym – PTC.

Inne modele terminacji translacji, które bardziej skupiają się na samym rybosomie, przedstawiają reakcję uwalniania peptydu jako zmodyfikowaną wersję reakcji transferu peptydu, podczas której reszta polipeptydowa jest przenoszona na cząsteczkę wody zamiast na grupę  $\alpha$ -aminową AA-tRNA (Rysunek 33). W takim przypadku, RF klasy I ogrywa rolę modulatora, zmieniającego aktywność centrum PTC [165]. Próbowano więc zidentyfikować elementy rybosomu, które mogłyby połączyć dwie główne reakcje, czyli transpeptydację i uwalnianie peptydu. Stwierdzono, że mutacje w pozycji A2602 rybosomów *E. coli* całkowicie eliminowały zależną od RF1 hydrolizę P-tRNA [165, 166]. Zgodnie z wynikami najnowszych badań, ryboza nukleotydu A2602 jest krytyczna dla wiązania RF1 oraz dla odpowiedniej orientacji RF w PTC, a także może być bezpośrednio związana z katalizą hydrolizy P-tRNA [167]. Zaproponowano zatem model terminacji translacji katalizowany przez rybosom (Rysunek 33). Według niego, wiązanie czynnika RF1 w odpowiedzi na występowanie kodonu STOP w rybosomalnym miejscu A powoduje zmianę konformacyjną nukleotydu A2602. Ta reorientacja A2602 powoduje przełączenie aktywności PTC z syntezy wiązań peptydowych na hydrolizę wiązań estrowych w P-tRNA. Dla tej regulatorowej funkcji nukleotydu A2602 niezwykle ważna jest ryboza [167]. Rolą konserwatywnej sekwencji GGQ czynników uwalnających byłoby w tym modelu koordynowanie A2602 w orientacji wymaganej do przeprowadzenia reakcji. Następnie miałyby miejsce atak nukleofilowy wody na karbonylowy węgiel wiązania estrowego P-tRNA. Model ten potwierdzają badania wykazujące zmienność w ułożeniu nukleotydu A2602 podczas procesu biosyntezy białka [50, 122, 168-



170] jak i struktura krystaliczna kompleksu RF1-rybosom, w której motyw GGQ czynnika uwalniającego znajduje się w bliskim sąsiedztwie nukleotydu A2602 [171].

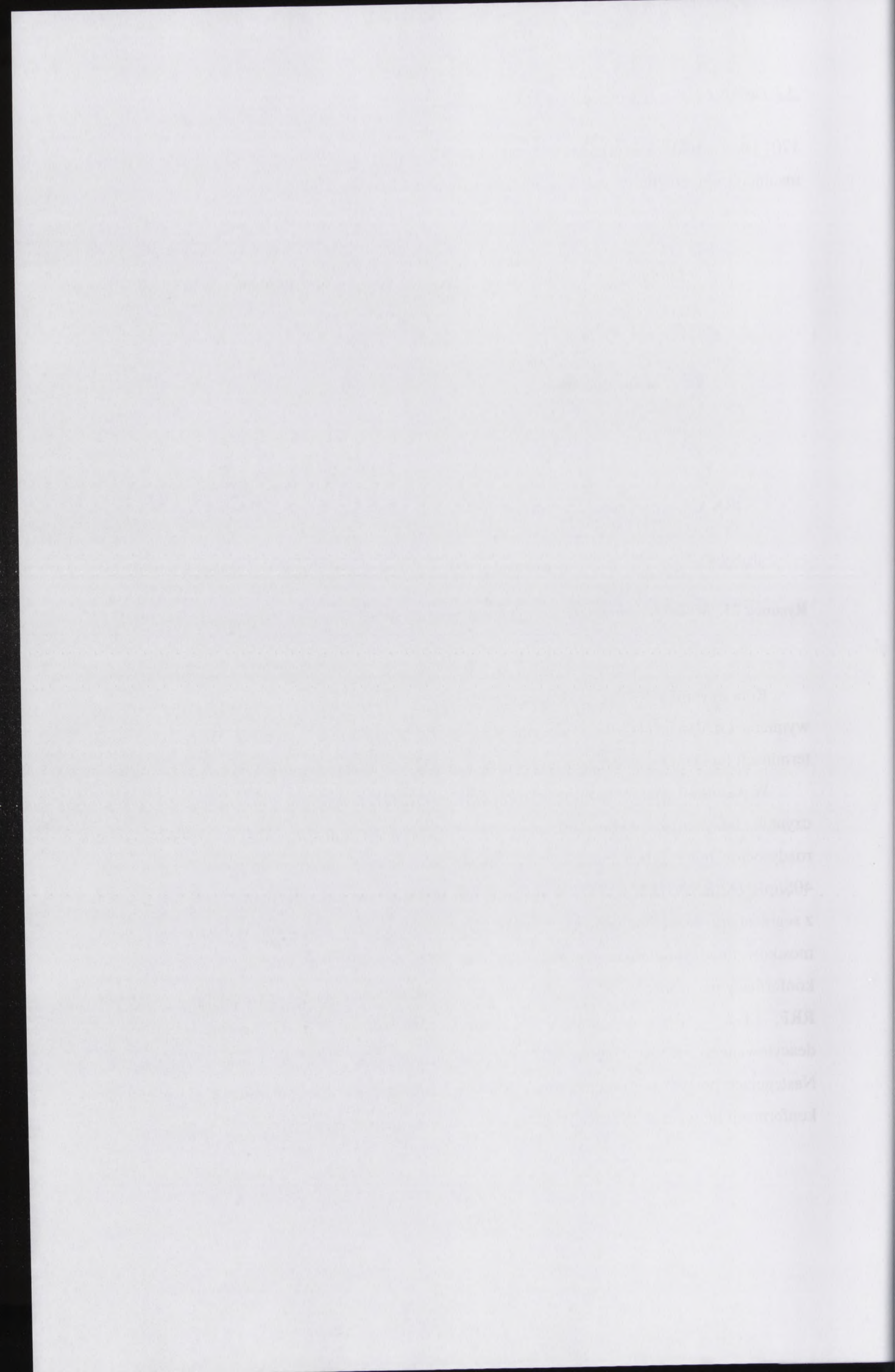


Rysunek 33. Model terminacji translacji katalizowanej przez rybosom. (na podstawie [165]).

Rolą czynnika RF3 jest oddzielenie czynników klasy I od rybosomu, z czym wiąże się wymiana GDP na GTP po związaniu RF3 do domeny sarcyny-rycyny L-rRNA. Ten etap terminacji biosyntezy białka kończy hydroliza GTP i uwolnienie czynnika RF3 [159].

W ostatnim etapie terminacji translacji biorą udział czynnik elongacyjny EF-2 oraz czynnik odzyskujący rybosomu (ang. *ribosome-recycling factor*, RRF). Powodują one rozdysocjowanie rybosomu 80S i uwolnienie podjednostki 60S oraz kompleksu 40S/mRNA/tRNA [172, 173]. Wykazano, że podczas swojego działania, RRF oddziałuje z segmentami dużej podjednostki rybosomalnej, które są zaangażowane w tworzenie dwóch mostków międzypodjednostkowych, B2a i B3. Wiązanie RRF powoduje znaczące zmiany konformacyjne rybosomu [173, 174]. Natomiast nakładające się na siebie miejsca wiązania RRF, EF-2 i tRNA w miejscu P sugerują, że wiązanie EF-G powoduje usunięcie deacylowanego tRNA z miejsca P poprzez przesunięcie RRF w kierunku miejsca E. Następujące po tym oddysocjowanie mRNA jest prawdopodobnie indukowane przez zmianę konformacji helisy h44 18S rRNA, która oddziałuje z cząsteczką mRNA.





### 3.3 Zmiany konformacyjne rybosomu podczas biosyntezy białka.

Dynamiczny charakter procesu biosyntezy białka sugeruje, że rybosom zawiera ruchome fragmenty, które umożliwiają jego prawidłowe funkcjonowanie. Zmiany konformacji rybosomu następują w wielu etapach biosyntezy białka, a relatywnie niewielkie zmiany w strukturze drugorzędowej rRNA pociągają za sobą rearanżacje konformacji podjednostek rybosomalnych na dużą skalę.

Już na etapie formowania aktywnego rybosomu mają miejsce zmiany w jego konformacji [175, 176]. Porównanie struktur izolowanych podjednostek rybosomalnych [1, 2, 20] ze strukturą całego rybosomu [5, 43] wykazało wiele istotnych różnic w budowie podjednostek. W podjednostce 30S największe zmiany zaobserwowano w regionie ostrogi, w helisie h44 16S rRNA, wierzchołku i górnej części platformy. W podjednostce 50S najbardziej widoczną zmianą jest globularna domena rRNA w obrębie wypukłości L1 oraz zmiany konformacyjne w helisach H38, H43, H61 i H69. Ponadto stwierdzono, że w centrum peptydylotransferazowym podjednostki 50S zachodzą zmiany konformacyjne kilku nukleotydów w zależności od tego, czy PTC przyjmuje aktywną czy nieaktywną formę. Zmiany te obejmują przede wszystkim ułożenie nukleotydów, A2572, U2584 [177] a także A2451 i A2602 [6, 165].

Przy użyciu techniki wykorzystującej zjawisko rezonansowego transferu energii Förster'a (ang. *Förster resonance energy transfer*, FRET) stwierdzono przemieszczanie się całej podjednostki 30S w kierunku powierzchni oddziaływania z 50S oraz rotację platformy zgodnie z kierunkiem ruchu wskazówek zegara [178]. Wyniki te zostały potwierdzone z wykorzystaniem metody kalkulacji dostępności powierzchni nazwanej techniką POPS (ang. *parameter optimized surfaces*) [179]. Wyniki te potwierdzają również struktury krioelektronowe wolnej podjednostki 30S i skompleksowanej z 50S, z takim wyjątkiem, że w badaniach tych stwierdzono ruch platformy w przeciwnym kierunku [16].

Podczas asocjacji podjednostek następują zmiany konformacyjne w obrębie helisy h11 łomeny 5' oraz helis h22, h23 i h24 domeny centralnej [180]. Zaobserwowano również zmiany strukturalne w dolnej części podstawy 30S w pobliżu nukleotydów w pozycjach 249 i 272 oraz z prawej strony platformy w pobliżu nukleotydów w pozycjach 672, 682 i 809. W obrębie 23S rRNA zmiany obserwowane były w regionach 1740-1750 oraz 2150-2000. W strukturze krystalicznej region 1470-1750 wykazuje interakcje z regionem 249-272 6S rRNA [2], co sugeruje tworzenie dodatkowego kontaktu między podjednostkami po ich socjacji. Drugi region (2150-2000) zlokalizowany jest w obrębie wypukłości L1 rybosomu,

3.3.3.3.3.3

[The following text is extremely faint and illegible due to low contrast and blurring. It appears to be a list of items or a detailed report.]

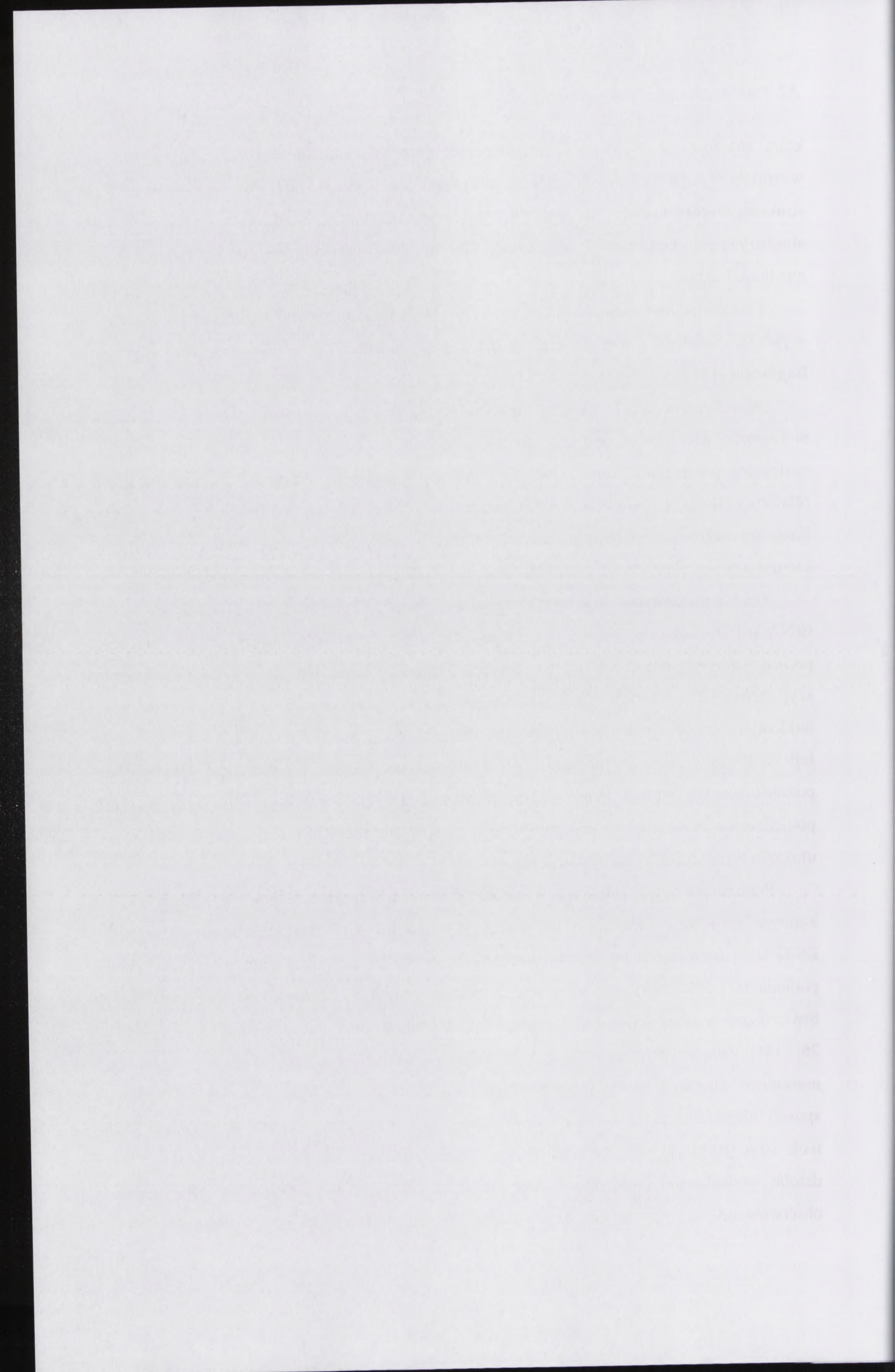
która znajduje się w bliskiej odległości od platformy podjednostki 30S. Jak wykazano w strukturze krystalicznej i krioelektronowej rybosomu 70S [4, 5, 41, 76], wypukłość L1 jest strukturą wysoce mobilną. Badania Nguylene i współpracowników dowodzą istnienia dwóch alternatywnych konformacji wypukłości L1, na które prawdopodobnie wpływa istnienie mostka B7a [180].

Ponadto stwierdzono, że białko S1, przyłączając się do regionu szyi małej podjednostki w pobliżu białek S7 i S11 podczas asocjacji podjednostek powoduje zmianę struktury tego fragmentu [181].

W trakcie inicjacji biosyntezy białka następują znaczące zmiany konformacji, zwłaszcza w regionie wierzchołka podjednostki 30S. Podczas przyłączania czynników inicjacyjnych następuje poszerzenie tunelu wejścia mRNA pomiędzy podstawą, wierzchołkiem i platformą [182], co prowadzi do reorganizacji struktury całej podjednostki 30S [183, 184]. Zaobserwowano rozluźnienie połączenia między podstawą i platformą, rotację platformy w kierunku zewnętrznej części rybosomu oraz ruchy „sprężynowe” helisy h18 18S rRNA.

Dzięki porównaniu struktury krystalicznej wolnego rybosomu [4] i oddziałującego z tRNA [6] stwierdzono zmiany wywołwane przez przyłączenie cząsteczki tRNA. W małej podjednostce największa zmiana ma miejsce w regionie wierzchołka, który obraca się dookoła szyi (helisa h27 16S rRNA) tak, że jego górna część przesuwa się o 15 Å. W rezultacie, nukleotydy w pozycjach 1240 i 1340 kolidują z cząsteczkami tRNA zajmującymi miejsce P lub E. Ponadto w małej podjednostce zmianom ulega helisa h6 tworząca w rybosomie prokariotycznym ostrogę, helisa h23 po prawej stronie platformy oraz helisa h44. W dużej podjednostce rybosomalnej podczas przyłączenia cząsteczki tRNA mają miejsce zmiany w ułożeniu wypukłości L1 na dystansie 40 Å.

Podczas kolejnego etapu, którym jest translokacja, następuje przemieszczenie tRNA z miejsc A i P do P i E o 20 Å lub więcej. U prokariota stwierdzono, że zarówno wiązanie EF-G jak i następująca po nim hydroliza GTP, prowadzą do zmian struktury przestrzennej podjednostki 30S [185] oraz reorganizacji połączeń między rRNA obu podjednostek [186]. Stwierdzono występowanie rotacji małej podjednostki w stosunku do podjednostki 50S [25, 26, 145]. Rotacja przebiega w sposób, który nazwano zapadkowym (ang. *ratchet-like movement*). Najpierw następuje przesunięcie podjednostki 30S o 20 Å (Rysunek 34C). W ten sposób ulega zmianie dystans między białkiem L1 dużej podjednostki a platformą 30S o ok. 10 Å (Rysunek 34A, B). Ruch ten ma również znaczący wpływ na pozycję ostrogi oraz dziobu podjednostki 30S, który staje się bardziej wystający. Jednak główne różnice obserwowane są w obrębie przewężenia łączącego wierzchołek i podstawę [149].



Obserwowano również różnice w ułożeniu helis h34, h28, h19/h27 [187]. Wszystkie te miejsca są zasadnicze dla akomodacji i translokacji cząsteczek tRNA.

Podczas etapu translokacji obserwowanych jest również wiele zmian w strukturze dużej podjednostki rybosomalnej. W czasie wiązania EF-G zachodzą niewielkie zmiany w położeniu helisy H76, wypukłości centralnej w obrębie 5S rRNA oraz helis H43 i H44 23S rRNA [186]. Najbardziej dynamiczny jest słupek L7/L12, który rozszczepia się na dwie subdomeny. Jedna z nich zbudowana jest z białka L6 oraz helisy H95 L-rRNA, znanej jako pętla sarcyny-rycyny (SRL). SRL oddziałuje z domeną G' czynnika elongacyjnego EF-G stymulując aktywność GTPazową tego czynnika. Druga subdomena słupka L7/L12 składa się z białka L11 i 58-nukleotydowego fragmentu L-rRNA zawierającego helisy H43 i H44. Kompleks ten nosi nazwę centrum związanego z aktywnością GTPazową (ang. *GTPase-associated center*, GAC) [25]. Stwierdzono, że wiązanie czynnika EF-G powoduje znaczne zmiany konformacyjne w regionie białka L11 skutkujące aktywacją centrum GAC [188-190]. Zmiany te zachodzą przed hydrolizą GTP oraz jednocześnie z tym procesem [191]. Podczas hydrolizy GTP, oddziaływania czynnika EF-G z rybosomem powoduje przesunięcie drugiej subdomeny słupka w kierunku zewnętrznej części rybosomu. Ta niewielka zmiana konformacji pociąga za sobą przesunięcie słupka L7/L12 w kierunku domeny G' EF-G, wskutek czego słupek L7/L12 zajmuje również pozycję bliżej strony zewnętrznej rybosomu. Po hydrolizie GTP do GDP słupek L7/L12 wraca do pojedynczej, wydłużonej formy, odsłaniając jednocześnie łukowate połączenie między domeną G' czynnika EF-G i wypukłością L7/L12.

Odkrycia te doprowadziły do zaproponowania dwustopniowej reakcji translokacji i scharakteryzowania wiążących się z nimi zmian konformacyjnych rybosomu. W pierwszym etapie, po przyłączeniu GTP do EF-G następuje wzajemna rotacja podjednostek, transpozycja do mniej zwartej struktury rybosomu oraz kompleksowe rearanżacje w obrębie tunelu wejścia mRNA w małej podjednostce oraz tunelu wyjścia polipeptydu w dużej podjednostce [145]. Następuje poszerzenie tunelu, w którym znajduje się mRNA o ok. 30%. W drugim etapie translokacji, po hydrolizie GTP, następuje przemieszczanie kompleksu mRNA/(tRNA)<sub>2</sub> w kierunku rotacji podjednostki 30S. Po uwolnieniu czynnika EF-G następuje rotacja małej podjednostki w odwrotnym kierunku, wskutek czego zajmuje ona pozycję wyjściową, taką jak przed zmianami konformacyjnymi.

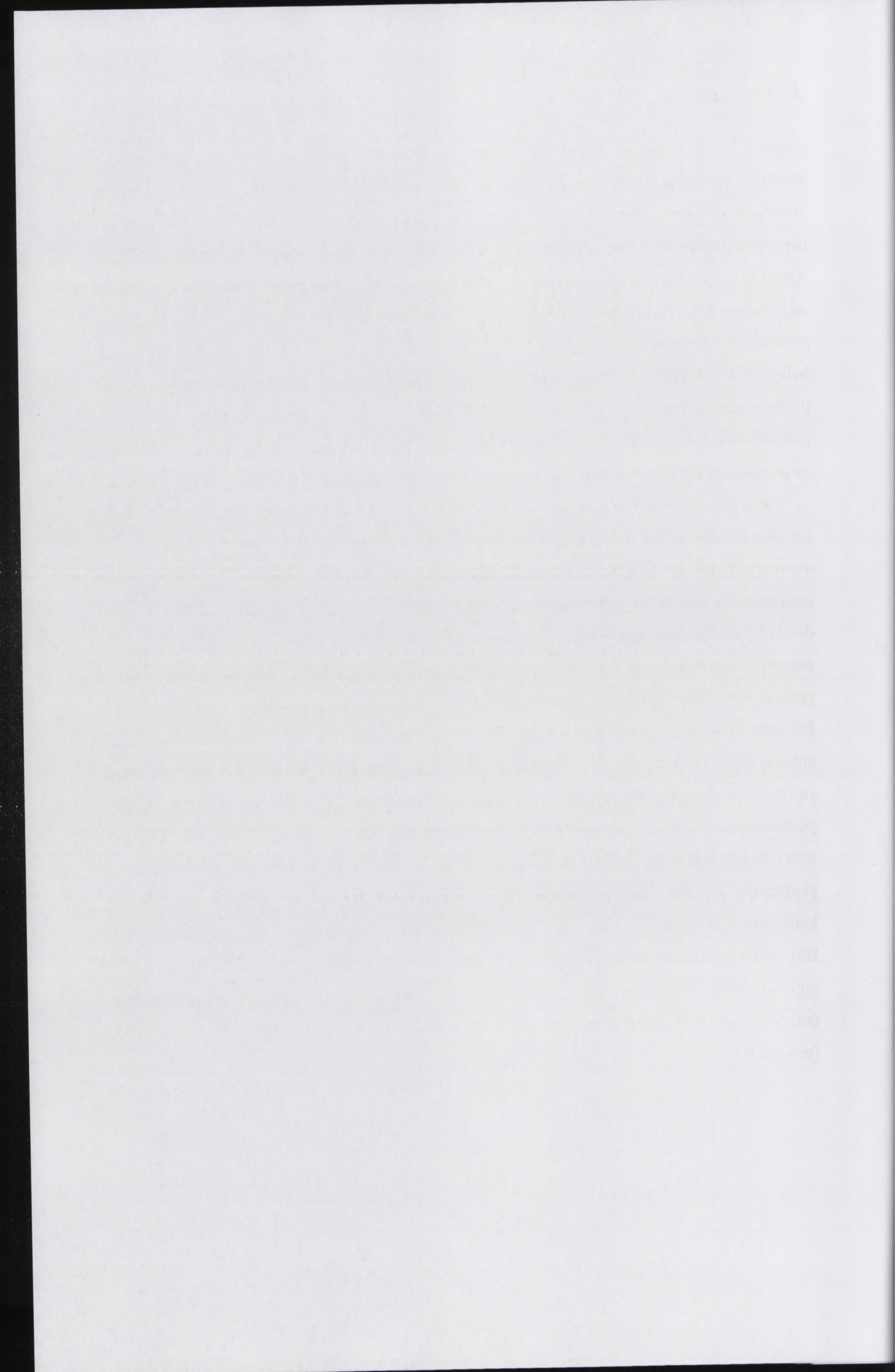
Podczas terminacji translacji również zaobserwowano liczne zmiany konformacji rybosomu. Stwierdzono, że wiązanie czynnika uwalniającego klasy II RF3 powoduje znaczące zmiany w strukturze zarówno małej jak i dużej podjednostki rybosomalnej [192]. Mała podjednostka wykazuje ruch zapadkowy o 10°, natomiast wypukłość L1 przesuwa się



o około  $20^\circ$  w kierunku wypukłości centralnej. Obie te zmiany są identyczne jak podczas wiązania czynnika elongacyjnego EF-G do rybosomu [25]. Czynniki RF3 powoduje również zmiany w obrębie regionu GAC. Region ten ulega skręceniu o około  $6\text{Å}$  w kierunku centrum peptydylotransferazowego. Zmiana ta jest odwróceniem zmian strukturalnych w GAC pod wpływem przyłączenia czynników RF1/RF2 [158]. Również związanie czynnika odzyskującego rybosomu RRF powoduje znaczące zmiany konformacyjne. Następuje przesunięcie podstawy kciuka podjednostki 50S o odległość ok.  $10\text{Å}$  oraz zmiana konformacji helisy h44 18S rRNA, która oddziałuje z cząsteczką mRNA [172-174]. Obserwowano także przesunięcie górnej części helisy H69 23S rRNA o  $20\text{Å}$  w kierunku helisy h44 małej podjednostki [169]. Helisy H69 i h44 tworzą mostek międzypodjednostkowy B2a, co sugeruje, że przyłączenie RRF powoduje zmianę w usytuowaniu również mostka B2a.

Ponadto w wielu badaniach wykazano, że zmiany konformacyjne na dużą skalę pojawiają się jako rezultat zmian w strukturze II-rzędowej rRNA. Przykładem jest występowanie dwóch alternatywnych możliwości tworzenia par zasad w obrębie regionu 912 16S rRNA podjednostki 30S [175]. Udowodniono, że przesunięcie par zasad z pozycji 912-910/885-887 do 912-910/888-890 wpływa na wiązanie mRNA i tRNA do rybosomu, a także wywołuje zmiany konformacyjne. Zmiany te obejmują przede wszystkim obszary przewężenia i podstawy podjednostki 30S. Połączenie między wierzchołkiem i podstawą w konformacji 912-888 jest znacząco przesunięte w stosunku do konformacji 912-885 i wpływa przez to na zmianę morfologii tunelu wejścia mRNA. Ramię podjednostki 30S również zmienia swoją strukturę i ulega spłaszczeniu powodując powstawanie większej przestrzeni między podjednostkami. Kiedy struktura 16S rRNA zmienia się z formy 912-885 do 912-888, wierzchołek 30S ulega rotacji w stosunku do podjednostki 50S w kierunku od ramienia do platformy. Rotacji tej towarzyszy zgięcie platformy w stronę słupka L1. Zmiany konformacyjne zachodzą również w niższej części podstawy (miejsca występowania mostka B6), która przesuwa się w kierunku dużej podjednostki, podczas gdy ramię odsuwa się od regionu oddziaływań między podjednostkami. Powoduje to „zanik” palca ramienia (ang. *shoulder finger*), który w konformacji 912-888 łączy się z platformą i podjednostką 50S (mostek B3).





### 3.3 Antysensowe oligonukleotydy.

Antysensowe oligomery (a-DNA) są to krótkie, jednoniciowe deoksyoligonukleotydy, wiążące się do DNA lub RNA na zasadzie hybrydyzacji z wykorzystaniem wiązań wodorowych [193]. A-DNA są projektowane tak, aby oddziaływały z sekwencją docelową w sposób specyficzny sekwencyjnie. A-DNA są komplementarne do sekwencji sensowej DNA lub RNA, właśnie dlatego przyjęto nazywać je „antysensowymi oligonukleotydami”. Hybrydyzacja a-DNA do właściwego fragmentu DNA lub mRNA może powodować zahamowanie procesu replikacji, transkrypcji lub translacji.

#### 3.3.1 Podstawy strategii antysensu.

Strategiami antysensowymi nazywamy metody ingerencji w funkcjonowanie komórki za pomocą krótkich oligonukleotydów komplementarnych do komórkowych kwasów nukleinowych. Ze względu na uniwersalny mechanizm działania antysensowych oligonukleotydów, można je stosować do regulacji ekspresji genów praktycznie na każdym jej etapie. W strategii antygenowej, polegającej na oddziaływaniu a-DNA z komplementarnym fragmentem dwuniciowej cząsteczki DNA, zahamować można powstawanie transkryptu mRNA. Dzieje się to poprzez stabilizację trypleksu a-DNA/dsDNA przez wiązania wodorowe między zasadami trzeciej nici a zasadami purynowymi, tzw. wiązania Hoogsten'a. Utworzony trypleks może inhibować proces transkrypcji w zależności od miejsca hybrydyzacji poprzez uniemożliwienie tworzenia się kompleksu inicjującego DNA-polimeraza (Rysunek 34C) lub poprzez zablokowanie odczytu informacji DNA (Rysunek 34E).

W odróżnieniu od strategii antygenowej, strategia antysensu zazwyczaj stosowana jest do zahamowania translacji zsyntetyzowanego już mRNA. W tym przypadku a-DNA przyłącza się do komplementarnego fragmentu mRNA tworząc heterodupleks mRNA - a-DNA za pomocą wiązań typu Watsona-Cricka. W ten sposób dochodzi do zablokowania dostępu rybosomu do informacji zakodowanej w mRNA (Rysunek 34D). Dupleks a-DNA/mRNA może również aktywować działanie endogennego enzymu, RNazy H, która przecina mRNA, uniemożliwiając w ten sposób proces biosyntezy białka (Rysunek 34F) poprzez degradację matrycy.

1. The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions and activities. It emphasizes that proper record-keeping is essential for the effective management of any organization and for ensuring compliance with relevant laws and regulations.

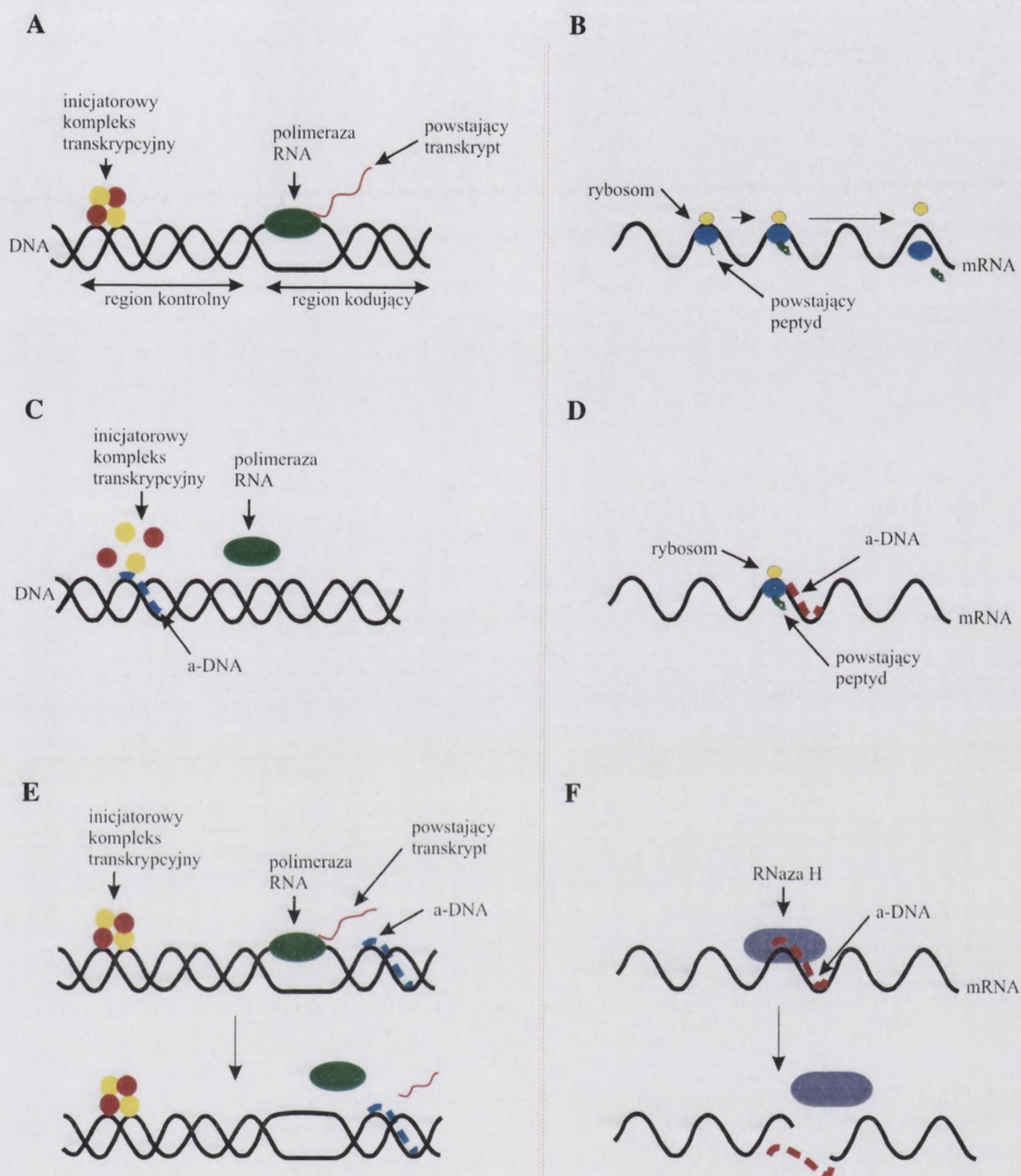
2. The second part of the document outlines the various methods and techniques used to collect, analyze, and interpret data. It covers both qualitative and quantitative research methods, highlighting the strengths and limitations of each approach. The text also discusses the importance of data integrity and the need for rigorous quality control measures throughout the research process.

3. The third part of the document focuses on the application of research findings in practical settings. It provides examples of how research can be used to inform decision-making, improve organizational performance, and address social issues. The text also discusses the ethical considerations that must be taken into account when applying research results.

4. The fourth part of the document discusses the role of research in the development of new theories and models. It highlights the importance of testing and validating these theories through empirical research and the need for a systematic and logical approach to theory building.

5. The fifth part of the document discusses the challenges and limitations of research. It identifies common pitfalls and biases that can affect the validity and reliability of research findings and provides strategies to minimize these risks. The text also discusses the importance of transparency and open communication in the research process.

6. The sixth part of the document discusses the future of research and the emerging trends in the field. It highlights the increasing use of technology in research and the growing importance of interdisciplinary approaches. The text also discusses the need for continued investment in research and the development of new research methods and techniques.



**Rysunek 34. Mechanizm działania antysensowych oligonukleotydów.** (na podstawie [194]).

A - prawidłowy proces transkrypcji;

B - inhibicja transkrypcji poprzez uniemożliwienie utworzenia kompleksu inicjującego DNA-polimeraza i rozplecenie DNA;

C - inhibicja transkrypcji poprzez zablokowanie odczytu informacji z DNA;

D - prawidłowy proces translacji;

E - zablokowanie translacji poprzez uniemożliwienie odczytu mRNA przez rybosom;

F - inhibicja translacji spowodowana przecięciem mRNA przez RNazę H.

Handwritten text, possibly a name or title, appearing as a faint, mirrored bleed-through from the reverse side of the page.

Second line of handwritten text, also appearing as a faint, mirrored bleed-through from the reverse side.

Third line of handwritten text, appearing as a faint, mirrored bleed-through from the reverse side.

Fourth line of handwritten text, appearing as a faint, mirrored bleed-through from the reverse side.

Fifth line of handwritten text, appearing as a faint, mirrored bleed-through from the reverse side.

Sixth line of handwritten text, appearing as a faint, mirrored bleed-through from the reverse side.

Bottom section of the page containing several lines of very faint, illegible handwritten text, likely bleed-through from the reverse side.

Oprócz wymienionych powyżej dwóch podstawowych funkcji, oligonukleotydy są stosowane również jako:

a) syntetyczne rybozomy - katalityczne oligonukleotydy degradujące RNA. Skutkiem ich działania jest eliminacja lub ograniczenie populacji cząsteczek RNA niepożądanych w komórce [195]. Strategia degradacji RNA jest ukierunkowana głównie na geny kodujące białka onkogenne [196], czynniki wzrostu, receptory powierzchniowe oraz na cząsteczki przekazujące sygnały komórkowe [197]. Także wirusowe RNA stanowią potencjalne sekwencje docelowe [198-201].

b) aptamery - krótkie fragmenty kwasów nukleinowych (uzyskiwane drogą selekcji *in vitro*), które wykazują wysokie powinowactwo i specyficzność wiązania ze ściśle określonymi biomolekułami. Określenie aptamer pochodzi od łacińskiego słowa „aptus”, – co oznacza „pasować” [202]. Aptamery mogą pełnić rolę inhibitorów białek, których funkcją jest rozpoznawanie i oddziaływanie z kwasami nukleinowymi (np.: polimeraz wirusowych) jak i białek, które w warunkach fizjologicznych z RNA nie oddziałują. Mogą również pełnić funkcje katalityczne czy też rolę ligandów wiążących inne molekuly, takie jak aminokwasy, nukleotydy, antybiotyki, czy witaminy. Do tej pory uzyskano bardzo wiele aptamerów wobec całego szeregu molekuł, począwszy od małych nieorganicznych cząsteczek a skończywszy na organizmach jednokomórkowych [203-207].

### 3.3.2 Czynniki warunkujące optymalne działanie antysensowych oligonukleotydów.

W strategiach wykorzystujących działanie antysensowych oligonukleotydów zakłada się, że w pełni efektywne działanie a-DNA uwarunkowane jest przez szereg czynników [208]:

- 1) **Wybór sekwencji docelowej w DNA lub RNA.** Należy wziąć pod uwagę zarówno funkcjonalną ważność wybranego fragmentu genu lub mRNA jak i dostępność dla a-DNA (struktura II- i III-rzędowa kwasu nukleinowego, brak oddziaływań z białkami komórkowymi).
- 2) **Proces rozpoznawania docelowego DNA lub RNA.** Powinien być szybki oraz specyficzny sekwencyjnie.
- 3) **Stabilność a-DNA w komórce.** Oligonukleotydy nie powinny być degradowane przez enzymy nukleolityczne z szybkością, która uniemożliwi utworzenie struktur trypleksowych lub dupleksowych. Zwiększenie stabilności a-DNA można uzyskać poprzez zastosowanie optymalnej długości a-DNA lub wprowadzenie modyfikacji chemicznych, np. otoczenia



atomu fosforu w pozycjach niemostrkowych. Jest to zamiana jednego z dwóch atomów tlenu internukleotydydowej grupy fosforanowej na atom siarki lub grupę metylową. Tak zmodyfikowane oligonukleotydy są określone odpowiednio jako tiofosforanowe i metanofosfonianowe analogi DNA.

- 4) **Brak toksycznego wpływu a-DNA na komórkę.** Wyniki licznych badań klinicznych wskazują, że dawki a-DNA niezbędne do zainicjowania działania antysensowego są bezpieczne dla komórki.
- 5) **System dostarczania a-DNA do komórki.** a-DNA dostarczane są zazwyczaj do komórki jako wolne oligonukleotydy bądź skompleksowane z kationowymi liposomami. Należy zoptymalizować zarówno dostarczenie a-DNA do żądanej tkanki jak i pobór odpowiedniej ilości oligonukleotydu przez komórki. Dlatego musi być możliwy transport syntetycznych oligonukleotydów poprzez błony komórkowe. Dla ułatwienia transportu a-DNA przez błony komórkowe zaproponowano ich modyfikowanie związkami o charakterze lipofilowym, np. cholesterolem lub długołańcuchowymi alkoholami alifatycznymi. Innym sposobem jest ich łączenie z dodatnio naładowanymi cząsteczkami, np. polilizyną. Ma to na celu neutralizację ujemnego ładunku tiofosforanowych wiązań internukleotydydowych i ułatwienie kontaktu oligonukleotydów z ujemnie naładowaną błoną komórkową.
- 6) **Produkty ewentualnej degradacji a-DNA.** Nie powinny one powodować mutacji genetycznych.

### 3.3.3 Zastosowanie antysensowych oligonukleotydów.

Mechanizm oddziaływania a-DNA z kwasami nukleinowymi prowadzi do inhibicji procesów biosyntezy białka w wyniku :

- zablokowania (inhibicja kompetywna),
- zahamowania transkrypcji (formowanie trypleksu),
- zahamowania translacji (zazwyczaj adresowane do kodonu inicjacji),
- zniszczenia struktury RNA (zazwyczaj adresowane do struktury pętla-łodyga),
- aktywacji RNazy H (degradacja RNA w heterodupleksie).

Strategie antysensowe znajdują liczne zastosowanie w agrobiotechnologii [194]. Zastosowanie a-DNA związane jest nie tylko z zaletami, często technicznymi, ale również z odbiorem społecznym żywności modyfikowanej technikami inżynierii genetycznej. Strategie antysensu prowadzą do obniżenia aktywności biologicznej wybranego enzymu, a jednocześnie





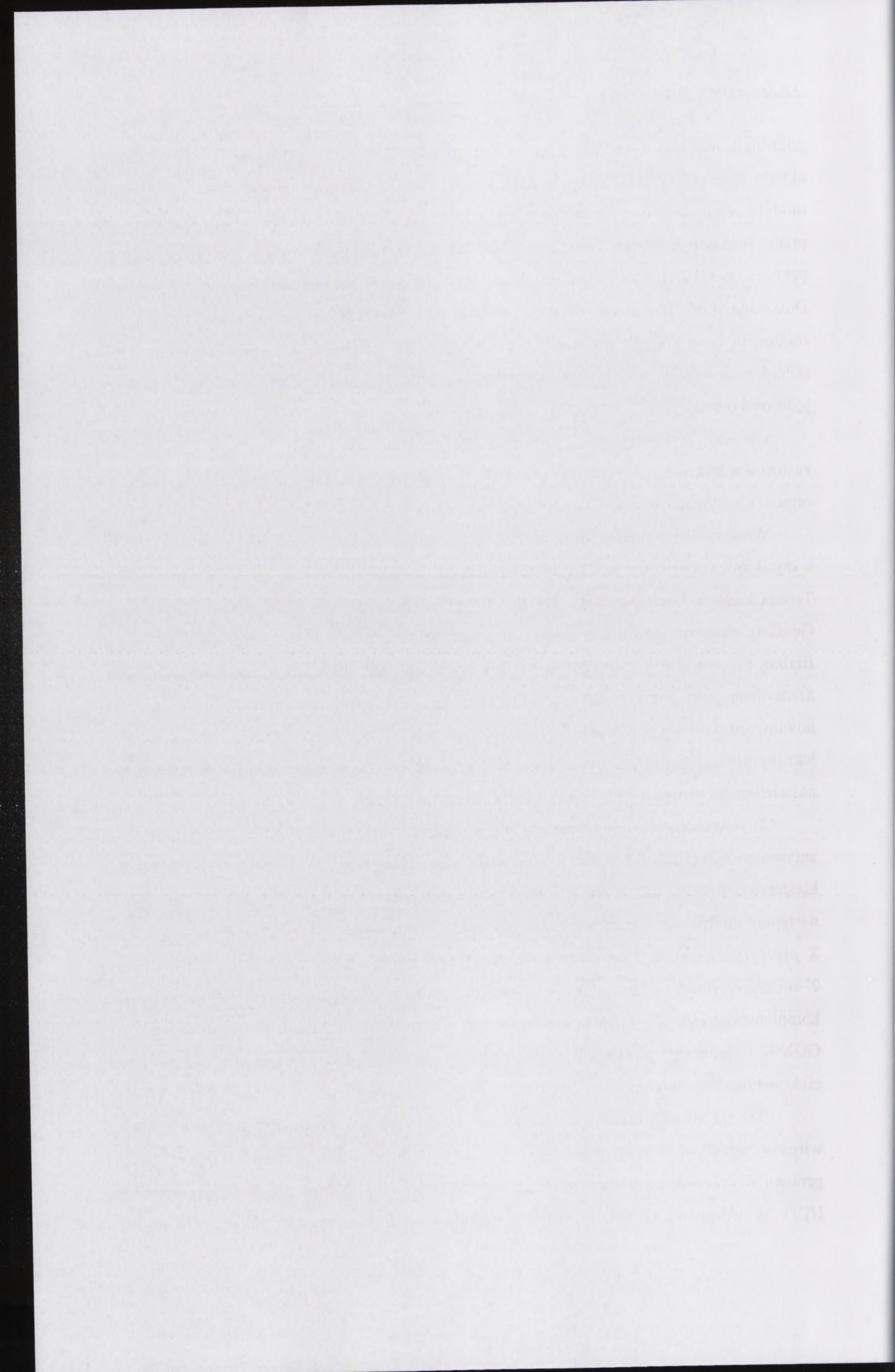
pozwalają uniknąć wprowadzenia nowego np. bakteryjnego lub zwierzęcego, czyli obcego układu ekspresyjnego. Doskonałą ilustracją tej tezy są transgeniczne pomidory, w których modyfikacji podlegały dwie istotne cechy technologiczne: szybkość dojrzewania (katalizowana przez fitohormon etylen) oraz szybkość mięknięcia (trawienie przez poligalaktourynazę pektyny - podstawowego składnika skórki wielu owoców, odpowiedzialnego za jej jędrność). Dokonana modyfikacja FlavrSavr<sup>TM</sup> polegała na wprowadzeniu w orientacji antysensowej fragmentu genu poligalaktourynazy, co spowodowało obniżenie aktywności tego enzymu w pomidorach o 95%, a w konsekwencji spowolnienie degradacji skórki, a zatem zachowanie jędrności owocu.

Oprócz wykorzystania antysensu w agrobiotechnologii, trwają badania nad zastosowaniem a-DNA jako terapeutyków. Z największym zainteresowaniem spotkały się oligonukleotydy antysensowe wobec mRNA [209].

Wnikanie oligomerów do komórki w celu zahamowania biosyntezy białka ma przede wszystkim zastosowanie w terapii medycznej, np. w leczeniu złośliwych nowotworów [210]. Trwają badania kliniczne (faza III), w których stosuje się antysensowy DNA G3139 firmy Genta (Genasense, oblimersen sodu), hamujący czynność białka antyapoptotycznego Bcl-2. Białko to pomaga komórkom nowotworowym uniknąć niszczenia przez chemioterapię. Stwierdzono, że poprzez zahamowanie produkcji Bcl-2, oblimersen sodu czyni komórki nowotworu bardziej podatnymi na chemioterapię i wywołuje apoptozę nawet w opornych na leki komórkach szpiczaka mnogiego [211]. Ponadto, stosowanie G3139 jednocześnie z naświetlaniem wzmacnia jego efekt antynowotworowy [212].

Chi i współpracownicy przedstawili w 2005 roku wyniki podawania oligonukleotydu antysensowego OGX-011 wobec mRNA kodującego klasterynę [213]. Stwierdzono, że poziom klasteryny wzrasta na wczesnym etapie rozwoju raka okrężnicy i piersi. W ten sposób następuje inhibicja pro-apoptotycznego białka Bax związanego z Bcl-2 (ang. *Bcl-2-associated X protein*), co skutkuje wydłużeniem przeżycia komórek nowotworowych. OGX-011 jest 2'-metoksyetylową pochodną tiofosforanową antysensowego oligonukleotydu komplementarnego do mRNA klasteryny. W fazie I badań klinicznych stwierdzono, że OGX-011 skutecznie obniża ekspresję klasteryny, nawet do 90%, zwiększając w ten sposób efektywność chemioterapii.

Trwają również badania zmierzające do syntezy a-DNA w celu zahamowania replikacji wirusów szkodliwych dla roślin, zwierząt i ludzi. Proponowana jest między innymi terapia genowa w przypadku wirusa upośledzenia odporności (ang. *human immunodeficiency virus*, HIV). W terapii tej zakłada się zablokowanie ekspresji określonych genów w komórkach

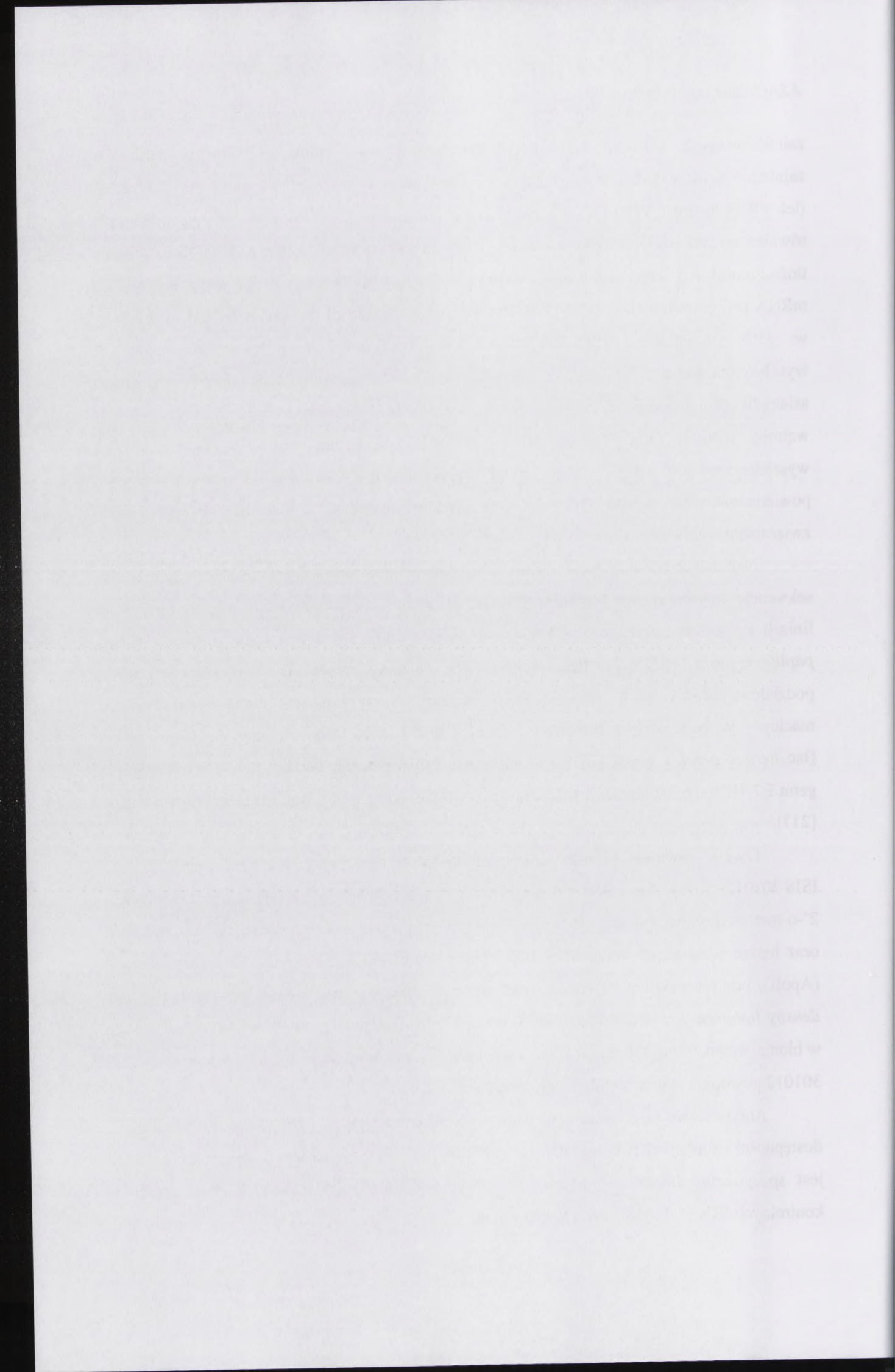


zainfekowanych wirusem HIV [210] lub wstrzymanie replikacji samego wirusa w zainfekowanym układzie biologicznym za pomocą antysensowych oligonukleotydów RNA (lek VRX496 firmy VIRxSYS w fazie I badań klinicznych) [214]. W 2006 roku opublikowano również wyniki strategii antysensowej w leczeniu infekcji wirusa Ebola (EBOV) z użyciem tiofosforanowych oligomerów morfolinowych (PMO). PMO komplementarne do wirusowych mRNA kodujących białka VP24 i VP35 wykazywały działanie ochronne przed infekcją EBOV w 75% pacjentów [215]. W 2006 roku opublikowano również doniesienie o wyselekcjonowaniu a-DNA specyficznie inhibujących działanie receptora asialoglikoproteinowego (ASGRP), który bierze udział w przyłączaniu wirusa zapalenia wątroby typu B (ang. *hepatitis B virus*, HBV) do hepatocytów. W badaniach tych wyselekcjonowano a-DNA, które redukowały poziom DNA wirusa, poziom antygeny powierzchniowego wirusa (HbsAg) oraz poziom antygeny "e" wirusa (HbeAg) ściśle związanego z antygenem rdzeniowym HbcAg [216].

Najnowsze badania dotyczą również wykorzystania wektorów wirusowych kodujących sekwencje antysensowych oligonukleotydów. Badania takie wykonywano między innymi na liniach komórkowych zakażonych wirusem brodawczaka ludzkiego typu 16 (ang. *human papilloma virus*, HPV). Zakażenie typem HPV 16 może prowadzić do niekontrolowanych podziałów komórkowych nabłonka szyjki macicy, czego skutkiem może być rak szyjki macicy. W badaniach zastosowano wektory pochodzące z wirusa opryszczki pospolitej (łac. *herpes simplex virus*, HSV), dla ekspresji antysensowego RNA komplementarnego do genu E7 HPV-16. Stwierdzono, że konstrukty takie skutecznie inhibują ekspresję onkogenu [217].

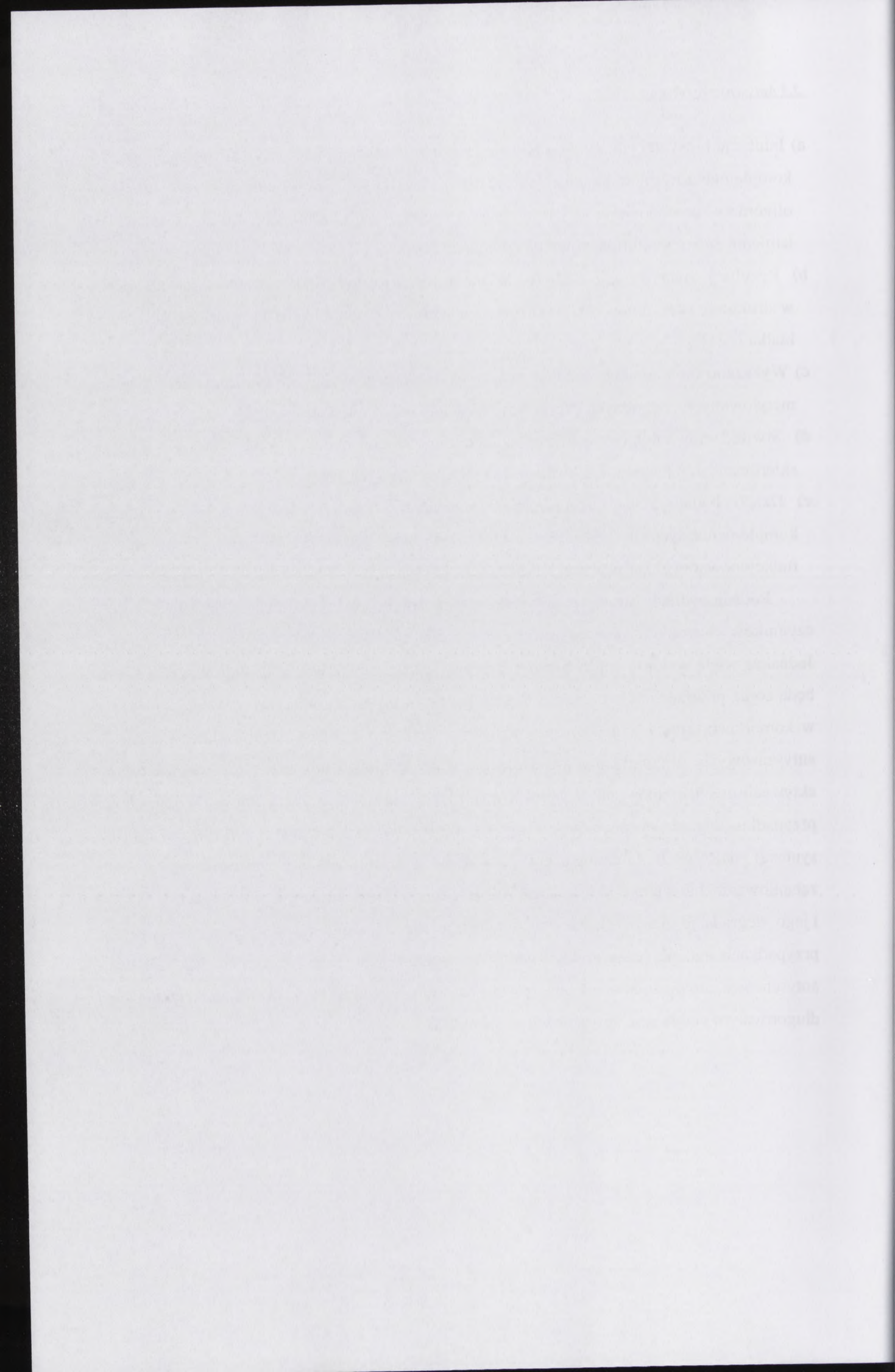
Trwają również badania kliniczne (faza II) w przypadku zastosowania leku ISIS 301012 firmy Isis. Jest to antysensowy oligonukleotyd zawierający modyfikacje 2'-o-metoksyetylowe rybozy, które powodują większe powinowactwo do docelowej cząsteczki oraz lepsze wchłanianie leku. ISIS 301012 powoduje inhibicję ekspresji apolipoproteiny B (ApoB), odpowiedzialnej za transport cholesterolu lipoprotein o niskiej gęstości (ang. *low density lipoproteins*, LDL) do tętnic. Skutkiem tego następuje gromadzenie się cholesterolu w błonie wewnętrznej tętnic, co może prowadzić do miażdżycy tętnic. Stwierdzono, że ISIS 301012 powoduje skuteczne obniżenie poziomu LDL [209].

Antysensowe oligonukleotydy stosowane również były w celu określenia lokalizacji, dostępności i funkcji rRNA w strukturze rybosomów [218]. Stwierdzono, że proces translacji jest specyficznie hamowany przez antysensowe oligomery skierowane wobec regionów kontrolnych rRNA i/lub mRNA. Dla przykładu:



- a) Inhibicję biosyntezy białka w systemie roślinnym obserwowano przy zastosowaniu a-DNA komplementarnych do domeny  $\alpha$ -sarcyny podjednostki 50S. W przypadku *E. coli* takie same oligomery powodowały jedynie częściowy efekt, najprawdopodobniej ze względu na istnienie zmian konformacyjnych tej domeny [220].
- b) Rezultaty hybrydyzacji a-DNA do nieskompleksowanego 5S rRNA i do 5S rRNA w strukturze rybosomów 80S wskazują na uczestnictwo pętli C 5S rRNA podczas biosyntezy białka [221].
- c) Wykazano funkcjonalną ważność miejsca A w małej podjednostce rybosomalnej z pomocą metylowanych pochodnych antysensowych oligodeoksynukleotydów [222].
- d) Stwierdzono inhibicję asocjacji podjednostek rybosomalnych pod wpływem a-DNA skierowanych na wybrane sekwencje 18S rRNA i 5S rRNA [223].
- e) Dzięki badaniom z wykorzystaniem specyficznych antysensowych oligonukleotydów komplementarnych do 5,8S rRNA stwierdzono, że cząsteczka ta pełni ważną rolę w funkcjonowaniu eukariotycznych rybosomów [224].

Podsumowując, strategie antysensowe są trudne w zastosowaniu, bowiem szereg czynników warunkuje sukces takiej koncepcji modyfikowania szlaku metabolicznego. Jednakże wiele walorów tej technologii pozwala sądzić, że medyczne i rolnicze zastosowania będą coraz powszechniejsze. Należy jednak pamiętać, że szczególnie przy stosowaniu a-DNA w komórkach, efekty terapeutyczne mogą być wynikiem zarówno bezpośredniego działania antysensowych oligonukleotydów na sekwencję docelową lub też może dochodzić do aktywacji mechanizmów, takich jak RNAi (interferencja RNA) czy aptamerów. W pierwszym przypadku degradacja docelowego mRNA może być indukowana wprowadzeniem (lub synteza) dsRNA o homologicznej sekwencji. Ponadto, a-DNA zastosowany w celu zahamowania biosyntezy określonego białka poprzez hybrydyzację z odpowiednim mRNA i jego degradację, może okazać się aptamerem dla zupełnie innego białka. W pewnych przypadkach aptameryczny efekt działania oligonukleotydu może wzmacniać jego działanie antysensowe, ale może również powodować zdecydowanie negatywne skutki, szczególnie przy długotrwałym podawaniu antysensowego specyfiku.



### 3.4 Mini-tRNA.

W procesie biosyntezy białka dochodzi do skoordynowanej współpracy wielu makrocząsteczek: mRNA, tRNA, enzymów aktywujących, czynników translacyjnych i rybosomów. Cząsteczki tRNA są elementem łączącym podstawową jednostkę składową białka, czyli aminokwas, z informacją genetyczną zakodowaną w mRNA. W strukturze III-rzędowej tRNA wyróżniamy dwie główne domeny: I - domenę akceptorową (nazwaną domeną minihelisy, w skład której wchodzi ramię akceptorowe oraz pętla TΨC) oraz II - domenę antykodonową, zbudowaną z ramienia i pętli antykodonowej oraz ramienia i pętli DHU (Rysunek 35B). Każda z domen tRNA oddziałuje z innymi częściami rRNA rybosomu. Ponadto, przynajmniej 10 syntetaz aminoacylo-tRNA jest zdolnych do aminoacylacji helikalnych substratów RNA odpowiadających całej domenie I lub tylko jej fragmentowi. Takie substraty nazywa się odpowiednio mini- lub mikrohelisami [225]. Pomimo, że wszystkie badane cząsteczki mini-tRNA charakteryzowały się jedynie szczątkową aktywnością akceptorową, były one skutecznie rozpoznawane przez odpowiednie klasy syntetaz aminoacylo-tRNA. Dlatego też mini-tRNA stały się skutecznym narzędziem pomocnym w wielu aspektach badań dotyczących procesów zachodzących w rybosomie. Badania takie mogą dotyczyć przykładowo interakcji między syntetazami aminoacylo-tRNA a cząsteczką tRNA, poszczególnych etapów translacji, korelacji struktury i funkcji rybosomu, a także roli poszczególnych fragmentów tRNA w biosyntezie białka. Zastosowanie mini-tRNA posłużyło również do zweryfikowania hipotezy o ewolucyjnym pochodzeniu syntetaz aminoacylo-tRNA.

Zastosowanie mini-tRNA w pracach eksperymentalnych wymaga prawidłowo zaplanowanego modelu minimalnej cząsteczki tRNA, tak, aby była ona aktywna w procesie aminoacylacji. Konieczne jest zatem przeanalizowanie elementów strukturalnych tRNA, które są niezbędne, by cząsteczka ta specyficznie wypełniała swoją funkcję. Dlatego ważne jest poznanie reguł, jakich należy przestrzegać przy konstrukcji mini-tRNA. Do przedstawienia tego problemu wybrałam kilka przykładów zastosowań mini-tRNA.

#### 3.4.1 Budowa i funkcja cząsteczki tRNA.

Cząsteczki tRNA charakteryzują się specyficznym ułożeniem nukleotydów i określoną strukturą przestrzenną. Pomimo tego, że dana cząsteczka tRNA jest specyficzna wyłącznie dla określonego aminokwasu, struktura wszystkich tRNA jest zbliżona. W strukturze II-rzędowej



3.4. RNA mikro

W procesie tworzenia białka dochodzi do aktywności wycięcia wiekszości mikroRNA. RNA mikro powstaje w wyniku transkrypcji genów kodujących białka i jest to RNA o długości około 22 nukleotydów. W procesie tworzenia mikroRNA dochodzi do aktywności wycięcia wiekszości mikroRNA. RNA mikro powstaje w wyniku transkrypcji genów kodujących białka i jest to RNA o długości około 22 nukleotydów. W procesie tworzenia mikroRNA dochodzi do aktywności wycięcia wiekszości mikroRNA. RNA mikro powstaje w wyniku transkrypcji genów kodujących białka i jest to RNA o długości około 22 nukleotydów.

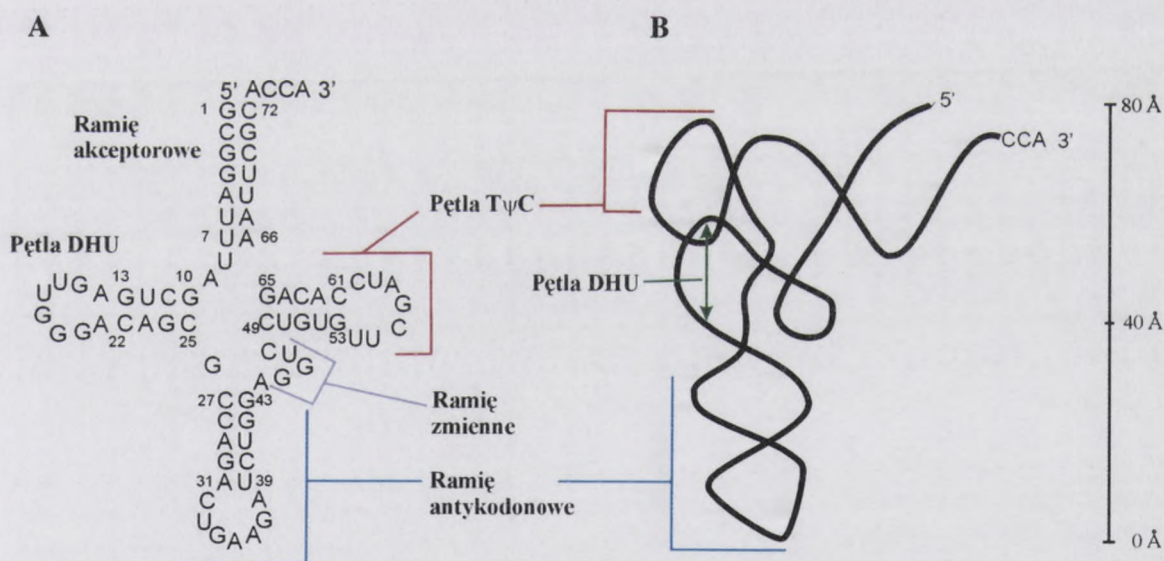
3.4.1. RNA mikro i funkcja mikroRNA

Funkcją mikroRNA jest regulacja poziomu białek w komórce. MikroRNA powstaje w wyniku transkrypcji genów kodujących białka i jest to RNA o długości około 22 nukleotydów. W procesie tworzenia mikroRNA dochodzi do aktywności wycięcia wiekszości mikroRNA. RNA mikro powstaje w wyniku transkrypcji genów kodujących białka i jest to RNA o długości około 22 nukleotydów.

przyjmuje ona postać „liścia koniczyny” (Rysunek 35A) a w III-rzędowej wszystkie cząsteczki tRNA przypominają kształtem literę L (Rysunek 35B). Cząsteczki tRNA zawierają wiele nietypowych, modyfikowanych zasad, zazwyczaj 7-15 na molekułę, co stanowi około 10 - 20 % wszystkich nukleotydów.

W strukturze II-rzędowej tRNA można wyróżnić pięć zasadniczych regionów, (tworzących wspomniane już wcześniej dwie główne domeny). Są to:

- region akceptorowy, składający się z ramienia i pętli akceptorowej, z charakterystyczną sekwencją 5'-CCA-3', do której przyłączany zostaje aminokwas;
- region antykodonowy (ramię i pętla antykodonowa);
- region dihydrourydyny (ramię i pętla DHU);
- region T $\Psi$ C, zbudowany z ramienia oraz pętli, w której występuje charakterystyczny układ zasad: rybotymidyna, T; pseudourydyna,  $\Psi$ ; cytozyna, C;
- ramię zmienne znajdujące się pomiędzy regionem antykodonowym a regionem T $\Psi$ C.

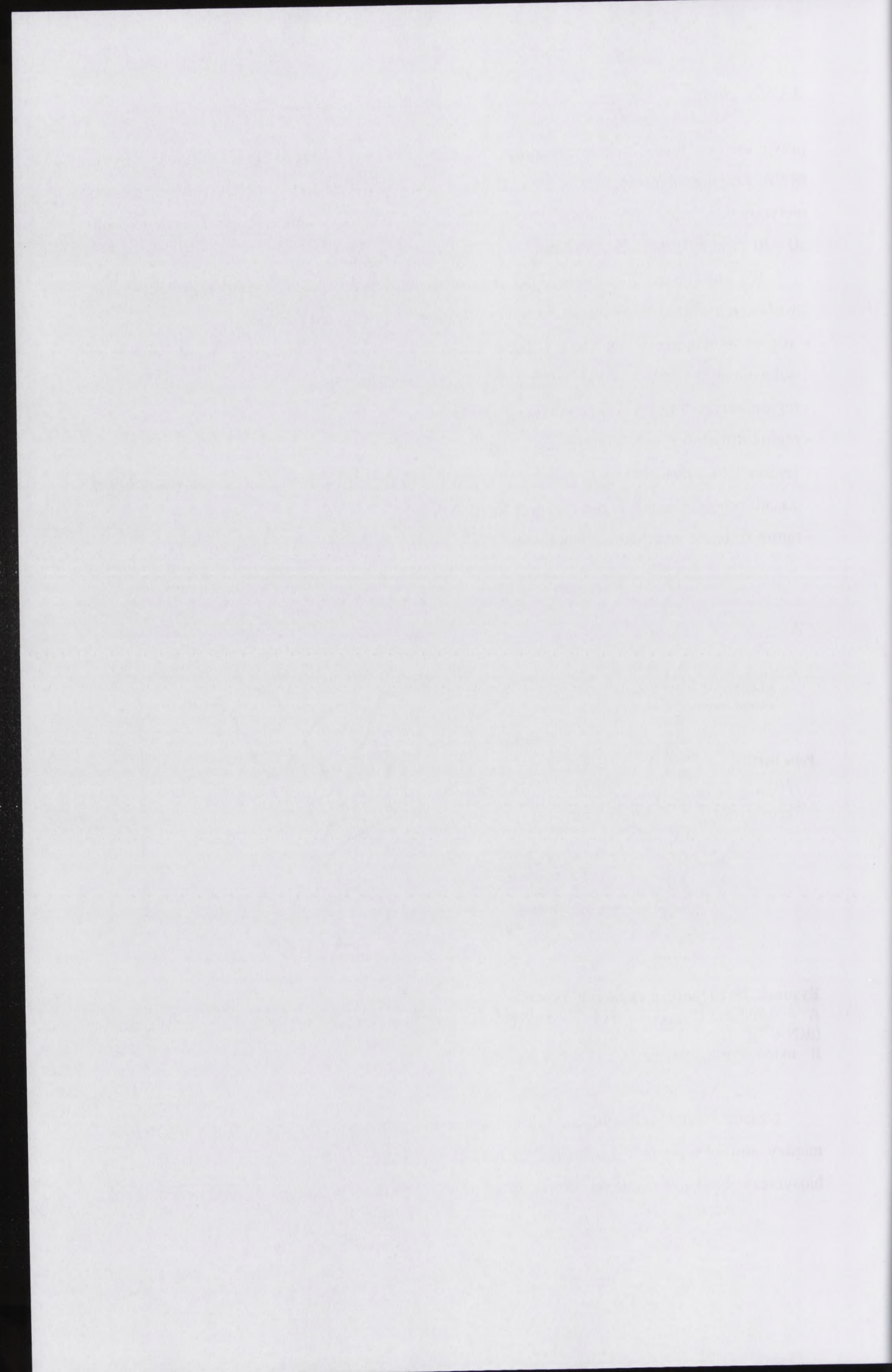


**Rysunek 35. Struktura cząsteczki tRNA.**

A - struktura II-rzędowa cząsteczki tRNA *S. cerevisiae* specyficznej względem fenyloalaniny (tRNA<sup>Phe</sup>);

B - układ przestrzenny cząsteczki tRNA i wymiary.

Cząsteczki tRNA są molekularnymi adaptorami, pełniącymi funkcję swoistych łączników między aminokwasami a kodonami mRNA. Poza zasadniczą funkcją, jaką pełnią podczas biosyntezy białka, cząsteczki tRNA biorą również udział w regulacji syntezy enzymów



komórkowych, syntezie ściany komórkowej u bakterii, regulacji transportu aminokwasów a także pełnią rolę startera dla odwrotnej transkryptazy wielu wirusów [226].

### 3.4.2 Elementy tożsamości cząsteczki tRNA a konstruowanie mini-tRNA.

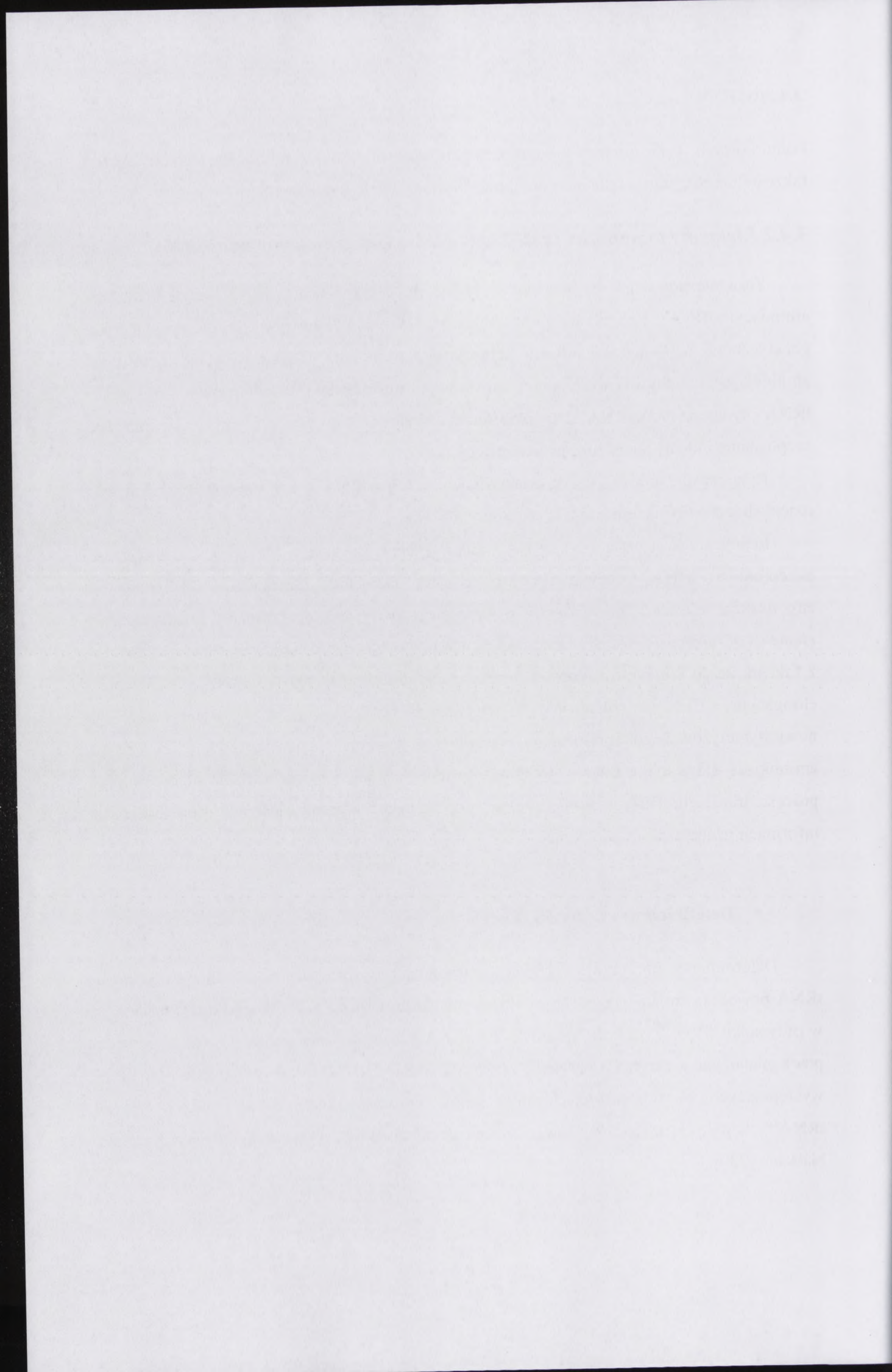
Zasadniczym etapem biosyntezy białka jest rozpoznanie tRNA przez syntetazy aminoacylo-tRNA. Proces ten jest kluczowy dla prawidłowego odszyfrowania kodu genetycznego zapisanego w mRNA. Selekcja odpowiedniego tRNA do acylacji określonym aminokwasem odbywa się poprzez utworzenie unikatowego, specyficznego kompleksu tRNA - syntetaza AA-tRNA. Dla określenia swoistości tego procesu używa się określeń rozpoznanie i identyfikacja (tożsamość) tRNA [227].

Rozpoznanie odnosi się do identyfikacji danego tRNA przez odpowiednią syntetazę dzięki specyficznym elementom strukturalnym tRNA.

Identyfikacja (tożsamość) tRNA jest pojęciem szerszym, określającym aktywność akceptorową tRNA, obejmującym pozytywne elementy rozpoznania (determinanty, ang. *positive elements of recognition*) oraz negatywne (anty-determinanty, ang. *negative elements of recognition*) [228]. Obecność elementów rozpoznania i identyfikacji związana jest z faktem, że do kompleksu rybosomalnego przenoszony jest każdy AA-tRNA przez czynnik elongacyjny EF1 (w układzie prokariotycznym EF Tu-Ts), a o wbudowaniu do nowosyntetyzowanego polipeptydu decyduje interakcja kodon-anty-kodon. A zatem aminokwas nie jest już traktowany przez system jako element rozpoznania i poprawności procesu translacji. Dlatego konieczne są inne elementy warunkujące poprawność odczytu informacji genetycznej.

- **Determinanty cząsteczki tRNA**

Determinanty (pozytywne elementy rozpoznania), wprowadzone do innej cząsteczki tRNA powodują zmianę specyficzności rozpoznania tej molekuly. Po raz pierwszy opisano je w przypadku tRNA<sup>Ala</sup> *E. coli*. W cząsteczce tRNA<sup>Ala</sup> determinantą jest para zasad utworzona przez guanozynę w pozycji 3 i urydynę w pozycji 70 (G3:U70) [229]. Po zastąpieniu naturalnie występujących w tych pozycjach nukleotydów w cząsteczkach tRNA<sup>Phe</sup>, tRNA<sup>Cys</sup> oraz tRNA<sup>Lys</sup> na parę G3:U70, obserwowano obecność dodatkowych reszt alaniny w tworzących się białkach [230].



W przypadku, gdy w pozycji odpowiadającej determinancie występowała mutacja, obserwowano gwałtowny spadek poziomu aminoacylacji takiej cząsteczki tRNA lub nawet jej całkowity brak, w związku z nieobecnością odpowiednich wiązań wodorowych [231]. Stwierdzono również, że im więcej determinant znajduje się w danej cząsteczce tRNA, tym mniejsze znaczenie ma każda z nich. Jeśli zatem silne determinanty zlokalizowane są w ramieniu akceptorowym cząsteczki tRNA, to pełnej długości tRNA mógłby być z powodzeniem zastąpiony przez minihelisy imitujące ten rejon.

Ponadto należy wyróżnić determinanty główne (ang. *major*) i poboczne (ang. *minor*) [232]. Jednak takie rozróżnienie nie jest łatwe i często bywa subiektywne. Za główne uważa się takie elementy, których nieobecność prowadzi do znaczących efektów, obserwowanych *in vitro* jako zmniejszenie stopnia aminoacylacji oraz *in vivo* jako supresję. Natomiast determinanty poboczne mają umiarkowany efekt i regulują specyficzność aminoacylacji. Te drugie elementy mogą działać poprzez mechanizmy pośrednie.

- **Antydeterminanty cząsteczki tRNA**

Tożsamość cząsteczki tRNA nie jest dyktowana jedynie obecnością pozytywnych elementów umożliwiających rozpoznanie przez specyficzną syntetazę. Istnieją również elementy negatywne, antydeterminanty, które uniemożliwiają błędną aminoacylację. W procesie regulowania bezbłędności biosyntezy polipeptydu są one równie ważnym czynnikiem jak determinanty.

Antydeterminantami mogą być pojedyncze lub sparowane zasady azotowe, zlokalizowane na całej długości cząsteczki tRNA. Pierwsza antydeterminanta została odkryta w tRNA<sup>Ile</sup> *E. coli*, gdzie zaobserwowano, że modyfikacja atomu węgla zasady azotowej w pozycji 34 zapobiega błędnej aminoacylacji tRNA<sup>Ile</sup> przez syntetazę specyficzną dla tRNA<sup>Met</sup> [228]. Sądzi się, że wszystkie tRNA zawierają antydeterminanty przeciwko kilku syntetazom.

- **Specyfika struktury przestrzennej cząsteczki tRNA**

Elementem tożsamości tRNA może być również specyficzna struktura tej cząsteczki. Dla przykładu, dla poprawnej aminoacylacji tRNA<sup>Ser</sup> *E. coli* konieczny jest rejon zmienny, gdzie występuje nietypowa para Levitt'a G15:G48 [233]. Optymalna efektywność procesu aminoacylacji często zależy od zachowania specyficznych cech architektury pnia tRNA. Dla

W. ...

... ..  
... ..  
... ..  
... ..  
... ..

... ..

... ..  
... ..  
... ..  
... ..  
... ..

... ..

... ..  
... ..  
... ..  
... ..  
... ..

... ..

... ..  
... ..  
... ..  
... ..  
... ..

... ..

... ..  
... ..  
... ..  
... ..  
... ..

rozpoznania przez GlnRS lub AlaRS *E. coli* oraz PheRS z *S. cerevisiae*, ważne są region zmienny i odpowiednia długość pętli DHU [234]. W drożdżowym inicjatorowym tRNA<sup>Met</sup> istotnym elementem są wzajemne oddziaływania między pętlą TΨC i pętlą DHU. Z drugiej strony, syntetazy mogą w pewnym stopniu tolerować zmiany w strukturze swoich substratów. Takie zmiany mogą polegać na braku modyfikacji nukleotydów lub na zamianie rybonukleotydów na ich odpowiedniki z serii deoksy. W większości systemów takim zmianom towarzyszy zmniejszenie efektywności aminoacylacji.

### 3.4.3 Wybrane przykłady zastosowań mini-tRNA.

Dotychczasowe prace z zastosowaniem mini-tRNA miały przede wszystkim na celu zgłębienie procesu aminoacylacji. Badano zwłaszcza funkcje poszczególnych reszt nukleotydów cząsteczki tRNA w tym procesie, specyficzną rolę determinant głównych i pobocznych [231]. Przewidywanie funkcji minimalnych substratów zawierających determinanty aminoacylacji badano po raz pierwszy z użyciem systemu tRNA *E. coli* specyficznego względem alaniny. Stwierdzono, że do rozpoznania tRNA<sup>Ala</sup> przez AlaRS wystarczająca jest obecność domeny akceptorowej a pozostała część tej molekuly nie jest istotna dla procesu aminoacylacji [235] i prace tam cytowane].

Minihelisy zbudowane z ramienia akceptorowego tych tRNA, których główne determinanty zlokalizowane są w antykodonie, na przykład tRNA specyficznego względem tryptofanu, metioniny, argininy, glicyny i waliny [236] i prace tam cytowane], powinny być nieaktywne podczas aminoacylacji. Jednak takie minihelisy w większości przypadków ulegają aminoacylacji, aczkolwiek na niskim poziomie [237] i prace tam cytowane]. Przyłączenie do takiego konstrukt pętli antykodonowej zwiększa stopień aminoacylacji w przypadku minihelis otrzymanych z tRNA<sup>Ile</sup> *E. coli* oraz tRNA<sup>Val</sup> *S. cerevisiae*. Dodanie antykodonu do minihelisy<sup>Asp</sup> *E. coli* nie ma takiego efektu na aminoacylację. Mini- i mikrohelisy uzyskane z tRNA<sup>Ile</sup> *E. coli* są również wydajnie aminoacylowane przez IleRS, pomimo tego, że zawierają jedynie część determinant, a główne determinanty znajdują się w ramieniu antykodonowym. Stąd też wniosek, że aminoacylacja niekoniecznie wymaga obecności głównych determinant. Aczkolwiek wydajność procesu aminoacylacji jest wówczas wyraźnie niższa (w przypadku mini-tRNA<sup>Val</sup> obserwowano  $6 \times 10^5$  - krotne obniżenie aktywności aminoacylacji w porównaniu z pełnej długości tRNA<sup>Val</sup> [228]).



The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records. It emphasizes that proper record-keeping is essential for the effective management of any organization. This section covers various aspects of record management, including the selection of appropriate record-keeping systems and the implementation of strict control procedures. The text also highlights the need for regular audits to ensure the integrity and accuracy of the records.

In addition, the document addresses the challenges associated with record management in a rapidly changing environment. It notes that the volume and complexity of records are increasing significantly, which requires the adoption of more advanced technologies and methodologies. The text provides a detailed overview of the various record-keeping systems available, ranging from traditional paper-based systems to modern digital solutions. It also discusses the importance of ensuring that records are easily accessible and retrievable at all times.

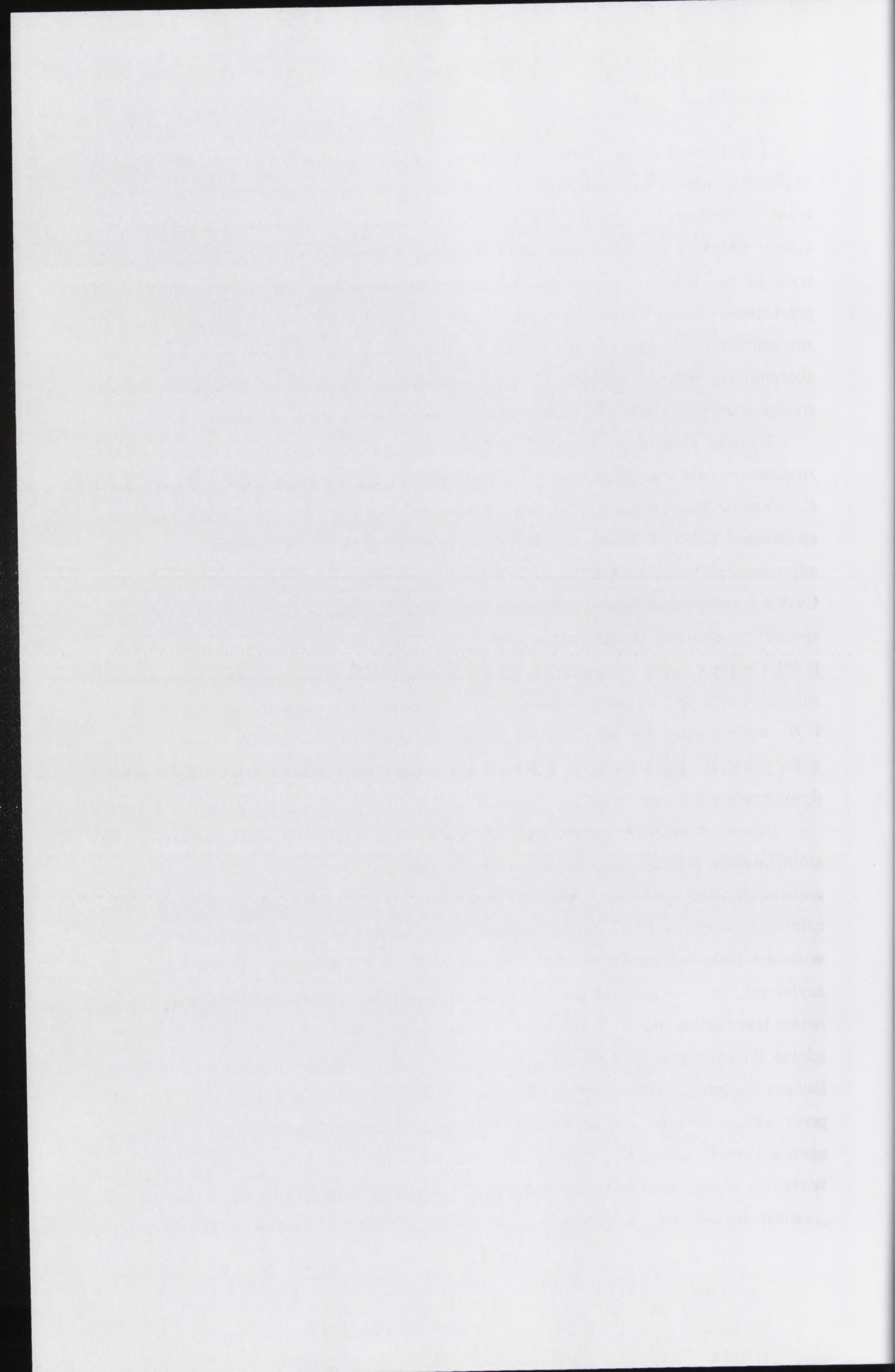
Furthermore, the document explores the legal and ethical implications of record management. It stresses that organizations must be aware of the legal requirements governing the retention and disposal of records. This section provides a comprehensive overview of the relevant laws and regulations, as well as the best practices for ensuring compliance. It also discusses the ethical considerations surrounding the use of records, such as the protection of personal data and the prevention of unauthorized access.

Finally, the document concludes by emphasizing the importance of a proactive approach to record management. It encourages organizations to regularly review and update their record-keeping policies and procedures to ensure they remain effective and relevant. The text also provides a list of key takeaways and recommendations for organizations looking to improve their record management practices. Overall, the document serves as a valuable resource for anyone involved in the management of organizational records.

Dla tRNA, których elementy tożsamości o różnej sile rozproszone są w całej długości cząsteczki, niewiele wiadomo na temat wzajemnego powiązania między tymi elementami oraz o roli determinant pobocznych. Bardzo dobrym modelem do badania tego zagadnienia jest system tRNA<sup>Val</sup>. Aminoacylacja przez syntetazę walinylo-tRNA (ValRS) *S. cerevisiae* wymaga nie tylko obecności determinant zlokalizowanych w antykodonie, ale również przynajmniej jednej z pozostałych determinant zlokalizowanych w dużej odległości od pętli antykodonowej. Z badań tych okazało się, że minihelisy skonstruowane na podstawie domeny akceptorowej tRNA<sup>Val</sup> skutecznie ulegały aminoacylacji. Aminoacylacja była dodatkowo stymulowana po dodaniu helisy zawierającej fragment domeny antykodonowej [228].

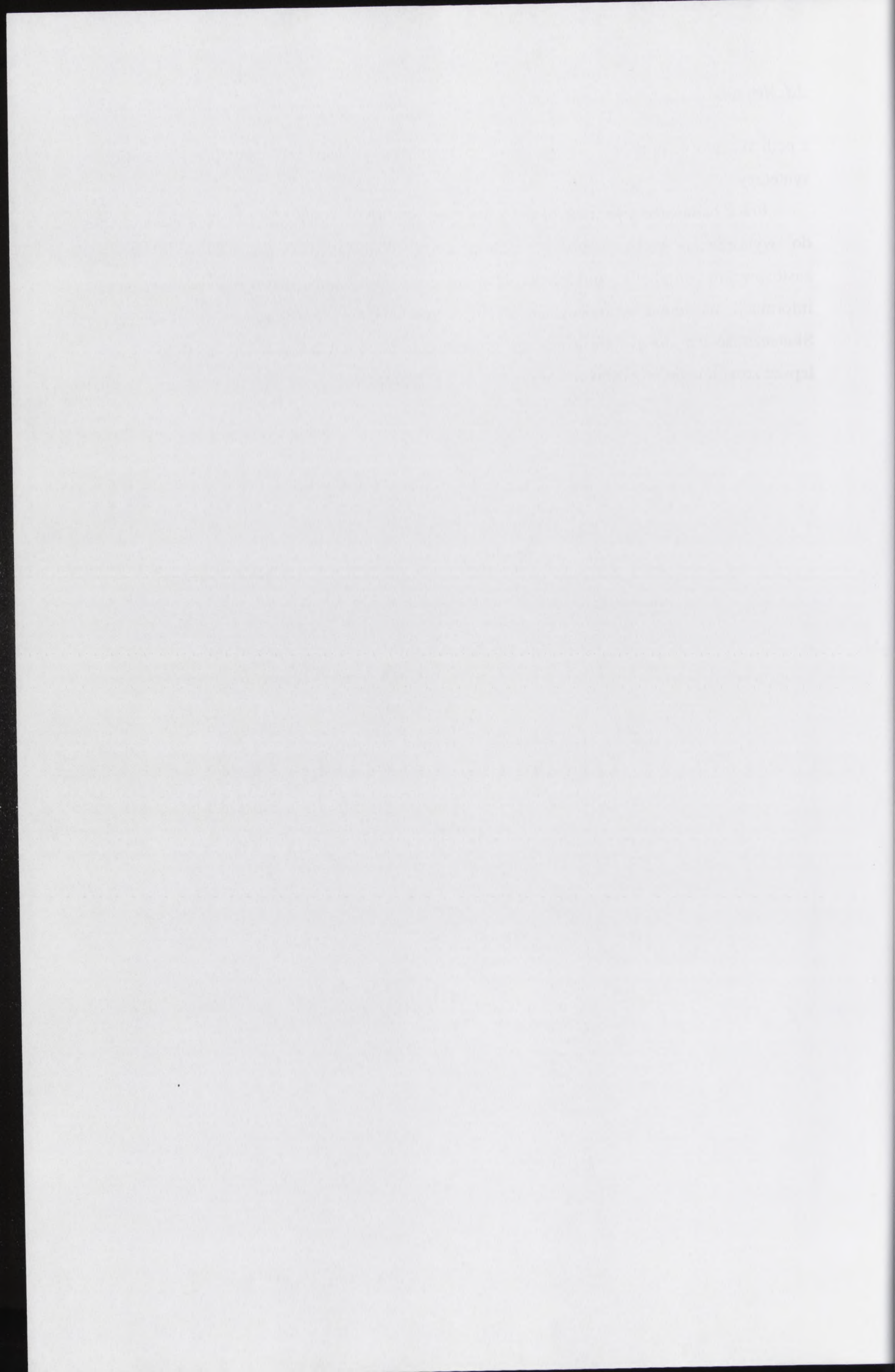
Badania procesu aminoacylacji z użyciem mini-tRNA mają również znaczenie dla zrozumienia ewolucji. Dostarczono wiele dowodów na ewolucję determinant aminoacylacji od *E. coli* przez *S. cerevisiae* do *H. sapiens* i koewolucję domen syntetaz, które oddziałują z tymi elementami [238]. Wiadomo, że selekcja specyficznego tRNA jest determinowana przez odpowiednie domeny strukturalne, które stanowią różne regiony w cząsteczce tRNA. Syntetaza CysRS *E. coli* posiada domeny, które rozpoznają tRNA zawierające U73, antykonon GCA oraz specyficzną strukturę trzeciorzędową rogu litery L, której kształt przybiera cząsteczka tRNA [236]. Enzym z *E. coli* nie jest zdolny do rozpoznania tRNACys *S. cerevisiae* i *H. sapiens*, co sugeruje ewolucję determinant aminoacylacji. Poprzez modyfikowanie tRNACys *S. cerevisiae* i *H. sapiens* tak, aby były one rozpoznawane przez enzym *E. coli*, Lipman i Hou zidentyfikowali determinanty w tRNA, które są ważne dla aminoacylacji, a które uległy dywergencji w procesie ewolucji.

Użycie mini-tRNA przysłużyło się również do zgłębienia mechanizmu selekcji aminokwasów podczas aminoacylacji oraz dla poparcia hipotezy, że dzisiejsze syntetazy aminoacylo-tRNA powstały z wcześniejszych form, które uczestniczyły w syntezie białka zależnej od tioestrów [239]. Takie badania prowadził między innymi Jakubowski. Stosował on w swoich badaniach oprócz minihelis również koenzym A (CoA-SH). Jest to przenośnik grup acylowych, które w połączeniu z nim są substratami syntetaz wszystkich klas. Koenzym A działa jako analog tRNA. Jakubowski wykazał, że syntetaza izoleucylo-tRNA *E. coli* jest zdolna do aminoacylacji CoA-SH z użyciem nie tylko izoleucyny, ale również waliny, leucyny, treoniny, alaniny i seryny. Syntetaza tRNA<sup>Val</sup> katalizowała aminoacylację CoA-SH przez walinę, treoninę, alaninę, serynę i izoleucynę. Natomiast syntetaza LysRS skutecznie aminoacylowała CoA-SH następującymi aminokwasami: Lys, Leu, Thr, Ala, Val i Ile. Wszystkie wymienione syntetazy: IleRS, ValRS oraz LysRS zachowują się jak syntetazy z „rozluźnioną selektywnością aminokwasową”. W przeciwieństwie, minihelisy RNA utworzone



z pętli akceptorowej tRNA<sup>Ile</sup> oraz tRNA<sup>Val</sup> były aminoacylowane wyłącznie przez specyficzne syntetazy.

Prace badawcze przeprowadzane z użyciem minimalnych struktur tRNA przyczyniły się do wyjaśnienia wielu procesów zachodzących z udziałem cząsteczki tRNA. Dzięki zastosowaniu minihelis, mikrohelis czy mniejszych struktur, uzyskano wiele cennych informacji na temat aminoacylacji tRNA i mechanizmu funkcjonowania tej molekuly. Skuteczność ich stosowania uzasadnia prowadzenie dalszych badań, które miałyby na celu lepsze zrozumienie procesów mających miejsce w rybosomie.



## 4. MATERIAŁY STOSOWANE W PRACY.

### 4.1. Materiał roślinny.

gatunek: łubin żółty (*Lupinus luteus*)

odmiana: Juno

klasa jakości: I

rok zbioru: 2002, 2003, 2004, 2005

pochodzenie: Poznańska Hodowla Roślin Spółka z o.o. w Tulcach k/Poznania

### 4.2 Odczynniki stosowane w pracy.

ODCZYNNIK	PRODUCENT
Akrylamid (amid kwasu akrylowego)	Sigma
Alkohol etylowy	Polmos
ATPNa <sub>2</sub> (adenozyno-5`-trifosforan sodu)	Sigma
BD-celuloza (benzoilodietylaminoetylo-celuloza)	Boehringer Mannheim GmbH
Bis-akrylamid (N,N'-metyleno-bisakrylamid)	Sigma
Błękit bromofenolowy (3,3',5,5'-tetrabromofenolosulfoftaleina)	Sigma
Chlorek magnezu	Merck
Chlorek potasu	Merck
Chlorek sodu	POCH
Chloroform	Sigma
DEAE-celuloza (dietyloaminoetyloceluloza)	Sigma
DTT (ditiotreitrol)	Sigma
EDTA (kwas etylenodiaminotetraoctowy)	Sigma
Fenol	Sigma
Glicerol	POCH
GTPLi (guanozyno-5`-trifosforan litu)	Sigma
T4 Kinaza Polinukleotydowa ( <i>Polinucleotide Kinase T4</i> )	Promega
Ksylencjanol FF	Sigma
Kwas borowy	POCH
Kwas octowy	POCH
Kwas solny	POCH
L-(2,4- <sup>3</sup> H) fenyloalanina	ICN
Mocznik (karbonylodiamid)	Sigma
Nadsiarczan amonu	Sigma
Octan magnezu	Sigma
Octan sodu	POCH
poli(U) (kwas poliurydynowy)	Sigma
POPOP (1,4-di-[2-(5-fenilo)-oksazol])	Sigma
PPO (2,5-difnylo-oksazol)	Sigma
Sacharoza	POCH
Siarczan amonu	POCH

4. MATHEMATICS

4.1. Algebra

Algebra is the study of mathematical symbols and the rules for manipulating these symbols. It is a unifying language of different areas of mathematics and has been a central topic for study since ancient times.

4.2. Geometry

Geometry is a branch of mathematics that deals with the properties and relationships of shapes and figures. It includes the study of lines, angles, surfaces, and solids.

Calculus is a branch of mathematics that deals with the study of continuous change. It includes the study of limits, derivatives, and integrals.

Trigonometry is a branch of mathematics that deals with the relationships between the sides and angles of triangles. It is used in many fields, including physics and engineering.

Statistics is a branch of mathematics that deals with the collection, analysis, and interpretation of data. It is used in many fields, including business and social sciences.

Probability is a branch of mathematics that deals with the study of random events and the likelihood of their occurrence. It is used in many fields, including science and finance.

Number theory is a branch of mathematics that deals with the properties of numbers. It includes the study of prime numbers, divisibility, and Diophantine equations.

ODCZYNNIK	PRODUCENT
TCA (kwas trichlorooctowy)	Sigma
TEMED (N,N,N',N'-tetrametyloetylenodwuamina)	Sigma
Toluen	POCh
Tris (tri(hydroksymetylo)-aminometan)	Sigma
Wodorotlenek sodu	POCh
$\beta$ -merkaptioetanol	Sigma

### 4.3 Bufory stosowane w pracy.

#### Bufor do ekstrakcji tRNA (1)

100 mM Tris-HCl, pH 7,5

100 mM NaCl

10 mM MgCl<sub>2</sub>

0,1% SDS

2 mM EDTA

5 mM  $\beta$ -merkaptioetanol

#### Bufor do oczyszczania tRNA na kolumnie z BD-celulozy (2)

350 mM NaCl

10 mM CH<sub>3</sub>COONa, pH 4,5

10 mM MgCl<sub>2</sub>

#### Bufor do oczyszczania tRNA na kolumnie z BD-celulozy (3)

1 M NaCl

10 mM CH<sub>3</sub>COONa, pH 4,5

10 mM MgCl<sub>2</sub>

#### Bufor do oczyszczania tRNA na kolumnie z BD-celulozy (4)

1,5 M NaCl

10 mM CH<sub>3</sub>COONa, pH 4,5

10 mM MgCl<sub>2</sub>

15% C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH



1970	105
1971	105
1972	105
1973	105
1974	105
1975	105
1976	105
1977	105
1978	105
1979	105
1980	105

### 4.3. Results of the study

#### 4.3.1. Prevalence of disease

The prevalence of disease was found to be 10.5%.

The prevalence of disease was found to be 10.5%.

The prevalence of disease was found to be 10.5%.

The prevalence of disease was found to be 10.5%.

The prevalence of disease was found to be 10.5%.

The prevalence of disease was found to be 10.5%.

The prevalence of disease was found to be 10.5%.

The prevalence of disease was found to be 10.5%.

The prevalence of disease was found to be 10.5%.

The prevalence of disease was found to be 10.5%.

The prevalence of disease was found to be 10.5%.

The prevalence of disease was found to be 10.5%.

The prevalence of disease was found to be 10.5%.

The prevalence of disease was found to be 10.5%.

The prevalence of disease was found to be 10.5%.

The prevalence of disease was found to be 10.5%.

The prevalence of disease was found to be 10.5%.

The prevalence of disease was found to be 10.5%.

The prevalence of disease was found to be 10.5%.

The prevalence of disease was found to be 10.5%.

The prevalence of disease was found to be 10.5%.

Bufor do izolacji rybosomów (5)

50 mM Tris-HCl, pH 7,5

50 mM KCl

5 mM MgCl<sub>2</sub>

2,5 mM β-merkaptioetanol

Bufor do izolacji rybosomów (poduszka sacharozowa) (6)

50 mM Tris-HCl, pH 7,5

100 mM KCl

5 mM MgCl<sub>2</sub>

2,5 mM β-merkaptioetanol

17,5 % sacharoza

Bufor do przechowywania rybosomów (7)

50 mM Tris-HCl, pH 7,5

50 mM KCl

5 mM MgCl<sub>2</sub>

1 mM DTT

50% glicerol

Bufor do izolacji frakcji enzymatycznej S-100 (8)

50 mM Tris-HCl, pH 7,5

10 mM KCl

1 mM MgCl<sub>2</sub>

5 mM β-merkaptioetanol

10% glicerol

Bufor do reakcji aminoacylacji (9)

100 mM Tris-HCl, pH 7,5

10 mM MgCl<sub>2</sub>

4 mM β-merkaptioetanol

4 mM ATP

1980  
1981  
1982  
1983  
1984  
1985  
1986  
1987  
1988  
1989  
1990

1991  
1992  
1993  
1994  
1995  
1996  
1997  
1998  
1999  
2000  
2001

2002  
2003  
2004  
2005  
2006  
2007  
2008  
2009  
2010  
2011  
2012

2013  
2014  
2015  
2016  
2017  
2018  
2019  
2020  
2021  
2022  
2023

2024  
2025  
2026  
2027  
2028  
2029  
2030  
2031  
2032  
2033  
2034

Bufor do nieenzymatycznego przekształcenia rybosomów w stan pretranslokacyjny (10)

50 mM Tris-HCl, pH 7,5

70 mM KCl

17 mM MgCl<sub>2</sub>

3 mM DTT

Bufor do nieenzymatycznego przekształcenia rybosomów w stan posttranslokacyjny (11)

50 mM Tris-HCl, pH 7,5

70 mM KCl

15 mM MgCl<sub>2</sub>

3 mM DTT

Bufor A do reakcji wiązania AA-tRNA do rybosomu (12)

50 mM Tris-HCl, pH 7,5

70 mM KCl

5 mM MgCl<sub>2</sub>

3 mM DTT

Bufor B do reakcji wiązania AA-tRNA do rybosomu (13)

1 mM GTP, pH 7,1

0,5 mg/ml poli(U)

50 pmoli [<sup>3</sup>H]-Phe-tRNA<sup>Phe</sup> (176 dpm/pmol)

Bufor płuczący do reakcji wiązania AA-tRNA do rybosomu (14)

10 mM Tris-HCl, pH 7,5

80 mM KCl

10 mM MgCl<sub>2</sub>



Bufor do kinazowania (15)

0,5 M Tris-HCl, pH 7,5  
100 mM  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$   
1 mM EDTA  
1 mM spermidyna

Bufor A do oczyszczania wyznakowanych oligonukleotydów (16)

100 mM NaCl  
50 mM MOPS, pH 7,0  
15% etanol

Bufor B do oczyszczania wyznakowanych oligonukleotydów (17)

1 M NaCl  
50 mM MOPS, pH 7,0  
15% etanol  
2 M mocznik

Bufor do hybrydyzacji oligonukleotydów do rybosomu (18)

50 mM Tris-HCl, pH 7,5  
70 mM KCl  
5 mM  $\text{MgCl}_2$   
3 mM DTT

Scyntylator toluenowy (19)

1 l toluenu bezwodnego  
4 g PPO  
0.2 g POPOP

Table 1. Physical constants of the monomers.

100 mm Hg, bp 73  
100 mm Hg, bp 73  
100 mm Hg, bp 73  
100 mm Hg, bp 73  
100 mm Hg, bp 73

Table 2. Physical constants of the polymers.

100 mm Hg, bp 73  
100 mm Hg, bp 73  
100 mm Hg, bp 73

Table 3. Physical constants of the copolymers.

100 mm Hg, bp 73  
100 mm Hg, bp 73  
100 mm Hg, bp 73

Table 4. Physical constants of the copolymers.

100 mm Hg, bp 73  
100 mm Hg, bp 73  
100 mm Hg, bp 73

Table 5. Physical constants of the copolymers.

100 mm Hg, bp 73  
100 mm Hg, bp 73  
100 mm Hg, bp 73

10% denaturujący żel poliakrylamidowy (20)

10% akrylamid

0,33% N,N'-metyleno-bisakrylamid

8 M mocznik

45 mM TEB

do polimeryzacji na 100 ml:

1 ml 10% nadsiarczanu amonu

33  $\mu$ l TEMED

Bufor do elektroforezy (TEB) (21)

0,9 M Tris

25 mM EDTA

0,9 M kwas borowy

Barwnik obciążający (22)

10 M mocznik

0,25% błękit bromofenolowy

0,25% ksylencjanol

Barwnik do barwienia RNA w żelu poliakrylamidowym (23)

40% metanol

10% kwas octowy

0,1% błękit toluidynowy



1. The first part of the document  
 2. The second part of the document  
 3. The third part of the document  
 4. The fourth part of the document  
 5. The fifth part of the document  
 6. The sixth part of the document  
 7. The seventh part of the document  
 8. The eighth part of the document  
 9. The ninth part of the document  
 10. The tenth part of the document

Section 1

1. The first part of the document  
 2. The second part of the document  
 3. The third part of the document  
 4. The fourth part of the document  
 5. The fifth part of the document  
 6. The sixth part of the document  
 7. The seventh part of the document  
 8. The eighth part of the document  
 9. The ninth part of the document  
 10. The tenth part of the document

Section 2

1. The first part of the document  
 2. The second part of the document  
 3. The third part of the document  
 4. The fourth part of the document  
 5. The fifth part of the document  
 6. The sixth part of the document  
 7. The seventh part of the document  
 8. The eighth part of the document  
 9. The ninth part of the document  
 10. The tenth part of the document

Section 3

1. The first part of the document  
 2. The second part of the document  
 3. The third part of the document  
 4. The fourth part of the document  
 5. The fifth part of the document  
 6. The sixth part of the document  
 7. The seventh part of the document  
 8. The eighth part of the document  
 9. The ninth part of the document  
 10. The tenth part of the document

## 5. METODY STOSOWANE W PRACY.

### 5.1 Izolacja tRNA.

Celem metody było otrzymanie fenyloalaninowego transferowego kwasu rybonukleinowego (tRNA<sup>Phe</sup>) pozbawionego zanieczyszczeń w postaci białek, polisacharydów, innych kwasów rybonukleinowych (RNA) i deoksyrybonukleinowych (DNA). Otrzymane tRNA powinno się cechować niskim stopniem degradacji oraz wysoką specyficznością mierzoną w reakcji aminoacylacji tRNA.

1. 250 g nasion łubinu zamrożonych w  $-70^{\circ}\text{C}$  zmieliłam i dodałam 1 l buforu ekstrakcyjnego (1), 500 ml fenolu i 500 ml chloroformu. Całość wytrząsałam kilkanaście razy i pozostawiłam do odstania.
2. Następnie zebrałam górną warstwę (wodną), dodałam do niej mieszaninę fenol/chloroform w ilości 1/2 objętości fazy wodnej i wytrząsałam.
3. Ponownie zebrałam górną warstwę (wodną), dodałam chloroformu w ilości 1/2 objętości zebranej fazy wodnej i energicznie wytrząsałam. Etap ekstrakcji z chloroformem powtarzałam kilkakrotnie, aż do zaniku interfazy.
4. RNA wytrącałam etanolem (3 objętości warstwy wodnej) w obecności 20%  $\text{CH}_3\text{COOK}$  pH 5,2 (1/10 objętości warstwy wodnej). Przechowałam w  $-20^{\circ}\text{C}$  przez noc.
5. Powstały osad wirowałam (8 000xg, 10 min.), wysuszyłam na lodzie, rozpuściłam w wodzie i ponownie wirowałam w warunkach jw., w celu oddzielenia nierozpuszczalnych zanieczyszczeń towarzyszących RNA.
6. Supernatant, o znanym stężeniu i ilości NA, zawiesiłam w DEAE-Celulozie (patrz metoda 5.2).

### 5.2 Oczyszczanie tRNA na DEAE-Celulozie.

DEAE-Celuloza (dwuetyloaminoetyloceluloza) jest wymienniczem jonowym stosowanym do izolacji tRNA. Przed rozpoczęciem procesu izolacji DEAE-Celulozę należy zregenerować. W tym celu umieściłam DEAE-Celulozę na lejku i przemywałam kolejno: wodą destylowaną (0,5 godz.), 0,5 M HCl (20 min.), wodą destylowaną (doprowadzając do pH 7,0), 96% etanolem. Do przemywania ponownie zastosowałam wodę destylowaną, po czym przemywałam DEAE-Celulozę 0,5 M NaOH (20 min.), a następnie wodą destylowaną

1. Introduction

2. Methodology

3. Results

4. Discussion

5. Conclusion

6. References

7. Appendix

8. Acknowledgements

9. Author Biographies

10. Correspondence

11. Contact Information

12. Funding Sources

13. Data Availability

14. Ethics Approval

15. Conflicts of Interest

16. Declaration of Interest

17. Statement of Contributions

18. Author Contributions

19. Peer Review Process

20. Publication Details

21. Copyright Information

22. Terms and Conditions

23. Disclaimer

24. Privacy Policy

25. Contact Us

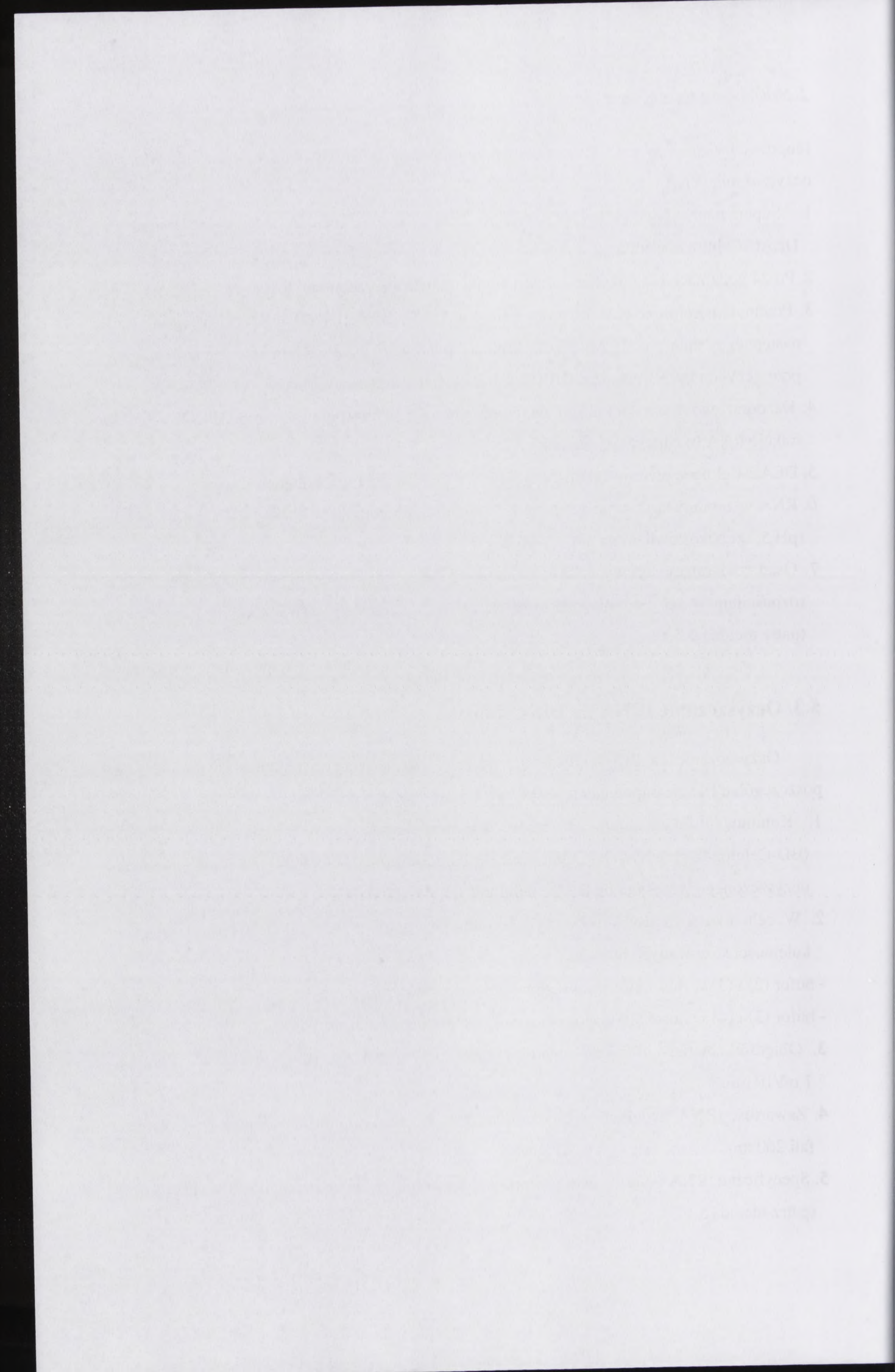
(doprowadzając do pH 7,0). Tak przygotowaną DEAE-Celulozę zastosowałam do oczyszczania tRNA.

1. Supernatant, pochodzący z izolacji tRNA (patrz metoda 5.2.1) zawiesiłam w DEAE-Celulozie według proporcji 50-100 A260/1 cm<sup>3</sup> celulozy.
2. Po 24 godzinach przełożyłam całość na lejek piankowy i zebrałam przesącz.
3. Przemyłam celulozę 0,25 M roztworem NaCl do wartości A260 = 0,001 i zawiesiłam do następnego dnia w 1 M NaCl. Całość ponownie przełożyłam na lejek piankowy, przesączałam i przemywałam DEAE-Celulozę małymi porcjami (po 50 ml) 1 M NaCl.
4. Każdorazowo mierzyłam absorbancję przy długości fali 260 nm i na tej podstawie zebrałam frakcje RNA (o najwyższej wartości A260).
5. DEAE-Celulozę przemywałam dalej 1 M NaCl w celu jej regeneracji.
6. RNA w zebranych frakcjach strąciłam 3 objętościami etanolu w obecności 20% CH<sub>3</sub>COOK (pH 5,2) i pozostawiłam na noc w -20°C.
7. Osad, zawierający surowy niskocząsteczkowy RNA, odwirowałam, wysuszyłam na lodzie, rozpuściłam w jak najmniejszej objętości wody i naniosałam na kolumnę z BD-Celulozy (patrz metoda 5.3.)

### 5.3. Oczyszczanie tRNA na BD-Celulozie.

Oczyszczanie na BD-Celulozie ma na celu rozdział otrzymanej mieszaniny tRNA na poszczególne frakcje odpowiadające specyficznym transferowym RNA.

1. Kolumnę o wymiarach 2,6 x 90 cm wypełnioną benzoilowaną DEAE-Celulozą (BD-Celuloza), przemywałam buforem (2) i naniosałam ok. 6000 A260 (10 μmoli) preparatu oczyszczonego wcześniej na DEAE-celulozie (patrz metoda 5.2).
2. W celu rozdziału tRNA wykorzystałam liniowy gradient stężenia NaCl w następującej kolejności stosowanych buforów:
  - bufor (2) i (3) w ilości 10 x większej niż objętość robocza kolumny
  - bufor (3) i (4) w ilości 5 x większej niż objętość robocza kolumny.
3. Objętość zbieranych frakcji wynosiła 1 ml przy prędkości przepływu przez kolumnę 1 ml/10 min.
4. Zawartość tRNA śledziłam w co dziesiątej frakcji przez pomiar absorbancji przy długości fali 260 nm.
5. Specyficzne tRNA wykrywałam przeprowadzając reakcję aminoacylacji co dziesiątej frakcji (patrz metoda 5.6).



6. Frakcje o najwyższej zawartości tRNA<sup>Phe</sup> strącałam 3 objętościami etanolu, odwirowałam (8 000 x g, 10 min) i rozpuściłam w jak najmniejszej ilości wody.

#### 5.4 Izolacja rybosomów 80S z *Lupinus luteus*.

1. 150 g nasion łubinu zamrożonych w ciekłym azocie zmieliłam i poddałam homogenizacji w 800 ml buforu (5), całość doprowadzając do pH 7,5 1 M Tris-em (pH 10,5).
2. Otrzymany supernatant wirowałam (30 000 x g, 15 min., temp. 4°C).
3. Roztwór zdekantowałam i poddałam kolejnemu wirowaniu (140 000 x g, 3 godz., temp. 4°C).
4. Otrzymany supernatant poddawany był dalszej obróbce do otrzymania aktywnych biologicznie czynników EF1 i EF2, w dalszej części pracy określanych jako S100 (patrz metoda 5.5).
5. Osad homogenizowałam w buforze (5) do otrzymania jednorodnej, klarownej, mlecznej suspensji rybosomów.
6. Rybosomy wirowałam w buforze (6), przez tzw. poduszkę sacharozową (po 5 ml), nakładając je bardzo ostrożnie na jej powierzchnię. Wirowanie prowadziłam w probówkach typu *Quick-Seal* (kubki wirówkowe 13.5 ml) w warunkach: 330 000 x g, 2 godz., temp. 4°C.
7. Osad rybosomów powtórnie homogenizowałam w buforze (5) i powtórzyłam proces wirowania przez poduszkę sacharozową w warunkach jak wyżej.
8. Otrzymany osad rybosomów homogenizowałam w buforze (7) i odwirowałam (2 000 x g, 5 min.).
9. Otrzymane rybosomy zawiesiłam w buforze (7) i przechowywałam w temp. -70°C.

1. The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that this is essential for the proper management of the organization's finances and for ensuring compliance with relevant laws and regulations.

2. The second part of the document outlines the various methods and techniques used to collect and analyze financial data. This includes a detailed description of the accounting process, from the initial recording of transactions to the final preparation of financial statements.

3. The third part of the document focuses on the role of the accounting department in providing valuable insights into the organization's financial performance. It discusses how this information can be used to identify areas of strength and weakness, and to develop strategies for improving overall financial health.

4. The fourth part of the document addresses the challenges and risks associated with financial reporting. It highlights the need for transparency and integrity in all financial transactions, and the potential consequences of non-compliance with reporting requirements.

5. The fifth part of the document provides a comprehensive overview of the current state of the financial markets and the impact of global economic trends. It discusses the role of various financial institutions and the challenges they face in a rapidly changing environment.

6. The sixth part of the document explores the future of financial reporting and the potential for new technologies to revolutionize the industry. It discusses the importance of staying up-to-date with the latest developments and the need for continuous learning and innovation.

7. The seventh part of the document concludes with a summary of the key findings and recommendations. It emphasizes the need for a strong financial foundation and the importance of working together to achieve the organization's long-term goals.

### 5.5 Izolacja frakcji enzymatycznej S100.

1. Supernatant S100, otrzymany w czasie izolacji rybosomów (patrz metoda 5.4), o znanej objętości, poddałam wysalaniu siarczanem amonu w dwóch etapach w temperaturze 0°C. W pierwszym etapie dodawałam (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> do uzyskania 35 % stężenia (194 g soli na 1000 ml roztworu). Proces prowadziłam powoli dodając sól małymi porcjami w czasie 30 minut przy stałym mieszaniu roztworu.
2. Następnie preparat wirowałam (30 000 x g, 30 min., temp. 4°C).
3. Supernatant, o znanej objętości, poddałam drugiemu etapowi wysalania do uzyskania 60 % stężenia (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> w roztworze (184 g na 1000 ml roztworu). Sposób dodawania soli i następujące po nim wirowanie powtórzyłam jak wyżej.
4. Otrzymany osad rozpuściłam w minimalnej ilości buforu (8) i poddałam dializie w czasie 3,5 godziny, trzykrotnie zmieniając bufor (8).
5. Następnie preparat wirowałam (6 000 x g, 5 min., 4°C), zebrałam supernatant, zmierzyłam A280 i przechowywałam w temperaturze -70°C.

### 5.6 Reakcja aminoacylacji tRNA.

1. Mieszaninę reakcyjną (50 µl) zawierającą: bufor (9), 300 pmoli [<sup>3</sup>H]-fenyloalaniny (aktywność specyficzna 38 Ci/mmol) oraz zoptymalizowaną ilość tRNA i frakcji enzymatycznej (S100) o znanym stężeniu, inkubowałam przez 15 min. w 37°C.
2. Mieszaninę przemywałam jednokrotnie 10 % roztworem kwasu trichlorooctowego (TCA), trzykrotnie 5 % roztworem TCA i jednokrotnie etanolem, jednocześnie przefiltrowując przez sączek z włókna szklanego Whatman GF/C.
3. Zatrzymaną na sączkach radioaktywność zmierzyłam na liczniku scyntylacyjnym w scyntylatorze toluenowym (19) na liczniku Beckmann LS 7000.



1. Introduction

2. Methodology

3. Results

4. Discussion

5. Conclusion

6. References

7. Appendix

8. Acknowledgements

9. Author Biographies

10. Contact Information

## 5.7 Preparatywna reakcja aminoacylacji.

1. Mieszaninę reakcyjną (5 ml) zawierającą: bufor (9), 300 nmoli [<sup>3</sup>H]-fenyloalaniny (aktywność specyficzna 38 Ci/mmol) i 9,8 nmoli tRNA<sup>Phe</sup> inkubowałam przez 5 min. w 37°C.
2. Następnie dodałam 150 ml frakcji enzymatycznej S100 o stężeniu 244,5 A280/ml i prowadziłam właściwą reakcję aminoacylacji przez 15 min. w temperaturze 37°C.
3. Po inkubacji próbę wytrząsałam z fenolem o temperaturze 4°C w czasie 15 minut w celu usunięcia syntetaz aminoacylo-tRNA.
4. Po odwirowaniu próby (12 000 x g, 20 min.) do warstwy wodnej dodałam 3 objętości etanolu i całość pozostawiłam w temperaturze -20°C przez 60 minut. Miało to na celu wytrącenie ze środowiska zsyntetyzowanego [<sup>3</sup>H]-Phe-tRNA<sup>Phe</sup> oraz usunięcie fenolu.
5. Wytrącony osad odwirowałam (12 000 x g, 20 min.) i rozpuściłam w wodzie.
6. Procedurę wytrącania etanolem powtarzałam kilkakrotnie w tych samych warunkach.
7. Osad [<sup>3</sup>H]-Phe-tRNA<sup>Phe</sup> rozpuściłam w wodzie (300 µl) i przechowywałam w temperaturze -70°C.

## 5.8 Nieenzymatyczne przekształcenie rybosomów w stan pretranslokacyjny.

### 5.8.1 Obsadzenie rybosomalnego miejsca P przez D-tRNA.

1. Mieszaninę reakcyjną (9 µl) zawierającą 12 pmoli rybosomów w buforze (10), 10 µg poli(U) o stężeniu 10 mg/ml i 20 pmoli deacylowanego tRNA, poddałam inkubacji w czasie 10 min. w temperaturze 37°C.

### 5.8.2 Obsadzenie rybosomalnego miejsca P przez mini-tRNA.

1. Mieszaninę reakcyjną (9 µl) zawierającą 12 pmoli rybosomów w buforze (10), 10 µg poli(U) o stężeniu 10 mg/ml i 20 pmoli mini-tRNA, poddałam inkubacji w czasie 10 min. w temperaturze 37°C.

### 2.3. Properties of the...

1. The first property is that the function is continuous on the interval  $[a, b]$ . This follows from the fact that the function is a sum of continuous functions.

2. The second property is that the function is differentiable on the interval  $(a, b)$ . This follows from the fact that the function is a sum of differentiable functions.

3. The third property is that the function is bounded on the interval  $[a, b]$ . This follows from the fact that the function is a sum of bounded functions.

4. The fourth property is that the function is integrable on the interval  $[a, b]$ . This follows from the fact that the function is a sum of integrable functions.

5. The fifth property is that the function is convex on the interval  $[a, b]$ . This follows from the fact that the function is a sum of convex functions.

6. The sixth property is that the function is concave on the interval  $[a, b]$ . This follows from the fact that the function is a sum of concave functions.

7. The seventh property is that the function is increasing on the interval  $[a, b]$ . This follows from the fact that the function is a sum of increasing functions.

8. The eighth property is that the function is decreasing on the interval  $[a, b]$ . This follows from the fact that the function is a sum of decreasing functions.

### 2.4. Properties of the...

1. The first property is that the function is continuous on the interval  $[a, b]$ . This follows from the fact that the function is a sum of continuous functions.

2. The second property is that the function is differentiable on the interval  $(a, b)$ . This follows from the fact that the function is a sum of differentiable functions.

3. The third property is that the function is bounded on the interval  $[a, b]$ . This follows from the fact that the function is a sum of bounded functions.

4. The fourth property is that the function is integrable on the interval  $[a, b]$ . This follows from the fact that the function is a sum of integrable functions.

5. The fifth property is that the function is convex on the interval  $[a, b]$ . This follows from the fact that the function is a sum of convex functions.

6. The sixth property is that the function is concave on the interval  $[a, b]$ . This follows from the fact that the function is a sum of concave functions.

7. The seventh property is that the function is increasing on the interval  $[a, b]$ . This follows from the fact that the function is a sum of increasing functions.

8. The eighth property is that the function is decreasing on the interval  $[a, b]$ . This follows from the fact that the function is a sum of decreasing functions.

### **5.8.3 Obsadzenie rybosomalnych miejsc: A przez Phe-tRNA<sup>Phe</sup> i P przez D-tRNA.**

1. Pierwszy etap reakcji przeprowadziłam analogicznie do metody opisanej w punkcie 5.8.1.
2. Następnie do mieszaniny reakcyjnej (9  $\mu$ l) dodałam 20 pmoli Phe-tRNA<sup>Phe</sup> i inkubowałam kolejne 10 minut w temperaturze 37°C. W ten sposób nastąpiło obsadzenie rybosomalnego miejsca A.

### **5.8.4 Obsadzenie rybosomalnych miejsc: A przez Phe-tRNA<sup>Phe</sup> i P przez mini-tRNA.**

1. Pierwszy etap reakcji przeprowadziłam analogicznie do metody opisanej w punkcie 5.8.2.
2. Następnie do mieszaniny reakcyjnej (9  $\mu$ l) dodałam 20 pmoli Phe-tRNA<sup>Phe</sup> i inkubowałam kolejne 10 minut w temperaturze 37°C. W ten sposób nastąpiło obsadzenie rybosomalnego miejsca A.

## **5.9 Nieenzymatyczne przekształcenie rybosomów w stan posttranslokacyjny.**

### **5.9.1 Obsadzenie rybosomalnego miejsca P przez Phe-tRNA<sup>Phe</sup>.**

1. Mieszaninę reakcyjną (9,5  $\mu$ l) zawierającą 12 pmoli rybosomów w buforze (11), 10  $\mu$ g poli(U) o stężeniu 10 mg/ml i 16 pmoli Phe-tRNA<sup>Phe</sup>, poddałam inkubacji w czasie 10 minut w temperaturze 37°C.

### **5.9.2 Obsadzenie rybosomalnych miejsc: P przez Phe-tRNA<sup>Phe</sup> oraz E przez D-tRNA.**

1. Pierwszy etap reakcji przeprowadziłam analogicznie do metody przedstawionej w punkcie 5.9.1.
2. Następnie do mieszaniny reakcyjnej (9,5  $\mu$ l) dodałam 40 pmoli deacylowanego tRNA i inkubowałam kolejne 10 minut w temperaturze 37°C. W ten sposób nastąpiło obsadzenie rybosomalnego miejsca E.

2.1.1.1.1.1

2.1.1.1.1.2

1.1.1.1.1.1

2.1.1.1.1.3

2.1.1.1.1.4

1.1.1.1.1.2

2.1.1.1.1.5

2.1.1.1.1.6

2.1.1.1.1.7

1.1.1.1.1.3

2.1.1.1.1.8

2.1.1.1.1.9

1.1.1.1.1.4

2.1.1.1.1.10

1.1.1.1.1.5

### 5.9.3 Obsadzenie rybosomalnych miejsc: P przez Phe-tRNA<sup>Phe</sup> oraz E przez mini-tRNA.

1. Pierwszy etap reakcji przeprowadziłam analogicznie do metody przedstawionej w punkcie 5.9.1.
2. Następnie do mieszaniny reakcyjnej (9,5  $\mu$ l) dodałam 40 pmoli mini-tRNA i inkubowałam kolejne 10 minut w temperaturze 37°C. W ten sposób nastąpiło obsadzenie rybosomalnego miejsca E.

### 5.10 Reakcja enzymatycznego wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup> do poli(U) rybosomów (RW).

1. Mieszanina inkubacyjna (50  $\mu$ l) zawierała: 5  $\mu$ l buforu (12), 10  $\mu$ l buforu (13), 12 pmoli rybosomów i zoptymalizowaną ilość frakcji enzymatycznej S100. Próbę kontrolną stanowiła mieszanina reakcyjna o takim samym składzie, niezawierająca S100. Inkubację prowadziłam przez 5 min. w 37°C.
2. Następnie do mieszaniny inkubacyjnej dodałam 1 ml schłodzonego buforu płuczającego (14) i sączyłam przez filtr nitrocelulozowy Millipore o średnicy porów 0,45  $\mu$ m.
3. Filtr nitrocelulozowy płukałam trzykrotnie tym samym buforem, suszyłam i zliczyłam radioaktywność w scyntylatorze toluenowym (19) na liczniku Beckmann LS 7000.

### 5.11 Znakowanie oligodeoksynukleotydów oraz mini-tRNA [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP na końcu 5'.

1. Oligonukleotydy DNA i cząsteczki mini-tRNA były znakowane na końcu 5' przy pomocy [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP.
2. Mieszanina reakcyjna (12  $\mu$ l) zawierała bufor (15), 6000 pmoli oligonukleotydu lub mini-tRNA, 18000 pmoli ATP, 30  $\mu$ Ci [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP (stężenie 10  $\mu$ Ci/ $\mu$ l) oraz 20 U kinazy polinukleotydowej T4 (stężenie 10000 U/ml). Reakcję prowadziłam przez 35 minut w temperaturze 37°C, a następnie przez 15 minut w temperaturze 65°C.
3. Znakowane oligonukleotydy oczyściłam przy pomocy chromatografii jonowymiennej na kolumnach Qiagen-20, na które można nanosiłam nie więcej niż 20  $\mu$ g oligomerów (około 6000 pmoli). Na kolumny doprowadzone do pH 7,0 buforem (16) naniosałam preparaty

### 2.1.1. Wykazanie specyficzności interakcji PIR-GNA<sup>TM</sup> oraz E przez mini-RNA

1. Wykazanie specyficzności interakcji PIR-GNA<sup>TM</sup> oraz E przez mini-RNA
2. Wykazanie specyficzności interakcji PIR-GNA<sup>TM</sup> oraz E przez mini-RNA

### 2.1.2. Wykazanie specyficzności interakcji PIR-GNA<sup>TM</sup> oraz E przez mini-RNA

1. Wykazanie specyficzności interakcji PIR-GNA<sup>TM</sup> oraz E przez mini-RNA
2. Wykazanie specyficzności interakcji PIR-GNA<sup>TM</sup> oraz E przez mini-RNA

### 2.1.3. Wykazanie specyficzności interakcji PIR-GNA<sup>TM</sup> oraz E przez mini-RNA

1. Wykazanie specyficzności interakcji PIR-GNA<sup>TM</sup> oraz E przez mini-RNA
2. Wykazanie specyficzności interakcji PIR-GNA<sup>TM</sup> oraz E przez mini-RNA

rozcieńczone buforem (16) (200  $\mu$ l). Zatrzymane na kolumnie znakowane oligonukleotydy wymywałam buforem (17) (2 ml) i strącałam trzykrotnym nadmiarem etanolu ( $-70^{\circ}\text{C}$ , 1h) i odwirowałam (12 000 x g, 30 min.,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Osad osuszyłam, rozpuściłam w 200  $\mu$ l wody i przechowywałam w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$ .

4. Znakowane mini-tRNA oczyściłam za pomocą ekstrakcji fenol/chloroform i strącałam trzykrotnym nadmiarem etanolu ( $-70^{\circ}\text{C}$ , 1h) i odwirowałam (12 000 x g, 30 min.,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Osad osuszyłam, rozpuściłam w 200  $\mu$ l wody i przechowywałam w temperaturze  $-70^{\circ}\text{C}$ .

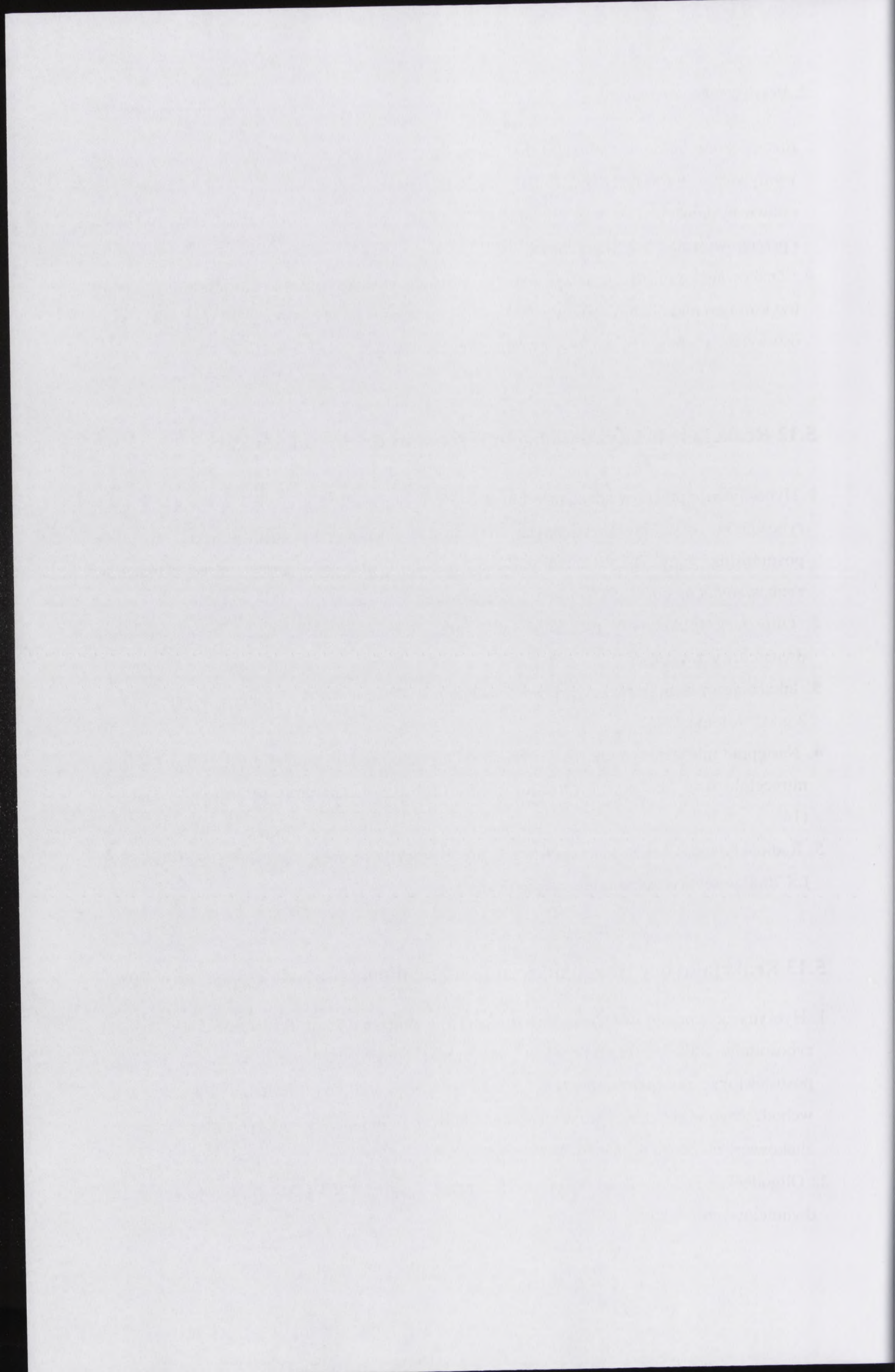
### 5.12 Reakcja hybrydyzacji oligonukleotydów do rybosomów 80S.

1. Hybrydyzację przeprowadzałam w buforze (18) w objętości 25  $\mu$ l. Próby zawierały 12 pmoli rybosomów 80S przekształconych na drodze nieenzymatycznej w stan pre- lub posttranslokacyjny (patrz metody 5.2.8. i 5.2.9.) oraz 360 pmoli oligonukleotydów znakowanych na końcu 5' fosforem  $^{32}\text{P}$  (patrz metoda 5.11).
2. Oligodeoksynukleotydy preinkubowałam przez 2 min. w  $65^{\circ}\text{C}$ , w celu zdenaturowania dwuniciowych struktur.
3. Inkubację mieszanin reakcyjnych prowadziłam w  $37^{\circ}\text{C}$  w czasie 5 min., a następnie przez 2 godz. w temp.  $0^{\circ}\text{C}$ .
4. Następnie mieszaniny reakcyjne rozcieńczyłam buforem (14) i przefiltrowałam przez filtry nitrocelulozowe Millipore o średnicy porów 0,45  $\mu\text{m}$ , kilkakrotnie przemywając buforem (14).
5. Radioaktywność zatrzymaną na filtrach zmierzyłam na liczniku scyntylicyjnym Beckmann LS 7000 w scyntylicytorze toluenowym (19).

### 5.13 Reakcja hybrydyzacji mieszanin oligonukleotydów do rybosomów 80S.

1. Hybrydyzację przeprowadzałam w buforze (18) w objętości 25  $\mu$ l. Próby zawierały 12 pmoli rybosomów 80S przekształconych na drodze nieenzymatycznej w stan pre- lub posttranslokacyjny (patrz metody 5.2.8 i 5.2.9) oraz po 180 pmoli każdego oligonukleotydu wchodzącego w skład kompozycji (w sumie 360 pmoli oligonukleotydów), z czego jeden był znakowany na końcu 5' [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]-ATP (patrz metoda 5.11).
2. Oligodeoksynukleotydy preinkubowałam przez 2 min. w  $65^{\circ}\text{C}$ , w celu zdenaturowania dwuniciowych struktur.





3. Całość inkubowałam w 37°C w czasie 5 min., a następnie przez 2 godz. w temp. 0°C.
4. Następnie mieszaniny reakcyjne rozcieńczyłam buforem (14) i przefiltrowałam przez filtry nitrocelulozowe Millipore o średnicy porów 0,45 µm, kilkakrotnie przemywając buforem (14).
5. Radioaktywność zatrzymaną na filtrach zmierzyłam na liczniku scyntylicyjnym Beckmann LS 7000 w scyntylatorze toluenowym (19).

#### **5.14 Analiza kwasów nukleinowych w żelach poliakrylamidowych.**

1. Podczas etapów izolacji i oczyszczania tRNA (patrz metody 5.2 oraz 5.3) poddawałam poszczególne frakcje RNA analizie elektroforetycznej w 10% denaturującym żelu poliakryloamidowym (20) w buforze do elektroforezy (21).
2. Na żel nanosiłam 1 OD preparatu z dodatkiem barwnika obciążającego (22).
3. Rozdział prowadziłam w żelu poddanym wcześniejszej preelektroforezie, przy natężeniu 5 mA i napięciu 250 - 400 V. Początkowe warunki rozdziału wynosiły: natężenie 10 mA, napięcie 400V.
4. Po wejściu preparatów w żel, natężenie podwyższałam do 20 mA, a napięcie do 2000V.
5. Produkty rozdziału elektroforetycznego analizowałam po wybarwieniu barwnikiem do RNA (25).

1. The first part of the document is a list of names and addresses. The names are: John Smith, Mary Jones, Robert Brown, and Elizabeth White. The addresses are: 123 Main Street, New York, NY; 456 Elm Street, New York, NY; 789 Oak Street, New York, NY; and 1010 Pine Street, New York, NY.

2. The second part of the document is a list of names and addresses. The names are: James Green, Susan Black, and David Gray. The addresses are: 234 Main Street, New York, NY; 567 Elm Street, New York, NY; and 890 Oak Street, New York, NY.

3. The third part of the document is a list of names and addresses. The names are: Michael Red, Jennifer Blue, and Christopher Yellow. The addresses are: 345 Main Street, New York, NY; 678 Elm Street, New York, NY; and 901 Oak Street, New York, NY.

4. The fourth part of the document is a list of names and addresses. The names are: Daniel Purple, Rebecca Green, and Andrew Brown. The addresses are: 456 Main Street, New York, NY; 789 Elm Street, New York, NY; and 1010 Oak Street, New York, NY.

5. The fifth part of the document is a list of names and addresses. The names are: Emily White, Matthew Black, and Sarah Gray. The addresses are: 567 Main Street, New York, NY; 890 Elm Street, New York, NY; and 1123 Oak Street, New York, NY.

6. The sixth part of the document is a list of names and addresses. The names are: Christopher Yellow, Jennifer Blue, and Daniel Purple. The addresses are: 678 Main Street, New York, NY; 901 Elm Street, New York, NY; and 1234 Oak Street, New York, NY.

7. The seventh part of the document is a list of names and addresses. The names are: Rebecca Green, Andrew Brown, and Emily White. The addresses are: 789 Main Street, New York, NY; 1010 Elm Street, New York, NY; and 1345 Oak Street, New York, NY.

8. The eighth part of the document is a list of names and addresses. The names are: Matthew Black, Sarah Gray, and Christopher Yellow. The addresses are: 890 Main Street, New York, NY; 1123 Elm Street, New York, NY; and 1456 Oak Street, New York, NY.

9. The ninth part of the document is a list of names and addresses. The names are: Jennifer Blue, Daniel Purple, and Rebecca Green. The addresses are: 901 Main Street, New York, NY; 1234 Elm Street, New York, NY; and 1567 Oak Street, New York, NY.

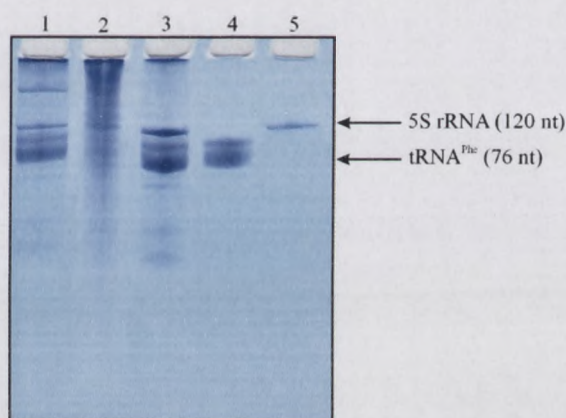
10. The tenth part of the document is a list of names and addresses. The names are: Andrew Brown, Emily White, and Matthew Black. The addresses are: 1010 Main Street, New York, NY; 1345 Elm Street, New York, NY; and 1678 Oak Street, New York, NY.

## 6. WYNIKI I DYSKUSJA.

### 6.1 Izolacja i oczyszczanie tRNA<sup>Phe</sup>.

Izolację i oczyszczanie tRNA<sup>Phe</sup> przeprowadziłam zgodnie z metodami 5.1, 5.2 oraz 5.3. Celem tych procedur było otrzymanie możliwie czystego fenyloalaninowego, transferowego RNA (tRNA<sup>Phe</sup>), pozbawionego zanieczyszczeń w postaci białek, polisacharydów, RNA i DNA. Do izolacji użyłam 250 g nasion *L. luteus*.

Na Rysunku 36 przedstawiłam obraz rozdziału elektroforetycznego (według metody 5.14) preparatu pochodzącego z poszczególnych etapów oczyszczania tRNA.



**Rysunek 36. Obraz rozdziału elektroforetycznego (10% denaturujący PAA) preparatu pochodzącego z oczyszczania tRNA.**

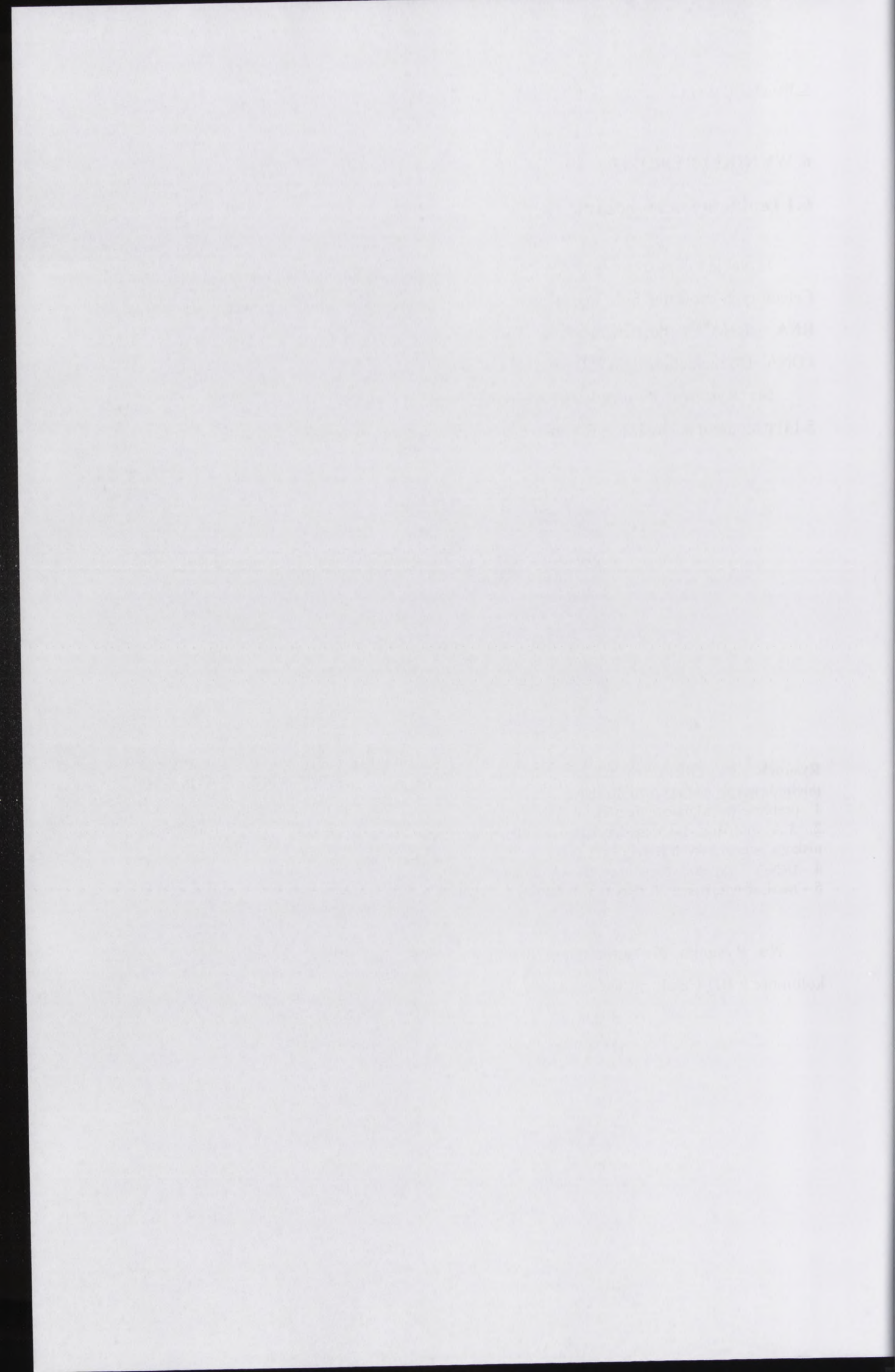
1 - preparat przed nałożeniem na DEAE-Celulozę;

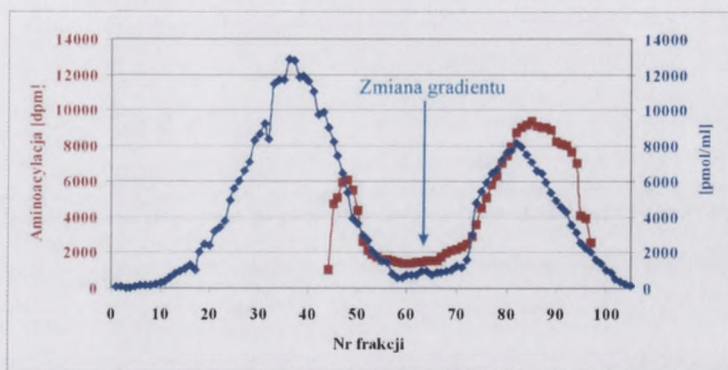
2, 3 - preparat po oczyszczeniu na DEAE-celulozie: frakcja wysokocząsteczkowych (2) oraz niskocząsteczkowych RNA (3);

4 - tRNA<sup>Phe</sup> po oczyszczeniu na BD-Celulozie;

5 - marker wielkości, 5S rRNA izolowany z *L. luteus*.

Na Rysunku 37 zamieściłam przebieg oczyszczania tRNA w gradiencie stężeń na kolumnie z BD-Celulozą (według metody 5.3).





**Rysunek 37. Przebieg rozdzielania niskocząsteczkowych RNA na kolumnie wypełnionej BD-Celulazą.**

Kolorami oznaczono: granatowym - wyniki pomiaru stężenia każdej frakcji [pmol/ml], czerwonym - wynik reakcji aminoacylacji [dpm]. Niebieska strzałka oznacza zmianę gradientu NaCl.

Pierwsze maksimum odpowiada między innymi  $tRNA^{Met}$ , natomiast drugie charakteryzuje  $tRNA^{Phe}$ . W wyniku rozdzielania otrzymałam oczyszczony  $tRNA^{Phe}$  o stężeniu  $1,35 \mu\text{mol/ml}$ . Aktywność specyficzna wydzielonego preparatu, zmierzona w reakcji aminoacylacji wynosiła  $900 \text{ pmol}/A_{260}$ .

## 6.2 Izolacja rybosomów 80S z *L. luteus*.

Izolację rybosomów przeprowadziłam według metody 5.4. Do izolacji użyłam 150g łubinu żółtego. Otrzymałam rybosomy o stężeniu  $24 \text{ mg/ml}$ .

## 6.3 Izolacja frakcji enzymatycznej S-100.

Izolację frakcji enzymatycznej przeprowadziłam według metody 5.5. Stężenie uzyskanej frakcji enzymatycznej S100 wynosiło  $244,5 A_{280}/\text{ml}$ . Aktywność preparatu została określona w reakcji enzymatycznego wiązania AA-tRNA do rybosomów (5.10).

Dear Sir,  
I have the honor to acknowledge the receipt of your letter of the 15th inst. in relation to the above matter.

I am sorry to hear that you are unable to attend the meeting on the 20th inst. I will be glad to discuss the matter with you at another time.

I am, Sir, very respectfully,  
Your obedient servant,  
John D. Smith

Very truly yours,  
John D. Smith

#### 6.4 Preparatywna reakcja aminoacylacji tRNA<sup>Phe</sup>.

Reakcję aminoacylacji preparatywnej tRNA<sup>Phe</sup> przeprowadziłam według metody 5.7. W wyniku aminoacylacji otrzymałam <sup>3</sup>H-fenylalanylo-tRNA<sup>Phe</sup> o stężeniu 72,6 nmola/ml. Radioaktywność specyficzna otrzymanego preparatu wynosiła 176 dpm/pmol.

#### 6.5 Zastosowanie oligonukleotydów antysensowych i mini-tRNA do badań zmian konformacyjnych rybosomu 80S.

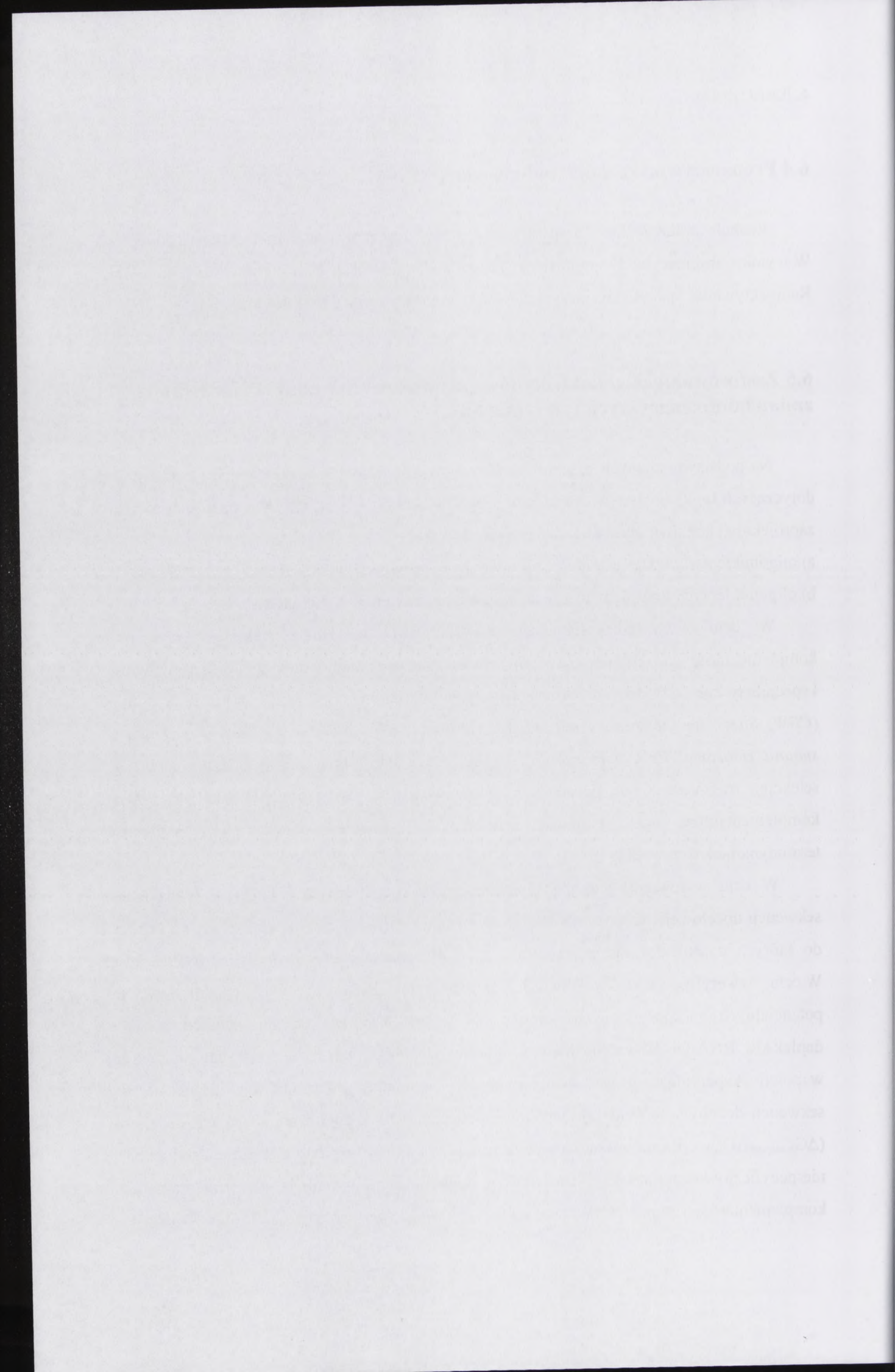
Na podstawie znanych struktur I- i II-rzędowych rRNA [22] oraz danych literaturowych dotyczących funkcjonalnej ważności poszczególnych nukleotydów rRNA w procesie translacji, zaprojektowałam dwie serie oligodeoksynukleotydów:

- a) oligonukleotydy komplementarne do wybranych sekwencji w 18S rRNA;
- b) oligonukleotydy komplementarne do wybranych sekwencji w 26S rRNA.

W celu wyłowienia sekwencji a-DNA, które posiadają tylko jedno miejsce komplementarne o silnym powinowactwie, zastosowałam metody bioinformatyczne i specjalistyczne bazy danych sekwencji kwasów nukleinowych (*The Comparative RNA Web (CRW) Site; The European small subunit ribosomal RNA database; The European large subunit ribosomal RNA database*) [22, 240, 241] a także oprogramowanie umożliwiające selekcję fragmentów o pożądanych właściwościach: długość (badania *in silico*), komplementarność oraz stabilność heterodupleksu (metoda obliczeniowa parametrów termodynamicznych według [242]).

W celu wyłowienia oligodeoksynukleotydów specyficznych względem tylko jednej sekwencji docelowej, przeprowadziłam analizę fragmentów 18S rRNA, 26S rRNA i 5S rRNA, do których zaprojektowane przeze mnie a-DNA wykazują częściową komplementarność. W celu zweryfikowania możliwości przyłączania badanych oligonukleotydów do potencjalnych niespecyficznych miejsc, obliczyłam wartości energii swobodnej ( $\Delta G$ ) dupleksów RNA/DNA, według metody opisanej w [242]. Najbardziej istotnym parametrem w moich eksperymentach jest stosunek energii swobodnej obliczonej dla niespecyficznej sekwencji docelowej do energii swobodnej obliczonej dla specyficznej sekwencji docelowej ( $\Delta G_{\text{nonspec}}/\Delta G_{\text{spec}}$ ). Im mniejsza wartość  $\Delta G_{\text{nonspec}}/\Delta G_{\text{spec}}$ , tym jest bardziej prawdopodobne, że niespecyficzny heterodupleks jest niestabilny w warunkach optymalnych dla istnienia w pełni komplementarnego dupleksu. W związku z tym, niska wartość  $\Delta G_{\text{nonspec}}/\Delta G_{\text{spec}}$  świadczy o



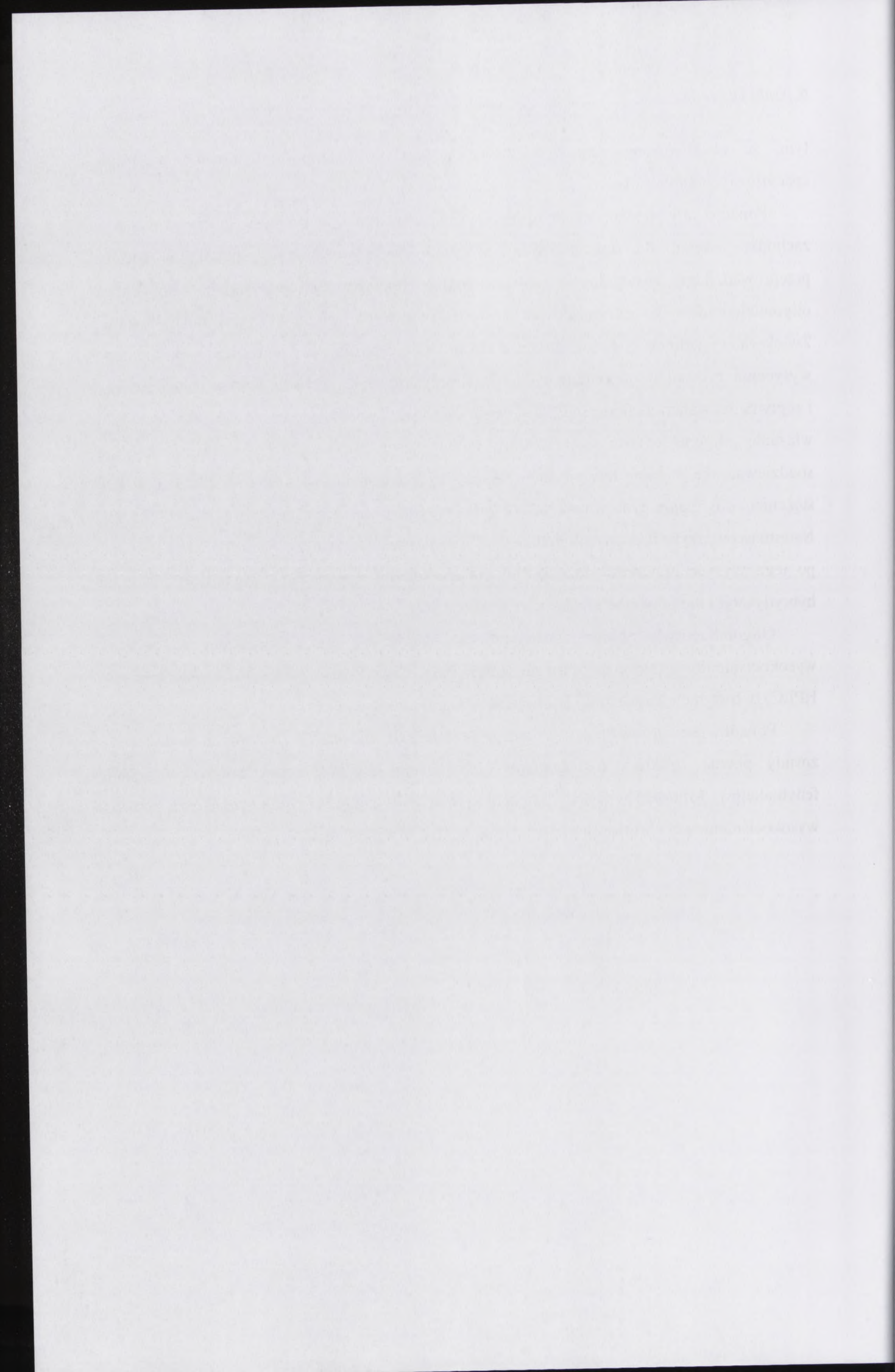


tym, że obserwowany stopień hybrydyzacji jest rezultatem występowania wyłącznie specyficznych dupleksów.

Ponadto, aby upewnić się, że obserwowana przeze mnie hybrydyzacja oligonukleotydów zachodzi jedynie do specyficznych, w pełni komplementarnych miejsc w rRNA, przeprowadziłam szczegółową analizę stopnia hybrydyzacji wszystkich testowanych oligonukleotydów w zależności od stosunku molowego oligonukleotydu do rybosomu. Zwiększałam nadmiar oligonukleotydu w stosunku do rybosomu aż do uzyskania całkowitego wysycenia rybosomu oligonukleotydem. Utworzyłam w ten sposób krzywe wysyceniowe i zoptymalizowałam jednocześnie ilość oligonukleotydu hybrydyzowanego do rybosomu. Jeśli wiązanie oligonukleotydu zachodziłoby w miejscach niespecyficznych, należałoby się spodziewać, że stopień hybrydyzacji wzrastałby nieustannie wraz ze zwiększającym się stężeniem oligonukleotydu w reakcji. Wówczas mógłby przekraczać nawet wartość 100% [60]. Natomiast w przypadku, gdy oligonukleotyd hybrydyzuje do jednego, specyficznego miejsca, po jego wysyceniu wzrost stężenia oligonukleotydu nie spowoduje zwiększonego stopnia hybrydyzacji i nie powinien przekroczyć wartości 100%.

Oligonukleotydy zostały zsyntetyzowane chemicznie oraz oczyszczone za pomocą wysokociśnieniowej chromatografii ciekowej (ang. *High Pressure Liquid Chromatography*, HPLC) w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie.

Ponadto skonstruowałam trzy rodzaje cząsteczek mini-tRNA, z których wykluczone zostały pewne strukturalne fragmenty „kompletnych” tRNA specyficznych względem fenyloalaniny. Mini-tRNA zostały zsyntetyzowane chemicznie oraz oczyszczone za pomocą wysokociśnieniowej chromatografii ciekowej w IBA GMBH Germany.

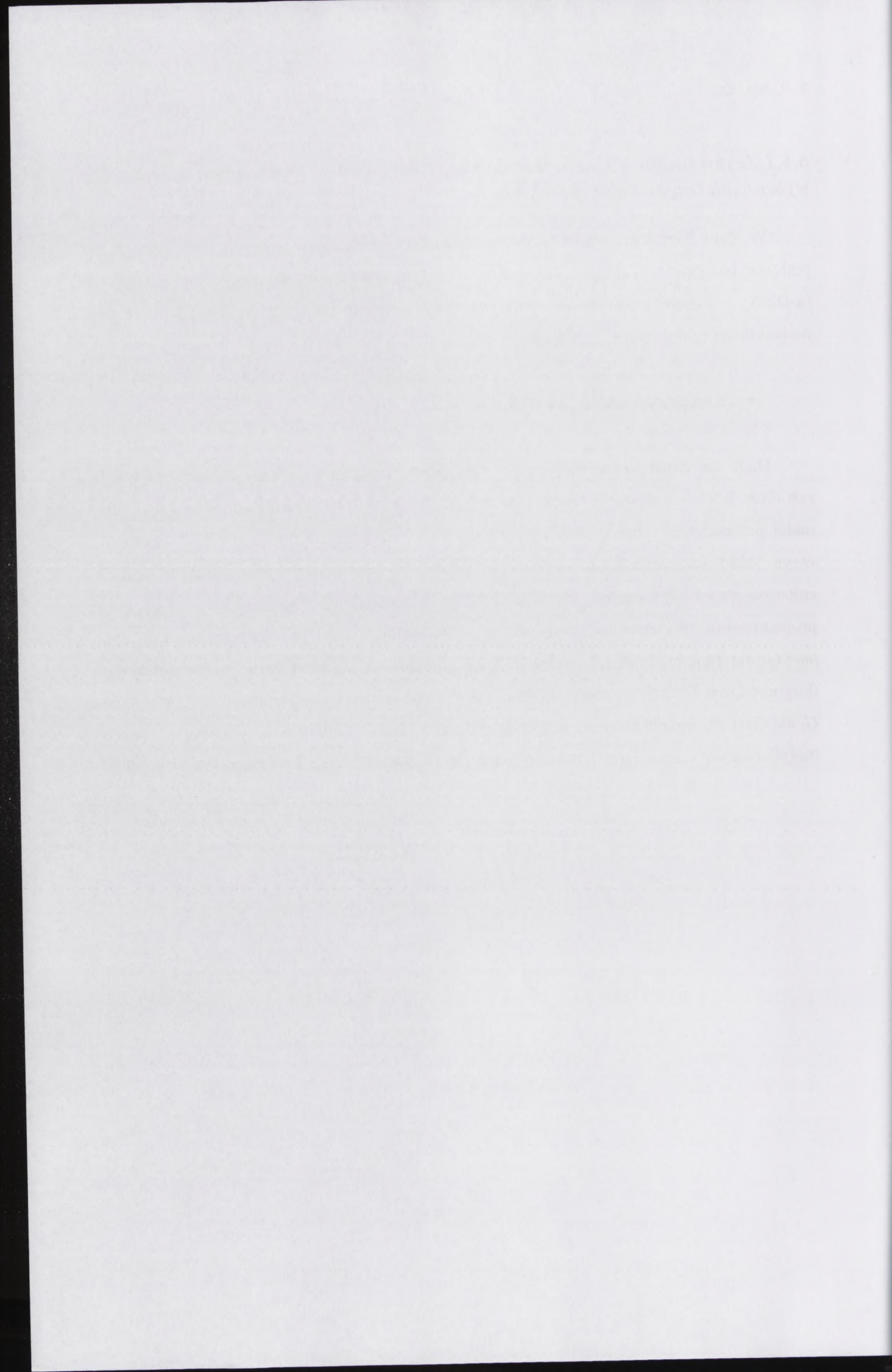


### 6.5.1 Zastosowanie oligonukleotydów antysensowych komplementarnych do wybranych fragmentów 18S rRNA.

W celu określenia zmian konformacyjnych zachodzących w rybosomie roślinnym podczas biosyntezy białka, zastosowałam 7 antysensowych oligodeoksyrybonukleotydów (a-DNA) komplementarnych do wysoce konserwatywnych sekwencji w 18S rRNA małej podjednostki rybosomalnej *Lupinus luteus*.

- **Konserwatywność 18S rRNA**

Dane na temat konserwatywności 18S rRNA uzyskałam z bazy danych sekwencji i struktur RNA *Comparative RNA Web Site* [22]. Stopień konserwatywności nukleotydów małej podjednostki rybosomalnej opracowany został na podstawie analizy 5591 sekwencji, w tym 4213 sekwencji bakteryjnych, 155 sekwencji archebakteryjnych i 1223 sekwencji eukariotycznych. Ze względu na brak struktury drugorzędowej 18S rRNA *L. luteus*, przy projektowaniu antysensowych oligomerów wykorzystałam strukturę drugorzędową *Glycine max* (struktura pobrana z [22], numer X02623). Spośród 16 gatunków roślin, których struktury drugorzędowe 18S rRNA zdeponowane są w bazie danych *Comparative RNA Web Site*, *G. max* jest najbardziej zbliżona filogenetycznie do *L. luteus*. Obie te rośliny należą do rodziny motylkowatych (*Leguminosae*). Pełną systematykę *G. max* i *L. luteus* przedstawiłam w Tabeli 4.



Domena	Eukaryota	Eukaryota
Królestwo	Viridiplantae	Viridiplantae
Nadgromada	Spermatophyta	Spermatophyta
Gromada	Magnoliophyta	Magnoliophyta
Podgromada	Magnoliophytina	Magnoliophytina
Klasa	Rosopsida	Rosopsida
Podklasa	Rosidae	Rosidae
Nadrząd	Fabanae	Fabanae
Rząd	Fabales	Fabales
Rodzina	Leguminosae	Leguminosae
Podrodzina	Papilionoideae	Glycinoideae
Plemię	Genisteae	Glycineae
Rodzaj	Lupinus	Glycine
Gatunek	Lupinus luteus	Glycine max

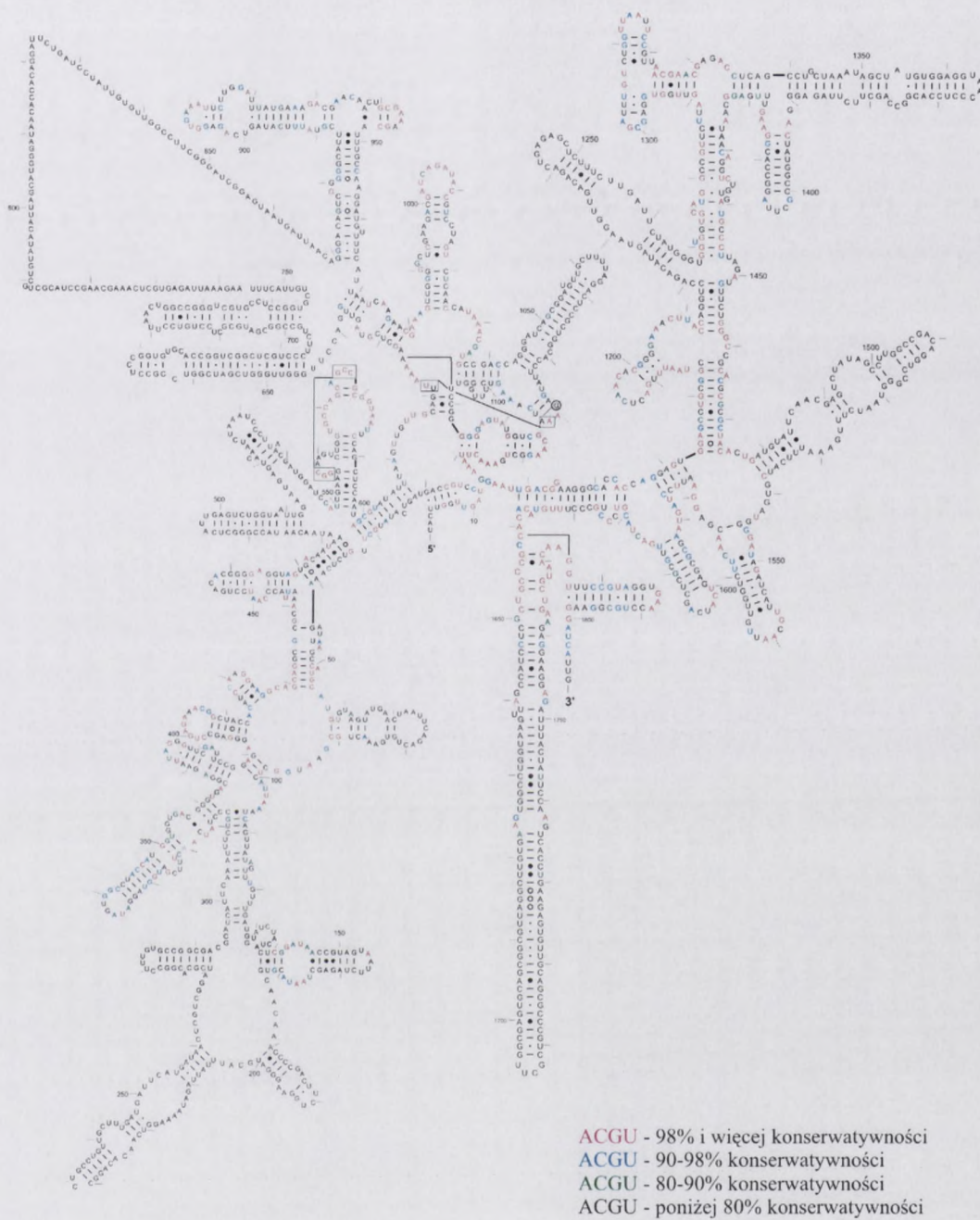
**Tabela 4.** Klasyfikacja taksonomiczna *Lupinus luteus* oraz *Glycine max* według systemu Reveala [243].

W celu otrzymania diagramu konserwatywności 18S rRNA, na strukturę II-rzędową 18S rRNA *G. max* naniosłam nukleotydy konserwatywne w trzech domenach organizmów żywych (*Archaea*, (*eu*)*Bacteria*, *Eucarya*; według [244]). Korzystałam z istniejącego diagramu konserwatywności 16S rRNA *E. coli* (struktura pobrana z [22], numer J01695). Wyróżniłam cztery zakresy konserwatywności nukleotydów 18S rRNA: poniżej 80%; 80-90%; 90-98% oraz 98% i więcej konserwatywności. Lokalizację nukleotydów konserwatywnych przedstawiłam w strukturze II-rzędowej 18S rRNA *Glycine max* oraz III-rzędowej 16S rRNA *Thermus thermophilus* na Rysunkach 38 i 39 (struktury pobrane odpowiednio z [22], numer X02623 oraz [23], numer 1FKA). Zachowawczość nukleotydów w strukturze III-rzędowej opracowałam przy użyciu programu UCSF Chimera package uzyskanego z Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco [245].

1	1980	100	100
2	1981	100	100
3	1982	100	100
4	1983	100	100
5	1984	100	100
6	1985	100	100
7	1986	100	100
8	1987	100	100
9	1988	100	100
10	1989	100	100
11	1990	100	100
12	1991	100	100
13	1992	100	100
14	1993	100	100
15	1994	100	100
16	1995	100	100
17	1996	100	100
18	1997	100	100
19	1998	100	100
20	1999	100	100
21	2000	100	100
22	2001	100	100
23	2002	100	100
24	2003	100	100
25	2004	100	100
26	2005	100	100
27	2006	100	100
28	2007	100	100
29	2008	100	100
30	2009	100	100
31	2010	100	100
32	2011	100	100
33	2012	100	100
34	2013	100	100
35	2014	100	100
36	2015	100	100
37	2016	100	100
38	2017	100	100
39	2018	100	100
40	2019	100	100
41	2020	100	100
42	2021	100	100
43	2022	100	100
44	2023	100	100
45	2024	100	100
46	2025	100	100
47	2026	100	100
48	2027	100	100
49	2028	100	100
50	2029	100	100
51	2030	100	100

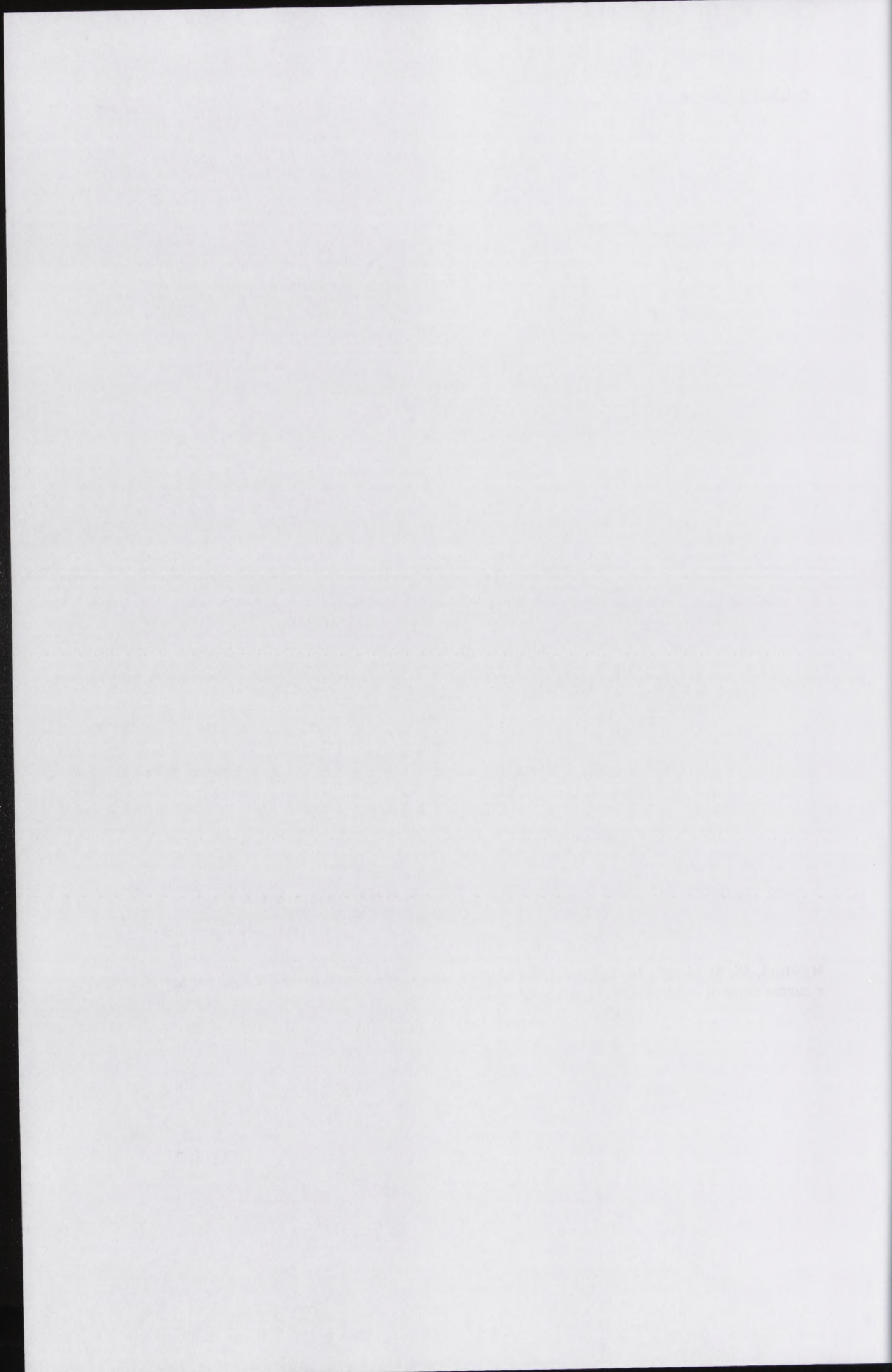
Table 1. Description of the data set.

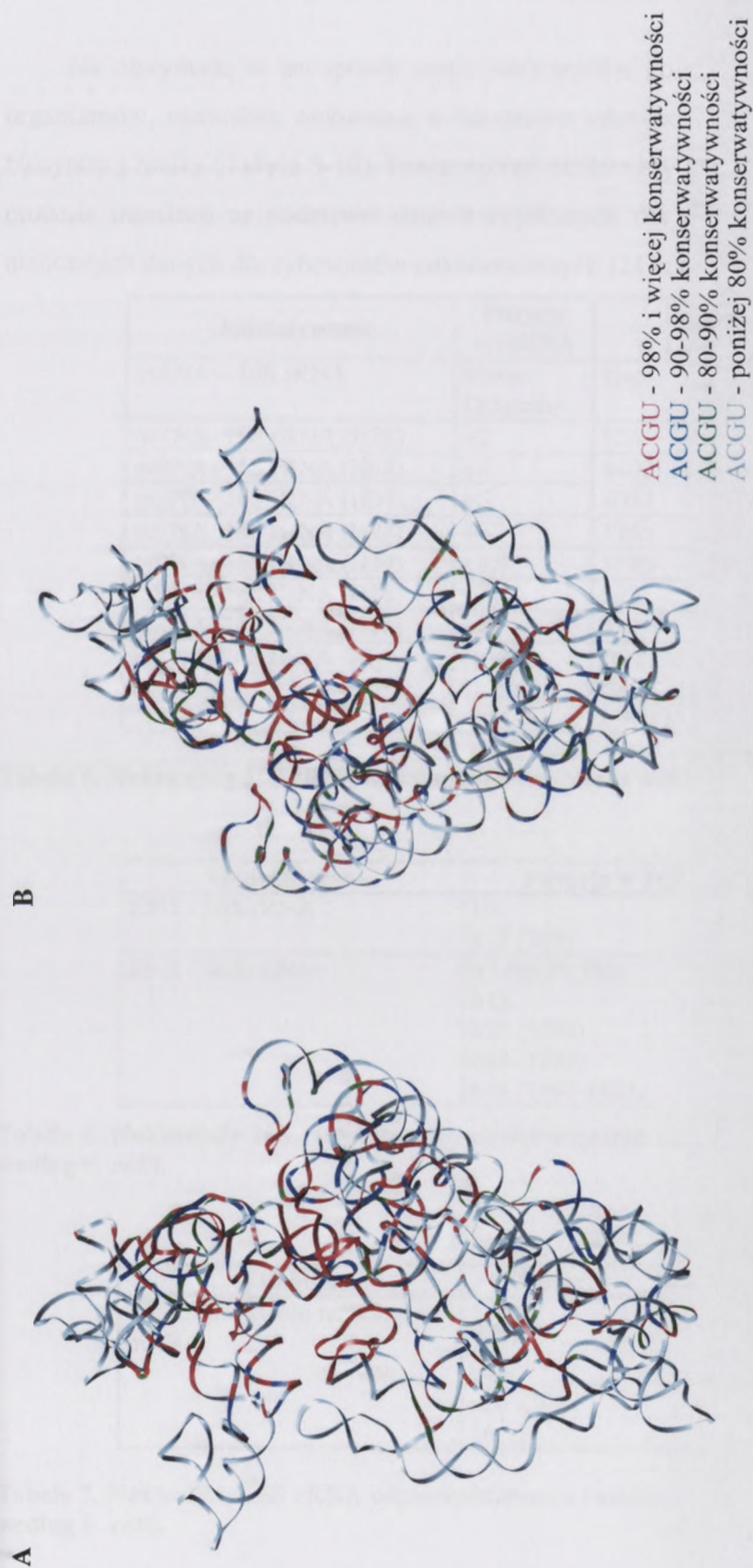
The data set consists of 50 years of observations from 1980 to 2029. The variables are: GDP (Gross Domestic Product), Inflation (Consumer Price Index), and Unemployment (Unemployment Rate). The data is presented in Table 1. The GDP variable shows a general upward trend over the period, with a significant dip in 2009. The Inflation variable shows a general upward trend, with a significant dip in 2009. The Unemployment variable shows a general upward trend, with a significant dip in 2009.



Rysunek 38. Struktura II-rzędowa 18S rRNA *G. max* (struktura pobrana z [22], numer X02623) z zaznaczonymi nukleotydami konserwatywnymi.



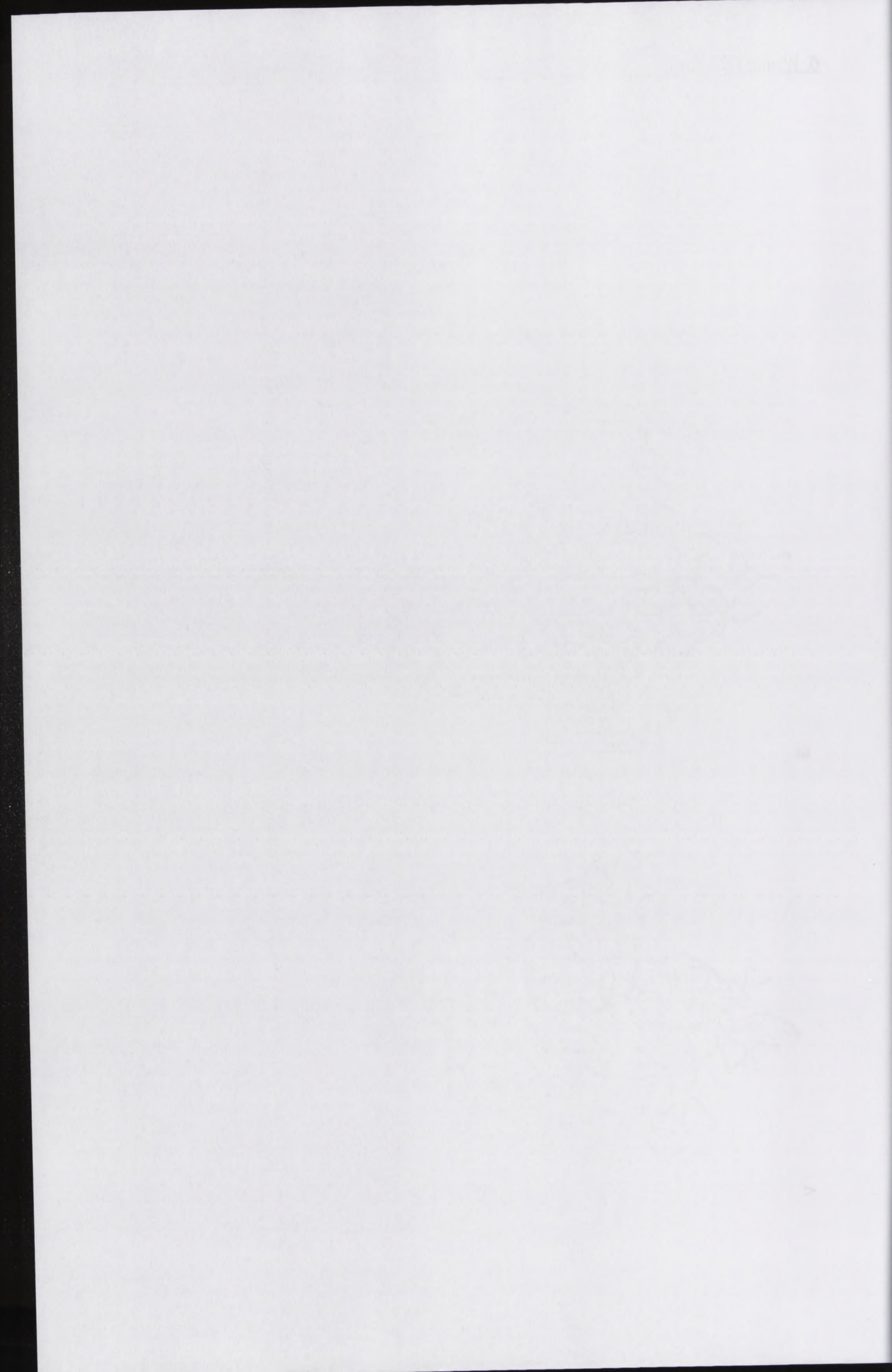




**Rysunek 39. Struktura III-rzędowa 16S rRNA *T. thermophilus* (struktura utworzona na podstawie [23], numer 1FKA) z zaznaczonymi nukleotydami konserwatywnymi.**

A – widok od strony oddziaływania podjednostek;

B – widok od strony zewnętrznej.



- **Miejsca funkcjonalnie ważne w biosyntezie białka w 16S rRNA**

Na otrzymaną w ten sposób mapę nukleotydów konserwatywnych w trzech domenach organizmów, naniosłam omówione w literaturze sekwencje ważne funkcjonalnie w procesie biosyntezy białka (Tabele 5-10). Poszczególne nukleotydy zostały zdefiniowane jako ważne w procesie translacji na podstawie danych uzyskanych dla rybosomów prokariotycznych jak i nielicznych danych dla rybosomów eukariotycznych [21] i prace tam cytowane].

Oddziaływanie	Pozycja w mRNA	Pozycja w 16S rRNA	Referencje
mRNA – 16S rRNA	Shine-Dalgarno	H45	[44]
mRNA- 16S rRNA (H28)	+2	926	[28]
mRNA- 16S rRNA (H44)	+4	1402	[27]
mRNA- 16S rRNA (H34)	+6	1052	[27]
mRNA- 16S rRNA (H28)	+7	1395	[27]
mRNA- 16S rRNA (H34)	+8,9	1196	[28]
mRNA- 16S rRNA (H18)	+11	532	[27]
mRNA- 16S rRNA (H18)	+12	530	[28]
mRNA- 16S rRNA	-1/-8	H22 (335) H43 (1360) H45 (1530)	[37]

Tabela 5. Nukleotydy 16S rRNA oddziałujące z cząsteczką mRNA (numeracja według *E. coli*).

Oddziaływanie	Pozycja w 16S rRNA	Referencje
EF-1 - 16S rRNA	h5 h15 (368)	[24]
EF-2 - 16S rRNA	h5 (bp 57:356) h13 h33 (1044) h34 (1208) h44 (1492-1493)	[15, 25]

Tabela 6. Nukleotydy 16S rRNA biorące udział w wiązaniu czynników elongacyjnych (numeracja według *E. coli*).

Funkcja	Pozycja w 16S rRNA	Referencje
Tworzenie tunelu wejścia mRNA	1360 1401 1196 h28 1397 16	[44]

Tabela 7. Nukleotydy 16S rRNA odpowiedzialne za tworzenie tunelu wejścia mRNA (numeracja według *E. coli*).

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records. It highlights the need for regular audits and the role of various departments in ensuring data integrity. The text emphasizes that without proper record-keeping, the organization's performance cannot be effectively monitored or improved.

In the second section, the author details the challenges faced by the organization in implementing new technologies. While digital tools offer significant advantages in terms of efficiency and data security, they also present a learning curve for staff. The document suggests that comprehensive training programs and ongoing support are essential for a successful transition to a digital-first environment.

The third part of the report focuses on the financial aspects of the organization's operations. It provides a detailed analysis of the budget, highlighting areas where costs can be reduced without compromising the quality of services. The author also discusses the importance of transparent financial reporting to stakeholders and the role of the board in overseeing the organization's fiscal health.

Finally, the document concludes with a series of recommendations for future action. These include the implementation of a new data management system, the expansion of employee training initiatives, and the establishment of a dedicated committee to oversee the organization's long-term strategic goals. The author expresses confidence that these steps will lead to a more resilient and successful organization.

Oddziaływanie	Pozycja w tRNA	Pozycja w 16S rRNA	Referencje	
Ramię antykodonowe tRNA – 16S rRNA (h30)	28-30	1229-12230	[2, 5, 9, 19, 40, 66, 179, 246]	
Pętla antykodonowa tRNA – 16S rRNA (h31)	34	966		
Pętla antykodonowa tRNA – 16S rRNA (h24)	39	790		
Ramię antykodonowe tRNA – 16S rRNA (h43)	40 40 41	1339 1339 1338		
Pętla antykodonowa tRNA – 16S rRNA	34	1400	[43, 179]	
Pętla antykodonowa tRNA – 16S rRNA	34	926 1498	[9, 179]	
Ramię akceptorowe tRNA – 16S rRNA (h45)	8	1531-1542	[247]	
Ramię DHU tRNA – 16S rRNA (h23)	20	694,711	[247]	
Ramię antykodonowe tRNA – 16S rRNA (h23)	32	693	[39]	
Ramię antykodonowe tRNA – 16S rRNA (h31)	32	957, 966	[39]	
Ramię antykodonowe tRNA – 16S rRNA (h44)	34	1400	[38]	
Ramię antykodonowe tRNA – 16S rRNA (h23)	47	686, 701,717	[38]	
Ramię antykodonowe tRNA – 16S rRNA (h29)	47	1345, 1348	[38]	
Ramię DHU tRNA – 16S rRNA (h44)	12	1923	[248]	
Ramię antykodonowe tRNA – 16S rRNA (h44)	34-35, 36	530	[2, 5, 19, 20, 30, 40, 42, 43, 179, 246, 249]	
Pętla antykodonowa tRNA – 16S rRNA (h44)	38 34	1493 1493		
Pętla antykodonowa tRNA – 16S rRNA (h44)	34	1492		
Ramię antykodonowe tRNA – 16S rRNA	40	955		
Ramię antykodonowe tRNA – 16S rRNA		1494	[250]	
Ramię akceptorowe/DHU tRNA – 16S rRNA (h23)	20:1	694,711	[247]	
Ramię antykodonowe tRNA – 16S rRNA (h43)	32	1378	[39]	
Pętla i ramię antykodonowe tRNA – 16S rRNA (h29)	35, 36 30	1339, 1340	[2, 5, 40, 43, 248]	
Pętla antykodonowa tRNA – 16S rRNA (h28)	34	1382		
Pętla antykodonowa tRNA – 16S rRNA	33	937		
Pętla antykodonowa tRNA – 16S rRNA	37-38	788-789		
Pętla antykodonowa tRNA – 16S rRNA	37 38-39	693 694-695		
Ramię antykodonowe tRNA – 16S rRNA (h23)	32	693		[39]
Ramię antykodonowe tRNA – 16S rRNA (h43)	32	1376, 1378		[39]
Pętla antykodonowa tRNA – 16S rRNA	37	1510-1542	[251]	

Tabela 8. Nukleotydy 16S rRNA biorące udział w wiązaniu tRNA w miejscach A, P i E (numeracja według *E. coli*).

Funkcja	Pozycja w 16S rRNA	Referencje
Tworzenie miejsc A i P w podjednostce 30S	1492-98	[30, 42]
	1402-1408	

Tabela 9. Nukleotydy 16S rRNA odpowiedzialne za tworzenie rybosomalnych miejsc A i P w podjednostce 30S (numeracja według *E. coli*).

Item No.	Description	Quantity	Unit	Rate	Total
1	...	...	...	...	...
2	...	...	...	...	...
3	...	...	...	...	...
4	...	...	...	...	...
5	...	...	...	...	...
6	...	...	...	...	...
7	...	...	...	...	...
8	...	...	...	...	...
9	...	...	...	...	...
10	...	...	...	...	...
11	...	...	...	...	...
12	...	...	...	...	...
13	...	...	...	...	...
14	...	...	...	...	...
15	...	...	...	...	...
16	...	...	...	...	...
17	...	...	...	...	...
18	...	...	...	...	...
19	...	...	...	...	...
20	...	...	...	...	...
21	...	...	...	...	...
22	...	...	...	...	...
23	...	...	...	...	...
24	...	...	...	...	...
25	...	...	...	...	...
26	...	...	...	...	...
27	...	...	...	...	...
28	...	...	...	...	...
29	...	...	...	...	...
30	...	...	...	...	...
31	...	...	...	...	...
32	...	...	...	...	...
33	...	...	...	...	...
34	...	...	...	...	...
35	...	...	...	...	...
36	...	...	...	...	...
37	...	...	...	...	...
38	...	...	...	...	...
39	...	...	...	...	...
40	...	...	...	...	...
41	...	...	...	...	...
42	...	...	...	...	...
43	...	...	...	...	...
44	...	...	...	...	...
45	...	...	...	...	...
46	...	...	...	...	...
47	...	...	...	...	...
48	...	...	...	...	...
49	...	...	...	...	...
50	...	...	...	...	...
51	...	...	...	...	...
52	...	...	...	...	...
53	...	...	...	...	...
54	...	...	...	...	...
55	...	...	...	...	...
56	...	...	...	...	...
57	...	...	...	...	...
58	...	...	...	...	...
59	...	...	...	...	...
60	...	...	...	...	...
61	...	...	...	...	...
62	...	...	...	...	...
63	...	...	...	...	...
64	...	...	...	...	...
65	...	...	...	...	...
66	...	...	...	...	...
67	...	...	...	...	...
68	...	...	...	...	...
69	...	...	...	...	...
70	...	...	...	...	...
71	...	...	...	...	...
72	...	...	...	...	...
73	...	...	...	...	...
74	...	...	...	...	...
75	...	...	...	...	...
76	...	...	...	...	...
77	...	...	...	...	...
78	...	...	...	...	...
79	...	...	...	...	...
80	...	...	...	...	...
81	...	...	...	...	...
82	...	...	...	...	...
83	...	...	...	...	...
84	...	...	...	...	...
85	...	...	...	...	...
86	...	...	...	...	...
87	...	...	...	...	...
88	...	...	...	...	...
89	...	...	...	...	...
90	...	...	...	...	...
91	...	...	...	...	...
92	...	...	...	...	...
93	...	...	...	...	...
94	...	...	...	...	...
95	...	...	...	...	...
96	...	...	...	...	...
97	...	...	...	...	...
98	...	...	...	...	...
99	...	...	...	...	...
100	...	...	...	...	...

Total

...

...

RNA-RNA	16S rRNA	Pozycja w 16S rRNA	23S rRNA	Pozycja w 23S rRNA
eB2a	H44	1408/1493	H69	1910-1920
eB2b	H24 H45	784/800 1515	H68	1847 1939-1941
eB2c	H27 H24	899 771	H62 H67	1693 1832
eB2d	H23	698-703	H68	1848/1895
eB3	H44	1418/1482	H71	1948/1960
eB4	H11 H20	247 580/761	H34 H34 H34	711/720 716 716
eB5b	H44	1428/1472	H62	1689/1704
eB10	H11	272	H63 H101	1713/1747
eB11	H9	187	H101	Sekwencja wstawiona
RNA-białko	16S rRNA	Pozycja w 16S rRNA	Białko	Pozycja w białku
eB2e	H22 H23	671 712/713	L43 L2	C-koniec 136
eB5a	H44	1422	L23	
eB6	H14	343	L23	132
eB7	H44	1446	L24	47

Tabela 10. Nukleotydy 16S rRNA tworzące mostki 16S rRNA- 23S rRNA oraz 16S rRNA –białko (numeracja według *E. coli*) [5, 9, 20].

Nukleotydy 18S rRNA biorące udział w procesie biosyntezy białka, charakteryzujące się wysoką zachowawczością ewolucyjną, zebrałam na Rysunkach 40-43. Przygotowane w ten sposób analizy zachowawczości poszczególnych nukleotydów RNA małej podjednostki rybosomalnej biorących udział w biosyntezie białka, posłużyły mi w dalszej części pracy do zaprojektowania antysensownych oligonukleotydów celem zbadania korelacji struktury i funkcji rybosomu eukariotycznego.



1/2  
1/2

1/2  
1/2

1/2  
1/2

1/2  
1/2

1/2  
1/2

1/2  
1/2

1/2  
1/2

1/2  
1/2

1/2  
1/2

1/2  
1/2

1/2  
1/2

1/2  
1/2

1/2  
1/2

1/2  
1/2

1/2  
1/2

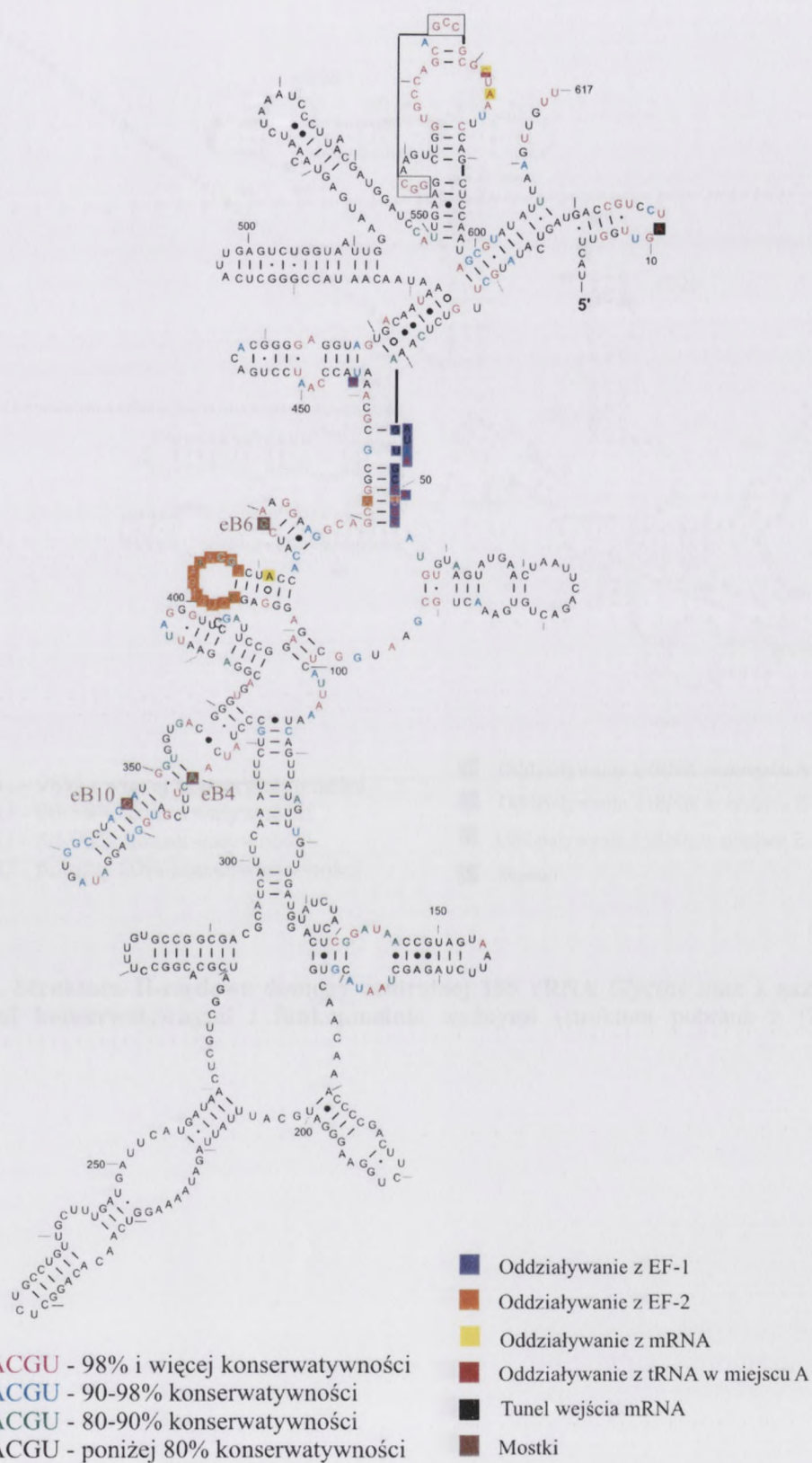
1/2  
1/2

1/2  
1/2

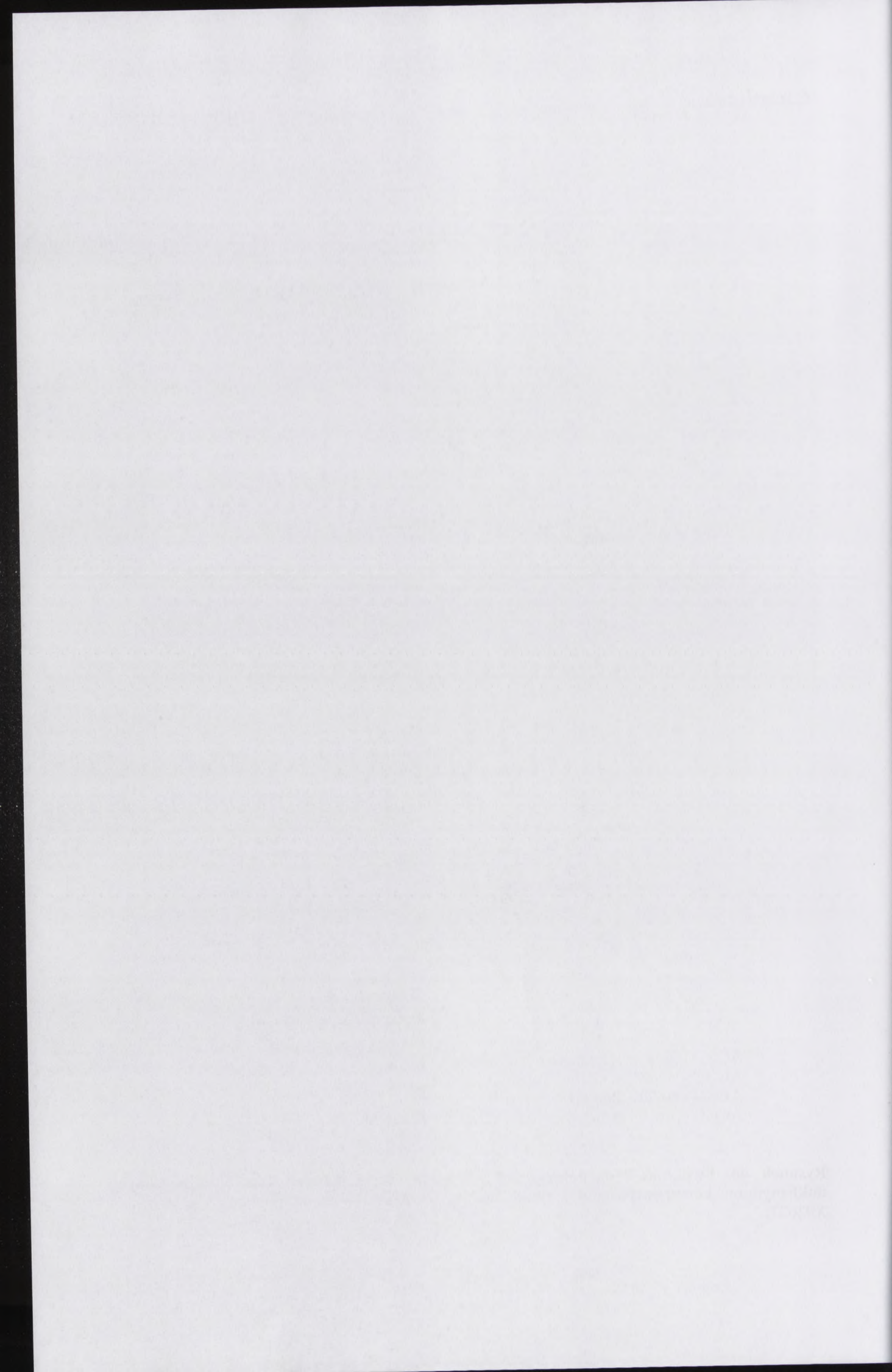
1/2  
1/2

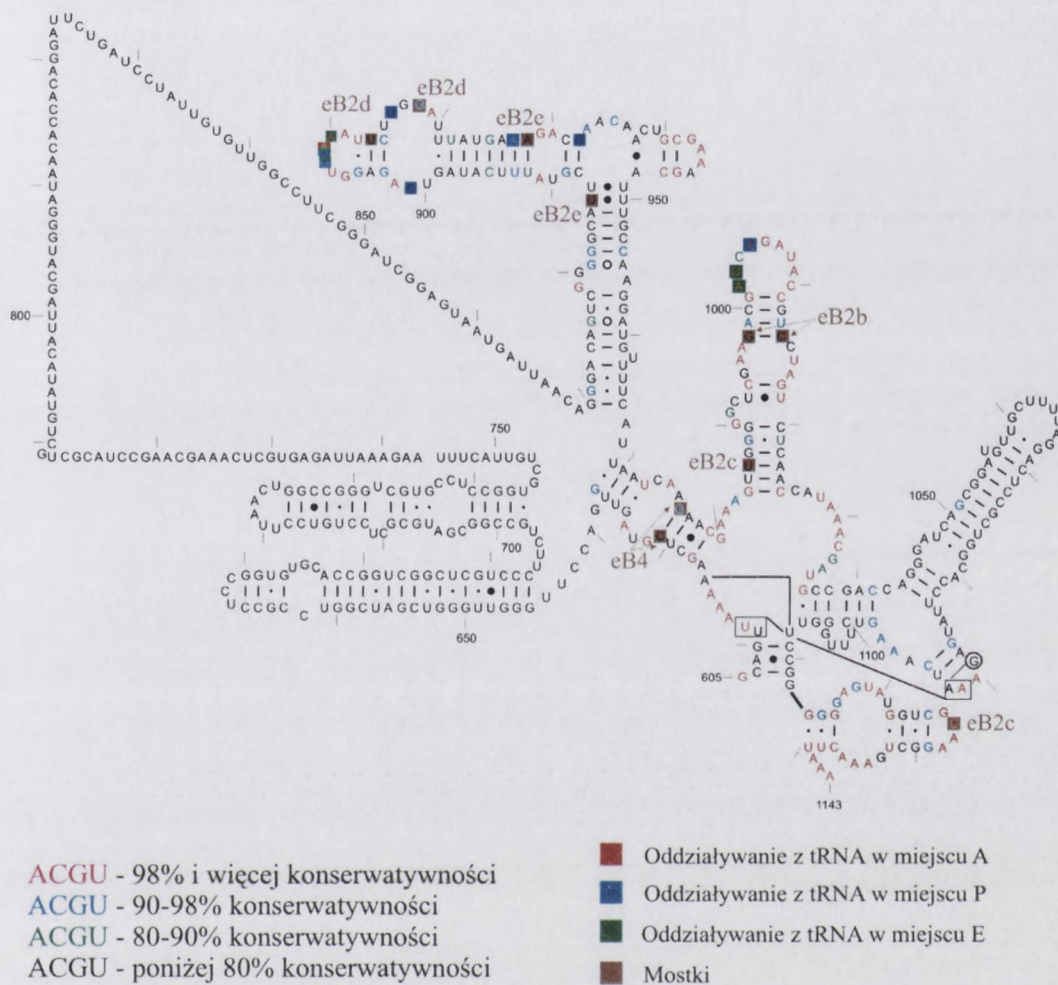
1/2  
1/2

1/2  
1/2

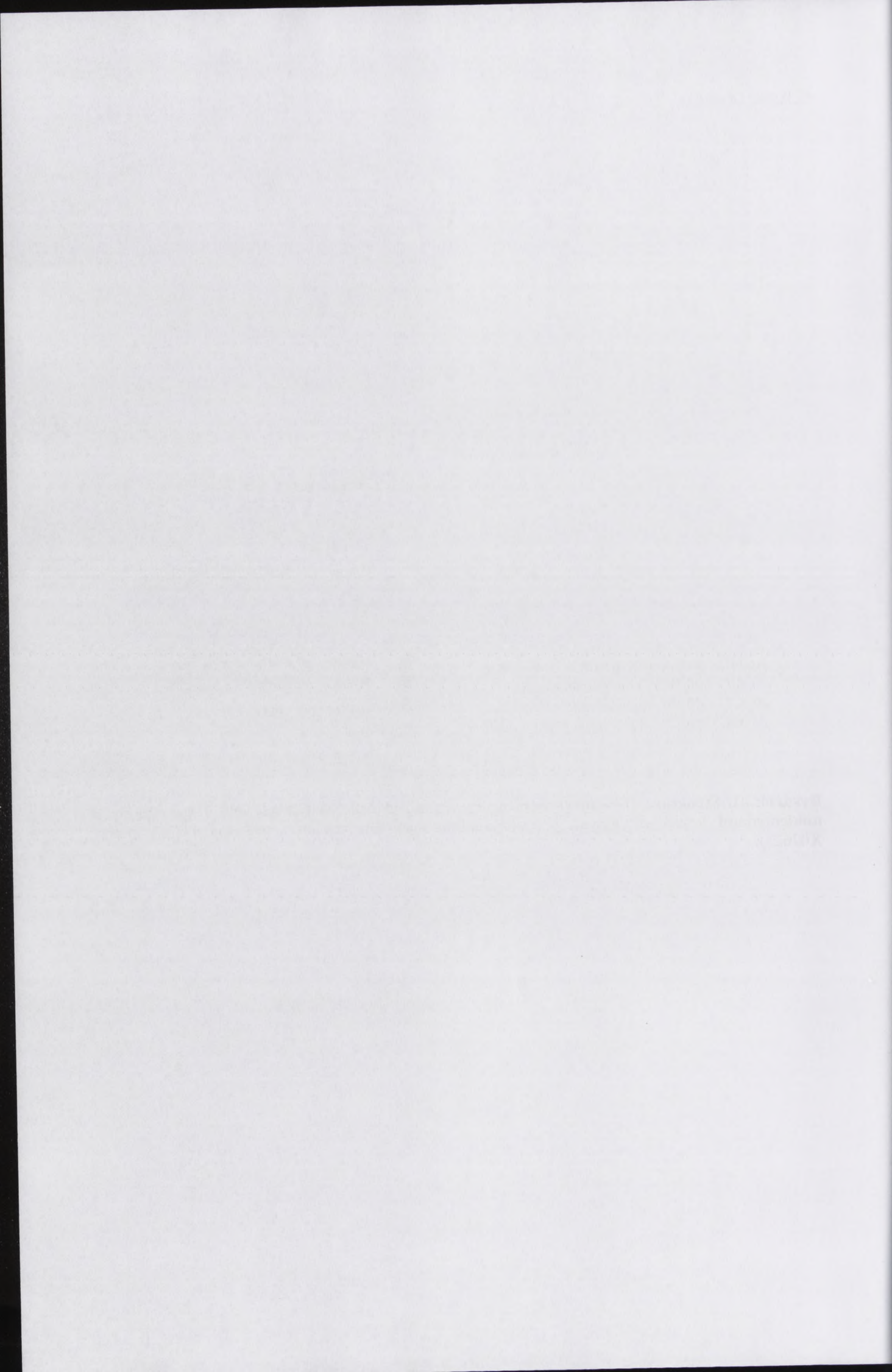


Rysunek 40. Struktura II-rzędowa domeny 5' 18S rRNA *Glycine max* z zaznaczonymi nukleotydami konserwatywnymi i funkcjonalnie ważnymi (struktura pobrana z [22], numer X02623).



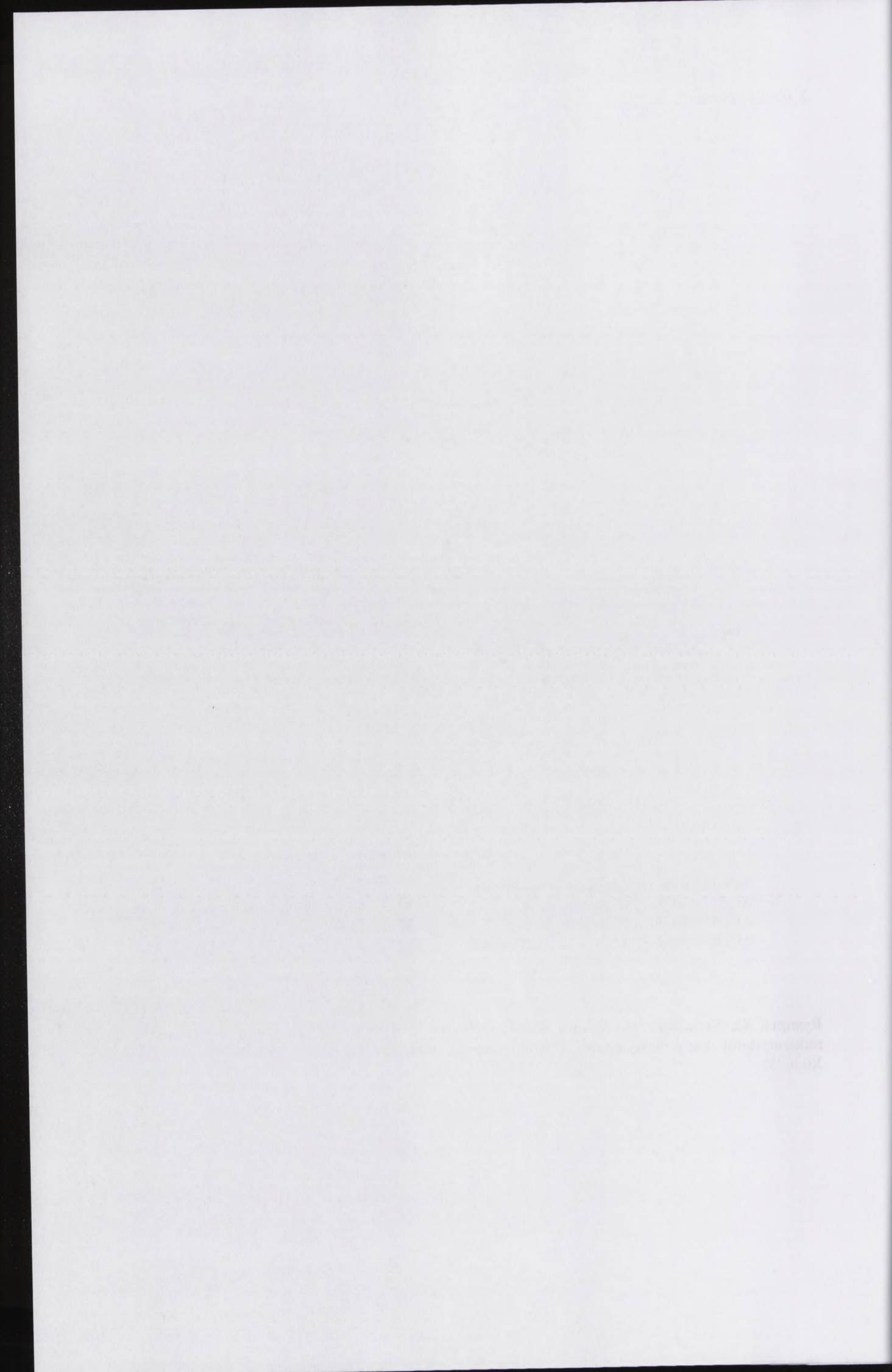


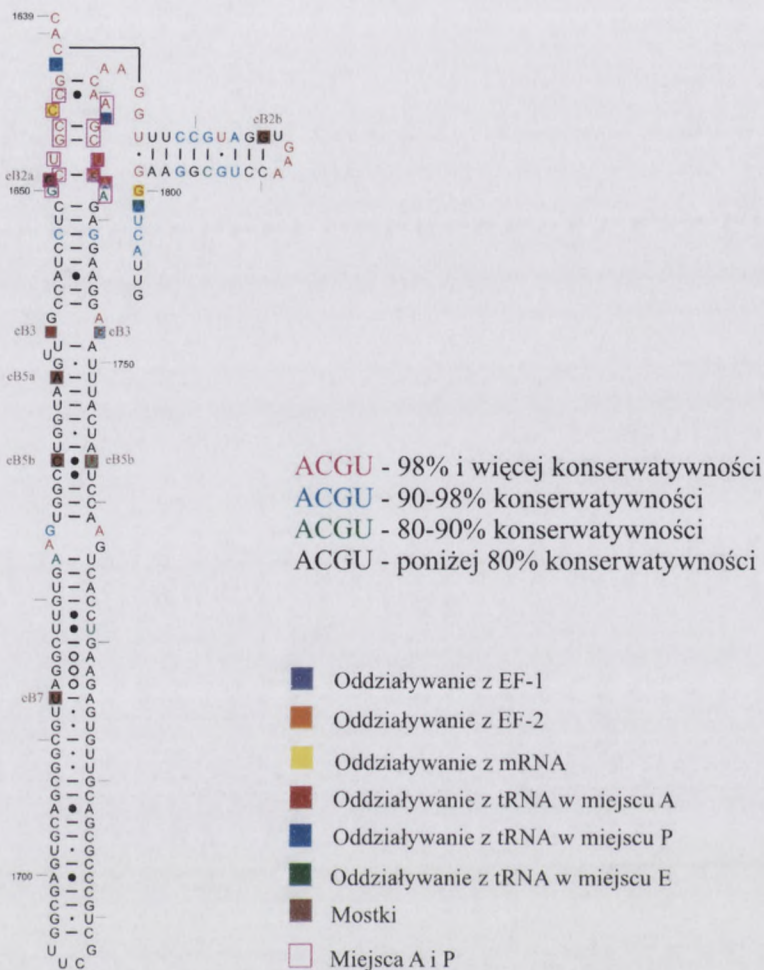
Rysunek 41. Struktura II-rzędowa domeny centralnej 18S rRNA *Glycine max* z zaznaczonymi nukleotydami konserwatywnymi i funkcjonalnie ważnymi (struktura pobrana z [22], numer X02623).





Rysunek 42. Struktura II-rzędowa domeny 3'major 18S rRNA *Glycine max* z zaznaczonymi nukleotydami konserwatywnymi i funkcjonalnie ważnymi (struktura pobrana z [22], numer X02623).

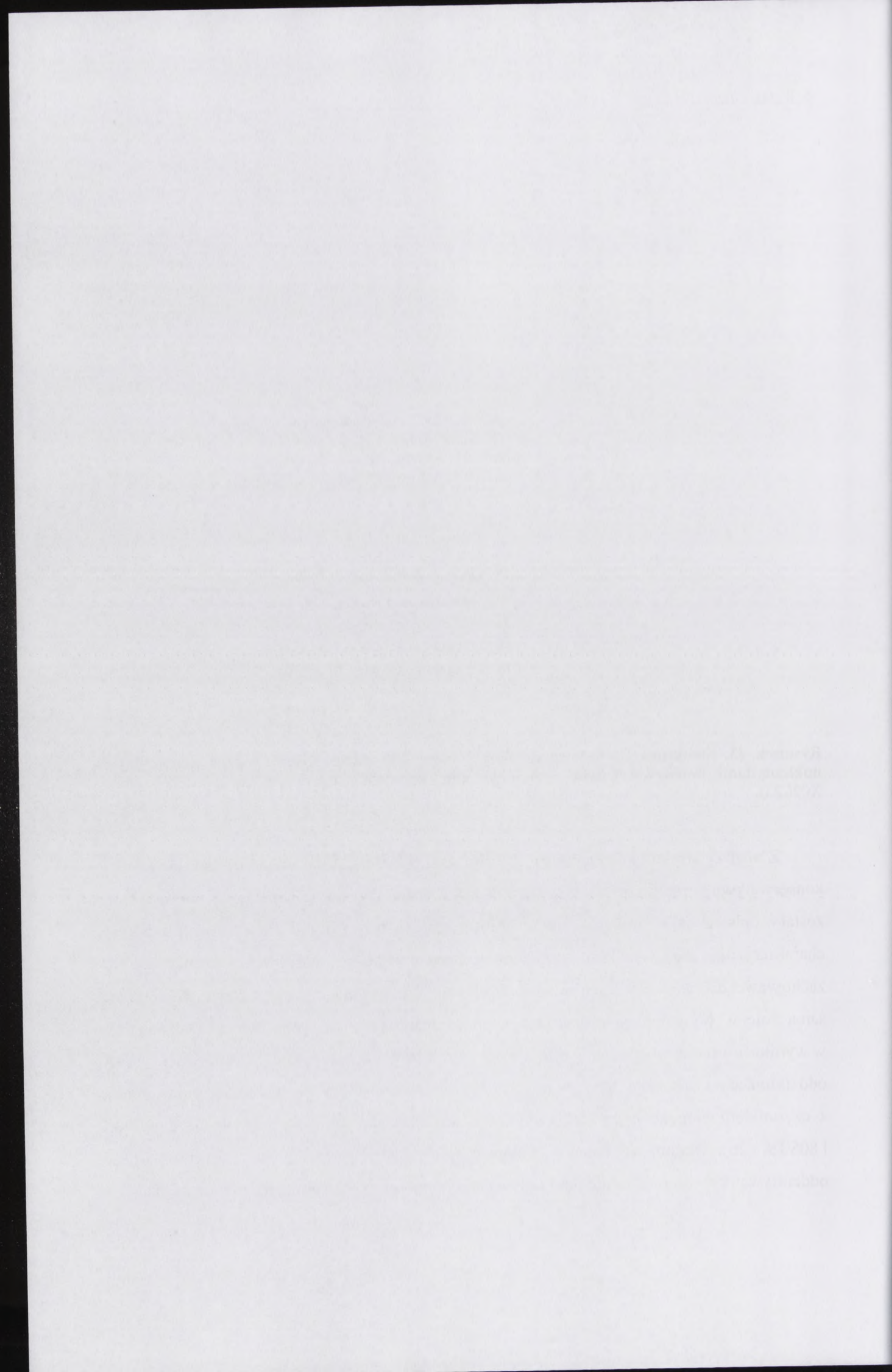




Rysunek 43. Struktura II-rzędowa domeny 3' minor 18S rRNA *Glycine max* z zaznaczonymi nukleotydami konserwatywnymi i funkcjonalnie ważnymi (struktura pobrana z [22], numer X02623).

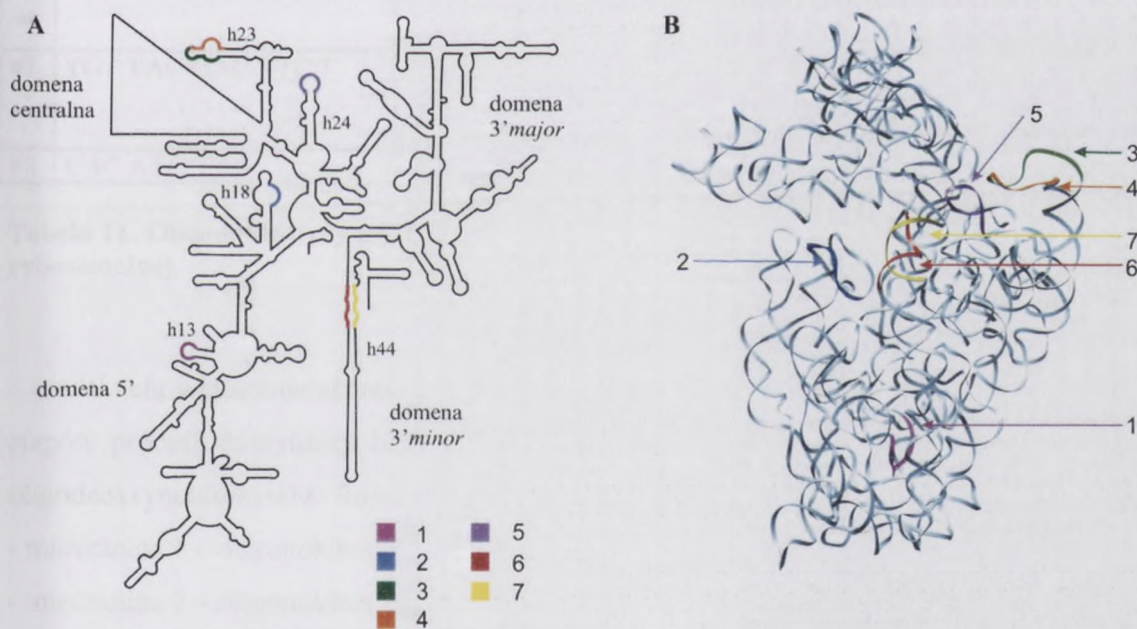
Z analizy struktury II-rzędowej 18S rRNA *G. max*, na której uwidoczniałam nukleotydy konserwatywne oraz ważne w procesie translacji, można wyciągnąć wniosek, iż miejsca, które zostały opisane jako funkcjonalne w biosyn-tezie białka u organizmów prokariotycznych charakteryzują się wysokim stopniem konserwatywności. Założyłam zatem, że ich zachowawczość we wszystkich domenach organizmów żywych świadczy o tym, że pełnią tę samą rolę w organizmach prokariotycznych i eukariotycznych. Teza ta ma silne poparcie w wynikach prac z rybosomami eukariotycznymi. Spahn zaobserwował, że nukleotydy rRNA oddziałujące z częścią tRNA w miejscu P, tworzące mostki rybosomalne oraz oddziałujące z czynnikiem elongacyjnym EF2, występują w takich samych pozycjach w układach 70S i 80S [9, 26]. Natomiast badania Phelps'a dostarczyły dowodów na konserwatywność oddziaływań rybosomu z ramieniem i pętlą anty-kodonową tRNA zajmującego miejsce A.





### • Charakterystyka antysensownych oligonukleotydów

Na podstawie danych dotyczących konserwatywności oraz funkcji poszczególnych nukleotydów 18S rRNA w procesie biosyntezy białka, zaprojektowałam serię 7 antysensownych oligodeoksyrybonukleotydów, komplementarnych do specyficznych miejsc rRNA małej podjednostki rybosomalnej. Lokalizację wybranych przeze mnie sekwencji w 18S rRNA, do których zaprojektowałam komplementarne oligonukleotydy (Rysunek 44) przedstawiłam na schemacie struktury II-rzędowej 18S rRNA *G. max* oraz w strukturze III-rzędowej 16S rRNA *T. thermophilus* (struktury pobrane odpowiednio z [22], numer X02623 oraz [23], numer 1FKA). Charakterystykę stosowanych oligonukleotydów przedstawia Tabela 11.



**Rysunek 44. Pozycja badanych miejsc, ważnych w procesie translacji (numery odnoszą się do numerów komplementarnych a-DNA).**

A – struktura II-rzędowa 18S rRNA *G. max*

B – struktura III-rzędowa 16S rRNA *T. thermophilus*, widok od strony oddziaływania podjednostek.

### Charakterystyka anizymowych oligonukleotydów

Na podstawie danych dotyczących kombinacyjności oraz funkcji porównawczych sekwencji 16S rRNA w procesie biogeny i jej A zaprezentowano w Tabeli 1 zestawienie oligonukleotydów, komplementarnych do sekwencji 16S rRNA, do podjednostki cytotoplazmatycznej. Lokalizację wyznaczonych sekwencji w 16S rRNA, do których odwołano się w tekście, przedstawiono w rysunku 4 (rysunek 4) przedstawiono sekwencje sekwencji 16S rRNA (5' oraz 3' w sekwencji III-rzędowej) 16S rRNA. Tabela 1 przedstawia sekwencje oligonukleotydów (23), numer 202523 oraz (23), numer 202523 (23). Charakterystyka anizymowych oligonukleotydów przedstawiona w Tabeli 1.



Rysunek 4. Budowa trójwymiarowa cząsteczki 16S rRNA w procesie biogeny i jej A zaprezentowano w Tabeli 1 zestawienie oligonukleotydów, komplementarnych do sekwencji 16S rRNA, do podjednostki cytotoplazmatycznej. Lokalizację wyznaczonych sekwencji w 16S rRNA, do których odwołano się w tekście, przedstawiono w rysunku 4 (rysunek 4) przedstawiono sekwencje sekwencji 16S rRNA (5' oraz 3' w sekwencji III-rzędowej) 16S rRNA. Tabela 1 przedstawia sekwencje oligonukleotydów (23), numer 202523 oraz (23), numer 202523 (23). Charakterystyka anizymowych oligonukleotydów przedstawiona w Tabeli 1.

Nr	Sekwencja a-DNA [5'-3']	Miejsca oddziaływania sekwencji docelowej 18S rRNA z czynnikami biorącymi udział w translacji	Pozycja sekwencji docelowej w 18S rRNA ( <i>G. max</i> )
#1	GCC TTT CTC AGG	397-408 - EF-2	397-408 domena 5'
#2	CGT ATT ACC GC	581 - mRNA (+12) 581 - tRNA w miejscu A (34-36) 583 - mRNA (+11)	578-588 domena 5'
#3	TTT CAC CTC TGA	901 - tRNA w miejscu P (47) 908 - tRNA w miejscu P (32) i E (32, 37) 909 - tRNA w miejscu P i A (20:1) oraz E (38, 39) 910 - tRNA w miejscu E (38, 39)	899-901 domena centralna
#4	AAA TCC AAG AAT	913, 918 - H68 23S rRNA (mostek eB2d) 916 - tRNA w miejscu P (47)	911-922 domena centralna
#5	GGT ATC TGA TC	1002, 1003 - tRNA w miejscu E (37,38) 1005 - tRNA w miejscu P (39)	1001-1011 domena centralna
#6	AGC GAC GGG CGG	1642 - tRNA w miejscu P (34) 1645 - mRNA (+4) 1650 - H96 23S rRNA (mostek eB2a) 1643-1651 - tworzenie miejsc A i P	1641-1652 domena 3' <i>minor</i>
#7	TGT TAC GAC TTC T	1762-1764 - tRNA w miejscu A (34, 38) 1768 - tRNA w miejscu P (34) 1762-1768 - tworzenie miejsc A i P	1760-1772 domena 3' <i>minor</i>
#8	CAC ATG TTA	KONTROLA	----

Tabela 11. Oligonukleotydy antysensowe do badań zmian konformacyjnych małej podjednostki rybosomalnej.

W celu wykazania skorelowanych zmian konformacyjnych rybosomu podczas kolejnych etapów procesu biosyntezy białka zaprojektowałam kompozycje złożone z dwóch różnych oligodeoksynukleotydów. Stosowałam następujące mieszaniny oligonukleotydów:

- mieszanina 1 – oligonukleotydy #1 oraz #4;
- mieszanina 2 – oligonukleotydy #3 oraz #5;
- mieszanina 3 – oligonukleotydy #6 oraz #7.

- **Specyficzność oddziaływań antysensowych oligonukleotydów z rybosomem**

W celu wyłowienia oligodeoksynukleotydów specyficznych względem tylko jednej sekwencji docelowej w 18S rRNA, przeprowadziłam kompletną i szczegółową analizę innych fragmentów częściowo komplementarnych do testowanych a-DNA. Potencjalne miejsca wiązania a-DNA zostały zidentyfikowane z użyciem programu BLAST-N [252]. Dodatkowe

№	Sequences	Miejsca oddziaływania związany z oddziaływaniem z czynnikiem biologicznym w transkrypcji	Typyła sekwencji w 15S rRNA (G. max)
81	GCCTT CTC AGG	191-192 - 193	397-408 domena 2'
82	GCT ATT ACC GC	191 - 192A (41) 191 - 192A w sekwencji A (34-36) 191 - 192A (41)	378-388 domena 2'
83	TTC GAC CTC TBA	191 - 192A w sekwencji P (47) 191 - 192A w sekwencji P (32) E (31, 37) 191 - 192A w sekwencji P - A (201) oraz E (38, 39) 191 - 192A w sekwencji E (38, 39)	499-501 domena centralna
84	AAA TCC AAG AAT	191 - 192 - 193 192 rRNA (pozycja 425) 191 - 192A w sekwencji P (47)	911-922 domena centralna
85	GCT ATC TGA TC	191 - 192 - 193 - 192A w sekwencji E (37, 38) 191 - 192A w sekwencji P (39)	1001-1011 domena centralna
86	AAC GAC GGG GGG	191 - 192A w sekwencji P (38) 191 - 192A (44) 191 - 192 192 rRNA (pozycja 425) 191 - 192 192 rRNA w sekwencji A 1 P	1041-1052 domena 3' końca
87	TGT TAC GAC TTT T	191 - 192 - 193 - 192A w sekwencji A (44, 38) 191 - 192A w sekwencji P (39) 191 - 192 - 193 - 192A w sekwencji A 1 P	1189-1192 domena 3' końca
88	CONTROL	CONTROL	

Tabela 11. Oligonukleotydy używane do badań zainicjowanych transkrypcji w 15S rRNA.

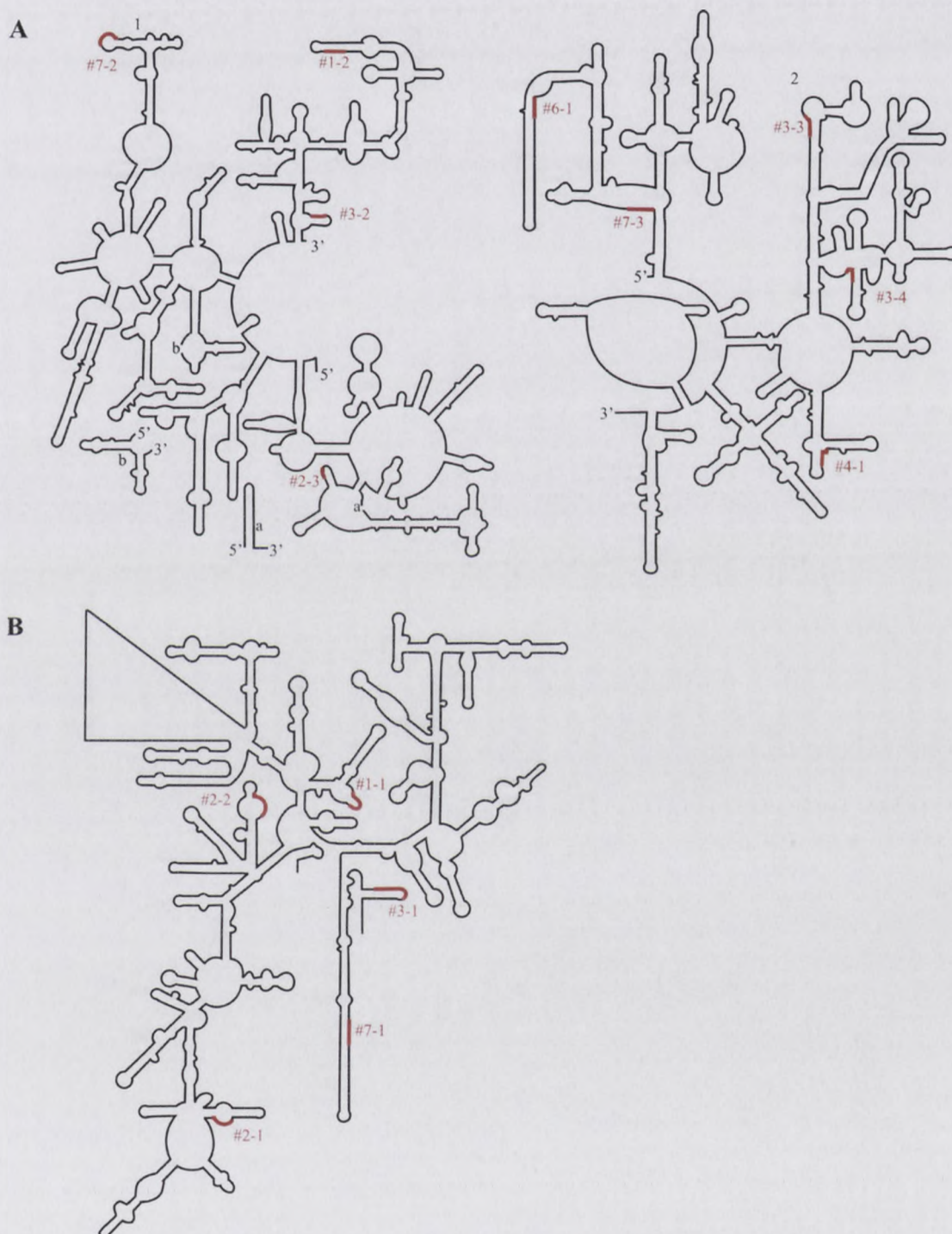
W celu wyznaczenia skuteczności transkrypcji w 15S rRNA podano podane poniżej dane. Wyniki przedstawiono w tabeli 11. Wyniki przedstawiono w tabeli 11. Wyniki przedstawiono w tabeli 11.

- mikroskładnik 1 - oligonukleotydy 81 oraz 82;
- mikroskładnik 2 - oligonukleotydy 83 oraz 85;
- mikroskładnik 3 - oligonukleotydy 86 oraz 87.

\* Specyficzność oddziaływań zainicjowanych oligonukleotydów z 15S rRNA

W celu wyznaczenia skuteczności transkrypcji w 15S rRNA podano podane poniżej dane. Wyniki przedstawiono w tabeli 11. Wyniki przedstawiono w tabeli 11. Wyniki przedstawiono w tabeli 11.

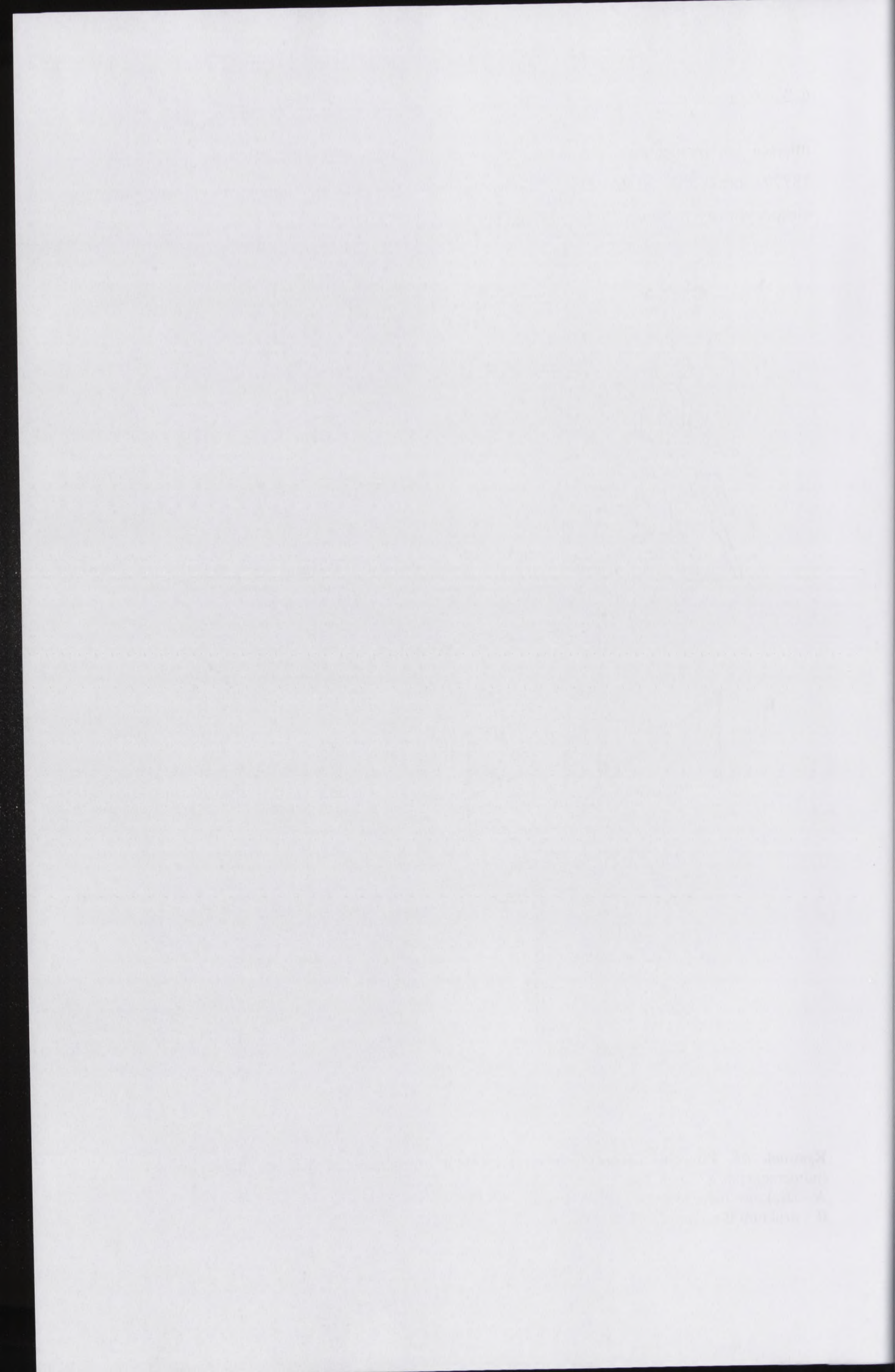
miejsca komplementarne wyszukiwałam w obrębie sekwencji 18S rRNA *G. max* (numer 18729) oraz 26S rRNA *Oryza sativa* (numer 169818). Wyłoniłam 14 potencjalnych niespecyficznych sekwencji docelowych dla 7 badanych a-DNA (Rysunek 45).



**Rysunek 45. Pozycja niespecyficznych sekwencji komplementarnych do badanych a-DNA.** (numeracja jak w Tabeli 12).

A – struktura II-rzędowa 26S rRNA *O. sativa*,

B - struktura II-rzędowa 18S rRNA *G. max*.



W celu zweryfikowania możliwości przyłączania badanych oligonukleotydów do wyłonionych potencjalnych niespecyficzných miejsc, obliczyłam wartości energii swobodnej ( $\Delta G$ ) dupleksów RNA/DNA oraz stosunek  $\Delta G_{\text{nonspec}}/\Delta G_{\text{spec}}$ .

Nr	Sekwencja	Pozycja w 18S rRNA <i>G. max</i>	Pozycja w 26S rRNA <i>O. sativa</i>	$\Delta G$ (kcal)	$\Delta G_{\text{nonspec}}/\Delta G_{\text{spec}}$
#1	<b>CCU GAG AAA CGG</b>	<b>397-408</b>	---	<b>-12.4</b>	---
#1-1	U GAG AAA U	1086-1093	---	-5.0	0.40
#1-2	G AAA CGG	---	1705-1711	-6.2	0.50
#2	<b>GCG GUA AUA CG</b>	<b>578-588</b>	---	<b>-11.1</b>	---
#2-1	UA AUA CG	171-165	---	-9.0	0.81
#2-2	GCG GUA AU	578-585	---	-3.8	0.34
#2-3	GCG GUA A	---	300-306	-7.0	0.63
#3	<b>UCA GAG GUG AAA</b>	<b>899-901</b>	---	<b>-10.5</b>	---
#3-1	AG GUG AA	1780-1789	---	-6.9	0.65
#3-2	AG GUG AA	---	1852-1858	-6.9	0.65
#3-3	A GAG GUG	---	2434-3440	-7.9	0.75
#3-4	A GAG GUG	---	2781-2787	-7.9	0.75
#4	<b>AUU CUU GGA UUU</b>	<b>911-922</b>	---	<b>-10.4</b>	---
#4-1	UU GGA UU	---	2906-2912	-5.0	0.48
#5	<b>GAU CAG AUA CC</b>	<b>1001-1011</b>	---	<b>-8.1</b>	---
#6	<b>CCG CCC GUC GCU</b>	<b>1641-1652</b>	---	<b>-15.1</b>	---
#6-1	CCC GUC G	---	1968-1974	-6.7	0.44
#7	<b>AGA AGU CGU AAC A</b>	<b>1760-1772</b>	---	<b>-11.9</b>	---
#7-1	AGA AGU C	1726-1732	---	-5.9	0.49
#7-2	GA AGU CG	---	1244-1250	-5.7	0.47
#7-3	GA AGU CG	---	1892-1898	-5.7	0.47
#8	<b>CAC ATG TTA</b>	---	---	---	---

**Tabela 12. Specyficzność interakcji a-DNA – rybosom.**

Kolorem czerwonym zaznaczono specyficzne sekwencje docelowe dla a-DNA, kolorem czarnym – niespecyficzne sekwencje (numeracja jak na Rysunku 45).  $\Delta G$  obliczono według [242].

Rezultaty opisanych analiz wskazują, że jedynie oligonukleotyd #5 nie posiada innych potencjalnych miejsc hybrydyzacji niż wybrana przeze mnie sekwencja docelowa w 18S rRNA. Oligonukleotyd #8 nie posiada żadnych miejsc komplementarnych, nawet częściowo, zarówno w 18S rRNA jak i 26S rRNA. Został on zaprojektowany jako kontrola testów biologicznych. Oligonukleotyd #1 może potencjalnie hybrydyzować do jednej niespecyficznej sekwencji w rRNA małej podjednostki (#1-1) oraz do jednej w 26S rRNA (#1-2). Jednak zgodnie z niską wartością  $\Delta G_{\text{nonspec}}/\Delta G_{\text{spec}}$  (odpowiednio, 0.40 i 0.50) oraz lokalizacją tej sekwencji w rejonie dwuniciowym (sekwencja #1-1, Rysunek 49) lub w przeważającej części dwuniciowym (sekwencja #1-2), zakładam, że warunki te nie są



1. *...*  
 2. *...*  
 3. *...*  
 4. *...*  
 5. *...*  
 6. *...*  
 7. *...*  
 8. *...*  
 9. *...*  
 10. *...*  
 11. *...*  
 12. *...*  
 13. *...*  
 14. *...*  
 15. *...*  
 16. *...*  
 17. *...*  
 18. *...*  
 19. *...*  
 20. *...*  
 21. *...*  
 22. *...*  
 23. *...*  
 24. *...*  
 25. *...*  
 26. *...*  
 27. *...*  
 28. *...*  
 29. *...*  
 30. *...*  
 31. *...*  
 32. *...*  
 33. *...*  
 34. *...*  
 35. *...*  
 36. *...*  
 37. *...*  
 38. *...*  
 39. *...*  
 40. *...*  
 41. *...*  
 42. *...*  
 43. *...*  
 44. *...*  
 45. *...*  
 46. *...*  
 47. *...*  
 48. *...*  
 49. *...*  
 50. *...*  
 51. *...*  
 52. *...*  
 53. *...*  
 54. *...*  
 55. *...*  
 56. *...*  
 57. *...*  
 58. *...*  
 59. *...*  
 60. *...*  
 61. *...*  
 62. *...*  
 63. *...*  
 64. *...*  
 65. *...*  
 66. *...*  
 67. *...*  
 68. *...*  
 69. *...*  
 70. *...*  
 71. *...*  
 72. *...*  
 73. *...*  
 74. *...*  
 75. *...*  
 76. *...*  
 77. *...*  
 78. *...*  
 79. *...*  
 80. *...*  
 81. *...*  
 82. *...*  
 83. *...*  
 84. *...*  
 85. *...*  
 86. *...*  
 87. *...*  
 88. *...*  
 89. *...*  
 90. *...*  
 91. *...*  
 92. *...*  
 93. *...*  
 94. *...*  
 95. *...*  
 96. *...*  
 97. *...*  
 98. *...*  
 99. *...*  
 100. *...*

101. *...*  
 102. *...*  
 103. *...*  
 104. *...*  
 105. *...*  
 106. *...*  
 107. *...*  
 108. *...*  
 109. *...*  
 110. *...*  
 111. *...*  
 112. *...*  
 113. *...*  
 114. *...*  
 115. *...*  
 116. *...*  
 117. *...*  
 118. *...*  
 119. *...*  
 120. *...*  
 121. *...*  
 122. *...*  
 123. *...*  
 124. *...*  
 125. *...*  
 126. *...*  
 127. *...*  
 128. *...*  
 129. *...*  
 130. *...*  
 131. *...*  
 132. *...*  
 133. *...*  
 134. *...*  
 135. *...*  
 136. *...*  
 137. *...*  
 138. *...*  
 139. *...*  
 140. *...*  
 141. *...*  
 142. *...*  
 143. *...*  
 144. *...*  
 145. *...*  
 146. *...*  
 147. *...*  
 148. *...*  
 149. *...*  
 150. *...*  
 151. *...*  
 152. *...*  
 153. *...*  
 154. *...*  
 155. *...*  
 156. *...*  
 157. *...*  
 158. *...*  
 159. *...*  
 160. *...*  
 161. *...*  
 162. *...*  
 163. *...*  
 164. *...*  
 165. *...*  
 166. *...*  
 167. *...*  
 168. *...*  
 169. *...*  
 170. *...*  
 171. *...*  
 172. *...*  
 173. *...*  
 174. *...*  
 175. *...*  
 176. *...*  
 177. *...*  
 178. *...*  
 179. *...*  
 180. *...*  
 181. *...*  
 182. *...*  
 183. *...*  
 184. *...*  
 185. *...*  
 186. *...*  
 187. *...*  
 188. *...*  
 189. *...*  
 190. *...*  
 191. *...*  
 192. *...*  
 193. *...*  
 194. *...*  
 195. *...*  
 196. *...*  
 197. *...*  
 198. *...*  
 199. *...*  
 200. *...*

wystarczające do utworzenia stabilnego kompleksu. Podobne konkluzje wyciągnęłam dla dodatkowych miejsc komplementarnych dla oligonukleotydów: #2 (target #2-3), #3 (targety #3-1 oraz #3-2), #4 (target #4-1), #6 (target #6-1) oraz #7 (target #7-1). Sekwencje dodatkowe #3-3 i #3-4, do której może potencjalnie hybrydyzować oligonukleotyd #3 charakteryzują się względnie wysoką wartością  $\Delta G_{\text{nonspec}}/\Delta G_{\text{spec}}$ , jednak obie zlokalizowane są w dwuniciowych regionach 26S rRNA. W przypadku dodatkowych sekwencji #2-2 oraz #7-2 i #7-3, obserwowałam przeciwną sytuację. Wyłonione sekwencje dodatkowe są ulokowane w jednoniciowych fragmentach rRNA ale potencjalne hybrydy charakteryzuje bardzo niska wartość  $\Delta G_{\text{nonspec}}/\Delta G_{\text{spec}}$ . Te obserwacje pozwoliły na konkluzję, że interakcje te nie mogą być stabilne. Jedna niespecyficzna sekwencja dodatkowa (#2-1) posiada względnie wysoką wartość  $\Delta G_{\text{nonspec}}/\Delta G_{\text{spec}}$  i występuje w regionie jednoniciowym rRNA. Jednak obserwowany przeze mnie stopień hybrydyzacji oligonukleotydu #2 do rybosomu w żadnym stanie konformacyjnym rybosomu nie przekraczał 100%, co jest dalszym argumentem popierającym konkluzje o specyficzności oddziaływań a-DNA z badanymi sekwencjami w 18S rRNA.

Ponadto, aby upewnić się, że obserwowana przeze mnie hybrydyzacja oligonukleotydów zachodzi jedynie do specyficznych, w pełni komplementarnych miejsc w 18S rRNA, wykonałam krzywe wysycenia dla wszystkich badanych a-DNA. W tym celu przeprowadziłam znakowanie oligonukleotydów oraz proces hybrydyzacji wyznakowanych oligonukleotydów do rybosomów przeprowadzonych w odpowiedni stan konformacyjny.

- **Znakowanie oligonukleotydów**

W wyniku znakowania 5' końca przy pomocy  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  (metoda 5.11) poszczególne oligonukleotydy wykazywały zamieszczone w Tabeli 8 radioaktywności specyficzne [dpm/pmol].

Oligonukleotyd	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8
Radioaktywność specyficzna (dpm/pmol)	247	139	187	171	332	112	113	498

Tabela 13. Radioaktywność specyficzna [dpm/pmol] oligonukleotydów po znakowaniu  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ .

Faint, illegible text covering the majority of the page, likely bleed-through from the reverse side.

TABLE 1  
RESULTS OF THE SURVEY

TABLE 1  
RESULTS OF THE SURVEY

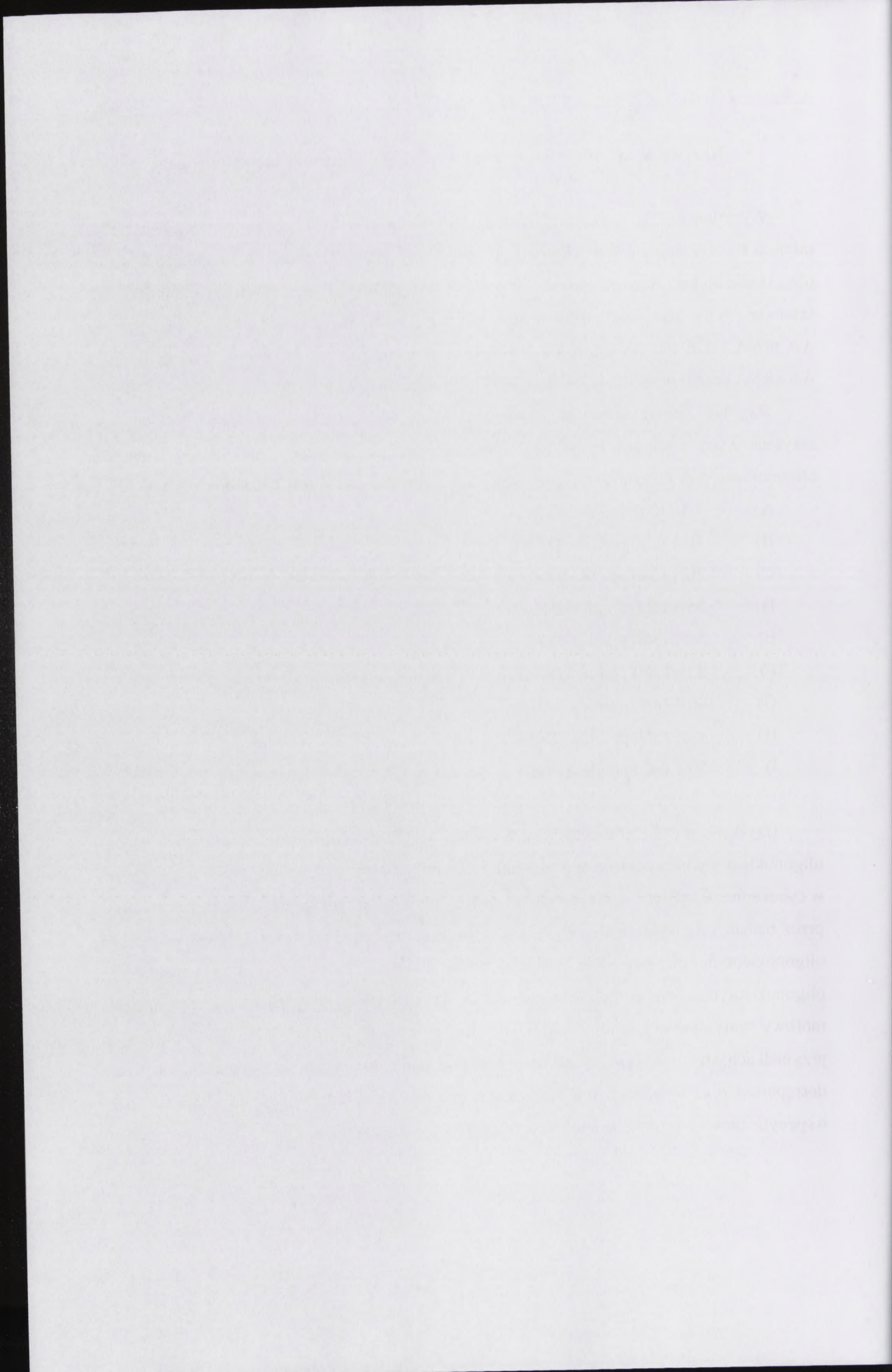
- **Krzywe wysycenia rybosomów 80S przez antysensowe oligonukleotydy**

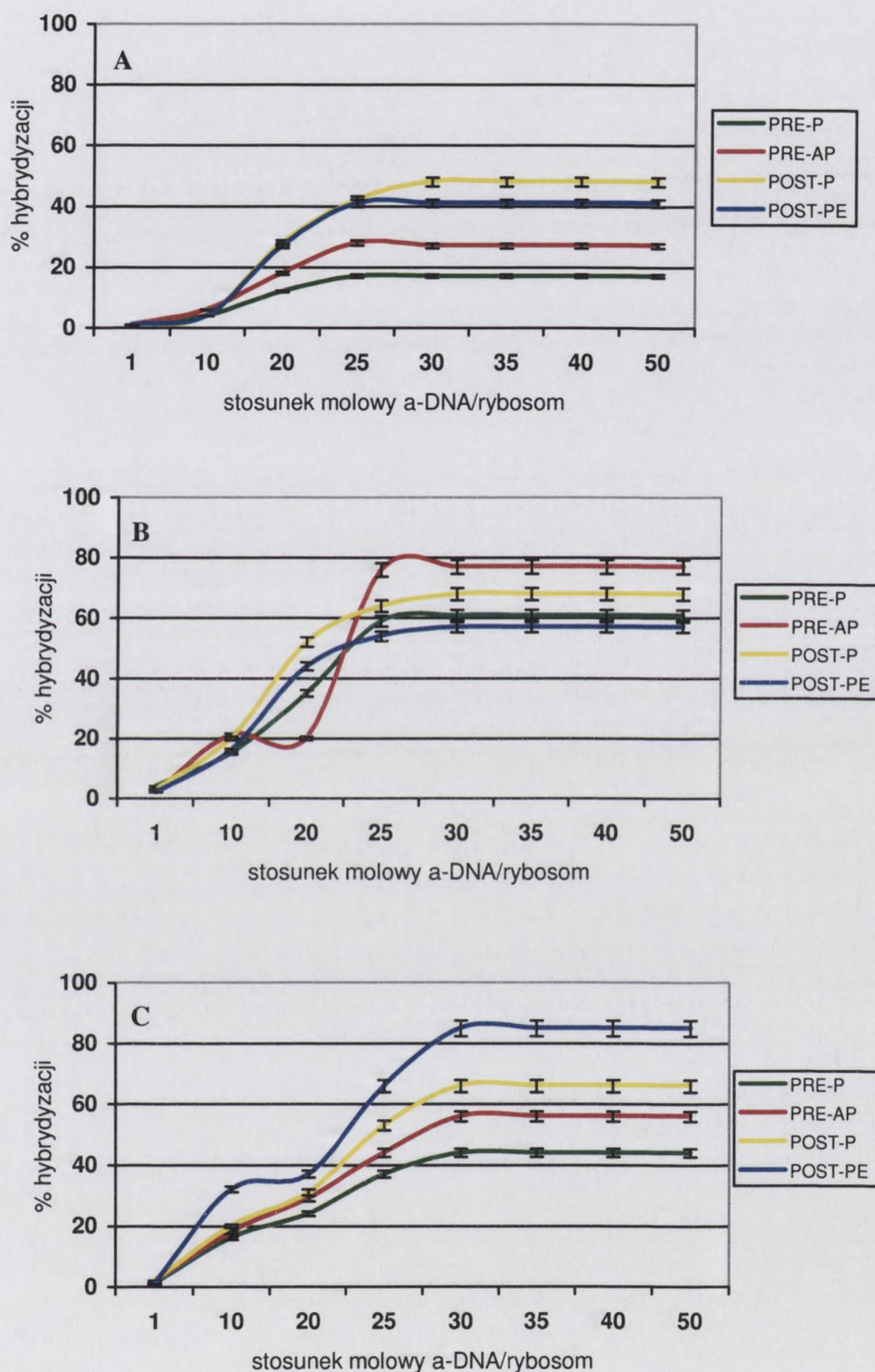
Wyizolowane rybosomy przeprowadzałam w stan pretranslokacyjny poprzez obsadzenie miejsca P przez deacylowany tRNA (D-tRNA) – stan PRE-P (metoda 5.8.1) oraz jednoczesne obsadzenie miejsc: A przez aminoacylo – tRNA (AA-tRNA) i P przez D-tRNA – stan PRE-AP (metoda 5.8.3). Stan posttranslokacyjny osiągnięty został przez obsadzenie miejsca P przez AA-tRNA (stan POST-P, metoda 5.9.1) oraz równoczesne zablokowanie miejsc: P przez AA-tRNA oraz E przez D-tRNA (stan POST-PE, metoda 5.9.2).

Na tak przygotowanych rybosomach przeprowadzałam reakcję hybrydyzacji antysensowych oligonukleotydów (metoda 5.12), stosując następujący nadmiar oligonukleotydów do rybosomu (przy stałej ilości rybosomów, to jest 12 pmoli):

- A) 1:1 (12 pmoli a-DNA)
- B) 10:1 (120 pmoli a-DNA)
- C) 20:1 (240 pmoli a-DNA)
- D) 25:1 (300 pmoli a-DNA)
- E) 30:1 (360 pmoli a-DNA)
- F) 35:1 (420 pmoli a-DNA)
- G) 40:1 (480 pmoli a-DNA)
- H) 45:1 (540 pmoli a-DNA)
- I) 50:1 (600 pmoli a-DNA).

Uzyskane wyniki zestawiałam na Rysunku 46. Zaobserwowałam, że wszystkie badane oligonukleotydy hybrydują specyficznie tylko do jednego, wybranego przeze mnie miejsca w rybosomie w każdym stanie translokacyjnym. Świadczy o tym stopień wysycenia rybosomu przez badane oligonukleotydy. Wysycenie rybosomu następuje wówczas, gdy wzrost stężenia oligonukleotydu nie powoduje dalszego wzrostu stopnia hybrydyzacji komplementarnego oligonukleotydu. Proces taki obserwowałam w większości przypadków, kiedy stosunek molowy antysensowego oligonukleotydu do rybosomu wynosił 25:1. W pozostałych przypadkach, stan wysycenia osiągnąć był przy stosunku 30:1. Różnice te wynikają zapewne z dostępności oraz lokalizacji miejsca docelowego w 18S rRNA. Wyniki te świadczą zatem o specyficzności wiązania badanych przeze mnie oligonukleotydów.





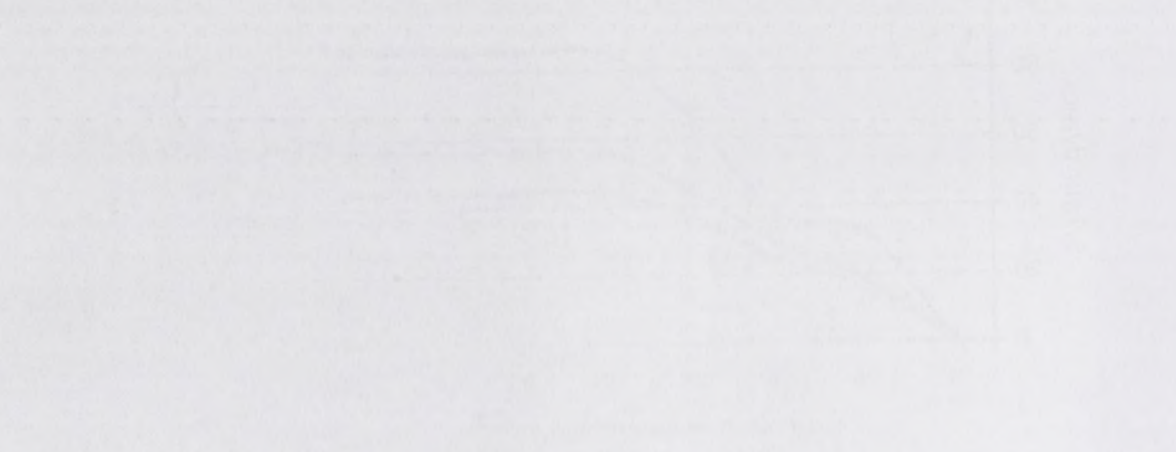
**Rysunek 46. Krzywe wysycenia 12 pmoli rybosomu przez wzrastające stężenie oligonukleotydów (12-600 pmoli).**

Rezultaty obarczone są odchyleniem standardowym ( $\pm 3\%$ ) z trzech niezależnych eksperymentów.

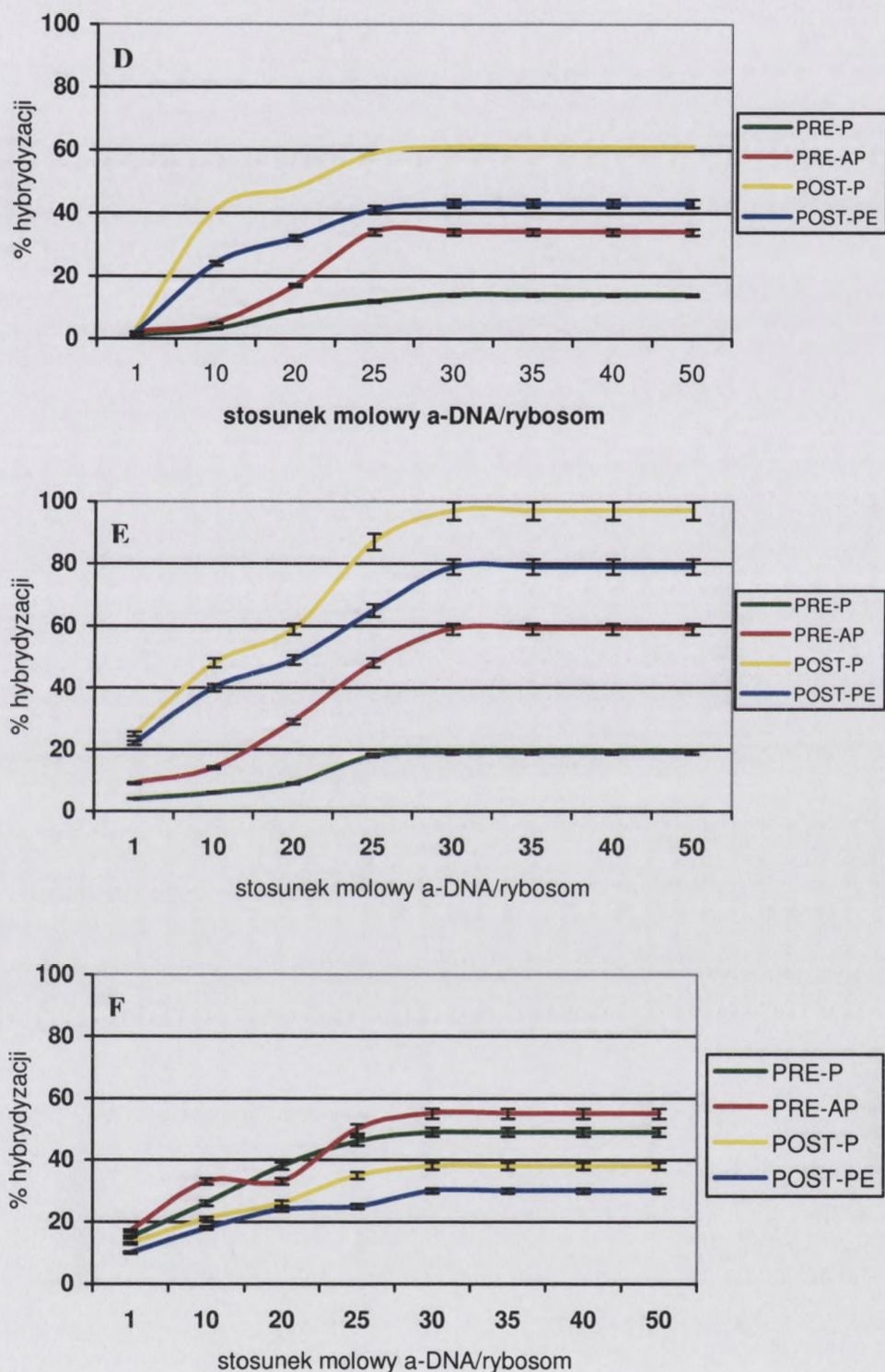
A – oligonukleotyd #1;

B – oligonukleotyd #2;

C – oligonukleotyd #3.



Series A: 1980-1990  
Series B: 1980-1990  
Series C: 1980-1990



**Rysunek 46. Krzywe wysycenia 12 pmoli rybosomu przez wzrastające stężenie oligonukleotydów (12-600 pmoli).**

Rezultaty obarczone są odchyleniem standardowym ( $\pm 3\%$ ) z trzech niezależnych eksperymentów.

D – oligonukleotyd #4;

E – oligonukleotyd #5;

F – oligonukleotyd #6.



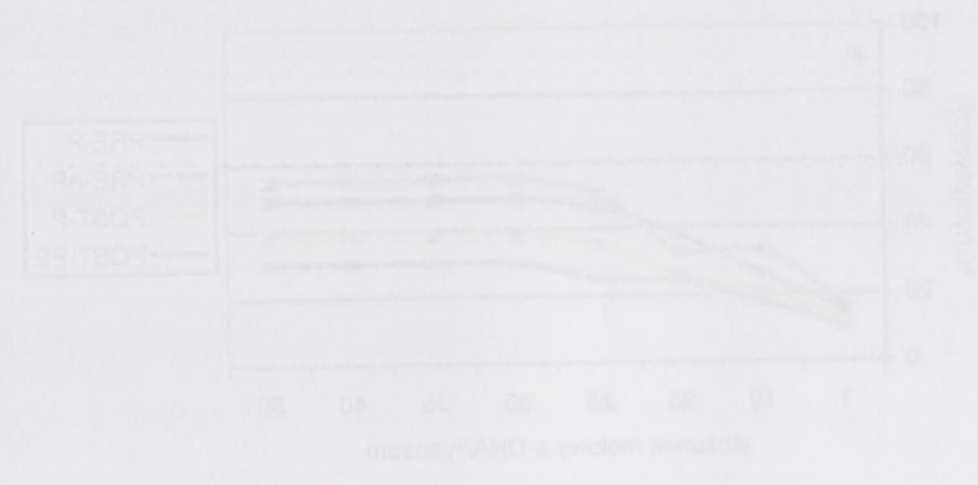
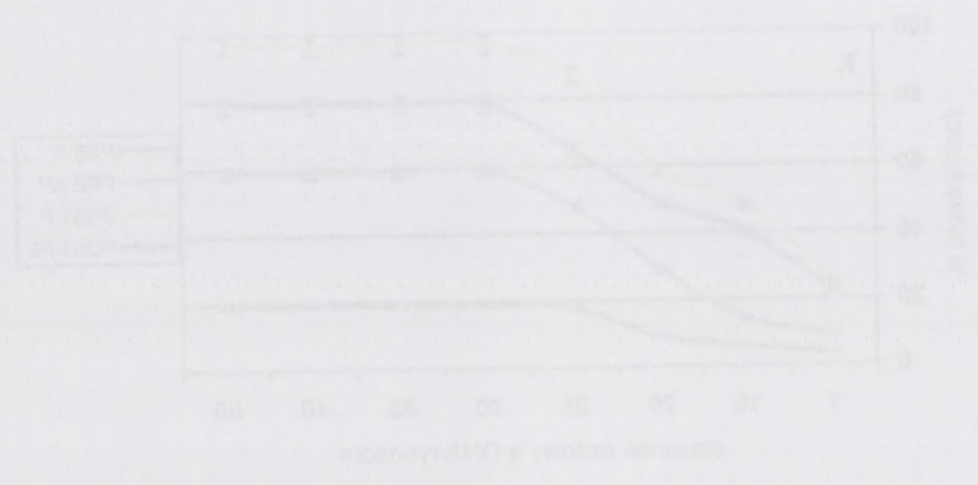
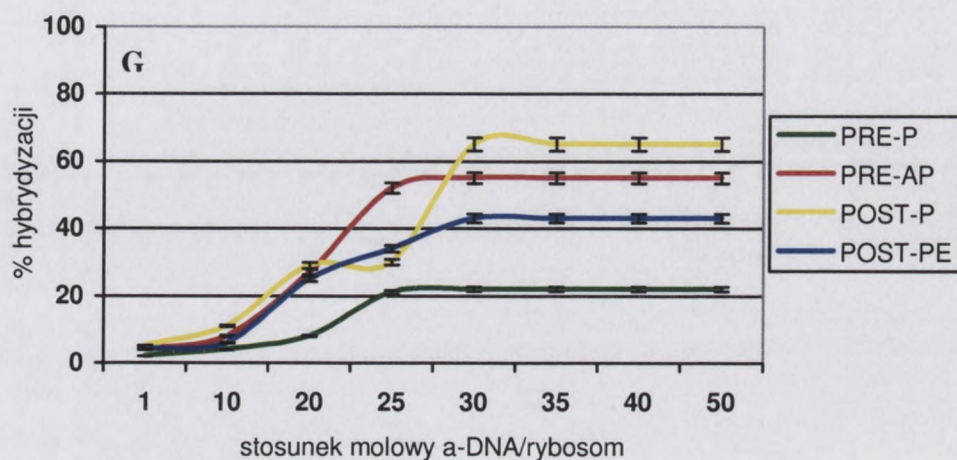


Figure 4. Conversion of monomer (M) versus time (t) for different polymerization conditions (PRE-P, PRE-AP, POST-P, POST-PE) at 60°C. The reaction was carried out in a 100 ml solution of monomer (M) and initiator (I) in a 100 ml solution of solvent (S). The concentration of monomer (M) was 1.0 mol/l, the concentration of initiator (I) was 0.01 mol/l, and the concentration of solvent (S) was 0.99 mol/l.



**Rysunek 46. Krzywe wysycenia 12 pmoli rybosomu przez wzrastające stężenie oligonukleotydów (12-600 pmoli).**

Rezultaty obarczone są odchyleniem standardowym ( $\pm 3\%$ ) z trzech niezależnych eksperymentów.

G – oligonukleotyd #7.



Figure 1: A line graph showing a downward trend over time. The x-axis is labeled 'Year' and the y-axis is labeled 'Value'. The line starts at a high point on the left and slopes downwards to a lower point on the right.

The following text is extremely faint and illegible. It appears to be a series of paragraphs or a list of items, but the content cannot be discerned from the image.

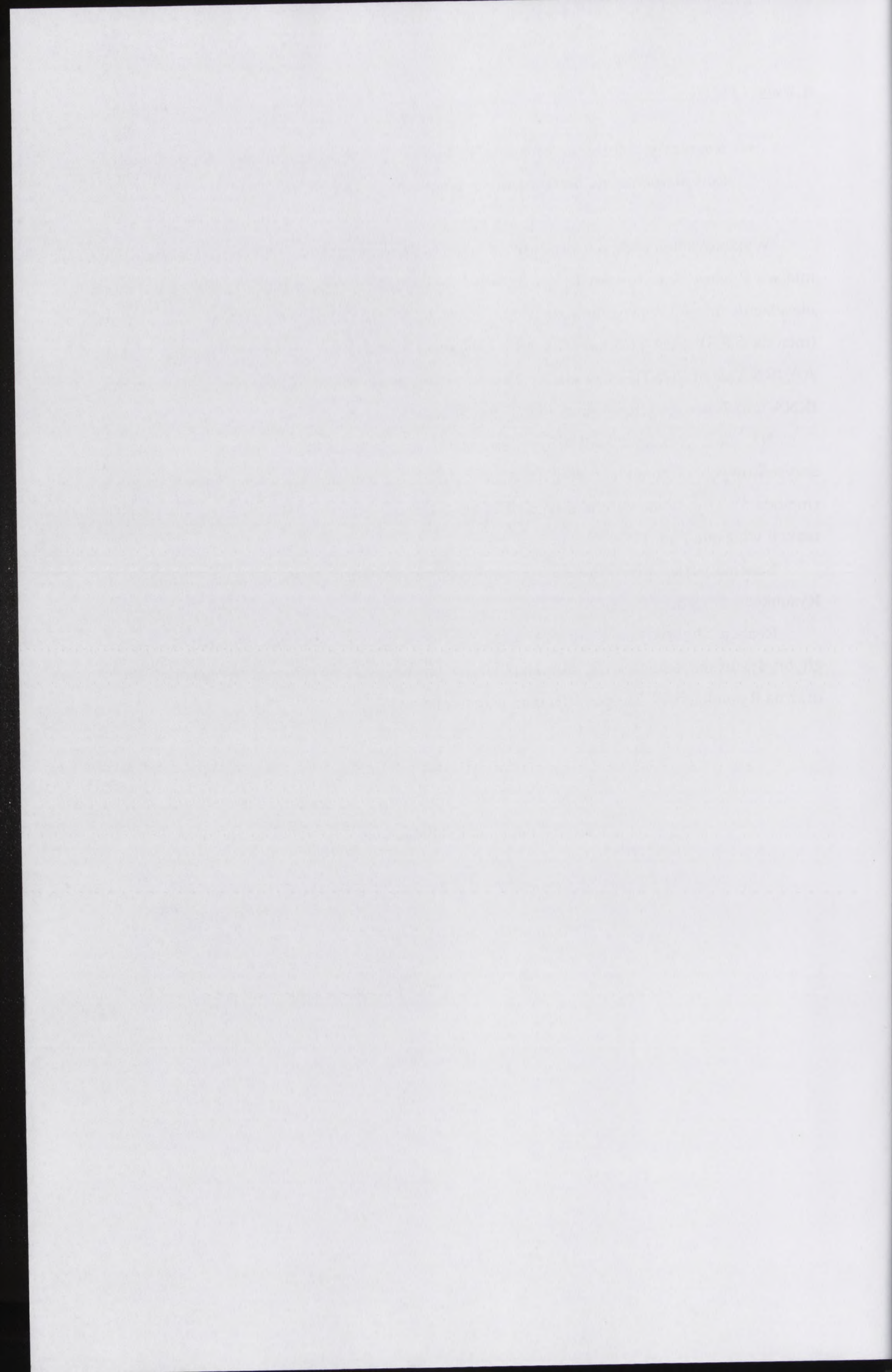
- **Rezultaty inhibicji biosyntezy białka przez antysensowe oligonukleotydy komplementarne do wybranych fragmentów 18S rRNA**

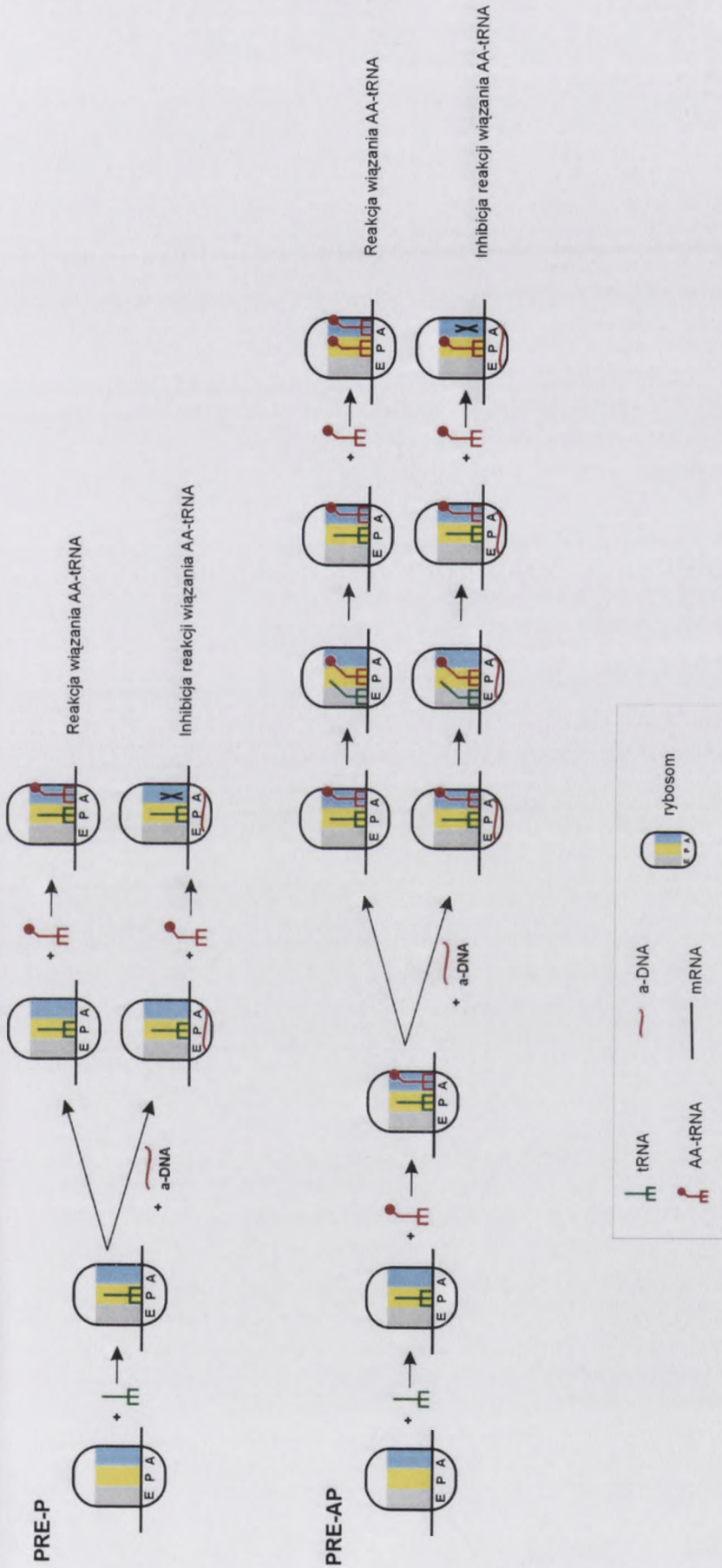
Wyizolowane rybosomy przeprowadzałam w stan pretranslokacyjny poprzez obsadzenie miejsca P przez deacylowany tRNA (D-tRNA) – stan PRE-P (metoda 5.8.1) oraz jednoczesne obsadzenie miejsc: A przez aminoacylo – tRNA (AA-tRNA) i P przez D-tRNA – stan PRE-AP (metoda 5.8.3). Stan posttranslokacyjny osiągnięty został przez obsadzenie miejsca P przez AA-tRNA (stan POST-P, metoda 5.9.1) oraz równoczesne zablokowanie miejsc: P przez AA-tRNA oraz E przez D-tRNA (stan POST-PE, metoda 5.9.2).

Na tak przygotowanych rybosomach przeprowadzałam reakcję hybrydyzacji antysensowych oligonukleotydów (metoda 5.12) lub kompozycji dwóch oligonukleotydów (metoda 5.13) w stosunku molarnym a-DNA/rybosom wynoszącym 30:1 a następnie inhibicję reakcji wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup>.

Schematyczne przedstawienie przeprowadzanych doświadczalnie reakcji ujęłam na Rysunkach 47 i 48.

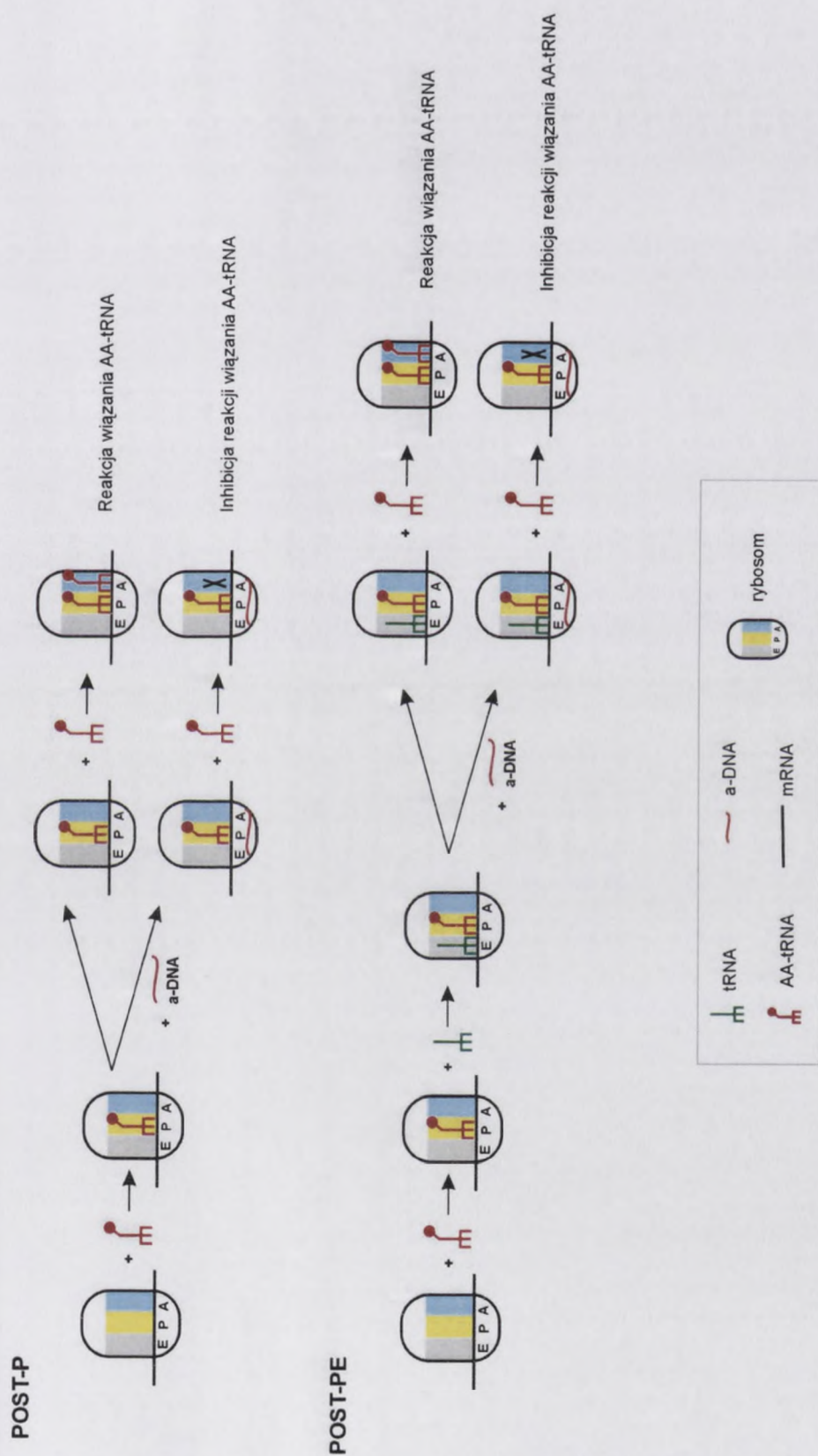
Reakcje hybrydyzacji a-DNA oraz inhibicji reakcji wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup> przez zhybrydowane antysensowe oligonukleotydy powtarzałam trzykrotnie. W Tabelach 14-17 oraz na Rysunkach 49-53 przedstawiłam uśrednione wyniki.





Rysunek 47. Schemat przeprowadzonych reakcji w stanie pretranslokacyjnym rybosomu. PRE-P, PRE-AP oznaczają poszczególne stany translokacyjne rybosomu podczas biosyntezy białka.





**Rysunek 48. Schemat przeprowadzonych reakcji w stanie posttranslacyjnym rybosomu.**  
 POST-P, POST-PE oznaczają poszczególne stany translacyjne rybosomu podczas biosyntezy białka.



The following is a list of the names of the persons who have been  
 elected to the office of Justice of the Peace for the year 1907.  
 The names are given in alphabetical order of their surnames.  
 The names of the persons who have been elected to the office of  
 Justice of the Peace for the year 1907 are as follows:

1	2	3	4
5	6	7	8
9	10	11	12
13	14	15	16
17	18	19	20
21	22	23	24
25	26	27	28
29	30	31	32
33	34	35	36
37	38	39	40
41	42	43	44
45	46	47	48
49	50	51	52
53	54	55	56
57	58	59	60
61	62	63	64
65	66	67	68
69	70	71	72
73	74	75	76
77	78	79	80
81	82	83	84
85	86	87	88
89	90	91	92
93	94	95	96
97	98	99	100

	a-DNA	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8
PRE-P	Wynik hybrydyzacji [pmol a-DNA/pmól rybosomu]	0,17	0,61	0,44	0,14	0,49	0,19	0,22	0,0
	Wydajność hybrydyzacji [%]	17	61	44	14	49	19	22	0
PRE-AP	Wynik hybrydyzacji [pmol; a-DNA/pmól rybosomu]	0,27	0,77	0,56	0,34	0,55	0,59	0,55	0,0
	Wydajność hybrydyzacji [%]	27	77	56	34	55	59	55	0
POST-P	Wynik hybrydyzacji [pmol a-DNA/pmól rybosomu]	0,48	0,68	0,66	0,61	0,39	0,97	0,65	0,0
	Wydajność hybrydyzacji [%]	48	68	66	61	39	97	65	0
POST-PE	Wynik hybrydyzacji [pmol a-DNA/pmól rybosomu]	0,41	0,57	0,85	0,43	0,30	0,79	0,43	0,01
	Wydajność hybrydyzacji [%]	41	57	85	43	30	79	43	1

**Tabela 14.** Wyniki reakcji hybrydyzacji antysensowych oligonukleotydów do rybosomów przekształconych w stan pre- lub posttranslokacyjny.

PRE-P, PRE-AP, POST-P, POST-PE oznaczają poszczególne stany translokacyjne rybosomu podczas biosyntezy białka.

Przedstawiono wyniki hybrydyzacji uśrednione z trzech niezależnych eksperymentów.

Year	1950	1951	1952	1953	1954	1955	1956	1957	1958	1959	1960
Population	1,000,000	1,050,000	1,100,000	1,150,000	1,200,000	1,250,000	1,300,000	1,350,000	1,400,000	1,450,000	1,500,000
Area (sq. miles)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Population Density	10,000	10,500	11,000	11,500	12,000	12,500	13,000	13,500	14,000	14,500	15,000

The following table shows the population and area of the state of California from 1950 to 1960. The population density is calculated by dividing the population by the area.

The population of California increased from 1,000,000 in 1950 to 1,500,000 in 1960. The area of California remained constant at 100 square miles.

The population density of California increased from 10,000 people per square mile in 1950 to 15,000 people per square mile in 1960.

The following table shows the population and area of the state of California from 1950 to 1960. The population density is calculated by dividing the population by the area.

The population of California increased from 1,000,000 in 1950 to 1,500,000 in 1960. The area of California remained constant at 100 square miles.

The population density of California increased from 10,000 people per square mile in 1950 to 15,000 people per square mile in 1960.

The following table shows the population and area of the state of California from 1950 to 1960. The population density is calculated by dividing the population by the area.

The population of California increased from 1,000,000 in 1950 to 1,500,000 in 1960. The area of California remained constant at 100 square miles.

The population density of California increased from 10,000 people per square mile in 1950 to 15,000 people per square mile in 1960.

The following table shows the population and area of the state of California from 1950 to 1960. The population density is calculated by dividing the population by the area.

The population of California increased from 1,000,000 in 1950 to 1,500,000 in 1960. The area of California remained constant at 100 square miles.

The population density of California increased from 10,000 people per square mile in 1950 to 15,000 people per square mile in 1960.

The following table shows the population and area of the state of California from 1950 to 1960. The population density is calculated by dividing the population by the area.

The population of California increased from 1,000,000 in 1950 to 1,500,000 in 1960. The area of California remained constant at 100 square miles.

	Mieszanina	$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ - ATP #1 + #4	#1 + $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ - ATP #4	$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ - ATP #3 + #5	#3 + $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ - ATP #5	$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ - ATP #6 + #7	#6 + $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ - ATP #7
	a-DNA	#1	#4	#3	#5	#6	#7
PRE-P	Wynik hybrydyzacji [pmol a-DNA /pmol rybosomu]	0,37	0,53	0,42	0,49	0,47	0,86
	Wydajność hybrydyzacji [%]	37	53	42	49	47	86
PRE-AP	Wynik hybrydyzacji [pmol a-DNA /pmol rybosomu]	0,43	0,51	0,71	0,62	0,70	0,43
	Wydajność hybrydyzacji [%]	43	51	71	62	70	43
POST-P	Wynik hybrydyzacji [pmol a-DNA /pmol rybosomu]	0,14	0,54	0,62	0,52	0,11	0,39
	Wydajność hybrydyzacji [%]	14	54	62	52	11	39
POST-PE	Wynik hybrydyzacji [pmol a-DNA /pmol rybosomu]	0,50	0,57	0,62	0,29	0,69	0,78
	Wydajność hybrydyzacji [%]	50	57	62	29	69	78

Tabela 15. Wyniki reakcji hybrydyzacji mieszanin ekwimolarnych antysensowych oligonukleotydów do rybosomów przekształconych w stan pre- lub posttranslokacyjny.

PRE-P, PRE-AP, POST-P, POST-PE oznaczają poszczególne stany translokacyjne rybosomu podczas biosyntezy białka.

Przedstawiono wyniki hybrydyzacji uśrednione z trzech niezależnych eksperymentów.

Sample	Wet weight		Dry weight		Wet weight		Dry weight	
	Wet weight (%)	Dry weight (%)	Wet weight (%)	Dry weight (%)	Wet weight (%)	Dry weight (%)	Wet weight (%)	Dry weight (%)
P-1	92	88	92	88	92	88	92	88
	92	88	92	88	92	88	92	88
P-2	92	88	92	88	92	88	92	88
	92	88	92	88	92	88	92	88
P-3	92	88	92	88	92	88	92	88
	92	88	92	88	92	88	92	88
P-4	92	88	92	88	92	88	92	88
	92	88	92	88	92	88	92	88
P-5	92	88	92	88	92	88	92	88
	92	88	92	88	92	88	92	88
P-6	92	88	92	88	92	88	92	88
	92	88	92	88	92	88	92	88
P-7	92	88	92	88	92	88	92	88
	92	88	92	88	92	88	92	88
P-8	92	88	92	88	92	88	92	88
	92	88	92	88	92	88	92	88
P-9	92	88	92	88	92	88	92	88
	92	88	92	88	92	88	92	88
P-10	92	88	92	88	92	88	92	88
	92	88	92	88	92	88	92	88

Table 1. Wet and dry weight percentages of the samples. The samples were prepared by the method described in the text. The samples were prepared by the method described in the text. The samples were prepared by the method described in the text.

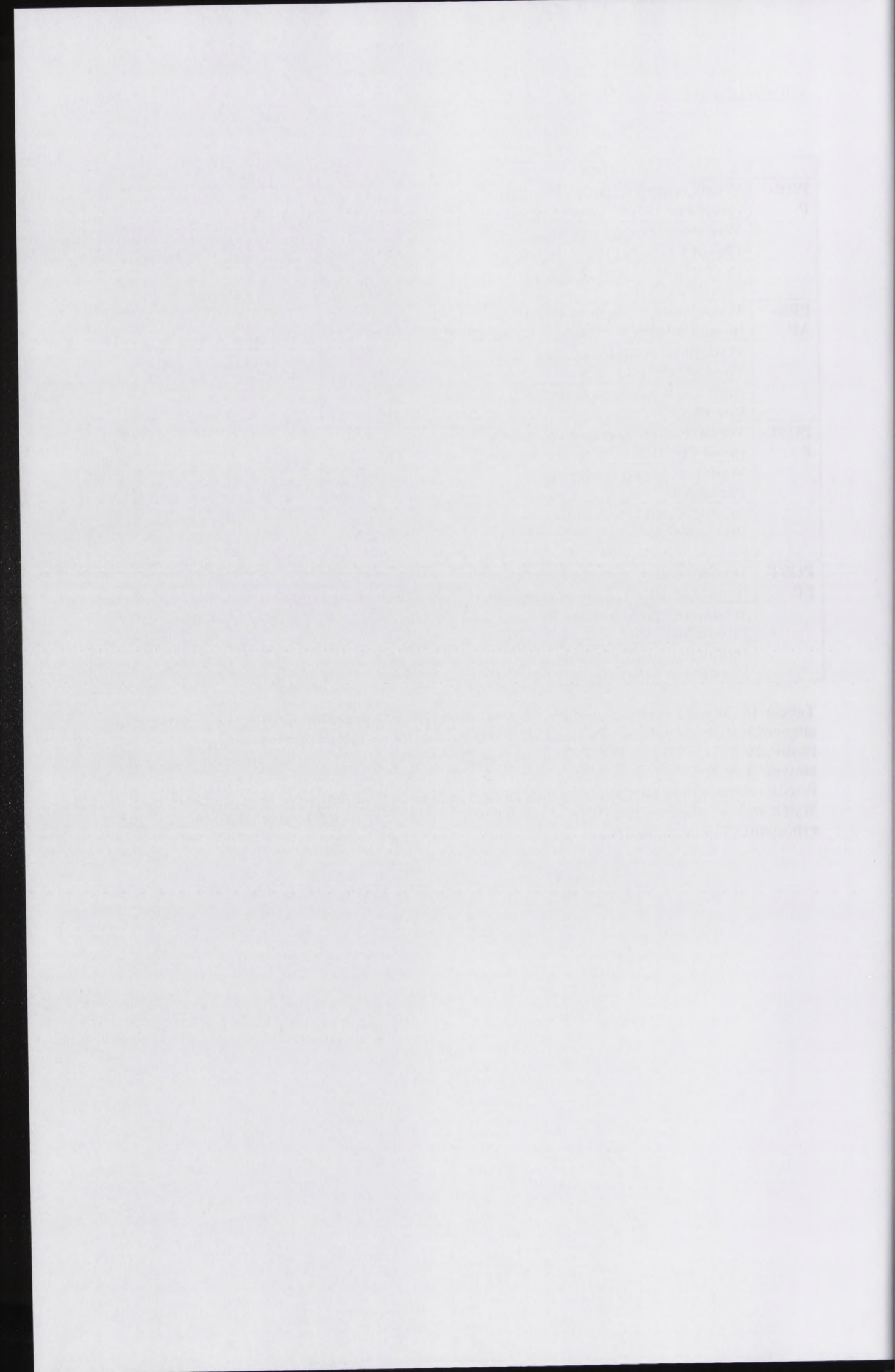
	a-DNA	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8
PRE-P	Wynik reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [pmol Phe-tRNA <sup>Phe</sup> /pmol rybosomu]	0,22	0,17	0,64	0,27	0,31	0,35	0,16	0,99
	Wydajność reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [%]	22	17	64	27	31	35	16	99
	Inhibicja reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [%]	78	83	36	73	69	65	84	1
PRE-AP	Wynik reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [pmol Phe-tRNA <sup>Phe</sup> /pmol rybosomu]	0,96	0,63	0,67	0,59	0,44	0,51	0,58	0,99
	Wydajność reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [%]	96	63	67	59	44	51	58	99
	Inhibicja reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [%]	4	37	33	41	56	49	42	1
POST-P	Wynik reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [pmol Phe-tRNA <sup>Phe</sup> /pmol rybosomu]	0,80	0,73	0,78	0,59	0,96	0,56	0,40	0,98
	Wydajność reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [%]	80	73	78	59	96	56	40	98
	Inhibicja reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [%]	20	27	22	41	4	44	60	2
POST-PE	Wynik reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [pmol Phe-tRNA <sup>Phe</sup> /pmol rybosomu]	0,93	0,68	0,72	0,56	0,56	0,69	0,67	0,99
	Wydajność reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [%]	93	68	72	56	56	69	67	99
	Inhibicja reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [%]	7	32	28	44	44	31	33	1

Tabela 16. Wyniki inhibicji reakcji wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup> przez zhybrydyzowane antysensowe oligonukleotydy do rybosomów przekształconych w stan pre- lub posttranslokacyjny.

PRE-P, PRE-AP, POST-P, POST-PE oznaczają poszczególne stany translokacyjne rybosomu podczas biosyntezy białka.

Przedstawiono wyniki uśrednione z trzech niezależnych eksperymentów.

Wynik reakcji wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup> bez udziału a-DNA wynosił 0,94 pmola Phe-tRNA<sup>Phe</sup> /pmol rybosomu (94% wydajności).



	a-DNA	#1 + #4	#3 + #5	#6 + #7
PRE-P	Wynik reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [pmol Phe-tRNA <sup>Phe</sup> /pmol rybosomu]	0,29	0,31	0,26
	Wydajność reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [%]	29	31	26
	Inhibicja reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [%]	71	69	74
PRE-AP	Wynik reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [pmol Phe-tRNA <sup>Phe</sup> /pmol rybosomu]	0,28	0,40	0,37
	Wydajność reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [%]	28	40	37
	Inhibicja reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [%]	72	60	63
POST-P	Wynik reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [pmol Phe-tRNA <sup>Phe</sup> /pmol rybosomu]	0,27	0,26	0,11
	Wydajność reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [%]	27	26	11
	Inhibicja reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [%]	73	74	89
POST-PE	Wynik reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [pmol Phe-tRNA <sup>Phe</sup> /pmol rybosomu]	0,62	0,68	0,68
	Wydajność reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [%]	62	68	68
	Inhibicja reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [%]	32	35	35

Tabela 17. Wyniki inhibicji reakcji wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup> przez zhybrydizowane mieszaniny ekwimolarne antysensowych oligonukleotydów do rybosomów przekształconych w stan pre- lub posttranslokacyjny.

PRE-P, PRE-AP, POST-P, POST-PE oznaczają poszczególne stany translokacyjne rybosomu podczas biosyntezy białka.

Przedstawiono wyniki uśrednione z trzech niezależnych eksperymentów.

Wynik reakcji wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup> bez udziału a-DNA wynosił **0,94 pmola Phe-tRNA<sup>Phe</sup> /pmol rybosomu** (94% wydajności).



<p>1. The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions.</p>	<p>1000</p>
<p>2. It is essential to ensure that all entries are supported by appropriate evidence and receipts.</p>	<p>1000</p>
<p>3. Regular audits should be conducted to verify the accuracy of the records and identify any discrepancies.</p>	<p>1000</p>
<p>4. The final section of the document provides a summary of the key findings and recommendations.</p>	<p>1000</p>

The following table provides a detailed breakdown of the data presented in the report. It includes information on the number of transactions, the total amount, and the average value per transaction. This data is crucial for understanding the overall financial performance and identifying areas for improvement.

### Oligonukleotydy #1 i #4

Sekwencja oligonukleotydu #1 została zaprojektowana tak, aby oddziaływać z pętlą apikalną helisy h13 18S rRNA (Rysunek 44 oraz Tabela 11). Helisa ta charakteryzuje się wysoce konserwatywną sekwencją (7 spośród 12 docelowych nukleotydów wykazuje 98% konserwatywności; dane na podstawie [22]) i stanowi miejsce wiązania czynnika elongacyjnego eEF-2 [25, 26]. Natomiast sekwencja oddziałująca z oligonukleotydem #4 znajduje się w obrębie centralnej domeny 18S rRNA (Rysunek 44 oraz Tabela 11) i wykazuje również silną konserwatywność. Miejsce to jest odpowiedzialne za dwie zasadnicze interakcje. Urydyna w pozycji 701 oddziałuje z nukleotydem w pozycji 47 cząsteczki tRNA znajdującej się w rybosomalnym miejscu P [38]. Najbardziej konserwatywne nukleotydy tej sekwencji zajmują pozycje 698 oraz 703 i wykazują 98% zachowawczości. Wykazano, że wraz z nukleotydami 1848 i 1895 helisy H68 26S rRNA biorą one udział w tworzeniu mostka eB2d między podjednostkami [5, 9, 20]. Obydwa wyżej wymienione miejsca w 18S rRNA uznałam za szczególnie interesujące w badaniu zależności pomiędzy ich strukturą i funkcją pełnioną podczas poszczególnych etapów biosyntezy białka.

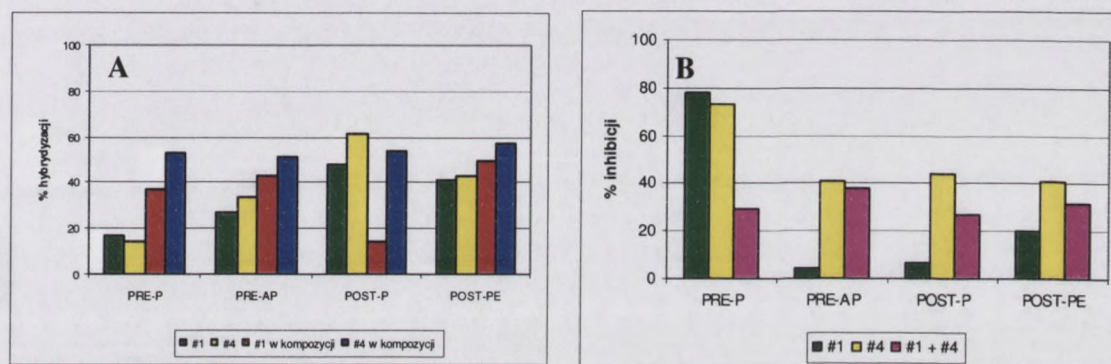
Wydajność inhibicji reakcji wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup> do rybosomów była szczególnie wysoka w stanie pretranslokacyjnym z obsadzonym miejscem P (78% inhibicji przez #1 oraz 73% przez #4, Rysunek 49B). **Interakcje helis h13 i h23 18S rRNA z eEF-2, tRNA w miejscu P oraz 26S rRNA są konieczne dla prawidłowego związania AA-tRNA do rybosomu.** Efekt ten wydaje się jeszcze silniejszy, jeśli weźmiemy pod uwagę stosunkowo niski stopień hybrydyzacji każdego z tych oligonukleotydów do rybosomu w stanie PRE-P (odpowiednio, 37% i 42%; Rysunek 49A). Jednak, kiedy stosowałam mieszaninę obu oligonukleotydów, wówczas obserwowałam, że stopień hybrydyzacji #4 ulega zwiększeniu do 53%. Prawdopodobnie przyłączenie oligonukleotydu #1 do helisy h13, a więc jednoczesne uniemożliwienie oddziaływań tego miejsca w 18S rRNA z czynnikiem elongacyjnym EF-2, pociąga za sobą zmianę konformacji rybosomu w obrębie helisy h23, która staje się bardziej dostępna dla oddziaływań z komplementarnym a-DNA. Jednocześnie w stanie PRE-P następowała inhibicja reakcji wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup> przez mieszaninę oligonukleotydów na poziomie 29%, a więc o około 50% niższa niż w przypadku hybrydyzacji pojedynczych oligonukleotydów. Wynik ten może świadczyć o zaistnieniu kolejnych zmian konformacyjnych w rybosomie pod wpływem hybrydyzacji a-DNA #1 i #4. Zmiany te prawdopodobnie powodują odsłonięcie w rybosomie innych miejsc wiązania czynnika elongacyjnego EF-2 lub tRNA w miejscu P, dzięki którym jedna lub obie te cząsteczki są stabilnie związane z rybosomem i elongacja biosyntezy białka nie zostaje zaburzona.

Współczesne badania nad...

Współczesne badania nad... (The text in this section is extremely faint and largely illegible, appearing to be a list of references or a detailed description of experimental results. It contains several lines of text, including what appears to be a list of authors and titles, such as "Współczesne badania nad..." and "Współczesne badania nad...".)

Współczesne badania nad... (This section continues the text, which remains very faint. It appears to be a continuation of the same topic, possibly discussing the implications of the findings or further research. The text is too light to transcribe accurately but seems to follow a standard academic structure.)

W przypadku oligonukleotydu #1, w pozostałych stanach translacyjnych nie obserwowałam wysokiego stopnia inhibicji reakcji wiązania (4-20% inhibicji). Inhibicja reakcji wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup> pod wpływem hybrydyzacji kompozycji oligonukleotydów #1 i #4 jest więc prawdopodobnie spowodowana blokującym działaniem #4. **Wynik taki nasuwa wniosek, że czynnik elongacyjny eEF-2 nie musi oddziaływać z pętlą apikalną helisy h13 po utworzeniu wiązania peptydowego i translacji.**



Rysunek 49. Porównanie stopnia hybrydyzacji oligonukleotydów #1 i #4 stosowanych samodzielnie lub w mieszaninie (A), ze stopniem inhibicji reakcji wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup> przez zhybrydowane oligonukleotydy #1 lub/i #4 (B).

Niższy stopień inhibicji w stanie posttranslokacyjnym (odpowiednio 7% i 20% dla oligonukleotydu #1; 44% i 41% dla oligonukleotydu #4 oraz 27% i 32% dla kompozycji obu oligonukleotydów) w połączeniu z dość wysokim stopniem hybrydyzacji, ilustruje również zmiany w konformacji rybosomu. **Po utworzeniu wiązania peptydowego następuje „rozluźnienie” struktury rybosomu w regionie helisy h13.** Jest to wyrażone poprzez wyższy stopień hybrydyzacji oligonukleotydu #1 niż w stanie PRE-AP (odpowiednio, 48% w przypadku #1 i 61% w przypadku #4). W stanie POST-P zaobserwowałam również ciekawą zależność między konformacją helisy h13 i h24. Mianowicie hybrydyzacja #1 w mieszaninie z #4 przedstawia się na poziomie aż o 34% niższym niż samego oligonukleotydu #1. Jednocześnie, stopień hybrydyzacji a-DNA #4 utrzymywał się na wyrównanym poziomie zarówno w mieszaninie #1+#4, jak i kiedy dodawany był do układu reakcyjnego samodzielnie. **Jest to nieobserwowany dotąd wynik, który nasuwa nowy wniosek, że w rybosomie przed utworzeniem wiązania peptydowego, pod wpływem zablokowania helisy h23 przez komplementarny oligonukleotyd, dochodzi do zmian w konformacji helisy h13. Jej struktura ulega zacieśnieniu i rybosom staje się bardziej „zamknięty” w tym regionie.**

W przypadku oligonukleotydu 41, w porównaniu z kontrolą, nie obserwowano większego stopnia inhibicji reakcji wiązania (4-50% inhibicji) niż w przypadku 42. Wynik taki należy do oczekiwanego, ponieważ wiązanie Prib-AP jest specyficzne dla sekwencji 5'-TAA-3'. Wynik taki należy do oczekiwanego, ponieważ wiązanie Prib-AP jest specyficzne dla sekwencji 5'-TAA-3'. Wynik taki należy do oczekiwanego, ponieważ wiązanie Prib-AP jest specyficzne dla sekwencji 5'-TAA-3'.



Wykres 4. Porównanie stopnia inhibicji wiązania oligonukleotydów 41 i 42 (wykres A) oraz 43 i 44 (wykres B) do sekwencji 5'-TAA-3' w kontrolnym i doświadczalnym układzie wiązania Prib-AP. Wynik taki należy do oczekiwanego, ponieważ wiązanie Prib-AP jest specyficzne dla sekwencji 5'-TAA-3'.

Wskazywane jest, że w stanie kontrolnym (kontrolny układ wiązania) nie obserwujemy większego stopnia inhibicji reakcji wiązania (4-50% inhibicji) niż w przypadku 42. Wynik taki należy do oczekiwanego, ponieważ wiązanie Prib-AP jest specyficzne dla sekwencji 5'-TAA-3'. Wynik taki należy do oczekiwanego, ponieważ wiązanie Prib-AP jest specyficzne dla sekwencji 5'-TAA-3'.

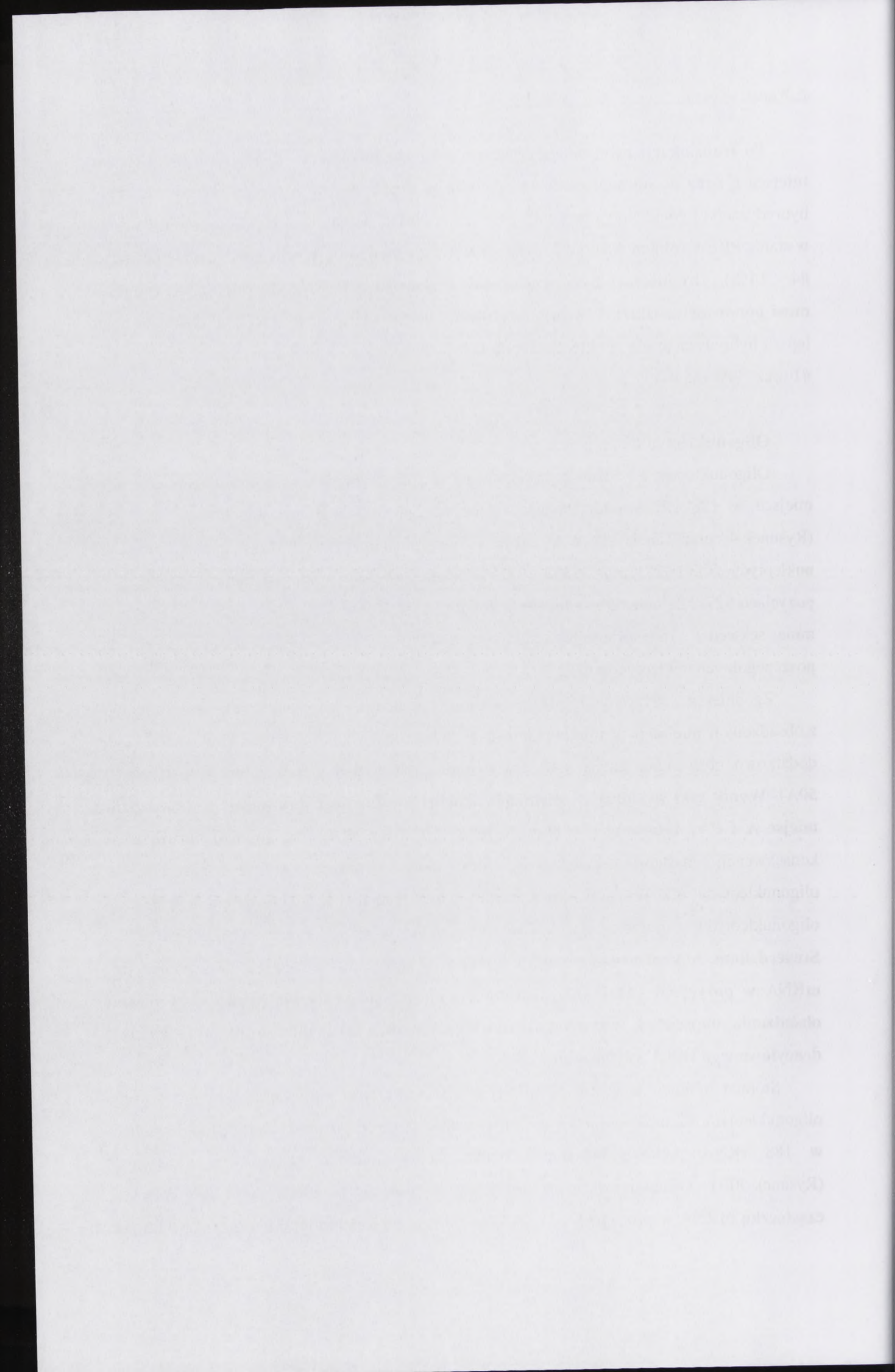
Po translokacji rybosom przygotowuje się do uwolnienia deacylowanego tRNA z miejsca E oraz do nowego cyklu elongacyjnego. Jest to wyrażone coraz niższym stopniem hybrydyzacji oligonukleotydów do docelowych miejsc aż do najniższej wartości obserwowanej w stanie PRE-P (oligonukleotyd #1 hybrydyzował z wydajnością równą 17%, a oligonukleotyd #4 – 14%). **Aby możliwe było przyłączenie cząsteczki AA-tRNA do miejsca A, rybosom musi ponownie „rozluźnić” swoją strukturę.** Dlatego też w stanie PRE-AP obserwowałam lepszą hybrydyzację oligonukleotydów do komplementarnego miejsca w 18S rRNA (27% dla #1 oraz 34% dla #4).

### Oligonukleotyd #2

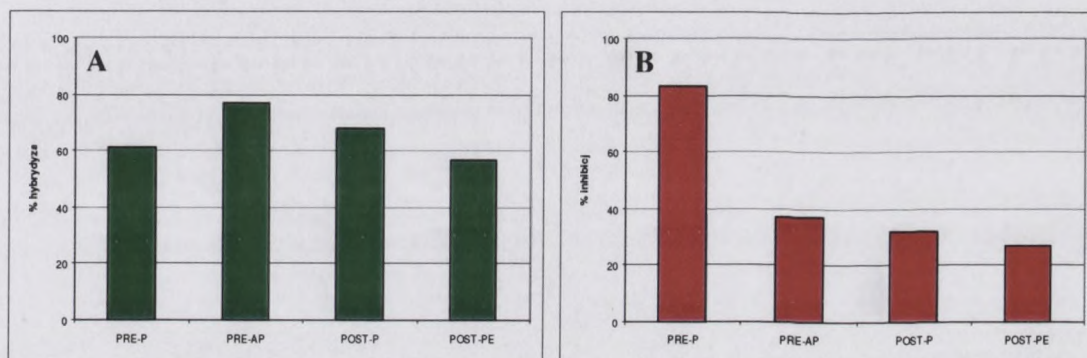
Oligonukleotyd #2 został zaprojektowany tak, aby hybrydyzował do komplementarnego miejsca w 18S rRNA oddziałującego z cząsteczką mRNA w pozycjach +11 oraz +12 (Rysunek 44 oraz Tabela 11). W tej części małego rybosomalnego RNA szczególnie ważne są nukleotydy G530 [28] oraz A532 [247]. Ponadto, w 2005 roku ustalono, że mutacje w pozycjach 527, 528 oraz 536 są letalne w *E. coli* [253]. Konserwatywność tej wybranej przeze mnie sekwencji 18S rRNA jest bardzo wysoka i oscyluje między 98% a 100% dla poszczególnych nukleotydów [22].

Zgodnie z uzyskanymi przeze mnie rezultatami, w stanie pretranslokacyjnym z obsadzonym miejscem P, oligonukleotyd #2 hybrydyzuje z wydajnością równą 61%. Gdy dodatkowo obsadziłam miejsce A, efektywność hybrydyzacji wzrastała do 77% (Rysunek 50A). **Wynik taki świadczy o zaistnieniu zmiany konformacji rybosomu po obsadzeniu miejsc A i P w rybosomie, w obrębie helisy h18 18S rRNA, na bardziej otwartą.** W konsekwencji nastąpiło zwiększenie dostępności miejsca komplementarnego dla oligonukleotydu #2. W stanie posttranslokacyjnym różnice w efektywności hybrydyzacji oligonukleotydu w poszczególnych stanach są mniejsze (POST-P 68% i POST-PE 57%). **Stwierdziłam, że konformacja małej podjednostki rybosomu w regionie oddziałującym z mRNA w pozycjach +11 i +12 prawdopodobnie nie ulega dużym zmianom w trakcie obsadzania miejsc P i E w stanie posttranslokacyjnym, a także podczas etapu uwalniania deacylowanego tRNA z rybosomu.**

Stopień inhibicji wiązania AA-tRNA do rybosomu pod wpływem zhybrydyzowanego oligonukleotydu #2 jasno wskazuje na funkcjonalną ważność wybranego przeze mnie miejsca w 18S rRNA podczas biosyntezy białka we wszystkich stanach translokacyjnych (Rysunek 50B). **Oddziaływania nukleotydów w pozycjach 530 i 532 18S rRNA z cząsteczką mRNA w pozycjach +11 i +12 są istotne na każdym etapie biosyntezy białka.**



Wynik ten jest zgodny z wcześniejszymi rezultatami uzyskanymi przez Sergieva w 1997 roku oraz Yusupov'a w 2001 roku [5, 28].



**Rysunek 50. Porównanie stopnia hybrydyzacji oligonukleotydu #2 (A) ze stopniem inhibicji reakcji wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup> pod wpływem hybrydyzowanego oligonukleotydu #2 (B).**

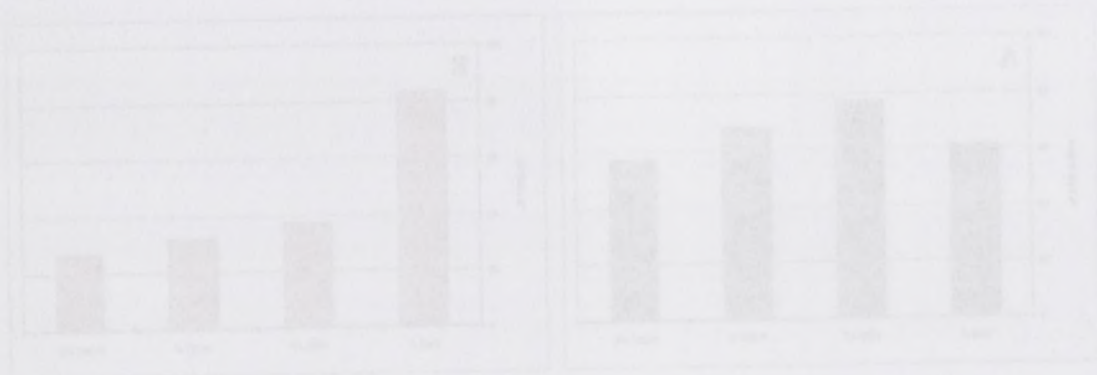
Wykazałam, że oligonukleotyd #2 skutecznie inhibuje reakcję wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup> do rybosomu, zwłaszcza w stanie pretranslokacyjnym z obsadzonym miejscem P (83% inhibicji, Rysunek 50B). Tak wysoki stopień inhibicji nie jest spowodowany wyłącznie wysoką wydajnością hybrydyzacji oligonukleotydu. Bowiem w pozostałych stanach pośrednich oligonukleotyd #2 hybrydyzował z większą wydajnością niż w stanie PRE-P, jednak stopień inhibicji reakcji wiązania AA-tRNA do rybosomu jest ponad dwukrotnie mniejszy. Być może helisa h18 angażując się w wiązanie AA-tRNA do miejsca A wzmacnia oddziaływanie z cząsteczką mRNA w pozycjach +11 oraz +12 i dzięki temu dostęp do niej staje się utrudniony. Inhibicja reakcji wiązania AA-tRNA do miejsca A w rybosomach z obsadzonymi miejscami A i P, P oraz P i E przebiegła z podobną wydajnością (37% w stanie PRE-AP, 33% w stanie POST-P i 29% w stanie POST-PE). **mRNA w pozycjach +11 i +12 oraz fragment helisy h18 oddziałujący z mRNA w tych pozycjach znajdują się w podobnej konformacji po utworzeniu wiązania peptydowego i translokacji.**

### Oligonukleotydy #3 i #5

Oligonukleotydy #3 i #5 są komplementarne do dwóch różnych fragmentów domeny centralnej 18S rRNA, które oddziałują z ramieniem antykodonowym cząsteczek tRNA zajmujących miejsca P i E (Rysunek 44 oraz Tabela 11). Miejsce docelowe oligonukleotydu #3 jest odpowiedzialne za stabilizację cząsteczki tRNA poprzez następujące interakcje:



Wieloletni doświadczenia z wieloletnim doświadczeniem w dziedzinie otolaryngologii w 1997 roku  
wzrost w 2001 roku (28)



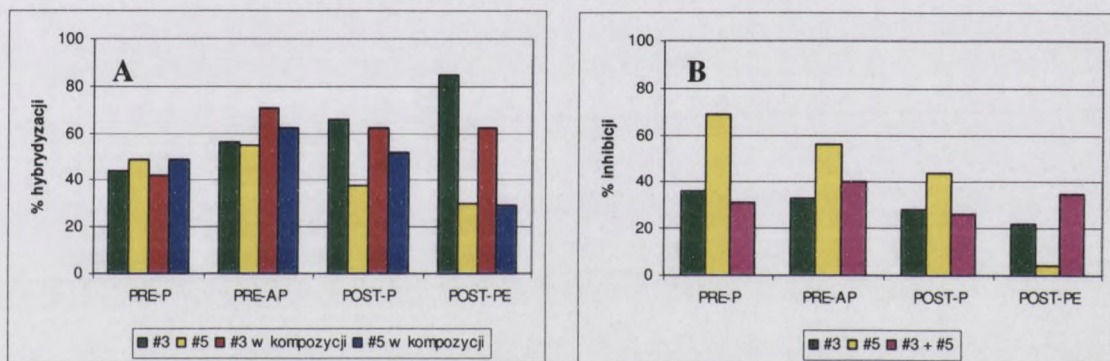
Rysunek 20. Porównanie zmian objętości błędnikowej (A) i zmiany objętości błędnikowej (B) w zależności od czasu trwania choroby.

Wskazano, że objętość błędnikowa jest istotnie większa w grupie z objętością błędnikową > 10 ml (p < 0,05).  
 Wynik ten jest zgodny z wcześniejszymi badaniami, które wykazały, że objętość błędnikowa jest istotnie większa  
 w grupie z objętością błędnikową > 10 ml (p < 0,05). Wynik ten jest zgodny z wcześniejszymi badaniami,  
 które wykazały, że objętość błędnikowa jest istotnie większa w grupie z objętością błędnikową > 10 ml  
 (p < 0,05). Wynik ten jest zgodny z wcześniejszymi badaniami, które wykazały, że objętość  
 błędnikowa jest istotnie większa w grupie z objętością błędnikową > 10 ml (p < 0,05).  
 Wynik ten jest zgodny z wcześniejszymi badaniami, które wykazały, że objętość błędnikowa  
 jest istotnie większa w grupie z objętością błędnikową > 10 ml (p < 0,05). Wynik ten jest  
 zgodny z wcześniejszymi badaniami, które wykazały, że objętość błędnikowa jest istotnie  
 większa w grupie z objętością błędnikową > 10 ml (p < 0,05). Wynik ten jest zgodny z  
 wcześniejszymi badaniami, które wykazały, że objętość błędnikowa jest istotnie większa  
 w grupie z objętością błędnikową > 10 ml (p < 0,05). Wynik ten jest zgodny z  
 wcześniejszymi badaniami, które wykazały, że objętość błędnikowa jest istotnie większa  
 w grupie z objętością błędnikową > 10 ml (p < 0,05).

### Ogólny wniosek

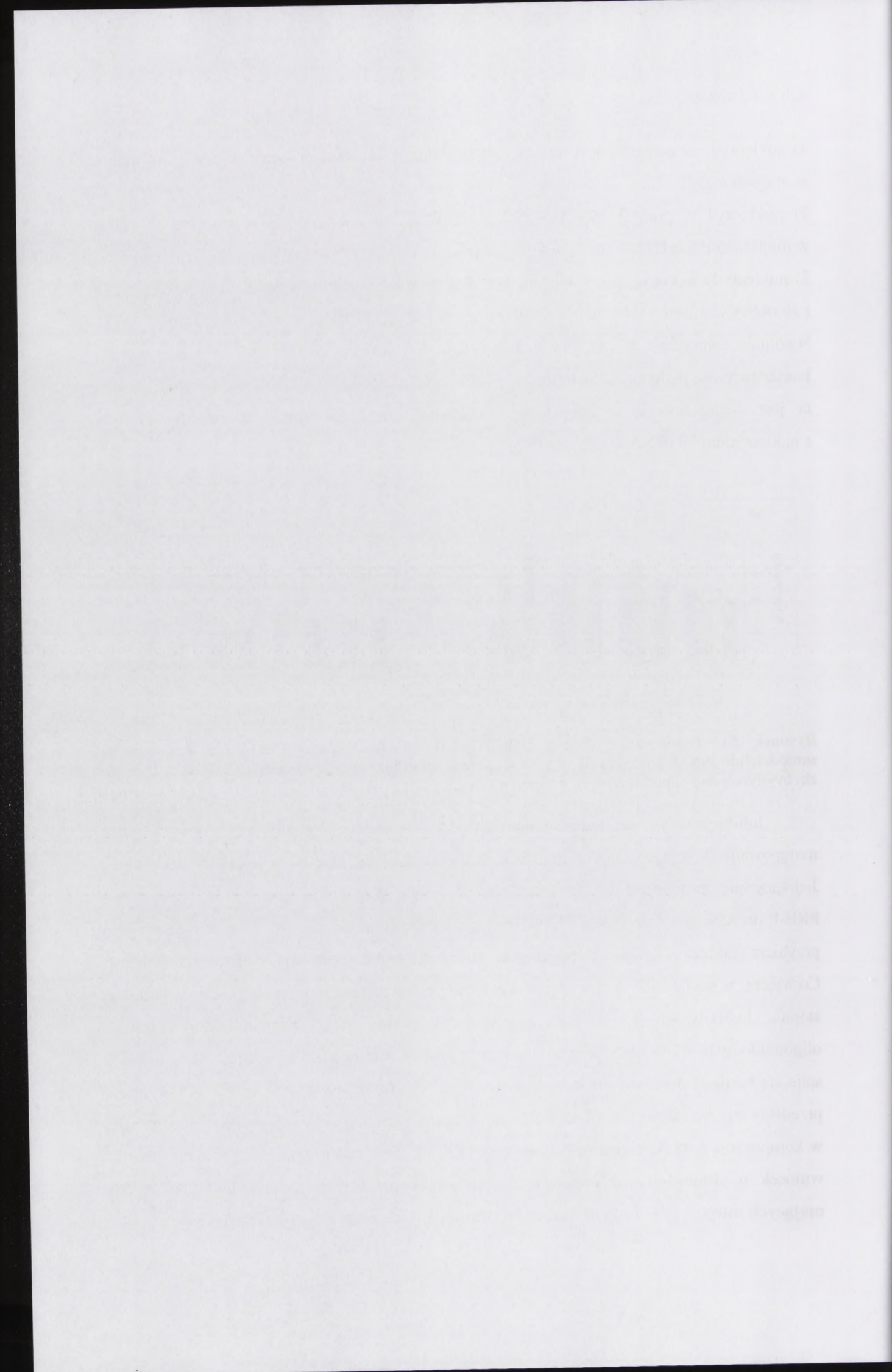
Ogólny wniosek z niniejszego badania jest taki, że objętość błędnikowa jest istotnie większa  
 w grupie z objętością błędnikową > 10 ml (p < 0,05). Wynik ten jest zgodny z  
 wcześniejszymi badaniami, które wykazały, że objętość błędnikowa jest istotnie większa  
 w grupie z objętością błędnikową > 10 ml (p < 0,05). Wynik ten jest zgodny z  
 wcześniejszymi badaniami, które wykazały, że objętość błędnikowa jest istotnie większa  
 w grupie z objętością błędnikową > 10 ml (p < 0,05). Wynik ten jest zgodny z  
 wcześniejszymi badaniami, które wykazały, że objętość błędnikowa jest istotnie większa  
 w grupie z objętością błędnikową > 10 ml (p < 0,05).

- 1) nukleotydy w pozycji 686 i 701 18S rRNA oddziałują z nukleotydem w pozycji 47 tRNA w miejscu P [38];
  - 2) nukleotyd w pozycji 693 18S rRNA oddziałuje z nukleotydem w pozycji 32 tRNA w miejscach P lub E [39] oraz z nukleotydem w pozycji 37 tRNA w miejscu E [5];
  - 3) nukleotydy w pozycjach 694 i 695 18S rRNA oddziałują z nukleotydami w pozycjach 38 i 39 tRNA w miejscu E [5] oraz z nukleotydem w pozycji 20 tRNA w miejscach A lub P [247].
- Natomiast miejsce, do którego zaprojektowałam oligonukleotyd #5 zawiera wysoce konserwatywną pętlę apikalną helisy h24 18S rRNA. Jak wykazały badania Yusupov'a, pętla ta jest zaangażowana w interakcje z nukleotydami 37-38 tRNA w miejscu E oraz z nukleotydem 39 tRNA w miejscu P [5].



**Rysunek 51. Porównanie stopnia hybrydyzacji oligonukleotydów #3 i #5 stosowanych samodzielnie lub w kompozycji (A), ze stopniem inhibicji reakcji wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup> przez zhybrydowane oligonukleotydy #3 lub/i #5 (B).**

Inhibicja wywołana przez oligonukleotyd #3 wahała się na poziomie 22-38% i w miarę następowania kolejnych etapów translacji, wykazywała tendencję do spadku (Rysunek 51B). Jednocześnie następował wzrost stopnia hybrydyzacji oligonukleotydu od 44 % w stanie PRE-P do 85% w stanie POST-PE. Najwidoczniej rybosom w badanym przez mnie miejscu przybiera podczas kolejnych podetapów translacji coraz bardziej otwartą konformację. Co więcej, w stanie PRE-AP, przy jednoczesnym przyłączeniu #5, obserwowałam zwiększenie stopnia hybrydyzacji #3 z 56% do 71% (Rysunek 51A). Najwidoczniej obecność oligonukleotydu #5 w układzie powoduje taką zmianę konformacji rybosomu, że helisa h23 staje się bardziej dostępna dla komplementarnego #3. Natomiast w stanie POST-PE sytuacja przedstawiała się odwrotnie. Obserwowałam wyraźny spadek hybrydyzacji oligonukleotydu #3 w kompozycji z #5 85% (sam oligonukleotyd #3) do 62% (mieszanka #3 i #5). **Nasuwa to wniosek o skumulowanych zmianach konformacyjnych helis h23 i h24 18S rRNA mających miejsce przed utworzeniem wiązania peptydowego oraz po translacji.**



Po uwolnieniu D-tRNA z miejsca E obserwowałam ponowne zamknięcie struktury rybosomu w badanym regionie, konieczne do związania cząsteczki AA-tRNA w miejscu A.

Zarówno dla samego oligonukleotydu #3, jak i w mieszaninie z #5, w stanie POST-P obserwowałam wysoki poziom hybrydyzacji (odpowiednio, 62% i 66%) i jednocześnie stosunkowo niski poziom inhibicji reakcji wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup> (odpowiednio, 26% i 28%). **Wydaje się, że po translatacji ramię antykodonowe cząsteczki tRNA zajmującej miejsce P (pozycje 32 i 47) lub E (pozycje 32, 37-39) nie jest ściśle związane z rybosomem w pozycjach 693-696 oraz 701. Co więcej, oddziaływanie to nie jest niezbędne dla związania cząsteczki tRNA w miejscu A.**

Wyniki hybrydyzacji oligonukleotydu #5 są następujące: w stanie pretranslokacyjnym oligonukleotyd lepiej hybrydyzuje gdy obsadzone są miejsca A i P, natomiast w stanie posttranslokacyjnym – gdy obsadzone jest tylko miejsce P. Takie same wyniki obserwowałam dla oligonukleotydu #5 podczas hybrydyzacji mieszaniny #3 + #5. Prawdopodobnie można tłumaczyć ten fakt większą dostępnością helisy h24 pod wpływem zmian konformacyjnych rybosomu. W stanie PRE-AP oligonukleotyd #5 hybrydyzuje z dużą wydajnością, sięgającą 55%, co świadczy o dostępności miejsca komplementarnego w 18S rRNA. W mieszaninie z oligonukleotydem #3, stopień hybrydyzacji #5 wynosił w tym stanie 62%. Najwidoczniej po przyłączeniu cząsteczki AA-tRNA do rybosomu, jednoczesna hybrydyzacja oligonukleotydu #3 do fragmentu h23 18S rRNA powoduje zwiększenie dostępności innego fragmentu domeny centralnej, helisy h24. Wynika z tego również, że łożdga antykodonowa tRNA zajmującego miejsce P (pozycja 39) lub E (pozycje 37 i 38) nie musi oddziaływać z rybosomem przed utworzeniem wiązania peptydowego. Jednak wysoki procent inhibicji reakcji wiązania pod wpływem zhybrydowanego oligonukleotydu #5 świadczy o tym, że aby zaszła reakcja, **niezbędne jest oddziaływanie łożdgi antykodonowej tRNA w miejscach P i E z pętlą apikalną helisy h24.**

W stanie posttranslokacyjnym POST-P zaobserwowałam, że hybrydyzacja oligonukleotydu #5 w mieszaninie z #3 jest na wyższym poziomie niż samego #5. Świadczy to o skumulowanych zmianach konformacji rybosomu w obrębie helis h23 i h24 po utworzeniu wiązania peptydowego i translatacji. Natomiast bardzo mały procent inhibicji w stanie POST-PE (4% inhibicji) potwierdza rolę miejsca E w tworzeniu odpowiedniej konformacji rybosomu. W kompozycji 2 obserwowałam inhibicję w tym stanie wynoszącą 35%, jednak jest ona zapewne spowodowana jednoczesnym działaniem oligonukleotydu #3 (inhibicja powodowana przez sam #3 wynosiła w stanie POST-PE 22%).

To dowodzi, że D-RNA z regionu I uczestniczy w procesie inicjacji transkrypcji w celu wytworzenia kompleksu AA-RNA w miejscu A.

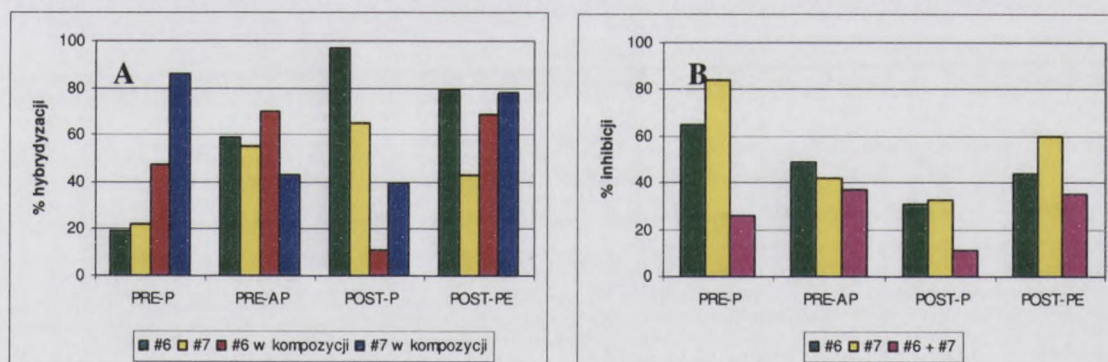
W celu dowiedzenia się, czy D-RNA jest potrzebna do inicjacji transkrypcji, przeprowadzono eksperymenty z użyciem mieszanek 1:1 i 1:2 D-RNA i RNA polimerazy. Wyniki dowiodły, że D-RNA jest niezbędna do inicjacji transkrypcji i że jej obecność jest warunkiem koniecznym do rozpoczęcia syntezy RNA.

W celu dowiedzenia się, czy D-RNA jest potrzebna do inicjacji transkrypcji, przeprowadzono eksperymenty z użyciem mieszanek 1:1 i 1:2 D-RNA i RNA polimerazy. Wyniki dowiodły, że D-RNA jest niezbędna do inicjacji transkrypcji i że jej obecność jest warunkiem koniecznym do rozpoczęcia syntezy RNA.

W celu dowiedzenia się, czy D-RNA jest potrzebna do inicjacji transkrypcji, przeprowadzono eksperymenty z użyciem mieszanek 1:1 i 1:2 D-RNA i RNA polimerazy. Wyniki dowiodły, że D-RNA jest niezbędna do inicjacji transkrypcji i że jej obecność jest warunkiem koniecznym do rozpoczęcia syntezy RNA.

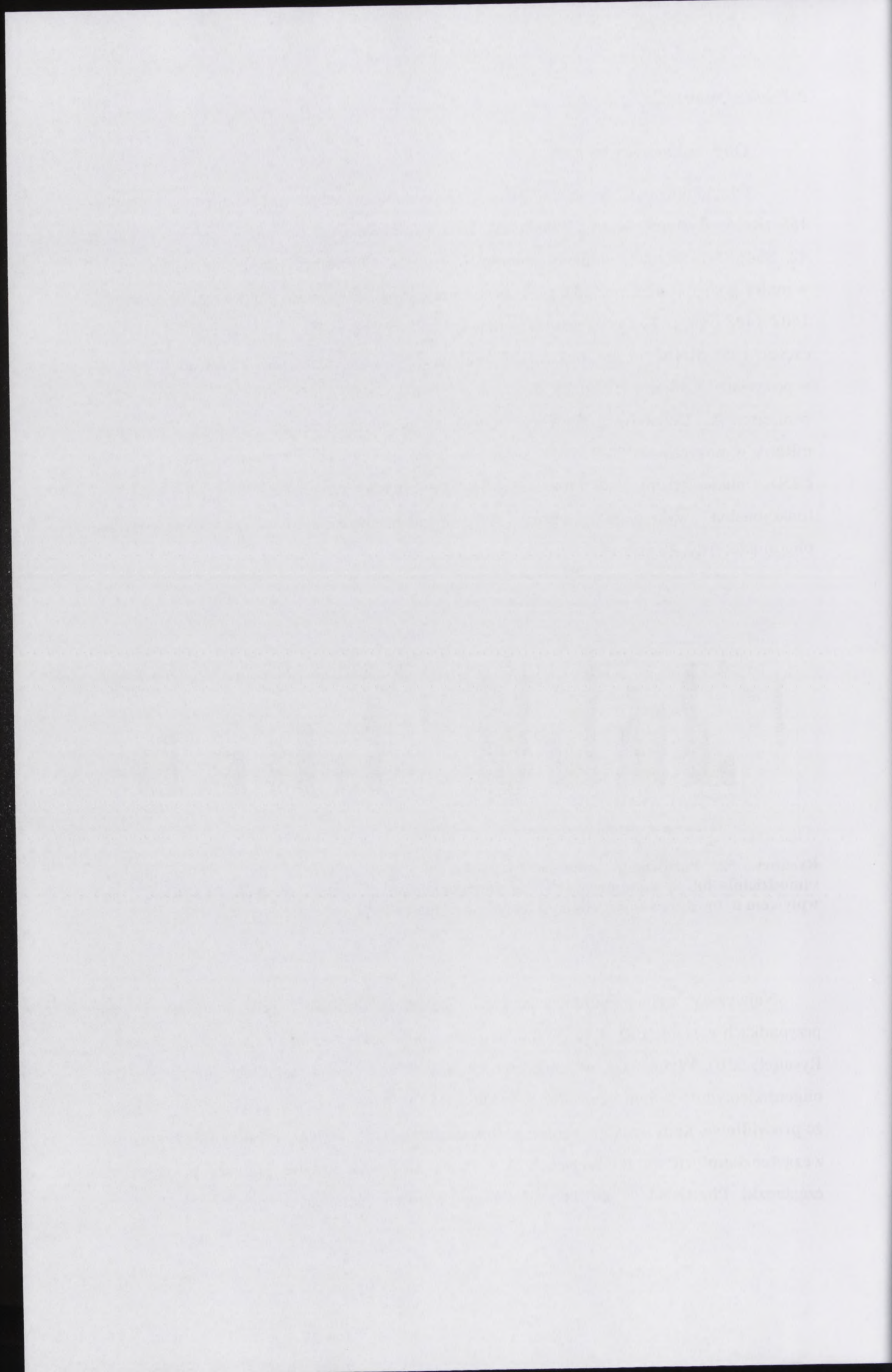
### Oligonukleotydy #6 i #7

Oligonukleotydy #6 oraz #7 zostały zaprojektowane względem fragmentów helisy h44 18S rRNA (Rysunek 44 oraz Tabela 11), które tworzą centrum dekodujące rybosomu [2, 30, 42, 254]. Ten fragment domeny 3' *minor* 18S rRNA, tworzący rybosomalne miejsca A i P w małej podjednostce, posiada wysoce konserwatywną sekwencję. Nukleotydy w pozycjach 1402-1408 oraz 1492-1498 charakteryzują się konserwatywnością wynoszącą 98% [22]. W tej części 18S rRNA, liczne nukleotydy oddziałują z cząsteczką tRNA. Są to nukleotydy w pozycjach: C1400 i U1498 (z tRNA w miejscu P) oraz A1492, A1493, G1494 (z tRNA w miejscu A). Dodatkowo, nukleotyd A1402 jest odpowiedzialny za interakcje z cząsteczką mRNA w pozycji +4 [247]. Para zasad w pozycjach 1428-1472 18S rRNA tworzy mostek eB5b z nukleotydami 1689-1704 helisy H62 26S rRNA. Ze względu na ogromną ważność funkcjonalną wybranego miejsca, zdecydowałam zaprojektować dwa antysensowe oligonukleotydy, #6 oraz #7.



Rysunek 52. Porównanie stopnia hybrydyzacji oligonukleotydów #6 i #7 stosowanych samodzielnie lub w kompozycji (A), ze stopniem inhibicji reakcji wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup> pod wpływem hybrydizowanych oligonukleotydów #6 lub/i #7 (B).

Najwyższy stopień inhibicji reakcji wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup> obserwowałam w obu przypadkach w stanie PRE-P (65% inhibicji przez oligonukleotyd #6 i 84% inhibicji przez #7; Rysunek 52B). Wynik taki, w połączeniu ze stosunkowo niskim stopniem hybrydyzacji obu oligonukleotydów w tym stanie (odpowiednio, 19% i 22%; Rysunek 52A) nasuwa wniosek, że prawidłowa konformacja centrum dekodującego 18S rRNA, a także oddziaływania z cząsteczkami tRNA w miejscach A i P, są niezwykle ważne podczas przyłączania cząsteczki Phe-tRNA<sup>Phe</sup> do rybosomalnego miejsca A. Wysoki wynik inhibicji może

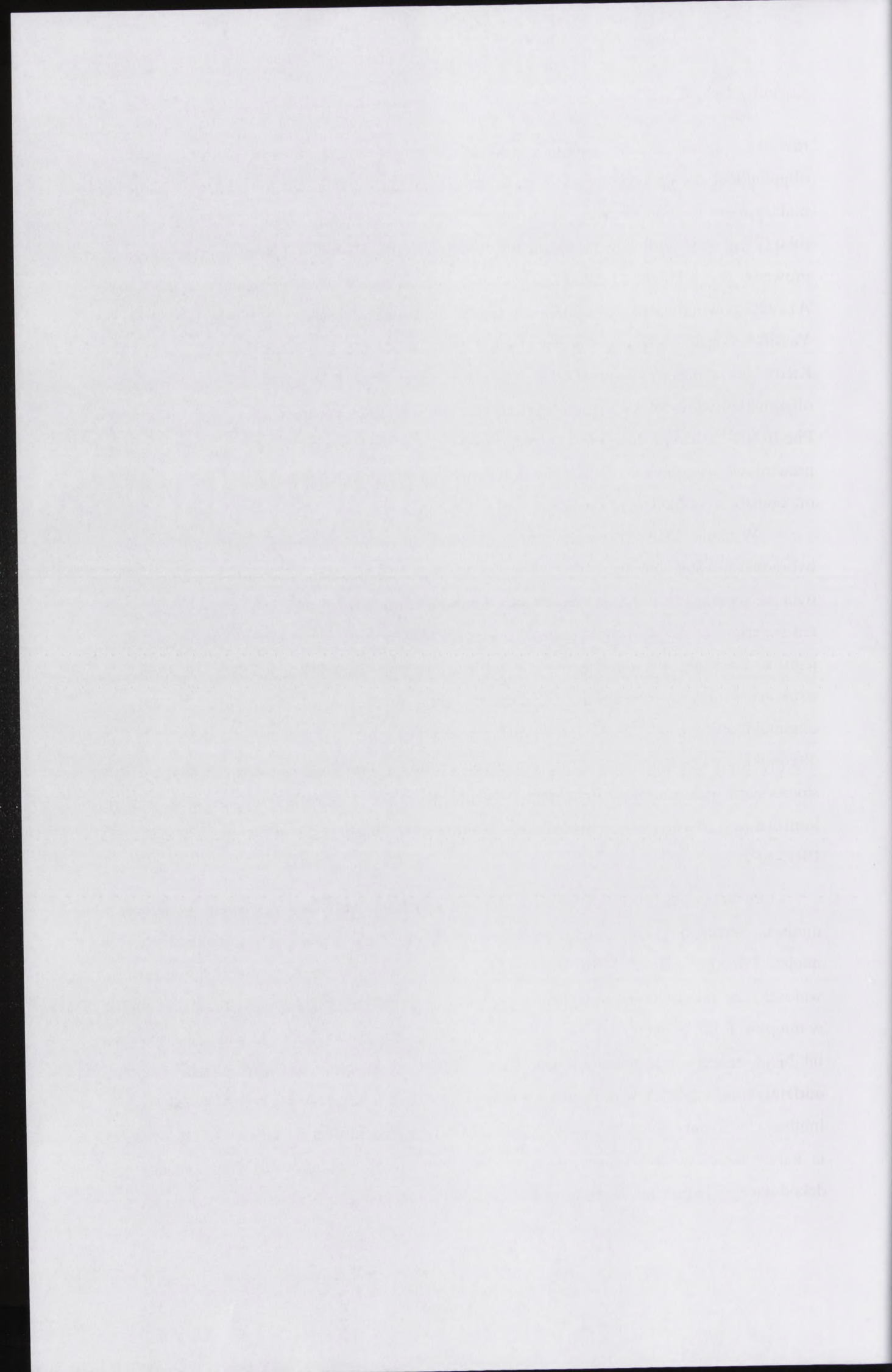


również sugerować, że centrum dekodujące zostało zablokowane przez antysensowy oligonukleotyd i reakcja translacji nie może zachodzić. Rezultat ten jest zgodny z badaniami mutacyjnymi przeprowadzonymi w rybosomach *E. coli* przez Abdi i Fredricka w 2005 roku [255]. Wykazali oni, że każda substytucja pozycji A1492 w rybosomalnym miejscu A prowadzi do całkowitego zahamowania procesu translacji. Co więcej, mutacje A1493U oraz A1493G powodowały ponad 20-krotny spadek aktywności translacyjnej rybosomów. Ponadto, Yassin wykazał, że mutacje w pozycjach 1406 i 1494 są letalne w przypadku *E. coli* [253]. Kiedy do rybosomów przekształconych do stanu PRE-P hybrydowałam mieszaninę oligonukleotydów #6 i #7, nie obserwowałam wysokiego poziomu inhibicji reakcji wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup>. Moim zdaniem konieczna była zmiana konformacji rybosomu, umożliwiająca prawidłowe usytuowanie substratów do utworzenia wiązania peptydowego w miejscach A i P oraz odsłonięcie nukleotydu w pozycji A1493.

W stanie PRE-AP pomimo, że obserwowałam wyższą zdolność oligonukleotydów do hybrydyzacji (59% dla #6, 55% dla #7), inhibicja reakcji wiązania przez nie powodowana nie była tak wysoka jak w stanie PRE-P (49% inhibicji przez 36 oraz 42% inhibicji przez #7). Fakt ten sugeruje, że przyłączenie cząsteczki AA-tRNA do miejsca A rybosomu powoduje zmianę jego konformacji i „rozluźnienie” w regionie centrum dekodującego 40S. Rozluźnienie struktury w obrębie centrum dekodującego dowodzą również wyniki hybrydyzacji kompozycji oligonukleotydów #6 i #7. Obserwowana przeze mnie hybrydyzacja każdego z tych oligonukleotydów była na znacznie wyższym poziomie (nawet do 64% różnicy), kiedy a-DNA stosowałam jednocześnie. **Fakt ten sugeruje wyraźne i skorelowane ze sobą zmiany konformacji dwóch przeciwbieżnych fragmentów helisy h44 w stanie PRE-P oraz PRE-AP.**

Po translokacji obserwowałam dalsze otwieranie struktury rybosomu w badanym miejscu, wyrażone jako zwiększoną dostępność oligonukleotydów do komplementarnych miejsc. Ponadto, niemal 100% hybrydyzacja oligonukleotydu #6 w stanie POST-P nasuwa wniosek, że po utworzeniu wiązania peptydowego, mRNA w pozycji +4 a także tRNA w miejscu P w pozycji 34, nie muszą oddziaływać z rybosomem. Jednak obserwowana inhibicja reakcji wiązania w tym stanie świadczy o tym, że **aby zaszła reakcja, oddziaływania mRNA w pozycji +4 a także tRNA w miejscu P w pozycji 34 są niezbędne.** Inhibicja wiązania tRNA zachodzi w stanie POST- z wydajnością 31-60%, stąd też wniosek, iż najwyraźniej po hybrydyzacji oligonukleotydów zostaje zablokowany fragment centrum dekodującego, jednak nadal możliwe jest częściowe wiązanie tRNA do miejsca A. Fakt ten jest





zgodny z badaniami Abdi i Fredricka, które wskazują, że miejsce P w podjednostce 30S wykazuje większą tolerancję na zmiany mutacyjne niż miejsce A [255].

W stanie POST-P obserwowałam, że wydajność hybrydyzacji a-DNA #6 i #7 stosowanych samodzielnie, znacznie przewyższa hybrydyzację obu oligonukleotydów w kompozycji. Moim zdaniem, przyłączenie jednego z a-DNA do rybosomu z AA-tRNA w miejscu P powoduje osłabienie oddziaływań rybosomu w jednym fragmencie centrum dekodującego z czynnikami biorącymi udział w translacji i jednocześnie wzmocnienie innych oddziaływań w innym miejscu centrum dekodowania. W rezultacie, struktura rybosomu ulega zacieśnieniu i miejsca w 18S rRNA, do których komplementarne są a-DNA, nie są dostępne dla hybrydyzacji.

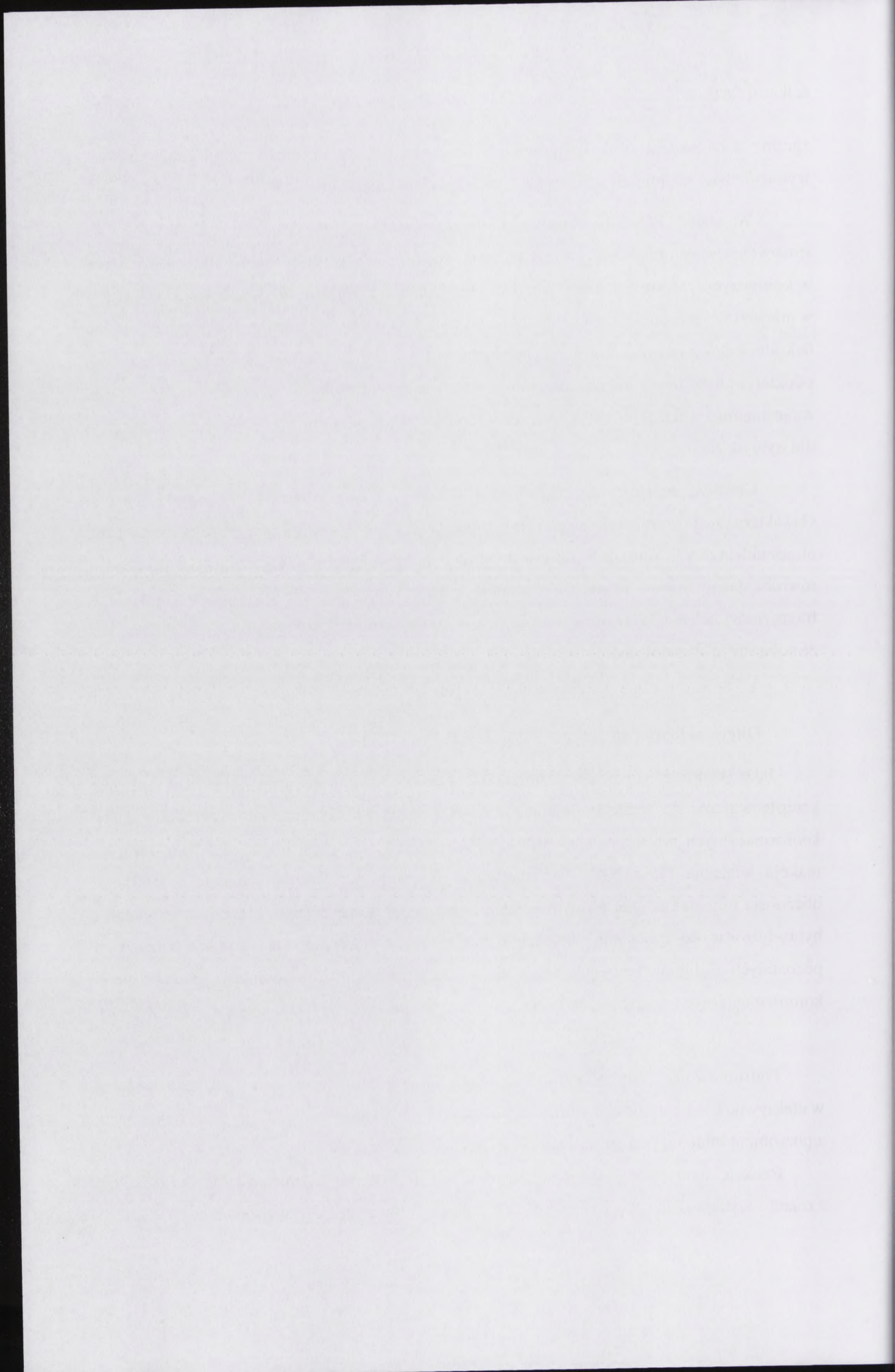
Ciekawą sytuację obserwowałam również w stanie POST-PE. Oligonukleotyd #6 charakteryzował się niższym stopniem hybrydyzacji, kiedy w kompozycji obecny był również oligonukleotyd #7. Natomiast przeciwna sytuacja miała miejsce dla oligonukleotydu #7. Jest to również jasny dowód na to, że dynamika przestrzenna ułożenia dwóch przeciwbieżnych fragmentów helisy h44, tworzących centrum dekodujące małej podjednostki rybosomalnej, jest ze sobą ściśle skorelowana.

### Oligonukleotyd #8

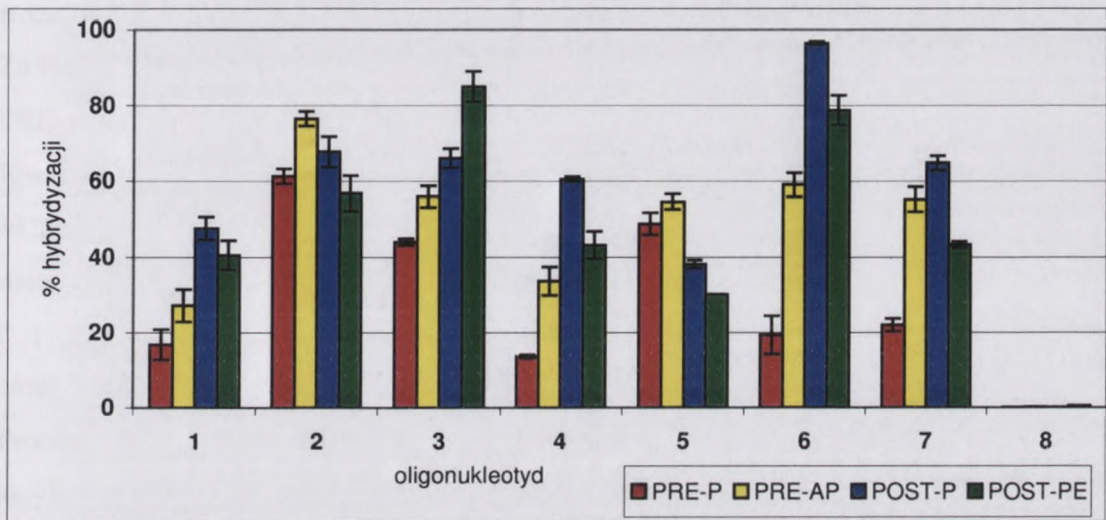
Jako kontrolę stosowałam oligonukleotyd #8, ponieważ jego sekwencja nie jest komplementarna do żadnego fragmentu rRNA (Tabela 11). Niemal we wszystkich stanach konformacyjnych rybosomu nie obserwowałam hybrydyzacji tego oligonukleotydu. Fakt, że reakcja wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup> do miejsca A w rybosomie zachodzi niemal w 100% w obecności oligonukleotydu #8 w mieszaninie reakcyjnej dowodzi tego, że nie jest on w stanie hybrydyzować do rybosomu. Zakładałam zatem, że obserwowana hybrydyzacja wszystkich pozostałych oligonukleotydów zachodzi specyficznie do wybranych przeze mnie komplementarnych miejsc w 18S rRNA.

Podsumowując, wykorzystując strategię antysensu, wykazałam wyraźne różnice w efektywności hybrydyzacji poszczególnych oligonukleotydów oraz jej ścisłą korelację z poziomem inhibicji reakcji wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup> do rybosomów.

Reakcje hybrydyzacji oligonukleotydów do wybranych fragmentów rRNA zachodzą z różną wydajnością w zależności od miejsca obsadzenia rybosomu przez tRNA.



Oligonukleotydy hybrydują z najwyższą efektywnością do rybosomów znajdujących się w stanie pretranslokacyjnym z obsadzonymi miejscami A i P (stan PRE-AP) lub w stanie post-translokacyjnym z obsadzonym miejscem P (stan POST-P, Rysunek 53).



**Rysunek 53. Procent hybrydyzacji oligonukleotydów do rybosomu.**

Rezultaty obarczone są odchyleniem standardowym ( $\pm 3\%$ ) z trzech niezależnych eksperymentów.

Sytuację tę można wyjaśnić różną dostępnością miejsc komplementarnych dla oligonukleotydów pod wpływem zmian konformacyjnych rybosomu. Rybosom z obsadzonym miejscem P przez tRNA<sup>Phe</sup> znajduje się w stanie pretranslokacyjnym, jednak niepełnym. Obserwowałam przyłączanie oligodeoksynukleotydów do komplementarnych sekwencji w 18S rRNA w rybosomie na wysokim poziomie w kilku przypadkach. Przyłączenie to było możliwe, gdyż następujące miejsca w rybosomie są w tym stanie udostępniane dla a-DNA: helisy h18, h23 i h24 18S rRNA. Jednak w porównaniu ze stanem posttranslokacyjnym z obsadzonymi miejscami P i E, który w moich badaniach jest ostatnim etapem cyklu elongacyjnego, obserwowałam wyraźnie zamykanie struktury małej podjednostki w obrębie helis h13, h18, h23 i h44. Wyniki te są potwierdzeniem i uzupełnieniem badań Ogle i współpracowników, którzy wykazali, że aby możliwe było związanie cząsteczki AA-tRNA do miejsca A, konieczne jest zamknięcie się struktury 30S w regionie helisy h44. Towarzyszą temu globalne zmiany małej podjednostki. Wierzchołek ulega rotacji w kierunku ramienia (pozycje te zajmują białka S14, S12 oraz region otaczający funkcjonalnie ważny nukleotyd w pozycji 530). Natomiast ramię, a wraz z nim h13, przesuwa się w kierunku regionu h44/h27 w obrębie platformy powodując w ten sposób zacieśnienie struktury rybosomu w tym regionie.



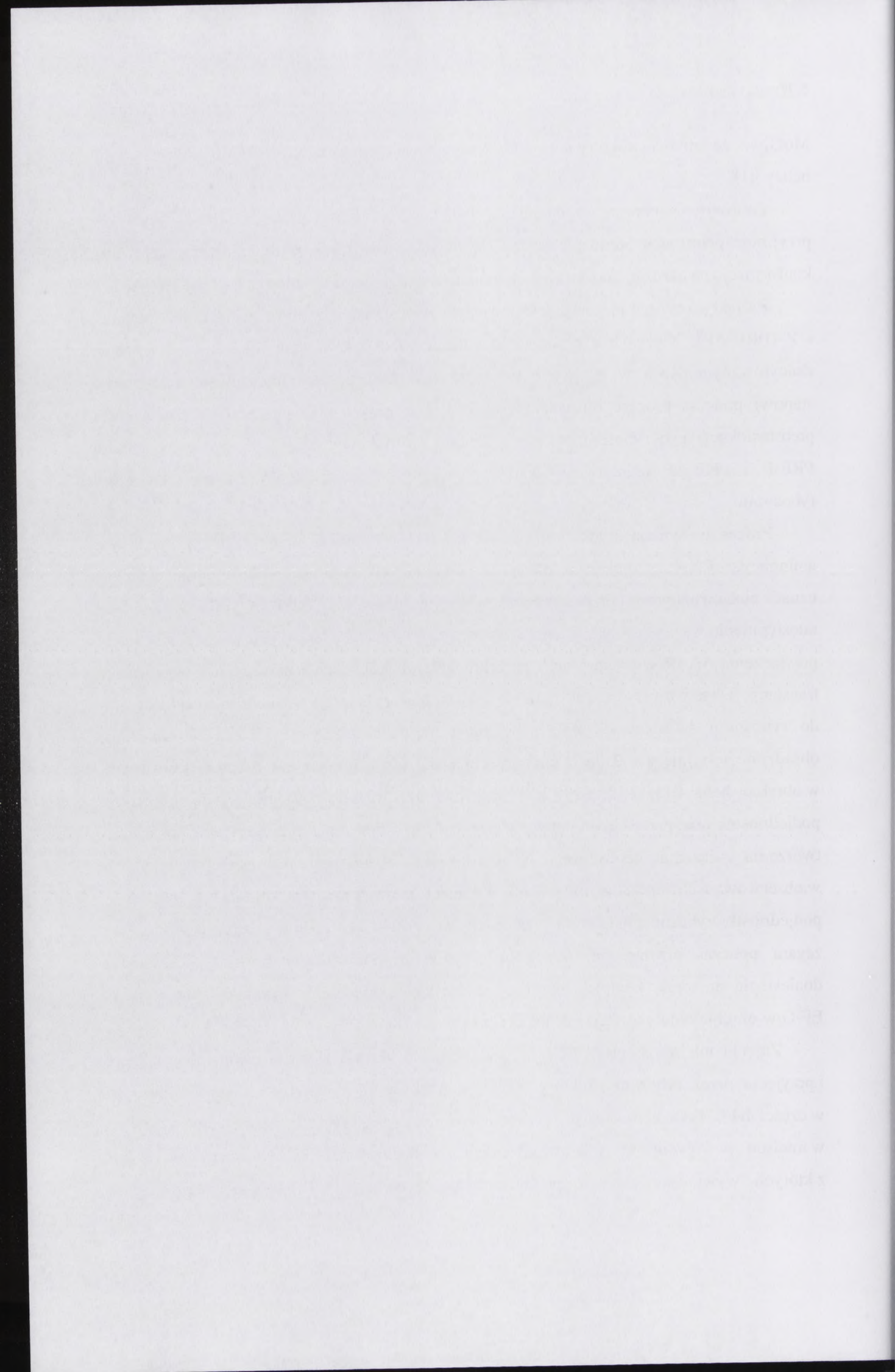
Możliwe, że zmiana struktury helis h27 i h44 wpływa również na ułożenie sąsiadującej z nimi helisy h18.

Zaobserwowałam, że po obsadzeniu dodatkowo miejsca A przez Phe-tRNA<sup>Phe</sup> rybosom przyjmuje pełny stan pretranslokacyjny i w wyniku rearanżacji strukturalnych zmienia swą konformację na bardziej „otwartą” w obrębie helis h13, h18, h23, h24 oraz h44 18S rRNA.

Za faktyczny stan pretranslokacyjny należy więc uznać rybosom z zajętymi miejscami A i P (PRE-AP). Nieenzymatyczne przekształcenie rybosomu w stan PRE- z przyłączonym deacylowanym tRNA w miejscu P nie odpowiada żadnemu fizjologicznie występującemu stanowi podczas procesu biosyntezy białka. Jest to jednak etap pośredni uzyskania stanu pretranslokacyjnego rybosomu *in vitro*. Zmiany hybrydyzacji oligonukleotydów w stanach PRE-P i PRE-AP umożliwiają analizę potencjalnych zmian konformacyjnych struktury rybosomu.

Proces biosyntezy białka rozpoczyna się od dostarczenia przez czynniki inicjacyjne aminoacylo-tRNA w miejsce P, dlatego za odpowiednik konformacyjny tego stanu można uznać nieenzymatyczne przekształcenie rybosomu w stan POST-P. Wynikiem tego jest udostępnienie ważnych funkcjonalnie sekwencji rRNA, co świadczy o gotowości rybosomu do przyłączenia AA-tRNA w miejscu A i przeprowadzenia kolejnych etapów cyklu elongacyjnego translacji. Obserwowany przeze mnie wysoki stopień hybrydyzacji oligodeoksynukleotydów do rybosomu świadczy o tym, że w stanie post-translokacyjnym, kiedy w rybosomie obsadzone jest miejsce P, jego konformacja nadal utrzymywana jest w stanie „otwartym” w obrębie helis h13, h18, h23, h24 oraz h44 18S rRNA. Nastąpiła wzajemna rotacja podjednostek oraz przejście do mniej zwartej struktury rybosomu, która utrzymuje się podczas tworzenia wiązania peptydowego i translokacji. Wynik ten ma swoje uzasadnienie w obserwowanych z pomocą mikroskopii krioelektronowej zmianach konformacyjnych małej podjednostki rybosomalnej, która przesuwała się o 3-10 Å zgodnie z ruchem wskazówek zegara podczas przyłączania AA-tRNA. Wyniki te potwierdzają również wcześniejsze doniesienia na temat kompleksowych rearanżacji po przyłączeniu czynnika elongacyjnego EF-G w obrębie tunelu wejścia mRNA [145, 149].

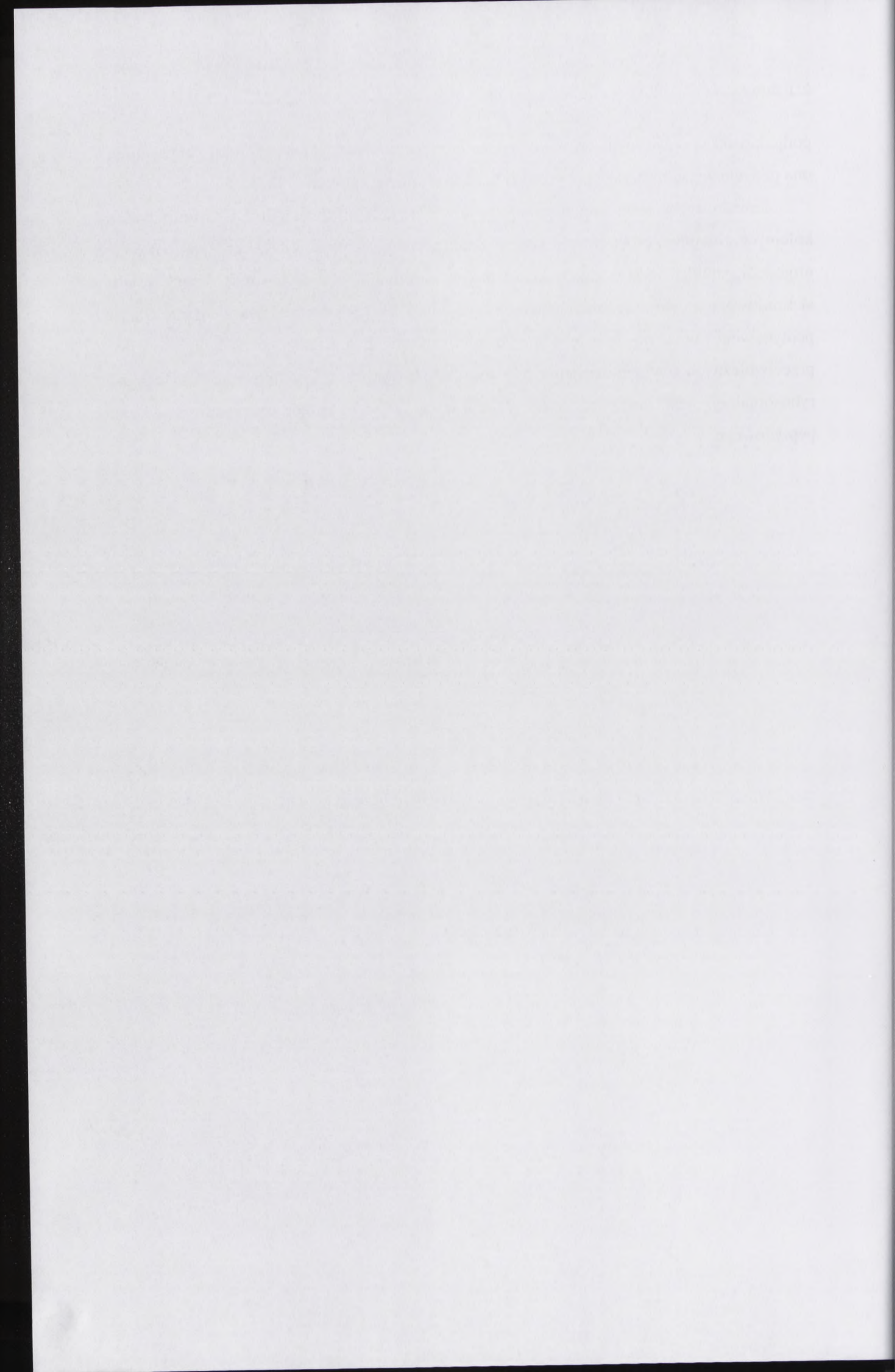
Zajęcie miejsca E przez tRNA<sup>Phe</sup> jest sygnałem do zakończenia cyklu elongacyjnego i przyjęcia przez rybosom struktury bardziej „zamkniętej” w obrębie helis h13, h24 oraz w części h44. Taka konformacja rybosomu uniemożliwia przyłączenie kolejnego AA-tRNA w miejscu A. Wyniki te są potwierdzeniem i uzupełnieniem dla wcześniejszych badań, z których wywnioskowano, że po uwolnieniu czynnika EF-G następuje rotacja małej



podjednostki w odwrotnym kierunku niż w stanie pretranslokacyjnym, wskutek czego zajmuje ona pozycję wyjściową, taką jak przed zmianami konformacyjnymi [145, 149].

Ponadto wykazałam istnienie skorelowanych zmian konformacyjnych rybosomu podczas kolejnych etapów procesu biosyntezy białka, przy użyciu mieszanin antysensowych oligodeoksynukleotydów. Zgodnie z moimi wynikami, w rybosomie mają miejsce skumulowane zmiany konformacyjne helisy h23 i h24 18S rRNA przed utworzeniem wiązania peptydowego oraz po translokacji. Ponadto, dynamika ułożenia przestrzennego dwóch przeciwbieżnych fragmentów helisy h44 tworzących centrum dekodujące małej podjednostki rybosomalnej, jest ze sobą ściśle skorelowana jeszcze przed utworzeniem wiązania peptydowego.





### **6.5.2 Zastosowanie cząsteczek mini- tRNA oraz oligonukleotydów antysensowych komplementarnych do wybranych fragmentów 26S rRNA.**

W celu określenia zmian konformacyjnych zachodzących w rybosomie roślinnym podczas biosyntezy białka, zastosowałam 9 antysensowych oligodeoksyrybonukleotydów (a-DNA) komplementarnych do wysoce konserwatywnych sekwencji w 26S rRNA dużej podjednostki rybosomalnej *Lupinus luteus* oraz 3 cząsteczki mini-tRNA.

- **Konserwatywność 26S rRNA**

Dane na temat konserwatywności 26S rRNA zaczerpnęłam z bazy danych sekwencji i struktur RNA *Comparative RNA Web Site* [22]. Stopień konserwatywności nukleotydów dużej podjednostki rybosomalnej opracowany został na podstawie analizy 585 sekwencji, w tym 431 sekwencji bakteryjnych, 39 sekwencji archebakteryjnych i 115 sekwencji eukariotycznych. Podczas projektowania antysensowych oligonukleotydów korzystałam ze struktury II-rzędowej *Oryza sativa* (struktura pobrana z [22], numer M11585m), ponieważ struktura 26S rRNA *L. luteus* pozostaje nierozwiązana. Wybór *O. sativa* jako struktury referencyjnej podyktowany był faktem, iż spośród 6 organizmów eukariotycznych, których struktury II-rzędowe 26S rRNA zdeponowane są w bazie danych *Comparative RNA Web Site*, *O. sativa* jest najbardziej zbliżona filogenetycznie do *L. luteus*. Pełną systematykę *O. sativa* i *L. luteus* przedstawiłam w Tabeli 18.

### 3.1.1. Charakterystyka struktury i funkcji RNA

W celu określenia struktury i funkcji RNA, konieczne jest zbadanie jej roli w procesie życia. W tym celu należy przeanalizować jej rolę w procesie życia, w szczególności w procesie przekazywania informacji genetycznej. W tym celu należy przeanalizować jej rolę w procesie życia, w szczególności w procesie przekazywania informacji genetycznej.

#### 3.1.1.1. Charakterystyka struktury i funkcji RNA

RNA jest cząsteczką biologiczną, która pełni rolę w procesie przekazywania informacji genetycznej. Jest to cząsteczka, która jest syntetyzowana w procesie transkrypcji DNA. Jej struktura jest zmienną, co umożliwia jej wykonywanie różnych funkcji. W tym celu należy przeanalizować jej rolę w procesie życia, w szczególności w procesie przekazywania informacji genetycznej.

Domena	Eukaryota	Eukaryota
Królestwo	Viridiplantae	Viridiplantae
Nadgromada	Spermatophyta	Spermatophyta
Gromada	Magnoliophyta	Magnoliophyta
Podgromada	Magnoliophytina	Magnoliophytina
Klasa	Rosopsida	Liliopsida
Podklasa	Rosidae	Commelinidae
Nadrząd	Fabanae	Juncanae
Rząd	Fabales	Poales
Rodzina	Leguminosae	Poaceae
Podrodzina	Papilionoideae	Ehrhartoideae
Plemię	Genisteae	Oryzeae
Rodzaj	Lupinus	Oryza
Gatunek	<i>Lupinus luteus</i>	<i>Oryza sativa</i>

Tabela 18. Klasyfikacja taksonomiczna *Lupinus luteus* oraz *Oryza sativa* według Reveala [243].

Aby antysensowe oligomery, zaprojektowane jako komplementarne względem sekwencji 26S rRNA *O. sativa*, były specyficzne i funkcjonalne również w układzie *L. luteus*, docelowe sekwencje rRNA muszą być wysoce konserwatywne we wszystkich organizmach. W celu zweryfikowania konserwatywności nukleotydów RNA dużej podjednostki rybosomalnej, przygotowałam diagram zachowawczości 26S rRNA. W tym celu na strukturę II-rzędową 26S rRNA *O. sativa* naniosłam nukleotydy konserwatywne w trzech domenach organizmów żywych (*Archaea*, (*eu*)*Bacteria*, *Eucarya*; według [244]). Korzystałam z istniejącego diagramu konserwatywności 23S rRNA *E. coli* (struktura pobrana z [22], numer J01695). Wyróżniłam cztery zakresy konserwatywności nukleotydów 26S rRNA: poniżej 80%; 80-90%; 90-98% oraz 98% i więcej konserwatywności. Lokalizację nukleotydów konserwatywnych przedstawiłam w strukturze II-rzędowej 26S rRNA *Oryza sativa* (struktura pobrana z [22], numer M11585m) oraz w strukturze trzeciorzędowej 23S rRNA *Haloarcula marismortui* (struktura utworzona na podstawie [23], numer 1FFK;) na Rysunkach 54-56.

1990	100
1991	105
1992	110
1993	115
1994	120
1995	125
1996	130
1997	135
1998	140
1999	145
2000	150
2001	155
2002	160
2003	165
2004	170
2005	175
2006	180
2007	185
2008	190
2009	195
2010	200
2011	205
2012	210
2013	215
2014	220
2015	225
2016	230
2017	235
2018	240
2019	245
2020	250
2021	255
2022	260
2023	265
2024	270
2025	275
2026	280
2027	285
2028	290
2029	295
2030	300

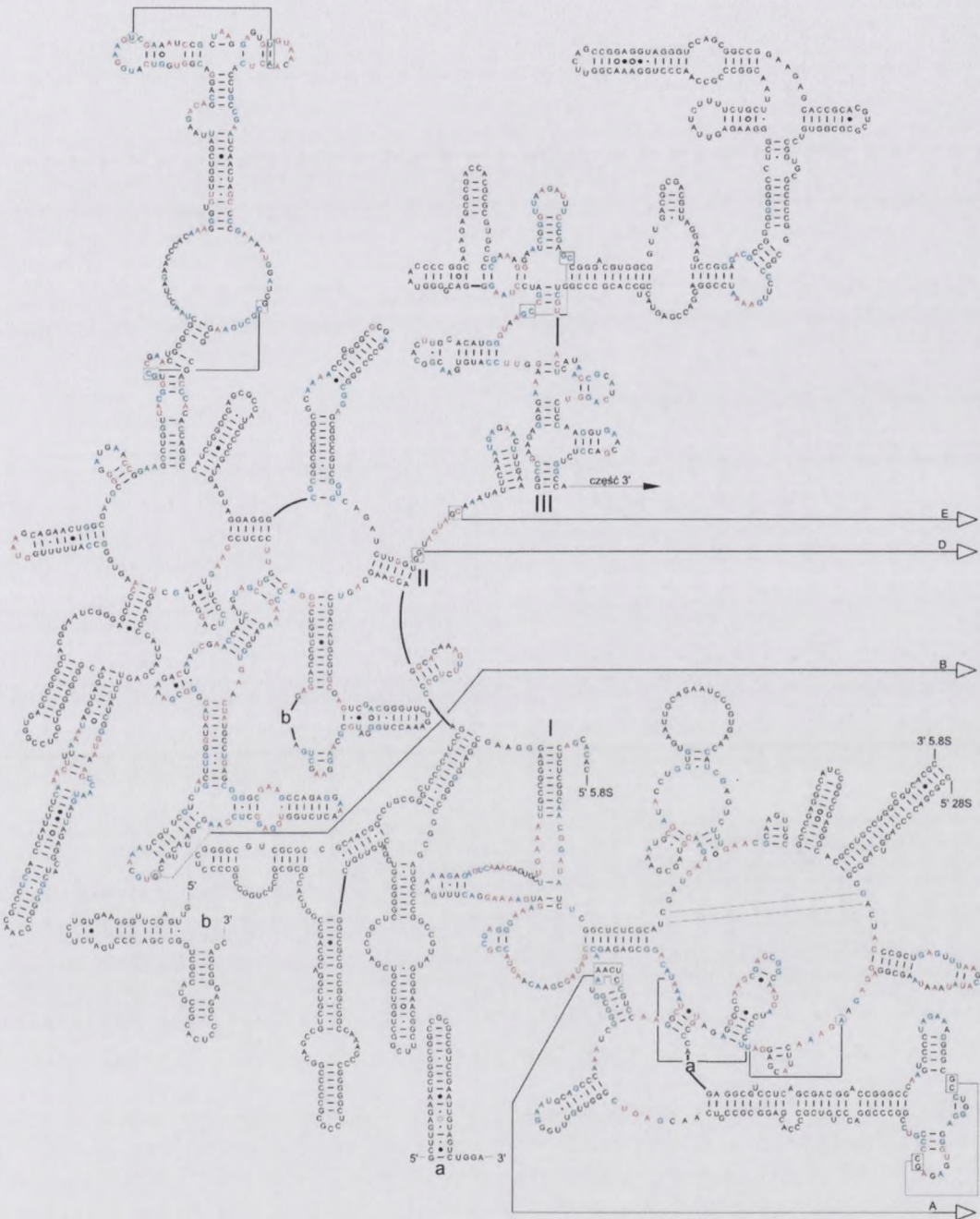
This table shows the projected population growth from 1990 to 2030. The population is expected to increase steadily over the period, starting at 100 million in 1990 and reaching 300 million by 2030. The growth rate is constant at 1% per year.

Table 1: Projected Population Growth (1990-2030)

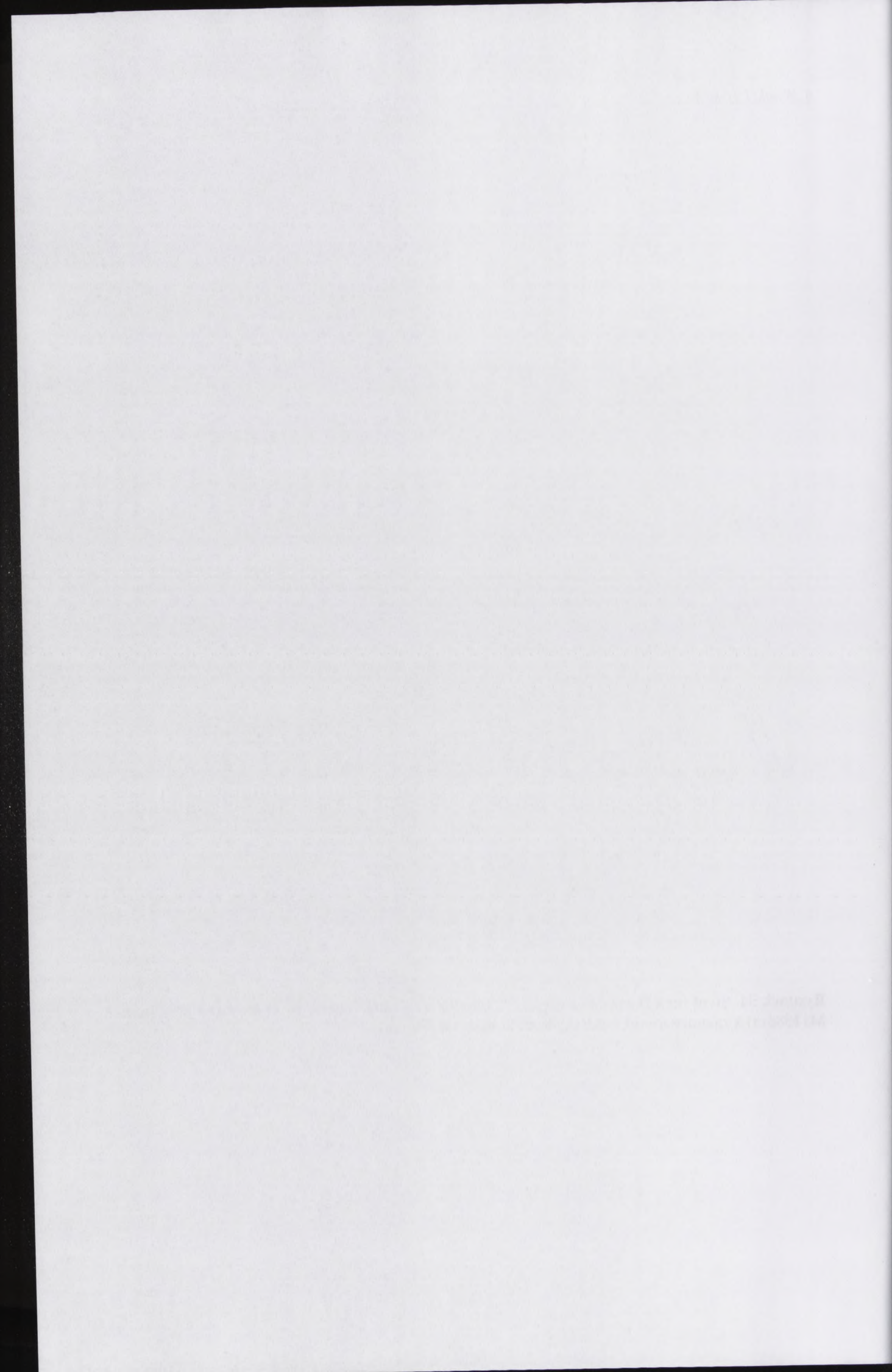
The following table provides a detailed breakdown of the population growth projections. The population starts at 100 million in 1990 and increases to 300 million by 2030. The growth rate is constant at 1% per year.

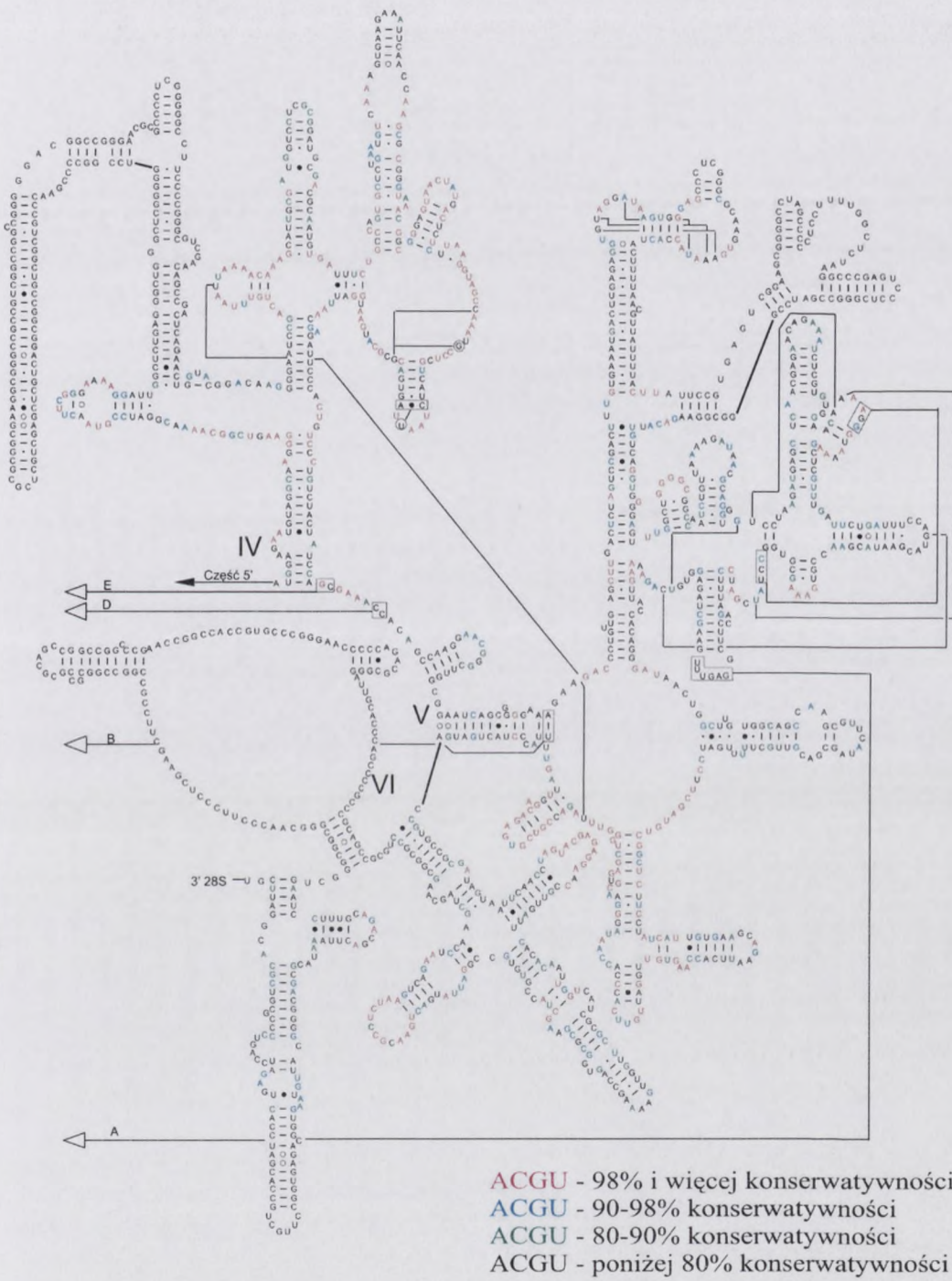
Year: 1990, 1991, 1992, 1993, 1994, 1995, 1996, 1997, 1998, 1999, 2000, 2001, 2002, 2003, 2004, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020, 2021, 2022, 2023, 2024, 2025, 2026, 2027, 2028, 2029, 2030

Population (Millions): 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300



Rysunek 54. Struktura II-rzędowa części 5' 26S rRNA *O. sativa* (struktura pobrana z [22], numer M11585m) z zaznaczonymi nukleotydami konserwatywnymi.





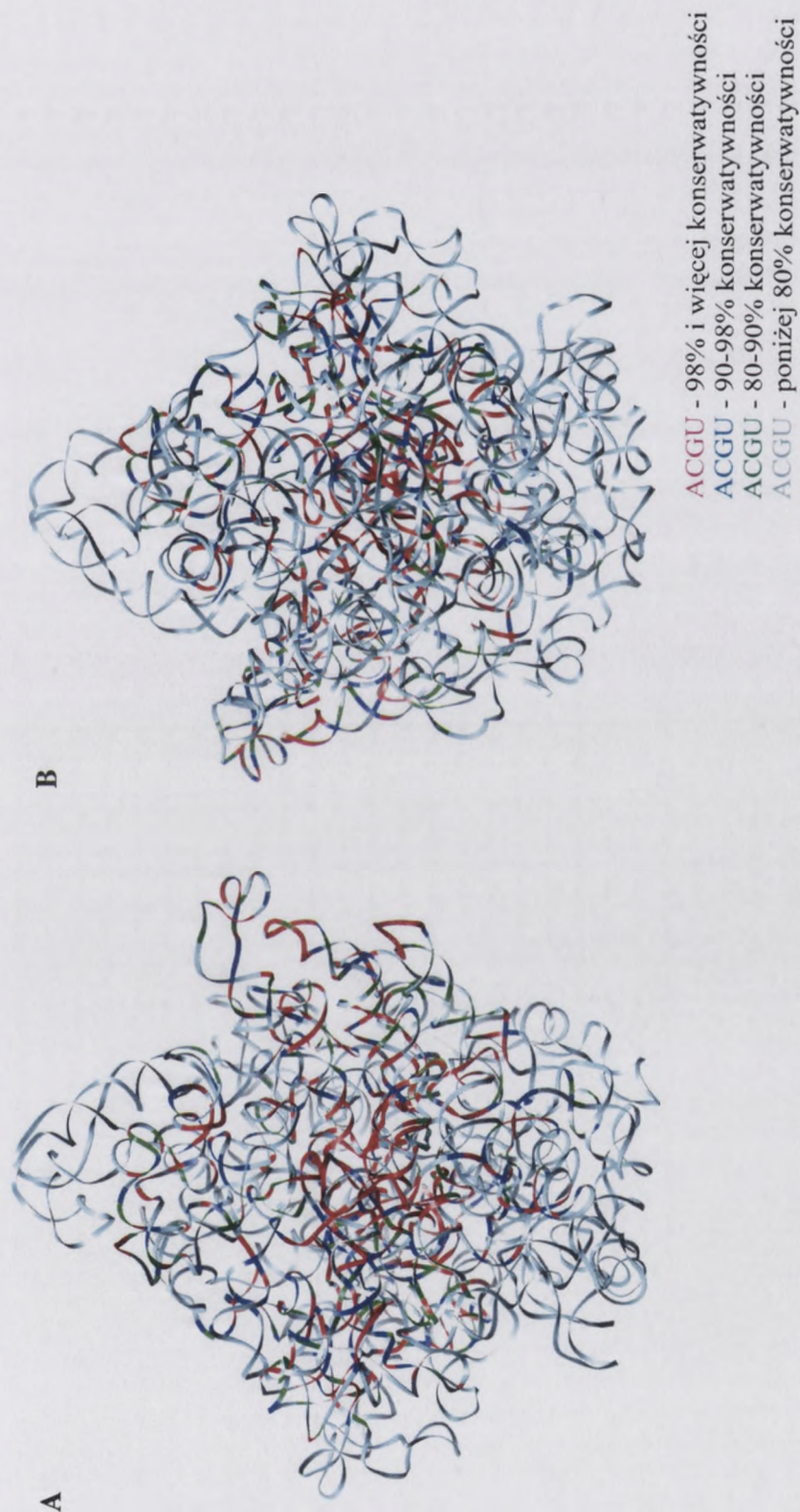
Rysunek 55. Struktura II-rzędowa części 3' 26S rRNA *O. sativa* (struktura pobrana z [22], numer M11585m) z zaznaczonymi nukleotydami konserwatywnymi.





1. 1872-1873 (1872-1873)  
 2. 1874-1875 (1874-1875)  
 3. 1876-1877 (1876-1877)  
 4. 1878-1879 (1878-1879)

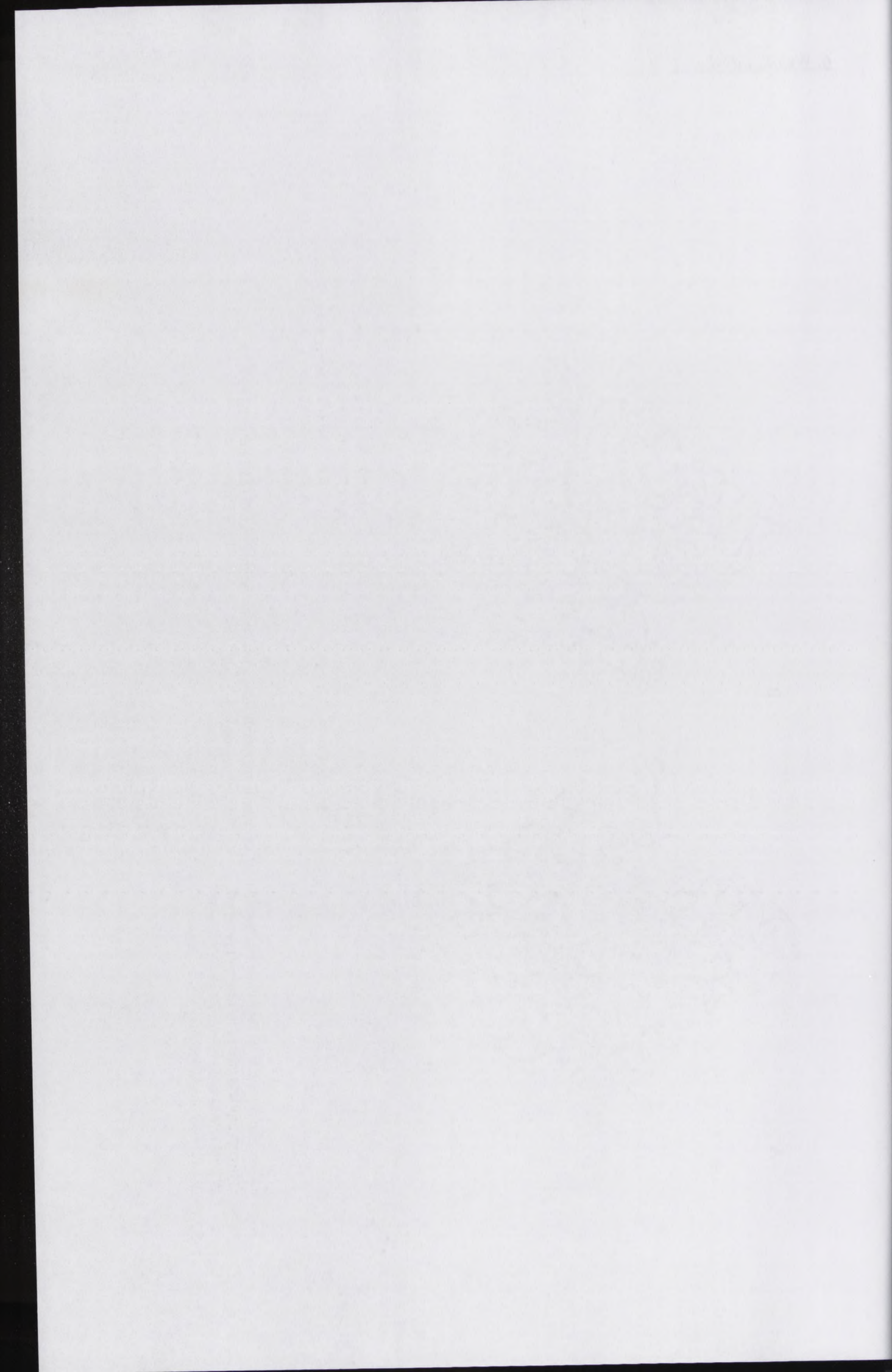
1872-1873 (1872-1873) 1874-1875 (1874-1875) 1876-1877 (1876-1877) 1878-1879 (1878-1879)



**Rysunek 56.** Struktura trzeciorzędowa 23S rRNA *H. marismortui* (struktura utworzona na podstawie [23], numer 1FFK) z zaznaczonymi nukleotydami konserwatywnymi.

A – widok od strony oddziaływania podjednostek;

B – widok od strony zewnętrznej.



- **Miejsca funkcjonalnie ważne w biosyntezie białka w 26S rRNA**

Po uzyskaniu diagramów konserwatywności poszczególnych nukleotydów 26S rRNA, opracowałam mapę pozycji nukleotydów funkcjonalnie ważnych w procesie biosyntezy białka (Tabele 19-21). Przedstawiam ją jako strukturę II-rzędową poszczególnych domen (I-VI) 26S rRNA *Oryza sativa* na Rysunkach 57-62. Poszczególne nukleotydy zostały zdefiniowane jako ważne w procesie translacji na podstawie danych uzyskanych dla rybosomów prokariotycznych jak i nielicznych danych dla rybosomów eukariotycznych.

Oddziaływanie	Pozycja w 23S rRNA	Referencje
Tworzenie tunelu wyjścia polipeptydu	H2 (23-37), H5 i H6 (53-70), H7 (85-97), H23 (442-517), H24 (563-585), H32 i H33 (671-689), H35 (736-759), H32 i H33 (773-812), H39 (953-964), H26 (1250-1272), H47 (1281-1289), H49 i H50 (1308-1344), H49 (1603-1621), H61 (1656-1659), H62 (1673-1678), H65 (1775-1789), H70 (1937-1943), H64 (1980-1984), H61 (2010-2022), H72 (2022-2040), H74 (2059-2065), H80 (2244-2255), H 74 (2434-2460), H89 i H90 (2490-2512), H92 (2552-2559), H90 i H93 (2572-2616)	[50]

Tabela 19. Nukleotydy 23S rRNA odpowiedzialne za tworzenie tunelu wyjścia polipeptydu (numeracja według *E. coli*).

Section 10

The following information is provided for your information. This information is not intended to be used as a substitute for professional advice. Please consult your attorney for more information.

Item	Description	Amount
1	...	...
2	...	...
3	...	...
4	...	...
5	...	...
6	...	...
7	...	...
8	...	...
9	...	...
10	...	...
11	...	...
12	...	...
13	...	...
14	...	...
15	...	...
16	...	...
17	...	...
18	...	...
19	...	...
20	...	...
21	...	...
22	...	...
23	...	...
24	...	...
25	...	...
26	...	...
27	...	...
28	...	...
29	...	...
30	...	...
31	...	...
32	...	...
33	...	...
34	...	...
35	...	...
36	...	...
37	...	...
38	...	...
39	...	...
40	...	...
41	...	...
42	...	...
43	...	...
44	...	...
45	...	...
46	...	...
47	...	...
48	...	...
49	...	...
50	...	...
51	...	...
52	...	...
53	...	...
54	...	...
55	...	...
56	...	...
57	...	...
58	...	...
59	...	...
60	...	...
61	...	...
62	...	...
63	...	...
64	...	...
65	...	...
66	...	...
67	...	...
68	...	...
69	...	...
70	...	...
71	...	...
72	...	...
73	...	...
74	...	...
75	...	...
76	...	...
77	...	...
78	...	...
79	...	...
80	...	...
81	...	...
82	...	...
83	...	...
84	...	...
85	...	...
86	...	...
87	...	...
88	...	...
89	...	...
90	...	...
91	...	...
92	...	...
93	...	...
94	...	...
95	...	...
96	...	...
97	...	...
98	...	...
99	...	...
100	...	...

Total 100 items. Total amount: \$100.00

Oddziaływanie	Pozycja w tRNA	Pozycja w 23S rRNA	Referencje
Ramię DHU tRNA – 23S rRNA (H69)	11, 12	1914-1915	[5, 179]
Ramię DHU tRNA – 23S rRNA (H69)	25, 26	1913-1914	
Pętla DHU tRNA – 23S rRNA (H38)	17 19	881-882 882-883	[5, 179]
Pętla TΨC tRNA – 23S rRNA (H38)	56	898-899	[5, 179]
Ramię TΨC tRNA – 23S rRNA (H89)	50-53 64-65	2470-2472 2482-2484	[5, 179]
Ramię akceptorowe tRNA – 23S rRNA (H71)	72-73	1942-1943	[5, 179]
Ramię akceptorowe tRNA – 23S rRNA (H89)	74-76	2452, 2494	[5, 179]
Ramię akceptorowe tRNA – 23S rRNA	75	2553	[5, 179]
	75	2588	[63]
Ramię DHU tRNA – 23S rRNA (H69)	12, 13 25, 26	1908-1909 1922-1923	[5, 9]
Ramię DHU tRNA – 23S rRNA (H69)	14	1924 1916, 1918 1926, 2251	[9, 61, 62, 179, 256]
Ramię akceptorowe tRNA – 23S rRNA	74	2252, 2253	[5, 43, 61, 62, 179, 248, 256]
Ramię akceptorowe tRNA – 23S rRNA (H80)	2	2255	[248]
Ramię akceptorowe tRNA – 23S rRNA (H80)	3	2255-2256 2439, 2451 2505, 2506	[5, 9, 61, 62]
Ramię akceptorowe tRNA – 23S rRNA (H93)	71/72	2594	[5]
Ramię akceptorowe tRNA – 23S rRNA (H80)	74	2286	[63]
Ramię akceptorowe tRNA – 23S rRNA (H93)	74	2601	[248]
Ramię akceptorowe tRNA – 23S rRNA (H93)	75	2602	[5, 9]
Ramię akceptorowe tRNA – 23S rRNA (H93)	75	2584	[61, 63]
Ramię akceptorowe tRNA – 23S rRNA (H93)	75	2251, 2063	[248]
Ramię akceptorowe tRNA – 23S rRNA (H93)	76	2585	[5, 61, 62, 256]
Ramię akceptorowe tRNA – 23S rRNA (H93)	76	2450, 2451, 2063, 2548	[248]
Pętla DHU – 23S rRNA	19	2112-2113	[5, 248, 256]
Pętla TΨC tRNA – 23S rRNA	56	2116-2117	[9]
Ramię akceptorowe tRNA – 23S rRNA (H68)	70	1893	[248]
Ramię akceptorowe tRNA – 23S rRNA (H68)	2-71 71 3-5	1852-1853 1892 1850-1853	[9]
Ramię akceptorowe tRNA – 23S rRNA (H68)	71	1892	[5, 58]
Ramię akceptorowe tRNA – 23S rRNA (H68)	71	1851	[248]
Ramię akceptorowe tRNA – 23S rRNA (H75)	73	2235 2392 2394	[5, 256]
Ramię akceptorowe tRNA – 23S rRNA (H74)	76	2433-2434	[5, 58]
Ramię akceptorowe tRNA – 23S rRNA (H11)	76	199	[9]
Ramię akceptorowe tRNA – 23S rRNA (H74)	76	2394, 2421, 2422, 2432	[248]

Tabela 20. Nukleotydy 23S rRNA udział wiązaniu tRNA w miejscach A, P i E (numeracja według *E. coli*).

Year	Month	Day	Time	Location	Activity	Notes
1998	Jan	1	10:00	...	...	...
1998	Jan	2	10:00	...	...	...
1998	Jan	3	10:00	...	...	...
1998	Jan	4	10:00	...	...	...
1998	Jan	5	10:00	...	...	...
1998	Jan	6	10:00	...	...	...
1998	Jan	7	10:00	...	...	...
1998	Jan	8	10:00	...	...	...
1998	Jan	9	10:00	...	...	...
1998	Jan	10	10:00	...	...	...
1998	Jan	11	10:00	...	...	...
1998	Jan	12	10:00	...	...	...
1998	Jan	13	10:00	...	...	...
1998	Jan	14	10:00	...	...	...
1998	Jan	15	10:00	...	...	...
1998	Jan	16	10:00	...	...	...
1998	Jan	17	10:00	...	...	...
1998	Jan	18	10:00	...	...	...
1998	Jan	19	10:00	...	...	...
1998	Jan	20	10:00	...	...	...
1998	Jan	21	10:00	...	...	...
1998	Jan	22	10:00	...	...	...
1998	Jan	23	10:00	...	...	...
1998	Jan	24	10:00	...	...	...
1998	Jan	25	10:00	...	...	...
1998	Jan	26	10:00	...	...	...
1998	Jan	27	10:00	...	...	...
1998	Jan	28	10:00	...	...	...
1998	Jan	29	10:00	...	...	...
1998	Jan	30	10:00	...	...	...
1998	Jan	31	10:00	...	...	...
1998	Feb	1	10:00	...	...	...
1998	Feb	2	10:00	...	...	...
1998	Feb	3	10:00	...	...	...
1998	Feb	4	10:00	...	...	...
1998	Feb	5	10:00	...	...	...
1998	Feb	6	10:00	...	...	...
1998	Feb	7	10:00	...	...	...
1998	Feb	8	10:00	...	...	...
1998	Feb	9	10:00	...	...	...
1998	Feb	10	10:00	...	...	...
1998	Feb	11	10:00	...	...	...
1998	Feb	12	10:00	...	...	...
1998	Feb	13	10:00	...	...	...
1998	Feb	14	10:00	...	...	...
1998	Feb	15	10:00	...	...	...
1998	Feb	16	10:00	...	...	...
1998	Feb	17	10:00	...	...	...
1998	Feb	18	10:00	...	...	...
1998	Feb	19	10:00	...	...	...
1998	Feb	20	10:00	...	...	...
1998	Feb	21	10:00	...	...	...
1998	Feb	22	10:00	...	...	...
1998	Feb	23	10:00	...	...	...
1998	Feb	24	10:00	...	...	...
1998	Feb	25	10:00	...	...	...
1998	Feb	26	10:00	...	...	...
1998	Feb	27	10:00	...	...	...
1998	Feb	28	10:00	...	...	...
1998	Feb	29	10:00	...	...	...
1998	Mar	1	10:00	...	...	...
1998	Mar	2	10:00	...	...	...
1998	Mar	3	10:00	...	...	...
1998	Mar	4	10:00	...	...	...
1998	Mar	5	10:00	...	...	...
1998	Mar	6	10:00	...	...	...
1998	Mar	7	10:00	...	...	...
1998	Mar	8	10:00	...	...	...
1998	Mar	9	10:00	...	...	...
1998	Mar	10	10:00	...	...	...
1998	Mar	11	10:00	...	...	...
1998	Mar	12	10:00	...	...	...
1998	Mar	13	10:00	...	...	...
1998	Mar	14	10:00	...	...	...
1998	Mar	15	10:00	...	...	...
1998	Mar	16	10:00	...	...	...
1998	Mar	17	10:00	...	...	...
1998	Mar	18	10:00	...	...	...
1998	Mar	19	10:00	...	...	...
1998	Mar	20	10:00	...	...	...
1998	Mar	21	10:00	...	...	...
1998	Mar	22	10:00	...	...	...
1998	Mar	23	10:00	...	...	...
1998	Mar	24	10:00	...	...	...
1998	Mar	25	10:00	...	...	...
1998	Mar	26	10:00	...	...	...
1998	Mar	27	10:00	...	...	...
1998	Mar	28	10:00	...	...	...
1998	Mar	29	10:00	...	...	...
1998	Mar	30	10:00	...	...	...
1998	Mar	31	10:00	...	...	...

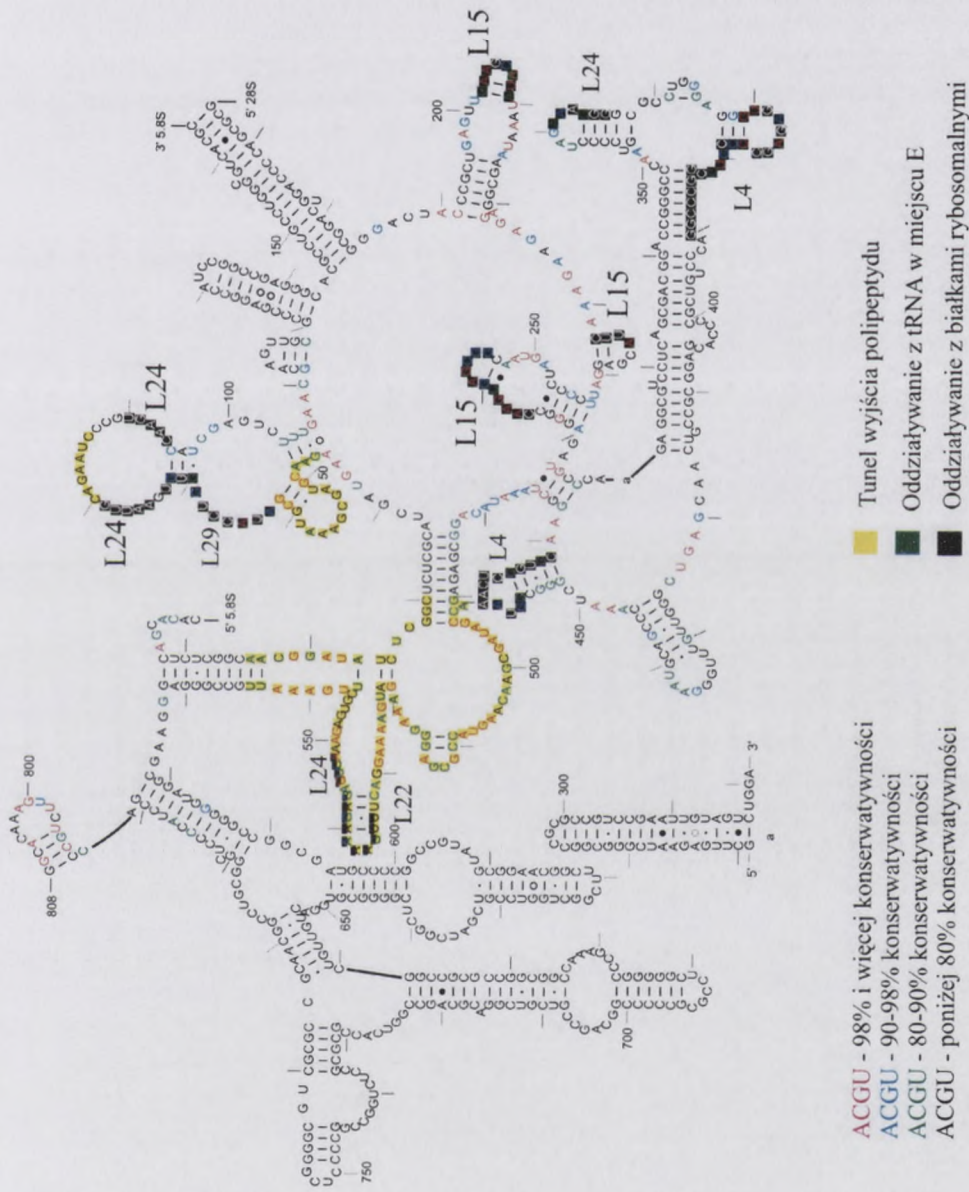
<b>Oddziaływanie</b>	<b>Pozycja w 23S rRNA</b>	<b>Referencje</b>
EF-1 - 23S rRNA	H43 (1065-1068) H44 (1093-1095)	[24]
EF-1 - 23S rRNA	H 89 (2471-2474)	[24]
EF-1 - 23S rRNA	H95 (2655, 2659-2663)	[24]
EF-2 - 23S rRNA	H95 (2654-2665, 2661-2663)	[25, 66]
<b>Oddziaływanie</b>	<b>Pozycja w 23S rRNA</b>	<b>Referencje</b>
EF-1 - 23S rRNA	H43 (1065-1068) H44 (1093-1095)	[24]
EF-1 - 23S rRNA	H 89 (2471-2474)	[24]
EF-1 - 23S rRNA	H95 (2655, 2659-2663)	[24]
EF-2 - 23S rRNA	H95 (2654-2665, 2661-2663)	[25, 66]

**Tabela 21.** Nukleotydy 23S rRNA biorące udział w wiązaniu czynników elongacyjnych (numeracja według *E. coli*).



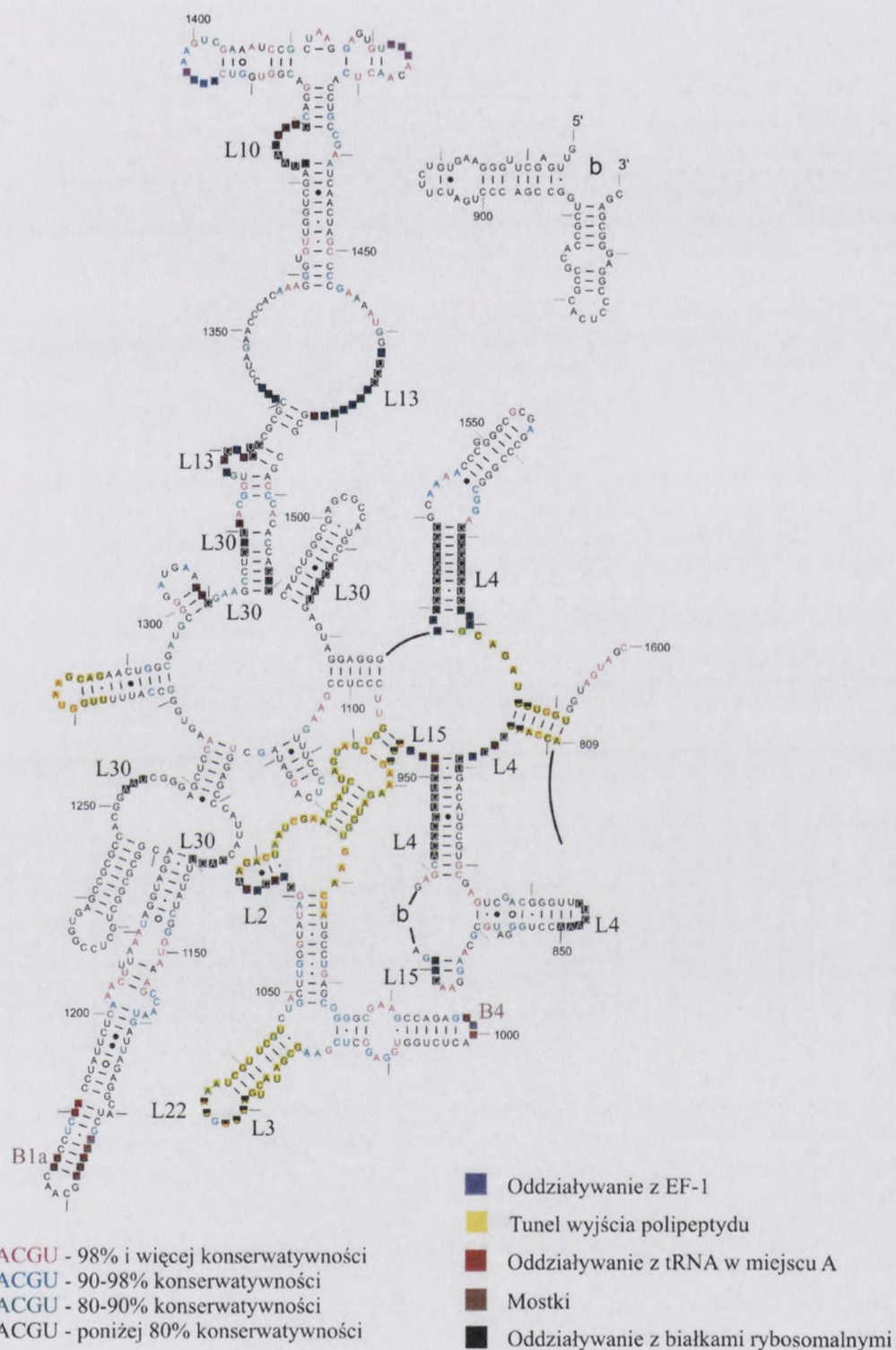
1	100
2	200
3	300
4	400
5	500
6	600
7	700
8	800
9	900
10	1000

Total 1000



**Rysunek 57. Struktura II-rzędowa domeny I 26S rRNA *Oryza sativa* z zaznaczonymi nukleotydami konserwatywnymi i funkcjonalnie ważnymi** (struktura pobrana z [22], numer M11585m).

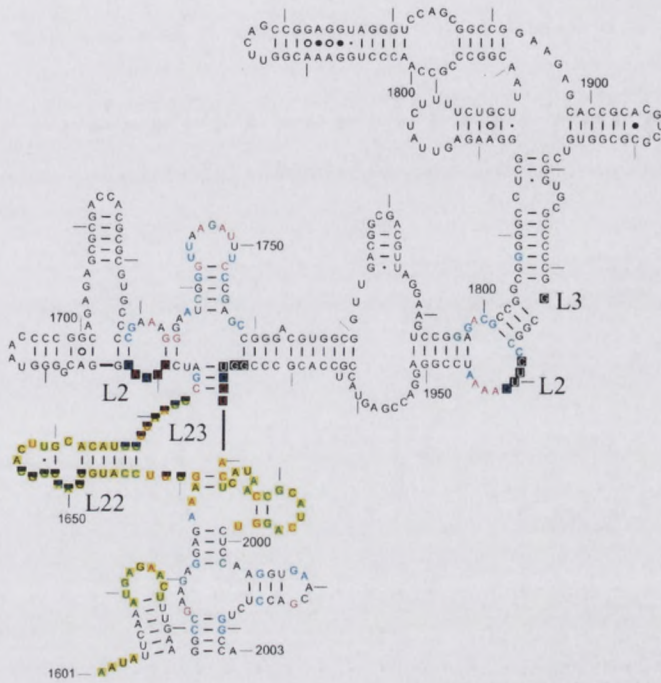
Faint, illegible text or markings covering the majority of the page.



Rysunek 58. Struktura II-rzędowa domeny II 26S rRNA *Oryza sativa* z zaznaczonymi nukleotydami konserwatywnymi i funkcjonalnie ważnymi (struktura pobrana z [22], numer M11585m).

Faint, illegible text covering the majority of the page, possibly bleed-through from the reverse side.

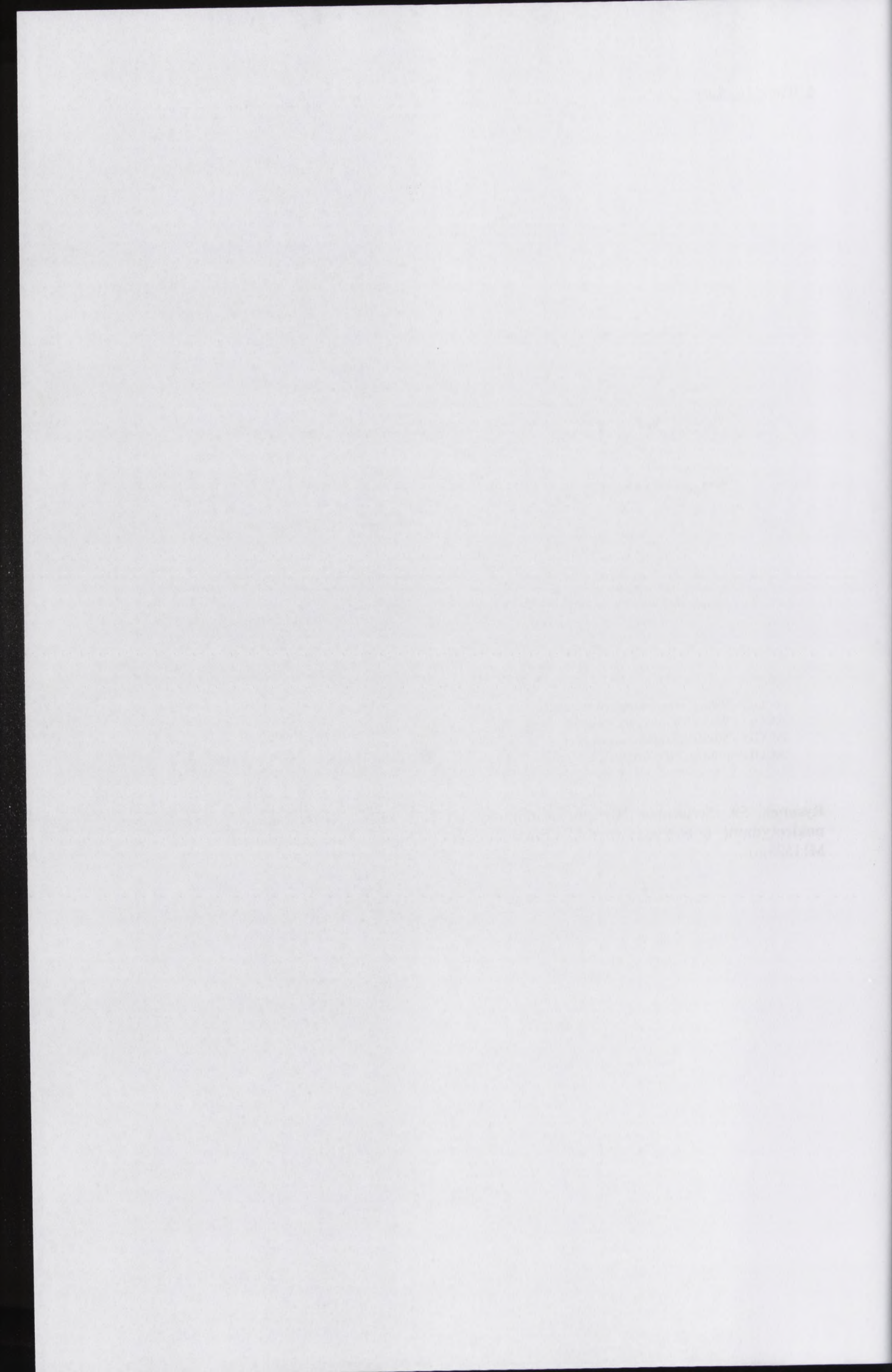
Faint text at the bottom right corner, possibly a signature or date.

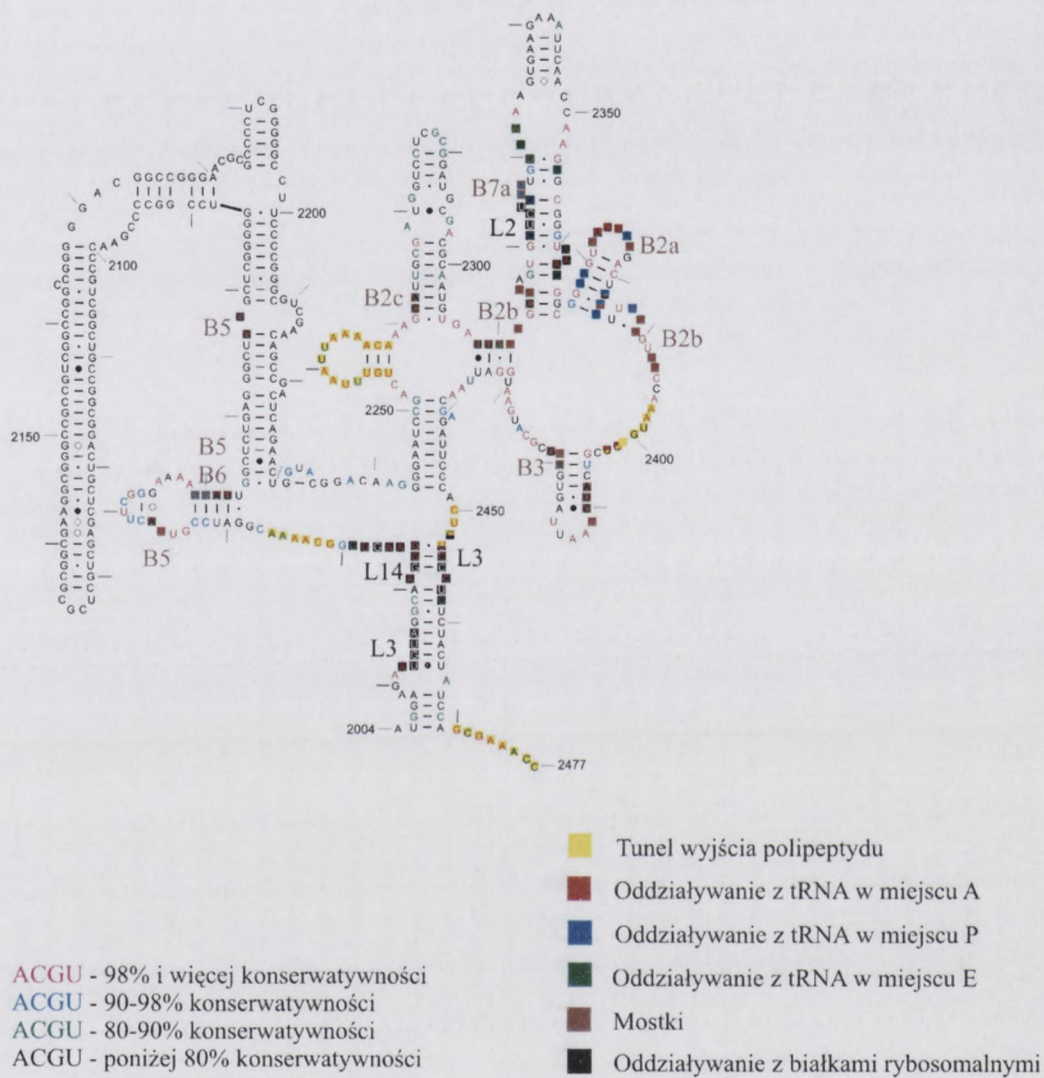


ACGU - 98% i więcej konserwatywności  
 ACGU - 90-98% konserwatywności  
 ACGU - 80-90% konserwatywności  
 ACGU - poniżej 80% konserwatywności

■ Tunel wyjścia polipeptydu  
 ■ Oddziaływanie z białkami rybosomalnymi

**Rysunek 59.** Struktura II-rzędowa domeny III 26S rRNA *Oryza sativa* z zaznaczonymi nukleotydami konserwatywnymi i funkcjonalnie ważnymi (struktura pobrana z [22], numer M11585m).





**Rysunek 60.** Struktura II-rzędowa domeny IV 26S rRNA *Oryza sativa* z zaznaczonymi nukleotydami konserwatywnymi i funkcjonalnie ważnymi (struktura pobrana z [22], numer M11585m).

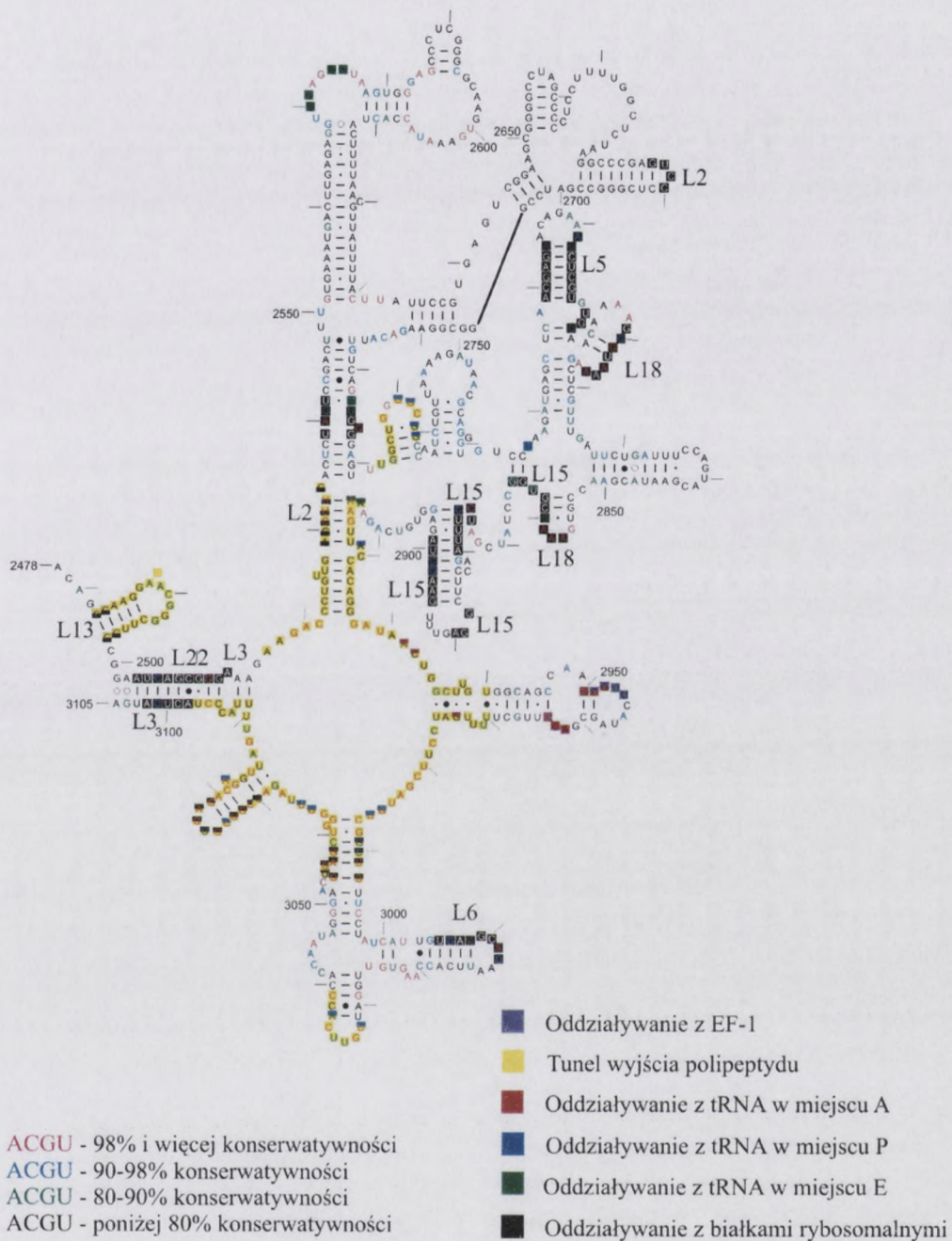




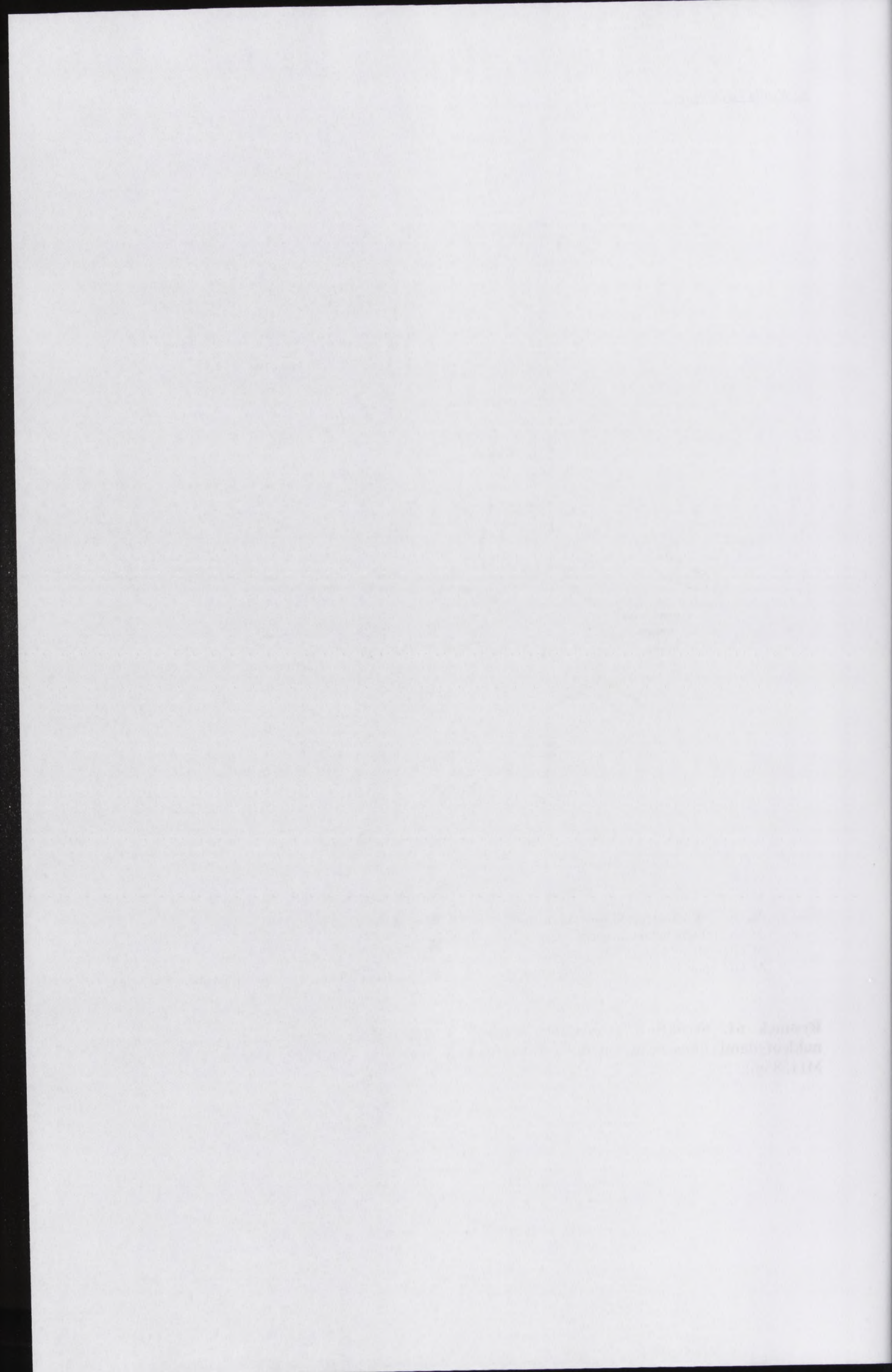
- 1. [Illegible text]
- 2. [Illegible text]
- 3. [Illegible text]
- 4. [Illegible text]
- 5. [Illegible text]
- 6. [Illegible text]
- 7. [Illegible text]
- 8. [Illegible text]
- 9. [Illegible text]
- 10. [Illegible text]

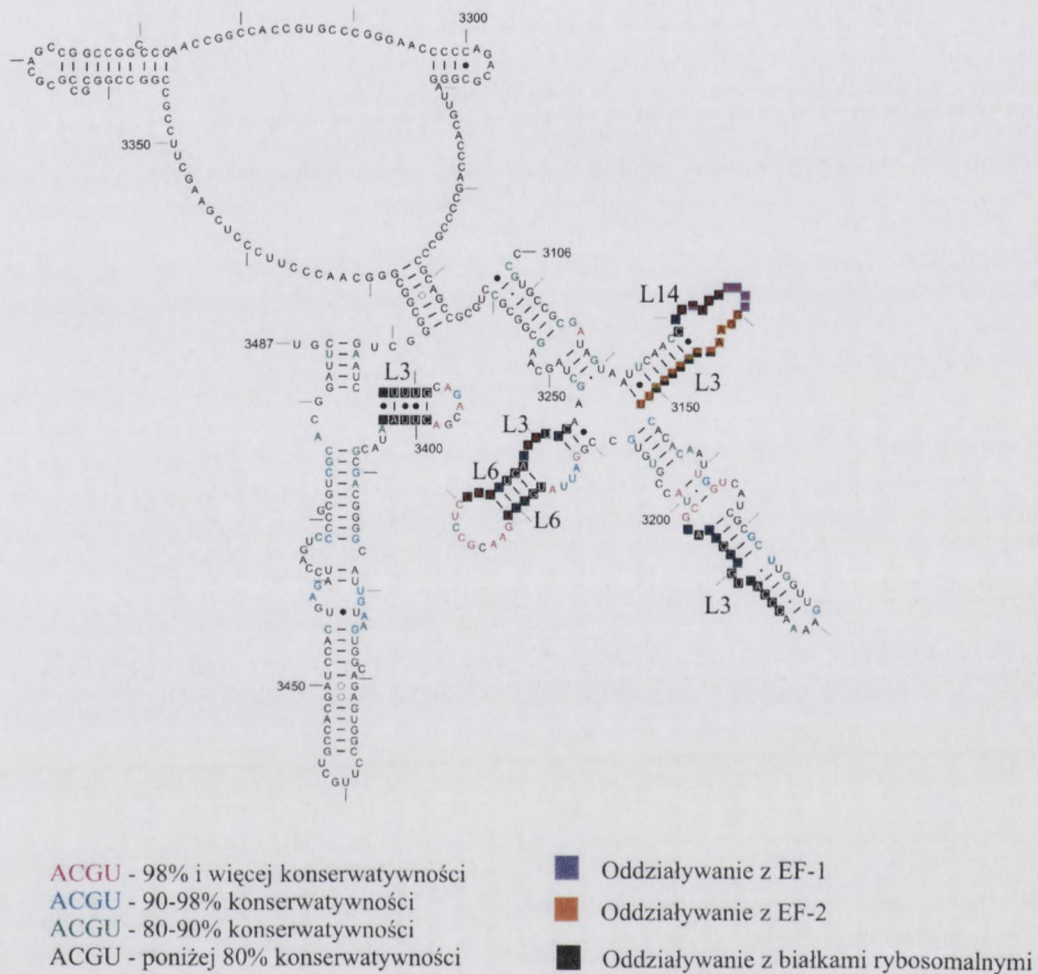
[Illegible text block]

Figure 10. Schematic diagram of the mechanical system of the engine (see text for details). The diagram shows the main components and their interconnections. The labels A through G correspond to the parts listed in the legend.



Rysunek 61. Struktura II-rzędowa domeny V 26S rRNA *Oryza sativa* z zaznaczonymi nukleotydami konserwatywnymi i funkcjonalnie ważnymi (struktura pobrana z [22], numer M11585m).





**Rysunek 62.** Struktura II-rzędowa domeny VI 26S rRNA *Oryza sativa* z zaznaczonymi nukleotydami konserwatywnymi i funkcjonalnie ważnymi (struktura pobrana z [22], numer M11585m).

Podczas analizy mapy funkcjonalności nukleotydów 26S rRNA, widoczny staje się fakt, iż nukleotydy RNA dużej podjednostki rybosomalnej, związane z procesem translacji, wykazują wysoki stopień zachowawczości ewolucyjnej. Założyłam zatem, że podobnie jak w przypadku małej podjednostki, ich konserwatywność świadczy o odgrywaniu tej samej roli w rybosomach 70S i 80S. Na poparcie mojego założenia przytoczę badania Spahn'a i współpracowników z rybosomami *Saccharomyces cerevisiae*. Zaobserwowali oni, że nukleotydy rRNA oddziałujące z cząsteczką tRNA w miejscu P i tworzące mostki rybosomalne między małą i dużą podjednostką, występują w identycznych pozycjach w układach 70S i 80S [9, 26]. Ponadto, na podstawie opublikowanych w 2004 roku wyników,



Fig. 1. Schematic diagram of the cell structure showing the location of the various components. The diagram is oriented vertically and includes several labeled parts, though the text is too faint to read. It appears to be a cross-section of a cell with various organelles and structures.

Fig. 1. Schematic diagram of the cell structure showing the location of the various components. The diagram is oriented vertically and includes several labeled parts, though the text is too faint to read. It appears to be a cross-section of a cell with various organelles and structures.

The diagram shows a cell with various internal components. The components are labeled as follows:

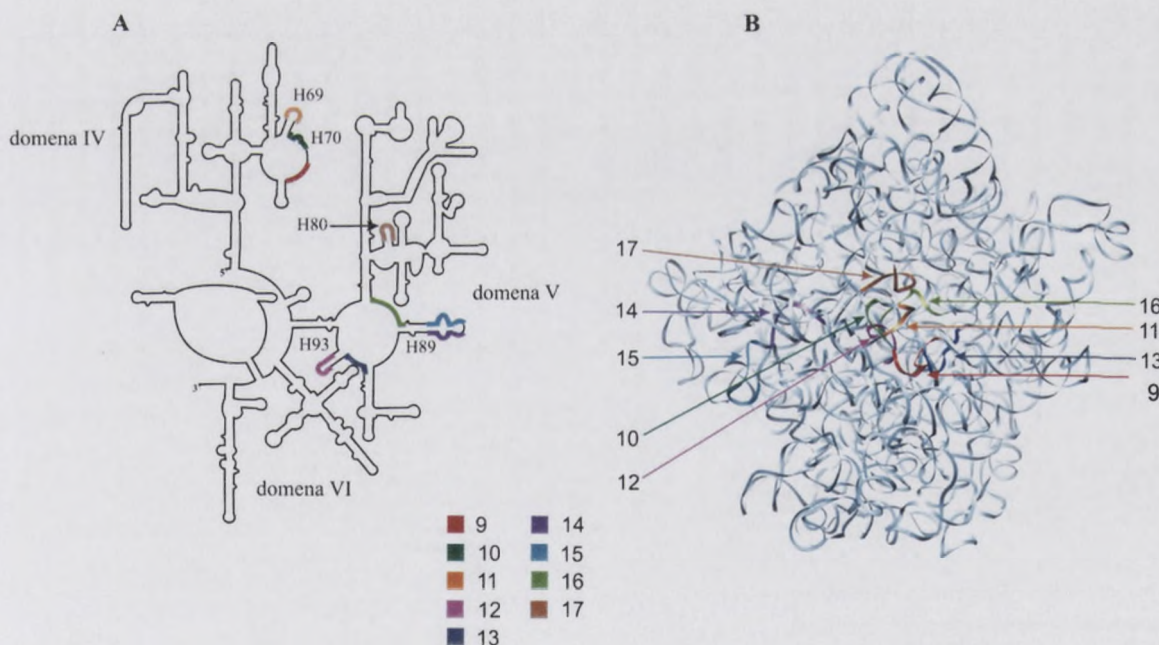
- 1. Cell wall
- 2. Cell membrane
- 3. Cytoplasm
- 4. Nucleus
- 5. Mitochondria
- 6. Golgi apparatus
- 7. Endoplasmic reticulum
- 8. Lysosomes
- 9. Peroxisomes
- 10. Vacuoles
- 11. Centrioles
- 12. Spindle fibers
- 13. Chromosomes
- 14. Ribosomes
- 15. Plasmids

The diagram is oriented vertically and includes several labeled parts, though the text is too faint to read. It appears to be a cross-section of a cell with various organelles and structures.

ta sama grupa badaczy wyciągnęła wniosek, iż interakcje czynników elongacyjnych z rybosomem eukariotycznym mają miejsce w większości przypadków w takich samych pozycjach jak w rybosomie prokariotycznym [26].

### • Charakterystyka antysensownych oligonukleotydów

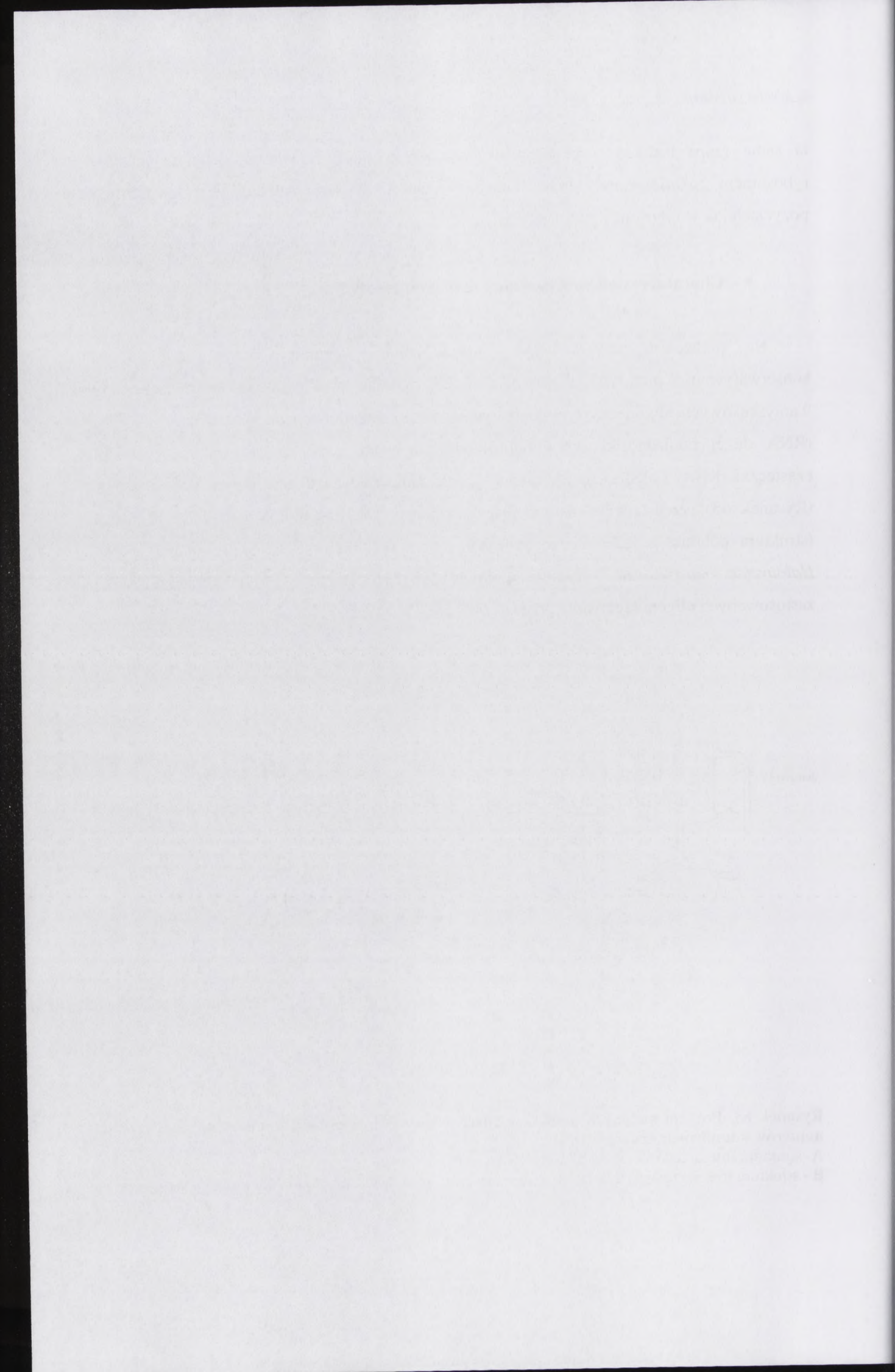
Na podstawie przygotowanych przeze mnie wcześniej danych dotyczących konserwatywności oraz funkcji nukleotydów 26S rRNA w translacji, zaprojektowałam serię 9 antysensownych oligodeoksyrybonukleotydów, komplementarnych do specyficznych miejsc rRNA dużej podjednostki rybosomalnej oddziałujących z poszczególnymi fragmentami cząsteczki tRNA. Lokalizację wybranych przeze mnie sekwencji docelowych w 26S rRNA (Rysunek 63) przedstawiłam na schemacie struktury II-rzędowej 26S rRNA *Oryza sativa* (struktura pobrana z [22], numer M11585m) oraz w strukturze III-rzędowej 23S rRNA *Haloarcula marismortui* (struktura pobrana z [23], numer 1FFK). Charakterystykę zastosowanych oligonukleotydów przedstawiłam w Tabeli 22.



**Rysunek 63. Pozycja badanych miejsc, ważnych w procesie translacji (numery odnoszą się do numerów komplementarnych a-DNA).**

A- struktura drugorzędowa części 5' 26S rRNA *O. sativa*;

B - struktura trzeciorzędowa 23S rRNA *H. marismortui*, widok od strony oddziaływania podjednostek.



Nr	Sekwencja a-DNA [5'-3']	Miejsca oddziaływania sekwencji docelowej 26S rRNA z cząsteczką tRNA	Pozycja sekwencji docelowej w 26S rRNA ( <i>O.sativa</i> )
#9	ACG AGG CAT TTG	C 2273, U 2274 - łańcuch CCA (72, 73) tRNA w miejscu A	2265-2276 domena IV
#10	TAC CTT AAG AGA	C 2252, U 2253 - łańcuch D (25, 26) tRNA w miejscu P	2251- 2262 domena IV
#11	ATA GTT ACT CCC	A 2243, C 2244 - łańcuch D (25, 26) tRNA w miejscu A C 2244, U 2245 - łańcuch D (11, 12) tRNA w miejscu A	2236-2247 domena IV
#12	ACG TGT CTC ACG	A 2965 - koniec CCA (75) tRNA w miejscu P	2954-2965 domena V
#13	TCT AAA CCC AGC	U 2938 - koniec CCA (75) tRNA w miejscu P	2938-2949 domena V
#14	CAA CGT CGC TAT	A2842, C2843, G2844 - ramię TΨC (64-65) tRNA w miejscu A	2836-2847 domena V
#15	AAC GCT TGG CTG	G2831, C2832, G2833 - ramię TΨC (50-53) tRNA w miejscu A	2823-2834 domena V
#16	AGC CAG TTA TCC	C2812 - koniec CCA (74-76) tRNA w miejscu A	2806-2817 domena V
#17	TGG CCG CCC CAG	G2610 - koniec CCA (74) tRNA w miejscu P G2614 - łańcuch CCA (73) tRNA w miejscu P	2606-2617 domena V
#8	CAC ATG TTA	KONTROLA	-----

Tabela 22. Oligonukleotydy antysensowe do badań zmian konformacyjnych dużej podjednostki rybosomalnej.

- **Specyficzność oddziaływań antysensowych oligonukleotydów z rybosomem**

W celu wyłowienia oligodeoksynukleotydów komplementarnych tylko do tylko jednej, specyficznej sekwencji docelowej w 26S rRNA, przeprowadziłam kompletną i szczegółową analizę wszystkich fragmentów częściowo komplementarnych do testowanych a-DNA. Możliwe miejsca wiązania a-DNA identyfikowałam przy użyciu programu BLAST-N [252], w obrębie sekwencji 18S rRNA *G. max* (numer 18729) oraz 26S rRNA *O. sativa* (numer 169818). Wyłoniłam 10 potencjalnych niespecyficznych sekwencji docelowych dla wszystkich 9 badanych a-DNA, w tym 6 w obrębie 18S rRNA a 4 – w 26S rRNA (Rysunek 64).

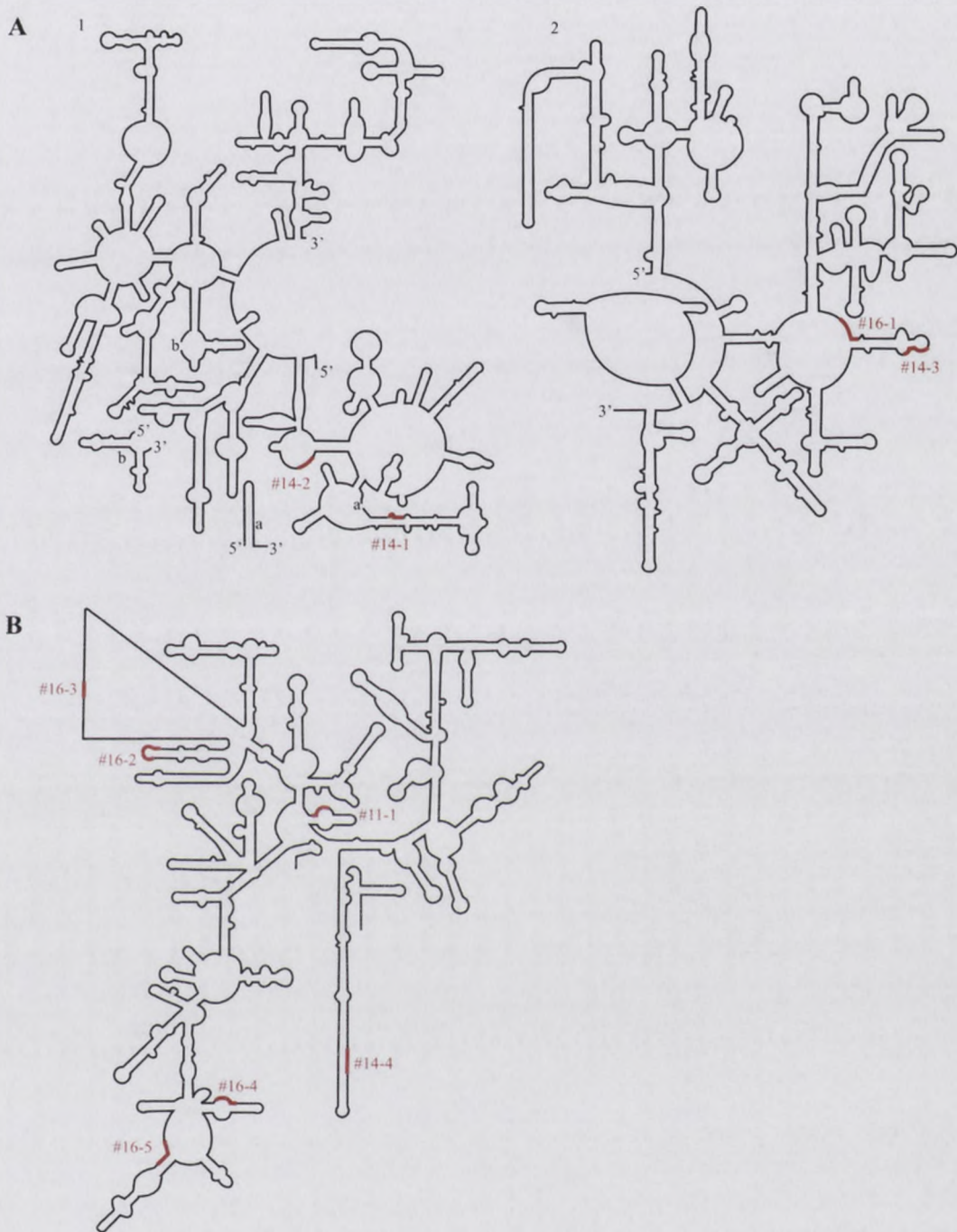


№	Symbol	Opis	Wzrostki (okresy)
49	ACT 217 C1C A1U	5' UAG - koniec CCA (75) RNA w miejscu	294-295
50	ACT 217 C1C A1U	5' UAG - koniec CCA (75) RNA w miejscu	294-295
51	ACT 217 C1C A1U	5' UAG - koniec CCA (75) RNA w miejscu	294-295
52	ACT 217 C1C A1U	5' UAG - koniec CCA (75) RNA w miejscu	294-295
53	ACT 217 C1C A1U	5' UAG - koniec CCA (75) RNA w miejscu	294-295
54	ACT 217 C1C A1U	5' UAG - koniec CCA (75) RNA w miejscu	294-295
55	ACT 217 C1C A1U	5' UAG - koniec CCA (75) RNA w miejscu	294-295
56	ACT 217 C1C A1U	5' UAG - koniec CCA (75) RNA w miejscu	294-295
57	ACT 217 C1C A1U	5' UAG - koniec CCA (75) RNA w miejscu	294-295
58	ACT 217 C1C A1U	5' UAG - koniec CCA (75) RNA w miejscu	294-295
59	ACT 217 C1C A1U	5' UAG - koniec CCA (75) RNA w miejscu	294-295
60	ACT 217 C1C A1U	5' UAG - koniec CCA (75) RNA w miejscu	294-295
61	ACT 217 C1C A1U	5' UAG - koniec CCA (75) RNA w miejscu	294-295
62	ACT 217 C1C A1U	5' UAG - koniec CCA (75) RNA w miejscu	294-295
63	ACT 217 C1C A1U	5' UAG - koniec CCA (75) RNA w miejscu	294-295
64	ACT 217 C1C A1U	5' UAG - koniec CCA (75) RNA w miejscu	294-295
65	ACT 217 C1C A1U	5' UAG - koniec CCA (75) RNA w miejscu	294-295
66	ACT 217 C1C A1U	5' UAG - koniec CCA (75) RNA w miejscu	294-295
67	ACT 217 C1C A1U	5' UAG - koniec CCA (75) RNA w miejscu	294-295
68	ACT 217 C1C A1U	5' UAG - koniec CCA (75) RNA w miejscu	294-295
69	ACT 217 C1C A1U	5' UAG - koniec CCA (75) RNA w miejscu	294-295
70	ACT 217 C1C A1U	5' UAG - koniec CCA (75) RNA w miejscu	294-295

Tabela 2. Wyniki analizy sekwencji DNA i RNA w miejscach...

Wpływ...

W tym miejscu przedstawiono wyniki analizy sekwencji DNA i RNA w miejscach... W tabeli 2 przedstawiono wyniki analizy sekwencji DNA i RNA w miejscach... W tabeli 3 przedstawiono wyniki analizy sekwencji DNA i RNA w miejscach...

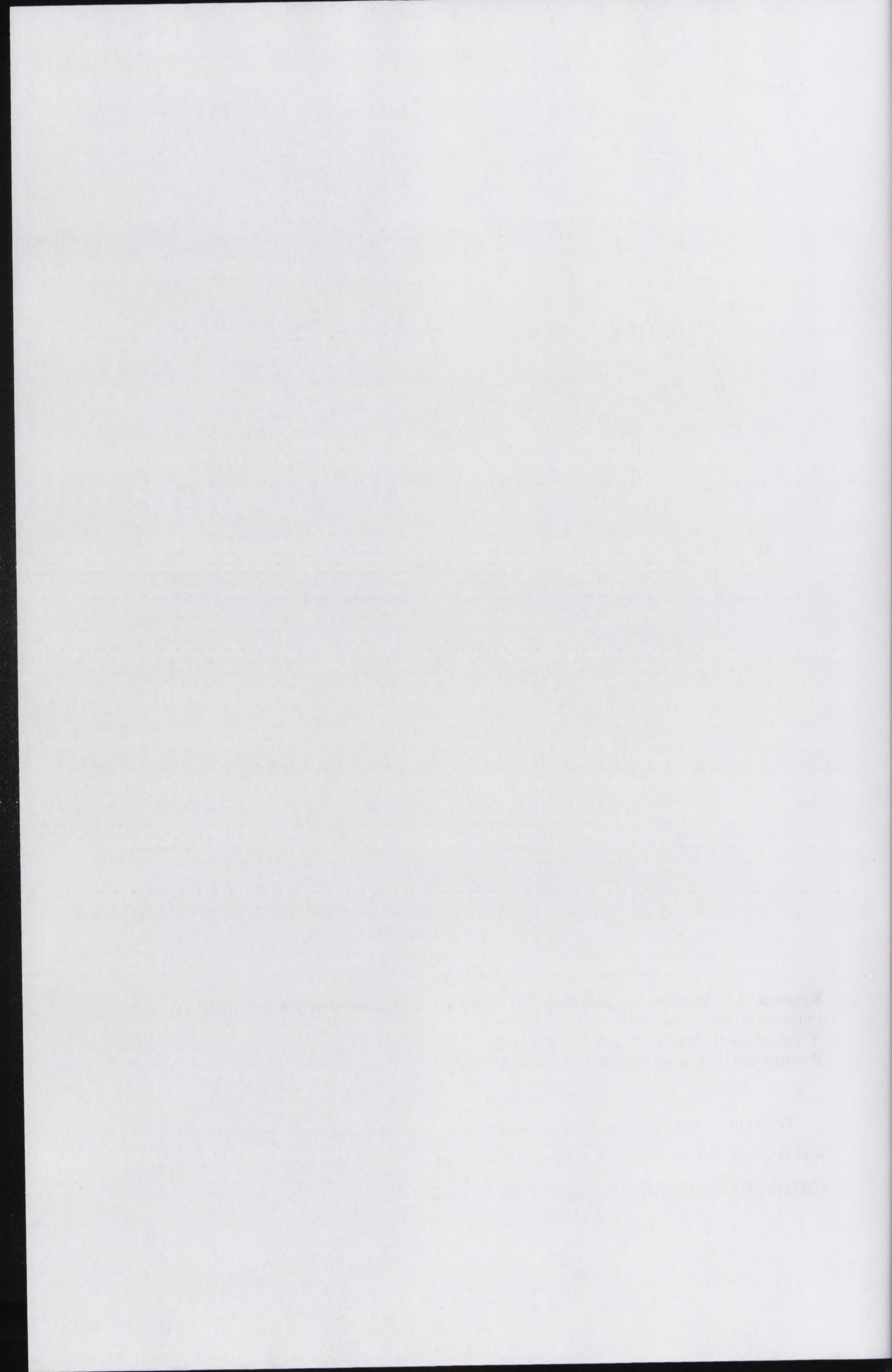


**Rysunek 64. Pozycja niespecyficzných sekwencji komplementarných do badanych a-DNA.** (numeracja jak w Tabeli 23).

A – struktura II-rzędowa 26S rRNA *O. sativa*;

B - struktura II-rzędowa 18S rRNA *G. max*.

W celu zweryfikowania możliwości przyłączenia badanych oligonukleotydów do wyłonionych potencjalnych niespecyficzných miejsc, obliczyłam wartości energii swobodnej ( $\Delta G$ ) dupleksów RNA/DNA oraz stosunek  $\Delta G_{\text{nonspec}}/\Delta G_{\text{spec}}$ .



Nr	Sekwencja	Pozycja w 18S rRNA <i>G. max</i>	Pozycja w 26S rRNA <i>O. sativa</i>	$\Delta G$ (kcal)	$\Delta G_{\text{nonspec}} / \Delta G_{\text{spec}}$
#9	CAA AUG CCU CGU	---	2265-2276	-9.6	---
#10	UCU CUU AAG GUA	---	2251- 2262	-8.7	---
#11	GGG AGU AAC UAU	---	2236-2247	12.2	---
#11-1	GGG AGU A	1114-1120	---	-8.0	0.65
#12	CGU GAG ACA CGU	---	2954-2965	-12.2	---
#13	GCU GGG UUU AGA	---	2938-2949	-12.7	---
#14	AUA GCG ACG UUG	---	2836-2847	-12.2	---
#14-1	A GCG ACG	---	169-175	-7.6	0.62
#14-2	AUA GCG A	---	341-347	-7.7	0.63
#14-3	AUA GCG A	---	2836-2842	-7.7	0.63
#14-4	GCG ACG UUG	1715-1723	---	-9,5	0.77
#15	CAG CCA AGC GUU	---	2823-2834	-13.4	---
#16	GGA UAA CUG GCU	---	2806-2817	-13.3	---
#16-1	AA CUG GC	---	2839-2847	-8.4	0.63
#16-2	UAA CUG GC	720-727	---	-8.7	0.65
#16-3	GGA UAA C	807-813	---	-5.9	0.44
#16-4	GGA UAA C	141-147	---	-5.9	0.44
#16-5	GA UAA CUC GU	256-265	---	-8.1	0.60
#17	CUG GGG CGG CCA	---	2606-2617	-18.2	---
#8	CAC ATG TTA	---	---	---	---

**Tabela 23. Specyficzność interakcji a-DNA – rybosom.**

Kolorem czerwonym zazaczyłam specyficzne sekwencje docelowe dla a-DNA, kolorem czarnym – niespecyficzne sekwencje (numeracja jak na Rysunku 63).

$\Delta G$  obliczono według [242].

Zgodnie z moimi wynikami, aż 6 testowanych przeze mnie oligodeoksynukleotydów nie posiada innych potencjalnych miejsc hybrydyzacji niż wybrana przeze mnie sekwencja docelowa w 26S rRNA. Pozostałe 3 oligonukleotydy (#11, #14 oraz #16) posiadają kilka miejsc, do których są częściowo komplementarne. Oligonukleotyd #8 został zaprojektowany jako kontrola testów biologicznych i nie posiada żadnych miejsc komplementarnych w 18S rRNA i 26S rRNA. Oligonukleotyd #11 może potencjalnie hybrydyzować do jednej niespecyficznej sekwencji w 18S rRNA (#11-1). Sekwencja ta jest częściowo jednoniciowa, jednak ze względu na dość niską wartość  $\Delta G_{\text{nonspec}} / \Delta G_{\text{spec}}$  założyłam, że warunki te nie są wystarczające do utworzenia stabilnego dupleksu. Podobne wnioski wyciągnęłam dla dodatkowego miejsca komplementarnego oligonukleotydu #14 (target #14-3) oraz dla oligonukleotydu #16 (target #16-5). Jedna niespecyficzna sekwencja dodatkowa (#14-4) posiada względnie wysoką wartość  $\Delta G_{\text{nonspec}} / \Delta G_{\text{spec}}$  (0.77) i występuje w regionie jednoniciowym 18S rRNA. Jednak obserwowany przeze mnie stopień hybrydyzacji oligonukleotydu #14 do rybosomu w żadnym stanie konformacyjnym rybosomu nie



przekraczał 100%, co jest dalszym argumentem popierającym poprawność założenia o specyficzności oddziaływań a-DNA z badanymi sekwencjami w 26S rRNA. Wszystkie pozostałe sekwencje dodatkowe charakteryzują się niską (#14-1, #14-2, #16-1, #16-2) lub bardzo niską (##16-3, #16-4) wartością  $\Delta G_{\text{nonspec}}/\Delta G_{\text{spec}}$ . Dlatego też nawet lokalizacja niektórych z nich nie jest wystarczająca, aby doszło do utworzenia stabilnego kompleksu z a-DNA. Te obserwacje pozwoliły mi na konkluzję, że wszystkie badane przeze mnie antysensowe oligodeoksynukleotydy hybrydują jedynie do specyficznych, wybranych przeze mnie miejsc w 26S rRNA.

Kolejnym argumentem potwierdzającym specyficzność oddziaływań a-DNA/26S rRNA są krzywe wysycenia badanych oligonukleotydów. W celu zaobserwowania stopnia wysycenia rybosomów w czterech podstawowych stanach konformacyjnych badanymi oligonukleotydami, przeprowadziłam reakcje znakowania oligonukleotydów oraz proces hybrydyzacji wyznakowanych a-DNA do rybosomów przeprowadzonych w odpowiedni stan konformacyjny.

#### • Znakowanie oligonukleotydów

W wyniku znakowania 5' końca przy pomocy  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  (metoda 5.11) poszczególne oligonukleotydy wykazywały zamieszczone w Tabeli 24 radioaktywności specyficzne [dpm/pmol].

Oligonukleotyd	#9	#10	#11	#12	#13	#14	#15	#16	#17	#8
Radioaktywność specyficzna (dpm/pmol)	436	635	491	211	4 126	532	253	453	568	498

Tabela 24. Radioaktywność specyficzna [dpm/pmol] oligonukleotydów po znakowaniu  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ .

#### • Krzywe wysycenia rybosomów 80S przez antysensowe oligonukleotydy

Wyizolowane rybosomy przeprowadzałam w stan pretranslokacyjny poprzez obsadzenie miejsca P przez deacylowany tRNA (D-tRNA) – stan PRE-P (metoda 5.8.1) oraz jednocześnie obsadzenie miejsc: A przez aminoacylo – tRNA (AA-tRNA) i P przez D-tRNA – stan PRE-AP (metoda 5.8.3). Stan posttranslokacyjny osiągnięty został przez obsadzenie miejsca P przez

The first part of the paper discusses the importance of the study and the objectives of the research. It highlights the need for a comprehensive understanding of the subject matter and the role of the researcher in this process. The second part of the paper focuses on the methodology used in the study, detailing the data collection methods and the analytical techniques employed. The results of the study are presented in the third part, showing the findings and their implications. Finally, the paper concludes with a summary of the key points and suggestions for further research.

References

- 1. Smith, J. (2001). The impact of technology on the economy. *Journal of Economic Surveys*, 15(2), 101-130.
- 2. Brown, M. (2003). The role of government in the economy. *Journal of Public Economics*, 78(3), 245-265.
- 3. White, R. (2005). The effects of globalization on the labor market. *Journal of International Economics*, 79(1), 1-20.
- 4. Green, L. (2007). The impact of trade on the environment. *Journal of Environmental Economics*, 58(2), 151-170.
- 5. Black, P. (2009). The effects of immigration on the labor market. *Journal of Human Capital*, 3(1), 1-28.

Table 1

Variable	Mean	Standard Deviation	Minimum	Maximum
Age	35.2	12.5	20	65
Income	45000	15000	20000	80000
Education	12.5	1.5	9	16
Experience	10.5	5.5	0	30
Health	0.8	0.1	0.5	1.0

AA-tRNA (stan POST-P, metoda 5.9.1) oraz równoczesne zablokowanie miejsc: P przez AA tRNA oraz E przez D-tRNA (stan POST-PE, metoda 5.9.2).

Na tak przygotowanych rybosomach przeprowadzałam reakcję hybrydyzacji antysensowych oligonukleotydów (metoda 5.12), stosując następujący nadmiar oligonukleotydów do rybosomu (przy stałej ilości rybosomów, to jest 12 pmoli):

- A) 1:1 (12 pmoli a-DNA)
- B) 10:1 (120 pmoli a-DNA)
- C) 20:1 (240 pmoli a-DNA)
- D) 25:1 (300 pmoli a-DNA)
- E) 30:1 (360 pmoli a-DNA)
- F) 35:1 (420 pmoli a-DNA)
- G) 40:1 (480 pmoli a-DNA)
- H) 45:1 (540 pmoli a-DNA)
- I) 50:1 (600 pmoli a-DNA).

Uzyskane wyniki przedstawiłam na Rysunku 65. Zgodnie z moimi wynikami, wysycenie rybosomu przez antysensowe oligonukleotydy, obserwowałam przy stosunku molowym a-DNA:rybosom wynoszącym 30:1. Dalsze zwiększanie stężenia dodanego do reakcji oligodeoksyrybonukleotydu nie powodowało zwiększenia stopnia hybrydyzacji. Fakt ten świadczy o tym, iż obserwowana przeze mnie hybrydyzacja a-DNA zachodzi jedynie w specyficznych, wybranych przeze mnie miejscach w 26S rRNA.

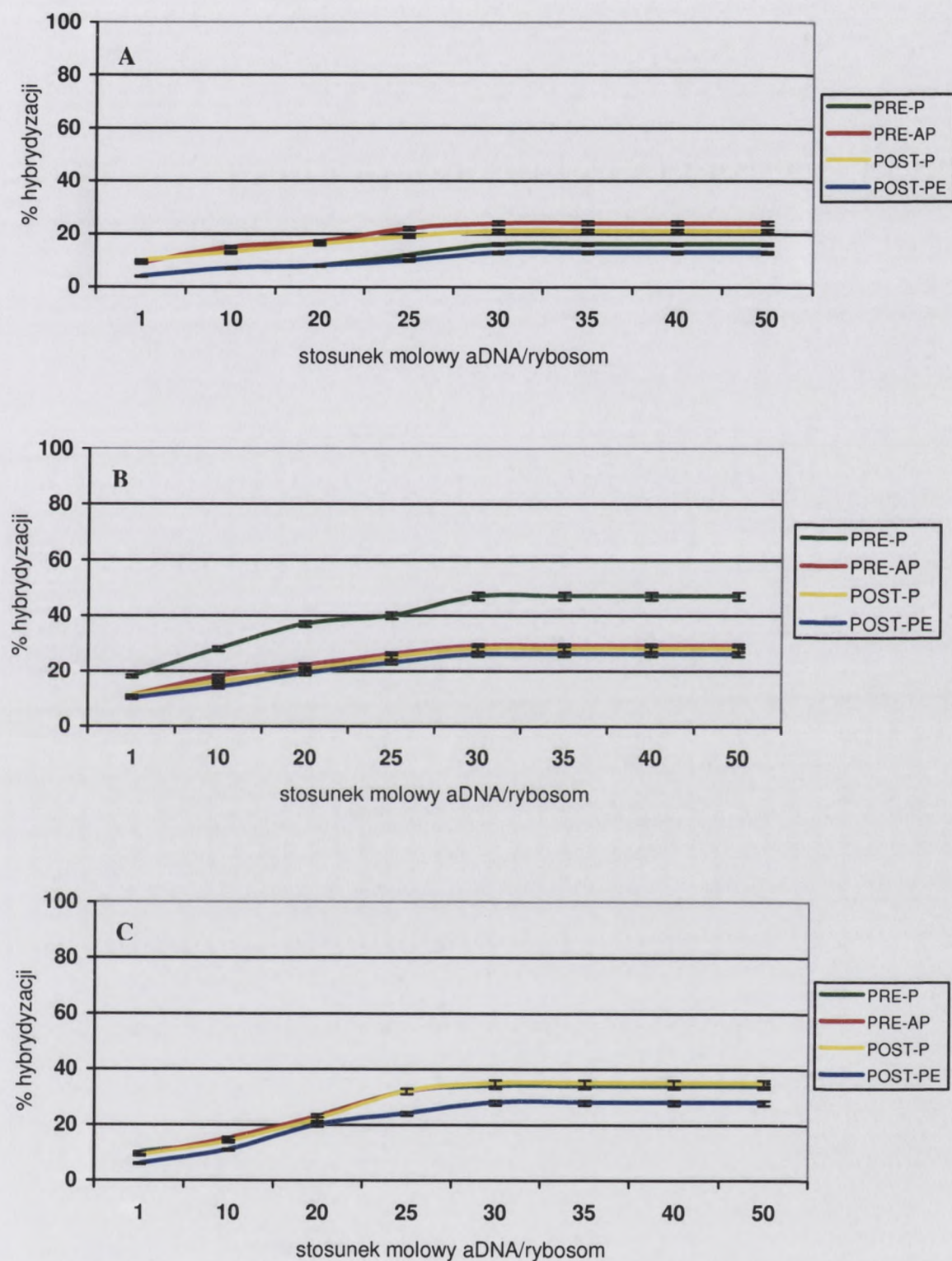


AA-DNA oraz E oraz D-RNA (zob. POST-PE, rysunek 2.2).

Wzrost w kierunku 5' do 3' jest charakterystyczny dla DNA. Wzrost w kierunku 3' do 5' jest charakterystyczny dla RNA. Wzrost w kierunku 5' do 3' jest charakterystyczny dla DNA. Wzrost w kierunku 3' do 5' jest charakterystyczny dla RNA.

- A) 1-12 parów z-DNA
- B) 101 (120 parów z-DNA)
- C) 201 (200 parów z-DNA)
- D) 221 (200 parów z-DNA)
- E) 301 (200 parów z-DNA)
- F) 321 (200 parów z-DNA)
- G) 401 (200 parów z-DNA)
- H) 421 (200 parów z-DNA)
- I) 501 (200 parów z-DNA)

Wzrost w kierunku 5' do 3' jest charakterystyczny dla DNA. Wzrost w kierunku 3' do 5' jest charakterystyczny dla RNA. Wzrost w kierunku 5' do 3' jest charakterystyczny dla DNA. Wzrost w kierunku 3' do 5' jest charakterystyczny dla RNA.



**Rysunek 65. Krzywe wysycenia 12 pmoli rybosomu przez wzrastające stężenie oligonukleotydów (12-600 pmoli).**

Rezultaty obarczone są odchyleniem standardowym ( $\pm 3\%$ ) z trzech niezależnych eksperymentów.

A – oligonukleotyd #9;

B – oligonukleotyd #10;

C – oligonukleotyd #11.

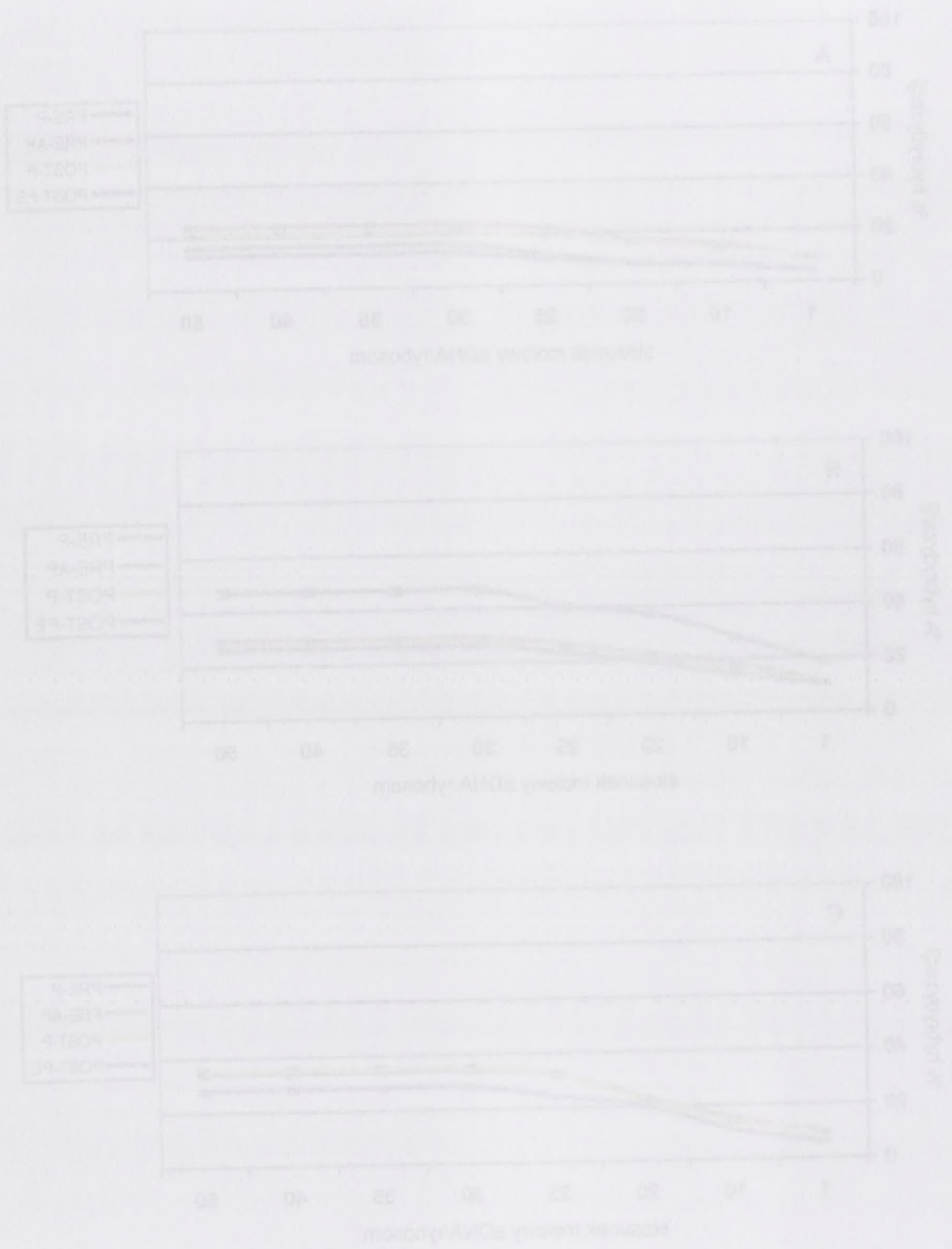
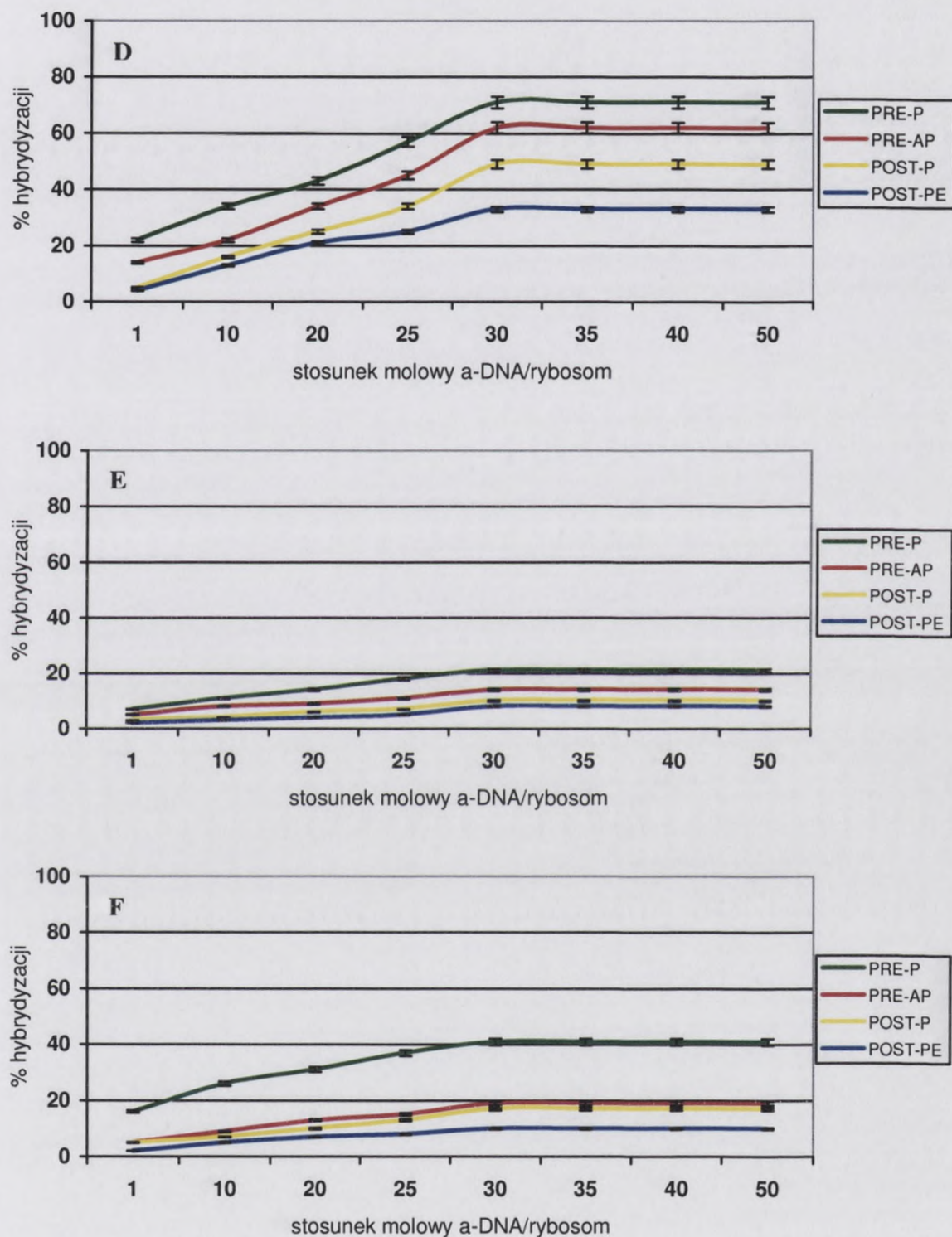


Figure 1. Percentage of respondents by days since diagnosis for three groups: Pre-AD (n = 11-20), Pre-AD (n = 21-30), and Post-AD (n = 31-40). The x-axis represents the number of days since diagnosis, and the y-axis represents the percentage of respondents.



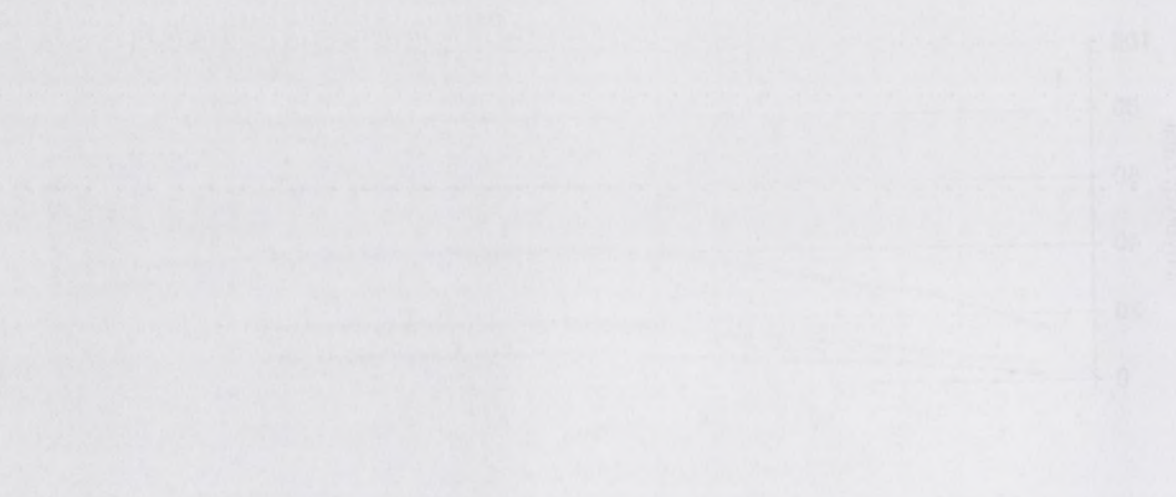
**Rysunek 65.** Krzywe wysycenia 12 pmoli rybosomu przez wzrastające stężenie oligonukleotydów (12-600 pmoli).

Rezultaty obarczone są odchyleniem standardowym ( $\pm 3\%$ ) z trzech niezależnych eksperymentów.

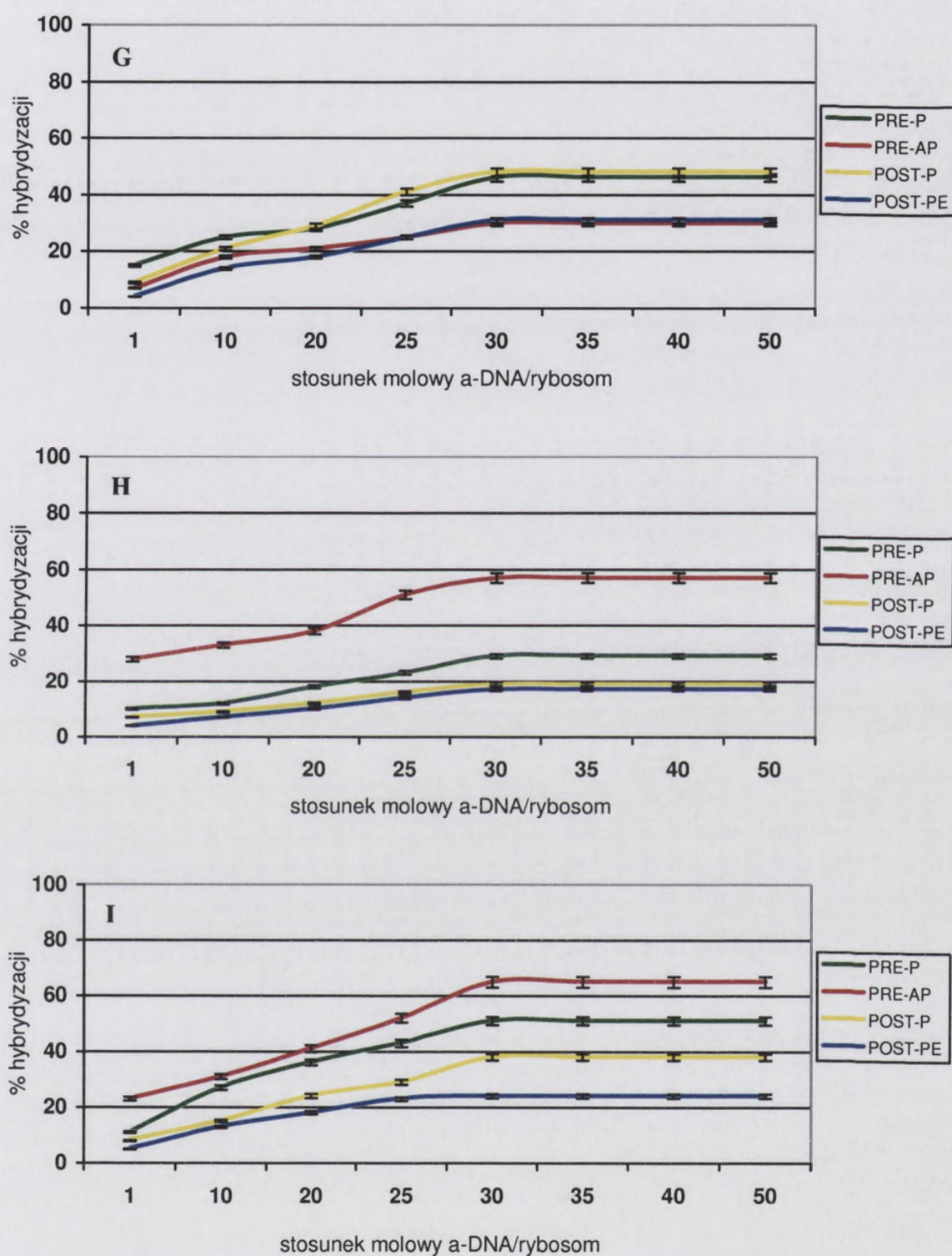
D – oligonukleotyd #12;

E – oligonukleotyd #13;

F – oligonukleotyd #14.



Legend:  
Series 1: ...  
Series 2: ...  
Series 3: ...



**Rysunek 65. Krzywe wysycenia 12 pmoli rybosomu przez wzrastające stężenie oligonukleotydów (12-600 pmoli).**

Rezultaty obarczone są odchyleniem standardowym ( $\pm 3\%$ ) z trzech niezależnych eksperymentów.

G – oligonukleotyd #15;

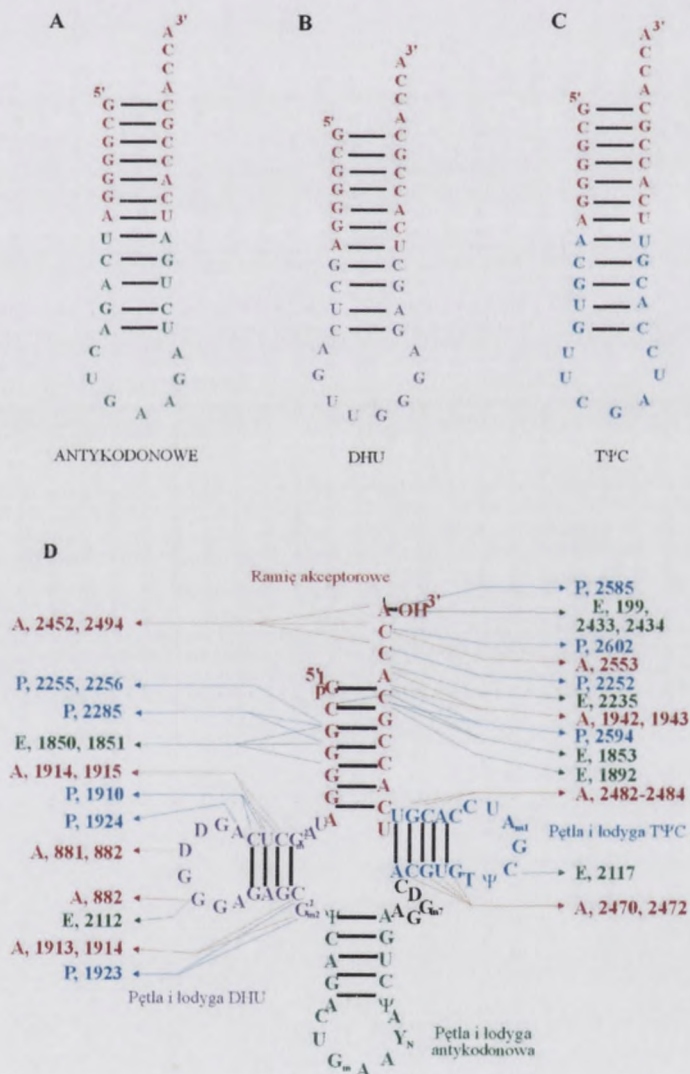
H – oligonukleotyd #16;

I – oligonukleotyd #17.



• Charakterystyka cząsteczek mini-tRNA

Skonstruowałam trzy rodzaje cząsteczek mini-tRNA, z których wykluczone zostały pewne strukturalne fragmenty „kompletnych” tRNA specyficznych względem fenyloalaniny (Rysunek 66).



Rysunek 66. Struktura II-rzędowa cząsteczek mini-tRNA (A-C) oraz tRNA<sup>Phe</sup> *S. cerevisiae* (D) z zaznaczonymi nukleotydami oddziałującymi z rRNA.

Oznaczenia: ANTUKODONOWE – mini-tRNA antykononowe, DHU – mini-tRNA DHU, TΨC - mini tRNA TΨC.



### Characterization of capripox virus mRNA

Structural genes for which capripox virus mRNA was analyzed by Northern blotting. The results are shown in Figure 1. The results show that the mRNA for the structural genes is present in the cytoplasm of the infected cells.

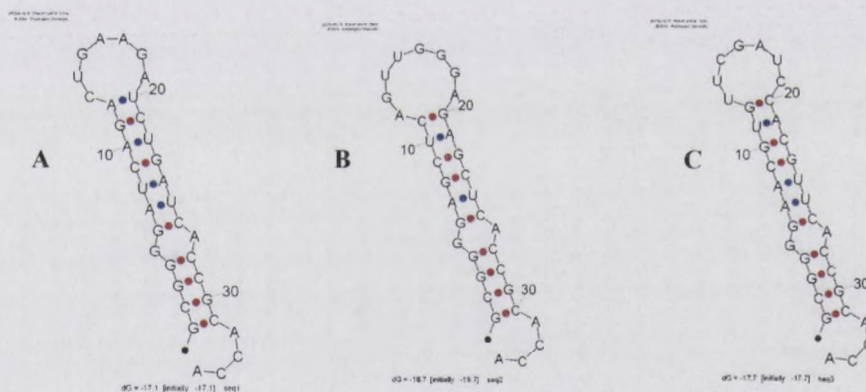


Figure 1. Northern blot analysis of capripox virus mRNA. (A) capripox virus mRNA, (B) capripox virus mRNA, (C) capripox virus mRNA. The results show that the mRNA for the structural genes is present in the cytoplasm of the infected cells.

Powstałe w ten sposób cząsteczki mini-tRNA oznaczyłam jako:

- 1) mini-tRNA antykodonowe – cząsteczka powstała w wyniku usunięcia ramienia i pętli DHU oraz ramienia i pętli TΨC z tRNA<sup>Phe</sup>;
- 2) mini-tRNA DHU – cząsteczka powstała w wyniku usunięcia ramienia i pętli antykodonowej oraz ramienia i pętli TΨC z tRNA<sup>Phe</sup>;
- 3) mini-tRNA TΨC – cząsteczka powstała w wyniku usunięcia ramienia i pętli DHU oraz ramienia i pętli antykodonowej z tRNA<sup>Phe</sup>.

W strukturze tRNA<sup>Phe</sup> *S. cerevisiae* wyróżniono 5 głównych determinant. Są to reszty A73, G20 i trzy nukleotydy antykodonu [237]. Stwierdzono również, że nukleotydy związane z tworzeniem trzeciorzędowej struktury tRNA nie są konieczne dla funkcjonowania tej molekuly. Stosowane przeze mnie konstrukty posiadają elementy konieczne dla ich funkcjonowania jako mini-tRNA (determinanty cząsteczek tRNA lub/ oraz przewidziana struktura drugorzędowa typu spinki do włosów; Rysunek 67).



**Rysunek 67.** Przewidywana struktura drugorzędowa cząsteczek mini-tRNA (z użyciem programu mfold [257]).

- A – mini-tRNA antykodonowe;  
 B – mini-tRNA DHU;  
 C – mini-tRNA TΨC.

#### • Wiązanie mini-tRNA do rybosomu

Cząsteczkami mini-tRNA obsadzałam miejsca P (metoda 5.8.2 oraz 5.8.4) lub E (metoda 5.9.3) rybosomów *L. luteus* zaprogramowanych cząsteczką poli(U). Wydajność wiązania poszczególnych mini-tRNA sprawdzałam po uprzednim wyznakowaniu 5' końca tych cząsteczek przy pomocy [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP (metoda 5.11). Radioaktywność przygotowanych w ten

1. Introduction

2. Methodology

3. Results

4. Discussion

5. Conclusion

6. References

7. Appendix

8. Acknowledgements

9. Author Biographies

10. Correspondence

11. Contact Information

12. Funding Sources

13. Declaration of Conflicting Interests

14. Informed Consent

15. Ethical Approval

16. Data Availability

17. Supplemental Materials

18. Reprints and Permissions

19. Copyright

20. Disclaimer

sposób mieszanin reakcyjnych zliczyłam na liczniku Beckmann LS 7000, uprzednio odmywając niezwiązane cząsteczki mini-tRNA jak w metodzie 5.10.

Wydajność reakcji wiązania mini-tRNA do rybosomalnych miejsc P i E przedstawiłam w Tabeli 25.

	Mini-tRNA	ANT	DHU	TΨC
Miejsce P	Wynik wiązania [pmol mini-tRNA/pmole rybosomu]	0,92	0,97	0,95
	Wydajność wiązania [%]	92	97	95
Miejsce E	Wynik wiązania [pmol mini-tRNA /pmole rybosomu]	0,97	1	0,94
	Wydajność wiązania [%]	97	100	94

**Tabela 25. Wyniki reakcji wiązania mini-tRNA do rybosomalnych miejsc P lub E.**

ANT – mini-tRNA antykodonowe; DHU – mini-tRNA DHU; TΨC – mini-tRNA TΨC.

Przedstawiono wyniki uśrednione z trzech niezależnych eksperymentów.

Zgodnie z moimi wynikami, cząsteczki mini-tRNA: antykodonowe, DHU i TΨC skutecznie obsadzają rybosomalne miejsca P lub E. Zasadne jest stosowanie ich równocześnie z a-DNA komplementarnymi do rejonów rRNA odpowiedzialnych za oddziaływanie z tymi fragmentami cząsteczki tRNA, które zostały wykluczone z mini-tRNA.

- **Rezultaty inhibicji biosyntezy białka przez antysensowe oligonukleotydy komplementarne do wybranych fragmentów 26S rRNA**

Wyzolowane rybosomy przeprowadzałam w stan pretranslokacyjny poprzez obsadzenie miejsca P przez deacylowany tRNA (D-tRNA) (metoda 5.8.1) lub mini-tRNA (metoda 5.8.2) - stan PRE-P oraz jednoczesne obsadzenie miejsc: A przez aminoacylo – tRNA (AA-tRNA) i P przez D-tRNA (metoda 5.8.3) lub mini-tRNA (metoda 5.8.4) – stan PRE-AP. Stan posttranslokacyjny osiągnięty został przez obsadzenie miejsca P przez AA-tRNA (stan POST-P, metoda 5.9.1) oraz równoczesne zablokowanie miejsc: P przez AA-tRNA oraz E przez D-tRNA (metoda 5.9.2) lub mini-tRNA (metoda 5.9.3) – stan POST-PE.

Do tak przygotowanych rybosomów hybrydyzowałam antysensowe oligonukleotydy (metoda 5.12) i obserwowałam inhibicję reakcji wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup>.

Schematyczne przedstawienie przeprowadzanych doświadczalnie reakcji ujęłam na Rysunkach 45 i 46.

Wyniki testów wiązania mini-RNA do cytozylowych miejsc P i E przedstawiam w tabeli 2. W tym celu wykorzystano cząsteczki mini-RNA jak w modelu 2.10.

Wyniki testów wiązania mini-RNA do cytozylowych miejsc P i E przedstawiam w tabeli 2.

Miejsce	Wzrost wiązania	mini-RNA /	ΔYT	DBU	TYC
Miejsce P	Wzrost wiązania	100	97	100	94
	Wzrost wiązania	100	97	100	94
Miejsce E	Wzrost wiązania	100	97	100	94
	Wzrost wiązania	100	97	100	94

Tabela 2. Wyniki testów wiązania mini-RNA do cytozylowych miejsc P i E. ΔYT - cząsteczki mini-RNA; DBU - cząsteczki DBU; TYC - cząsteczki TYC. Wyniki testów wiązania mini-RNA do cytozylowych miejsc P i E.

Wyniki testów wiązania mini-RNA do cytozylowych miejsc P i E przedstawiam w tabeli 2. Wyniki testów wiązania mini-RNA do cytozylowych miejsc P i E przedstawiam w tabeli 2.

**Wyniki testów wiązania mini-RNA do cytozylowych miejsc P i E**

Wyniki testów wiązania mini-RNA do cytozylowych miejsc P i E przedstawiam w tabeli 2. Wyniki testów wiązania mini-RNA do cytozylowych miejsc P i E przedstawiam w tabeli 2.

Reakcje hybrydyzacji a-DNA oraz inhibicji reakcji wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup> przez zhybrydowane antysensowe oligonukleotydy powtarzałam trzykrotnie. W Tabelach 26-33 oraz na Rysunkach 84-87 przedstawiłam uśrednione wyniki.

	a-DNA	#9	#10	#11	#12	#13	#14	#15	#16	#17	#8
PRE-P	Wynik hybrydyzacji [pmol a-DNA/pmol rybosomu]	0,15	0,47	0,34	0,70	0,85	0,33	0,47	0,26	0,50	0,0
	Wydajność hybrydyzacji [%]	15	47	34	70	85	33	47	26	50	0
PRE-AP	Wynik hybrydyzacji [pmol a-DNA/pmol rybosomu]	0,23	0,29	0,35	0,61	0,54	0,26	0,27	0,57	0,55	0,0
	Wydajność hybrydyzacji [%]	23	29	35	61	54	26	27	57	55	0
POST-P	Wynik hybrydyzacji [pmol a-DNA/pmol rybosomu]	0,20	0,27	0,31	0,49	0,40	0,29	0,41	0,19	0,33	0,0
	Wydajność hybrydyzacji [%]	20	27	31	49	40	29	41	19	33	0
POST-PE	Wynik hybrydyzacji [pmol a-DNA/pmol rybosomu]	0,12	0,26	0,27	0,32	0,33	0,23	0,30	0,17	0,28	0,0 1
	Wydajność hybrydyzacji [%]	12	26	27	32	33	23	30	17	28	1

Tabela 26. Wyniki reakcji hybrydyzacji antysensowych oligonukleotydów do rybosomów przekształconych w stan pre- lub posttranslokacyjny. Miejsce P lub E obsadzone przez D-tRNA. PRE-P, PRE-AP, POST-P, POST-PE oznaczają poszczególne stany translokacyjne rybosomu podczas biosyntezy białka.

Przedstawiono wyniki hybrydyzacji uśrednione z trzech niezależnych eksperymentów.

1. The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions.

2. The second part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions.

3. The third part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions.

4. The fourth part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions.

	a-DNA	#9	#10	#11	#12	#13	#14	#15	#16	#17	#8
PRE-P	Wynik hybrydyzacji [pmol a-DNA/pmol rybosomu]	0,23	0,18	0,50	0,82	0,48	0,34	0,87	0,55	0,56	0,0
	Wydajność hybrydyzacji [%]	23	18	50	82	48	34	87	55	56	0
PRE-AP	Wynik hybrydyzacji [pmol a-DNA/pmol rybosomu]	0,30	0,15	0,43	0,94	0,58	0,30	0,33	0,34	0,45	0,0
	Wydajność hybrydyzacji [%]	30	15	43	94	58	30	33	34	45	0
POST-P	Wynik hybrydyzacji [pmol a-DNA/pmol rybosomu]	0,42	0,22	0,49	0,85	0,40	0,28	0,40	0,22	0,40	0,0
	Wydajność hybrydyzacji [%]	42	22	49	85	40	28	40	22	40	0
POST-PE	Wynik hybrydyzacji [pmol a-DNA/pmol rybosomu]	0,22	0,16	0,21	0,61	0,45	0,29	0,40	0,20	0,28	0,01
	Wydajność hybrydyzacji [%]	22	16	21	61	45	29	40	20	28	1

Tabela 27. Wyniki reakcji hybrydyzacji antysensowych oligonukleotydów do rybosomów przekształconych w stan pre- lub posttranslokacyjny. Miejsce P lub E obsadzone przez mini-tRNA antykodonowe.

PRE-P, PRE-AP, POST-P, POST-PE oznaczają poszczególne stany translokacyjne rybosomu podczas biosyntezy białka.

Przedstawiono wyniki hybrydyzacji uśrednione z trzech niezależnych eksperymentów.



№ п/п	№	Исходные данные									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09	0,10
		0,11	0,12	0,13	0,14	0,15	0,16	0,17	0,18	0,19	0,20
2	2	0,21	0,22	0,23	0,24	0,25	0,26	0,27	0,28	0,29	0,30
		0,31	0,32	0,33	0,34	0,35	0,36	0,37	0,38	0,39	0,40
3	3	0,41	0,42	0,43	0,44	0,45	0,46	0,47	0,48	0,49	0,50
		0,51	0,52	0,53	0,54	0,55	0,56	0,57	0,58	0,59	0,60
4	4	0,61	0,62	0,63	0,64	0,65	0,66	0,67	0,68	0,69	0,70
		0,71	0,72	0,73	0,74	0,75	0,76	0,77	0,78	0,79	0,80
5	5	0,81	0,82	0,83	0,84	0,85	0,86	0,87	0,88	0,89	0,90
		0,91	0,92	0,93	0,94	0,95	0,96	0,97	0,98	0,99	1,00

Таблица 1. Исходные данные для расчета вероятности появления дефектов в процессе производства. В таблице приведены значения параметров, характеризующие технологический процесс. В таблице приведены значения параметров, характеризующие технологический процесс.

	a-DNA	#9	#12	#13	#14	#15	#16	#17	#8
PRE-P	Wynik hybrydyzacji [pmol a-DNA/pmol rybosomu]	0,60	0,12	0,33	0,22	0,38	0,20	0,32	0,0
	Wydajność hybrydyzacji [%]	60	12	33	22	38	20	32	0
PRE-AP	Wynik hybrydyzacji [pmol a-DNA/pmol rybosomu]	0,59	0,12	0,38	0,25	0,37	0,24	0,35	0,0
	Wydajność hybrydyzacji [%]	59	12	38	25	37	24	35	0
POST-P	Wynik hybrydyzacji [pmol a-DNA/pmol rybosomu]	0,33	0,20	0,34	0,32	0,35	0,18	0,26	0,0
	Wydajność hybrydyzacji [%]	33	20	34	32	35	18	26	0
POST-PE	Wynik hybrydyzacji [pmol a-DNA/pmol rybosomu]	0,24	0,08	0,11	0,15	0,30	0,25	0,35	0,01
	Wydajność hybrydyzacji [%]	24	8	11	15	30	25	35	1

Tabela 28. Wyniki reakcji hybrydyzacji antysensowych oligonukleotydów do rybosomów przekształconych w stan pre- lub posttranslokacyjny. Miejsce P lub E obsadzone przez mini-tRNA DHU.

PRE-P, PRE-AP, POST-P, POST-PE oznaczają poszczególne stany translokacyjne rybosomu podczas biosyntezy białka.

Przedstawiono wyniki hybrydyzacji uśrednione z trzech niezależnych eksperymentów.

	a-DNA	#9	#10	#11	#12	#13	#16	#17	#8
PRE-P	Wynik hybrydyzacji [pmol a-DNA/pmol rybosomu]	0,22	0,36	0,50	0,10	0,37	0,22	0,34	0,0
	Wydajność hybrydyzacji [%]	22	36	50	10	37	22	34	0
PRE-AP	Wynik hybrydyzacji [pmol a-DNA/pmol rybosomu]	0,42	0,44	0,67	0,14	0,26	0,15	0,20	0,0
	Wydajność hybrydyzacji [%]	42	44	67	14	26	15	20	0
POST-P	Wynik hybrydyzacji [pmol a-DNA/pmol rybosomu]	0,32	0,39	0,84	0,22	0,36	0,57	0,27	0,0
	Wydajność hybrydyzacji [%]	32	39	84	22	36	57	27	0
POST-PE	Wynik hybrydyzacji [pmol a-DNA/pmol rybosomu]	0,10	0,34	0,46	0,10	0,18	0,27	0,27	0,01
	Wydajność hybrydyzacji [%]	10	34	46	10	18	27	27	1

Tabela 29. Wyniki reakcji hybrydyzacji antysensowych oligonukleotydów do rybosomów przekształconych w stan pre- lub posttranslokacyjny. Miejsce P lub E obsadzone przez mini tRNA TΨC.

PRE-P, PRE-AP, POST-P, POST-PE oznaczają poszczególne stany translokacyjne rybosomu podczas biosyntezy białka.

Przedstawiono wyniki hybrydyzacji uśrednione z trzech niezależnych eksperymentów.

Год	Средняя температура воздуха в градусах Цельсия										
	Январь	Февраль	Март	Апрель	Май	Июнь	Июль	Август	Сентябрь	Октябрь	Ноябрь
1987	10.1	11.2	12.5	14.8	17.2	19.5	21.8	23.1	22.4	20.7	18.9
1988	10.5	11.8	13.1	15.4	17.8	20.1	22.4	23.7	23.0	21.3	19.5
1989	10.9	12.2	13.5	15.8	18.2	20.5	22.8	24.1	23.4	21.7	19.9
1990	11.3	12.6	13.9	16.2	18.6	20.9	23.2	24.5	23.8	22.1	20.3
1991	11.7	13.0	14.3	16.6	19.0	21.3	23.6	24.9	24.2	22.5	20.7
1992	12.1	13.4	14.7	17.0	19.4	21.7	24.0	25.3	24.6	22.9	21.1
1993	12.5	13.8	15.1	17.4	19.8	22.1	24.4	25.7	25.0	23.3	21.5
1994	12.9	14.2	15.5	17.8	20.2	22.5	24.8	26.1	25.4	23.7	21.9
1995	13.3	14.6	15.9	18.2	20.6	22.9	25.2	26.5	25.8	24.1	22.3
1996	13.7	15.0	16.3	18.6	21.0	23.3	25.6	26.9	26.2	24.5	22.7
1997	14.1	15.4	16.7	19.0	21.4	23.7	26.0	27.3	26.6	24.9	23.1
1998	14.5	15.8	17.1	19.4	21.8	24.1	26.4	27.7	27.0	25.3	23.5
1999	14.9	16.2	17.5	19.8	22.2	24.5	26.8	28.1	27.4	25.7	23.9
2000	15.3	16.6	17.9	20.2	22.6	24.9	27.2	28.5	27.8	26.1	24.3
2001	15.7	17.0	18.3	20.6	23.0	25.3	27.6	28.9	28.2	26.5	24.7
2002	16.1	17.4	18.7	21.0	23.4	25.7	28.0	29.3	28.6	26.9	25.1
2003	16.5	17.8	19.1	21.4	23.8	26.1	28.4	29.7	29.0	27.3	25.5
2004	16.9	18.2	19.5	21.8	24.2	26.5	28.8	30.1	29.4	27.7	25.9
2005	17.3	18.6	19.9	22.2	24.6	26.9	29.2	30.5	29.8	28.1	26.3
2006	17.7	19.0	20.3	22.6	25.0	27.3	29.6	30.9	30.2	28.5	26.7
2007	18.1	19.4	20.7	23.0	25.4	27.7	30.0	31.3	30.6	28.9	27.1
2008	18.5	19.8	21.1	23.4	25.8	28.1	30.4	31.7	31.0	29.3	27.5
2009	18.9	20.2	21.5	23.8	26.2	28.5	30.8	32.1	31.4	29.7	27.9
2010	19.3	20.6	21.9	24.2	26.6	28.9	31.2	32.5	31.8	30.1	28.3
2011	19.7	21.0	22.3	24.6	27.0	29.3	31.6	32.9	32.2	30.5	28.7
2012	20.1	21.4	22.7	25.0	27.4	29.7	32.0	33.3	32.6	30.9	29.1
2013	20.5	21.8	23.1	25.4	27.8	30.1	32.4	33.7	33.0	31.3	29.5
2014	20.9	22.2	23.5	25.8	28.2	30.5	32.8	34.1	33.4	31.7	29.9
2015	21.3	22.6	23.9	26.2	28.6	30.9	33.2	34.5	33.8	32.1	30.3
2016	21.7	23.0	24.3	26.6	29.0	31.3	33.6	34.9	34.2	32.5	30.7
2017	22.1	23.4	24.7	27.0	29.4	31.7	34.0	35.3	34.6	32.9	31.1
2018	22.5	23.8	25.1	27.4	29.8	32.1	34.4	35.7	35.0	33.3	31.5
2019	22.9	24.2	25.5	27.8	30.2	32.5	34.8	36.1	35.4	33.7	31.9
2020	23.3	24.6	25.9	28.2	30.6	32.9	35.2	36.5	35.8	34.1	32.3

Таблица 1. Средние температуры воздуха в градусах Цельсия по годам. Данные за период с 1987 по 2020 год. Средние температуры воздуха в градусах Цельсия по годам. Данные за период с 1987 по 2020 год.

Год	Средняя температура воздуха в градусах Цельсия										
	Январь	Февраль	Март	Апрель	Май	Июнь	Июль	Август	Сентябрь	Октябрь	Ноябрь
1987	10.1	11.2	12.5	14.8	17.2	19.5	21.8	23.1	22.4	20.7	18.9
1988	10.5	11.8	13.1	15.4	17.8	20.1	22.4	23.7	23.0	21.3	19.5
1989	10.9	12.2	13.5	15.8	18.2	20.5	22.8	24.1	23.4	21.7	19.9
1990	11.3	12.6	13.9	16.2	18.6	20.9	23.2	24.5	23.8	22.1	20.3
1991	11.7	13.0	14.3	16.6	19.0	21.3	23.6	24.9	24.2	22.5	20.7
1992	12.1	13.4	14.7	17.0	19.4	21.7	24.0	25.3	24.6	22.9	21.1
1993	12.5	13.8	15.1	17.4	19.8	22.1	24.4	25.7	25.0	23.3	21.5
1994	12.9	14.2	15.5	17.8	20.2	22.5	24.8	26.1	25.4	23.7	21.9
1995	13.3	14.6	15.9	18.2	20.6	22.9	25.2	26.5	25.8	24.1	22.3
1996	13.7	15.0	16.3	18.6	21.0	23.3	25.6	26.9	26.2	24.5	22.7
1997	14.1	15.4	16.7	19.0	21.4	23.7	26.0	27.3	26.6	24.9	23.1
1998	14.5	15.8	17.1	19.4	21.8	24.1	26.4	27.7	27.0	25.3	23.5
1999	14.9	16.2	17.5	19.8	22.2	24.5	26.8	28.1	27.4	25.7	23.9
2000	15.3	16.6	17.9	20.2	22.6	24.9	27.2	28.5	27.8	26.1	24.3
2001	15.7	17.0	18.3	20.6	23.0	25.3	27.6	28.9	28.2	26.5	24.7
2002	16.1	17.4	18.7	21.0	23.4	25.7	28.0	29.3	28.6	26.9	25.1
2003	16.5	17.8	19.1	21.4	23.8	26.1	28.4	29.7	29.0	27.3	25.5
2004	16.9	18.2	19.5	21.8	24.2	26.5	28.8	30.1	29.4	27.7	25.9
2005	17.3	18.6	19.9	22.2	24.6	26.9	29.2	30.5	29.8	28.1	26.3
2006	17.7	19.0	20.3	22.6	25.0	27.3	29.6	30.9	30.2	28.5	26.7
2007	18.1	19.4	20.7	23.0	25.4	27.7	30.0	31.3	30.6	28.9	27.1
2008	18.5	19.8	21.1	23.4	25.8	28.1	30.4	31.7	31.0	29.3	27.5
2009	18.9	20.2	21.5	23.8	26.2	28.5	30.8	32.1	31.4	29.7	27.9
2010	19.3	20.6	21.9	24.2	26.6	28.9	31.2	32.5	31.8	30.1	28.3
2011	19.7	21.0	22.3	24.6	27.0	29.3	31.6	32.9	32.2	30.5	28.7
2012	20.1	21.4	22.7	25.0	27.4	29.7	32.0	33.3	32.6	30.9	29.1
2013	20.5	21.8	23.1	25.4	27.8	30.1	32.4	33.7	33.0	31.3	29.5
2014	20.9	22.2	23.5	25.8	28.2	30.5	32.8	34.1	33.4	31.7	29.9
2015	21.3	22.6	23.9	26.2	28.6	30.9	33.2	34.5	33.8	32.1	30.3
2016	21.7	23.0	24.3	26.6	29.0	31.3	33.6	34.9	34.2	32.5	30.7
2017	22.1	23.4	24.7	27.0	29.4	31.7	34.0	35.3	34.6	32.9	31.1
2018	22.5	23.8	25.1	27.4	29.8	32.1	34.4	35.7	35.0	33.3	31.5
2019	22.9	24.2	25.5	27.8	30.2	32.5	34.8	36.1	35.4	33.7	31.9
2020	23.3	24.6	25.9	28.2	30.6	32.9	35.2	36.5	35.8	34.1	32.3

Таблица 2. Средние температуры воздуха в градусах Цельсия по годам. Данные за период с 1987 по 2020 год. Средние температуры воздуха в градусах Цельсия по годам. Данные за период с 1987 по 2020 год.

	a-DNA	#9	#10	#11	#12	#13	#14	#15	#16	#17	#8
PRE-P	Wynik reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [pmol Phe-tRNA <sup>Phe</sup> /pmol rybosomu]	0,78	0,76	0,82	0,75	0,73	0,67	0,75	0,77	0,48	0,99
	Wydajność reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [%]	78	76	82	75	73	67	75	77	48	99
	Inhibicja reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [%]	22	24	18	25	27	33	35	23	52	1
PRE-AP	Wynik reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [pmol Phe-tRNA <sup>Phe</sup> /pmol rybosomu]	0,64	0,76	0,71	0,77	0,82	0,89	0,72	0,69	0,52	0,99
	Wydajność reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [%]	64	76	71	77	82	89	72	69	52	99
	Inhibicja reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [%]	36	24	29	23	18	11	28	31	48	1
POST-P	Wynik reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [pmol Phe-tRNA <sup>Phe</sup> /pmol rybosomu]	0,53	0,43	0,52	0,75	0,53	0,53	0,70	0,58	0,42	0,98
	Wydajność reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [%]	53	43	52	75	53	53	70	58	42	98
	Inhibicja reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [%]	47	57	48	25	47	47	30	42	58	2
POST-PE	Wynik reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [pmol Phe-tRNA <sup>Phe</sup> /pmol rybosomu]	0,44	0,61	0,63	0,60	0,61	0,61	0,63	0,65	0,24	0,99
	Wydajność reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [%]	44	61	63	60	61	61	63	65	24	99
	Inhibicja reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [%]	46	39	37	40	39	39	37	35	76	1

Tabela 30. Wyniki inhibicji reakcji wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup> przez zhybrydyzowane antysensowe oligonukleotydy do rybosomów przekształconych w stan pre- lub posttranslokacyjny. Miejsce P lub E obsadzone przez D-tRNA.

PRE-P, PRE-AP, POST-P, POST-PE oznaczają poszczególne stany translokacyjne rybosomu podczas biosyntezy białka.

Przedstawiono wyniki uśrednione z trzech niezależnych eksperymentów.

Wynik reakcji wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup> bez udziału a-DNA wynosił **0,94 pmola Phe-tRNA<sup>Phe</sup> /pmol rybosomu** (94% wydajności).

Year	Jan	Feb	Mar	Apr	May	June	July	Aug	Sept	Oct	Nov	Dec
1910	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
1911	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
1912	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
1913	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
1914	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
1915	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
1916	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
1917	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
1918	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
1919	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
1920	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
1921	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
1922	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
1923	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
1924	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
1925	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
1926	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
1927	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
1928	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
1929	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
1930	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...

Table showing the results of the experiment conducted during the year 1930. The data is presented in the following table:

	a-DNA	#9	#10	#11	#12	#13	#14	#15	#16	#17	#8
PRE-P	Wynik reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [pmol Phe-tRNA <sup>Phe</sup> /pmol rybosomu]	0,40	0,45	0,43	0,44	0,41	0,48	0,43	0,49	0,44	0,99
	Wydajność reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [%]	40	45	43	44	41	48	43	49	44	99
	Inhibicja reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [%]	60	55	57	56	59	52	57	51	56	1
PRE-AP	Wynik reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [pmol Phe-tRNA <sup>Phe</sup> /pmol rybosomu]	0,57	0,53	0,51	0,56	0,50	0,58	0,51	0,48	0,48	0,99
	Wydajność reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [%]	57	53	51	56	50	58	51	48	48	99
	Inhibicja reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [%]	43	47	49	44	50	42	49	52	52	1
POST-P	Wynik reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [pmol Phe-tRNA <sup>Phe</sup> /pmol rybosomu]	0,67	0,83	0,86	0,61	0,44	0,80	0,76	0,73	0,62	0,98
	Wydajność reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [%]	67	83	86	61	44	80	76	73	62	98
	Inhibicja reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [%]	33	17	14	39	56	20	24	27	38	2
POST-PE	Wynik reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [pmol Phe-tRNA <sup>Phe</sup> /pmol rybosomu]	0,66	0,60	0,47	0,56	0,46	0,63	0,60	0,64	0,61	0,99
	Wydajność reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [%]	66	60	47	56	46	63	60	64	61	99
	Inhibicja reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [%]	34	40	53	44	54	37	40	36	39	1

Tabela 31. Wyniki inhibicji reakcji wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup> przez zhybrydowane antysensowe oligonukleotydy do rybosomów przekształconych w stan pre- lub posttranslokacyjny. Miejsce P lub E obsadzone przez mini-tRNA antykodonowe.

PRE-P, PRE-AP, POST-P, POST-PE oznaczają poszczególne stany translokacyjne rybosomu podczas biosyntezy białka.

Przedstawiono wyniki uśrednione z trzech niezależnych eksperymentów.

Wynik reakcji wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup> bez udziału a-DNA wynosił **0,94 pmola Phe-tRNA<sup>Phe</sup> /pmol rybosomu** (94% wydajności).

№	№№									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09	0,10
	0,11	0,12	0,13	0,14	0,15	0,16	0,17	0,18	0,19	0,20
	0,21	0,22	0,23	0,24	0,25	0,26	0,27	0,28	0,29	0,30
	0,31	0,32	0,33	0,34	0,35	0,36	0,37	0,38	0,39	0,40
	0,41	0,42	0,43	0,44	0,45	0,46	0,47	0,48	0,49	0,50
	0,51	0,52	0,53	0,54	0,55	0,56	0,57	0,58	0,59	0,60
	0,61	0,62	0,63	0,64	0,65	0,66	0,67	0,68	0,69	0,70
	0,71	0,72	0,73	0,74	0,75	0,76	0,77	0,78	0,79	0,80
	0,81	0,82	0,83	0,84	0,85	0,86	0,87	0,88	0,89	0,90
	0,91	0,92	0,93	0,94	0,95	0,96	0,97	0,98	0,99	1,00

Таблица 1. Результаты испытаний на прочность при растяжении образцов из полипропилена, армированного стекловолокном. Испытания проводились на машине ИД-1000. Испытанные образцы: 1 - полипропилен; 2 - полипропилен, армированный стекловолокном; 3 - полипропилен, армированный стекловолокном, с добавлением диоксида кремния; 4 - полипропилен, армированный стекловолокном, с добавлением диоксида кремния и карбоната кальция; 5 - полипропилен, армированный стекловолокном, с добавлением диоксида кремния, карбоната кальция и гидроксида алюминия; 6 - полипропилен, армированный стекловолокном, с добавлением диоксида кремния, карбоната кальция, гидроксида алюминия и оксида цинка; 7 - полипропилен, армированный стекловолокном, с добавлением диоксида кремния, карбоната кальция, гидроксида алюминия, оксида цинка и оксида титана; 8 - полипропилен, армированный стекловолокном, с добавлением диоксида кремния, карбоната кальция, гидроксида алюминия, оксида цинка, оксида титана и оксида магния; 9 - полипропилен, армированный стекловолокном, с добавлением диоксида кремния, карбоната кальция, гидроксида алюминия, оксида цинка, оксида титана, оксида магния и оксида алюминия; 10 - полипропилен, армированный стекловолокном, с добавлением диоксида кремния, карбоната кальция, гидроксида алюминия, оксида цинка, оксида титана, оксида магния, оксида алюминия и оксида кальция.

	a-DNA	#9	#12	#13	#14	#15	#16	#17	#8
PRE-P	Wynik reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [pmol Phe-tRNA <sup>Phe</sup> /pmol rybosomu]	0,26	0,30	0,40	0,45	0,42	0,38	0,40	0,99
	Wydajność reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [%]	26	30	40	45	42	38	40	99
	Inhibicja reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [%]	74	70	60	55	58	62	60	1
PRE-AP	Wynik reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [pmol Phe-tRNA <sup>Phe</sup> /pmol rybosomu]	0,59	0,58	0,61	0,56	0,53	0,50	0,58	0,99
	Wydajność reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [%]	59	58	61	56	53	50	58	99
	Inhibicja reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [%]	41	42	39	44	47	50	42	1
POST-P	Wynik reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [pmol Phe-tRNA <sup>Phe</sup> /pmol rybosomu]	0,39	0,60	0,48	0,53	0,59	0,55	0,45	0,98
	Wydajność reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [%]	39	60	48	53	59	55	45	98
	Inhibicja reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [%]	61	40	52	47	41	45	55	2
POST-PE	Wynik reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [pmol Phe-tRNA <sup>Phe</sup> /pmol rybosomu]	0,49	0,38	0,46	0,22	0,49	0,42	0,20	0,99
	Wydajność reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [%]	49	38	46	22	49	42	20	99
	Inhibicja reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [%]	51	62	54	78	51	58	80	1

Tabela 32. Wyniki inhibicji reakcji wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup> przez zhybrydyzowane antysensowe oligonukleotydy do rybosomów przekształconych w stan pre- lub posttranslokacyjny. Miejsce P lub E obsadzone przez mini-tRNA DHU.

PRE-P, PRE-AP, POST-P, POST-PE oznaczają poszczególne stany translokacyjne rybosomu podczas biosyntezy białka.

Przedstawiono wyniki uśrednione z trzech niezależnych eksperymentów.

Wynik reakcji wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup> bez udziału a-DNA wynosił **0,94 pmola Phe-tRNA<sup>Phe</sup> /pmol rybosomu** (94% wydajności).





	a-DNA	#9	#10	#11	#12	#13	#16	#17	#8
PRE-P	Wynik reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [pmol Phe-tRNA <sup>Phe</sup> /pmol rybosomu]	0,47	0,41	0,46	0,48	0,41	0,38	0,20	0,99
	Wydajność reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [%]	47	41	46	48	41	38	20	99
	Inhibicja reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [%]	53	59	54	52	59	62	80	1
PRE-AP	Wynik reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [pmol Phe-tRNA <sup>Phe</sup> /pmol rybosomu]	0,71	0,57	0,54	0,53	0,59	0,75	0,70	0,99
	Wydajność reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [%]	71	57	54	53	59	75	70	99
	Inhibicja reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [%]	29	43	46	47	41	25	30	1
POST-P	Wynik reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [pmol Phe-tRNA <sup>Phe</sup> /pmol rybosomu]	0,75	0,85	0,86	0,60	0,45	0,65	0,46	0,98
	Wydajność reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [%]	75	85	86	60	45	65	46	98
	Inhibicja reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [%]	25	15	14	40	55	35	54	2
POST-PE	Wynik reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [pmol Phe-tRNA <sup>Phe</sup> /pmol rybosomu]	0,58	0,27	0,60	0,60	0,60	0,69	0,48	0,99
	Wydajność reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [%]	58	27	60	60	60	69	48	99
	Inhibicja reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [%]	42	63	40	40	40	31	52	1

Tabela 33. Wyniki inhibicji reakcji wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup> przez zhybrydyzowane antysensowe oligonukleotydy do rybosomów przekształconych w stan pre- lub posttranslokacyjny. Miejsce P lub E obsadzone przez mini-tRNA TΨC.

PRE-P, PRE-AP, POST-P, POST-PE oznaczają poszczególne stany translokacyjne rybosomu podczas biosyntezy białka.

Przedstawiono wyniki uśrednione z trzech niezależnych eksperymentów.

Wynik reakcji wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup> bez udziału a-DNA wynosił **0,94 pmola Phe-tRNA<sup>Phe</sup> /pmol rybosomu** (94% wydajności).

No.	Name	Address	City	State	Zip
1	John Doe	123 Main St	New York	NY	10001
2	Jane Smith	456 Elm St	Los Angeles	CA	90001
3	Robert Johnson	789 Oak St	Chicago	IL	60601
4	Mary Brown	101 Pine St	Houston	TX	77001
5	David Wilson	202 Cedar St	Phoenix	AZ	85001
6	Susan Taylor	303 Birch St	Philadelphia	PA	19101
7	Michael Anderson	404 Maple St	San Antonio	TX	78101
8	Linda White	505 Walnut St	San Diego	CA	92101
9	James Green	606 Spruce St	Dallas	TX	75201
10	Karen Black	707 Ash St	San Jose	CA	95101

This is a list of names and addresses for the purpose of the study. The data is accurate as of the date of collection. All names are listed in alphabetical order by last name.

### Oligonukleotydy #9 i #16

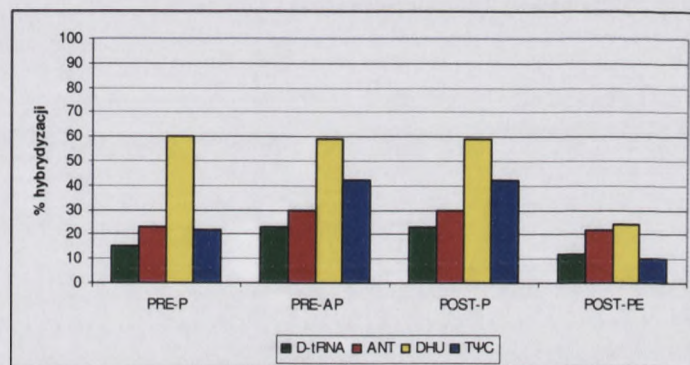
Oligonukleotydy #9 i #16 zostały przeze mnie zaprojektowane jako komplementarne do fragmentów 26S rRNA oddziałujących z ramieniem akceptorowym cząsteczki tRNA zajmującej rybosomalne miejsce A. Oligonukleotyd #9 jest komplementarny do jednoniciowego fragmentu domeny IV 26S rRNA, znajdującego się między helisami H70 i H71 (nukleotydy 2265-2276 według numeracji *O. sativa*; Rysunek 63). Fragment ten (nukleotydy w pozycjach 2275 i 2276 L-rRNA) jest odpowiedzialny za oddziaływanie z nukleotydami 72 i 73 ramienia akceptorowego cząsteczki tRNA w miejscu A (Tabela 21). Oligonukleotyd #16 jest komplementarny do fragmentu pętli centralnej domeny V 26S rRNA, między helisami H74 i H89 (nukleotydy 2446-2457), odpowiedzialnego za oddziaływanie z nukleotydami 74 - 76 końca CCA cząsteczki tRNA w miejscu A (Rysunek 63 i Tabela 22). Z tego względu do badań wpływu a-DNA #9 i #16 na proces translacji, zastosowałam cząsteczki mini-tRNA antykodonowe, mini-tRNA DHU, mini-tRNA TΨC oraz D-tRNA.

Sekwencja, do której zaprojektowałam oligodeoksynukleotyd #9 charakteryzuje się wysoką zachowawczością, aż 7 spośród 12 nukleotydów wykazuje ponad 98% konserwatywności. Sekwencja docelowa dla a-DNA #16 jest również zachowawcza, 3 nukleotydy wykazują konserwatywność w ponad 98%, a 2 – w ponad 90% (dane na podstawie [22]).

W stanie pretranslokacyjnym, oligonukleotyd #9 hybrydyzował z wydajnością równą 23%, 22%, 60% i 15% (Rysunek 68), odpowiednio dla stanu z obsadzonym miejscem P przez mini-tRNA antykodonowe, mini-tRNA TΨC, mini-tRNA DHU i deacylowany tRNA. Gdy dodatkowo obsadziłam miejsce A (przez Phe-tRNA<sup>Phe</sup> we wszystkich przypadkach), efektywność hybrydyzacji wzrosła tylko w jednej z 4 testowanych możliwości - gdy rybosomalne miejsce P było obsadzone przez mini-tRNA DHU. Taka sytuacja związana jest zapewne z faktem, że mini-tRNA DHU posiada inne miejsca interakcji z 26S rRNA niż pozostałe cząsteczki mini-tRNA oraz cząsteczka tRNA. Kiedy w miejscu P znajduje się mini-tRNA DHU, w rybosomie istnieje więcej możliwości oddziaływań z cząsteczkami biorącymi udział w translacji oraz z a-DNA niż w przypadku tRNA, stąd obserwowany wyższy poziom hybrydyzacji. Taka sama sytuacja prawdopodobnie ma miejsce również w przypadku pozostałych mini-tRNA, jednak niższa hybrydyzacja w porównaniu z rybosomami obsadzonymi tRNA sugeruje, że w oddziaływania te nie są zaangażowane wprowadzane do układu a-DNA. Być może występują dodatkowe oddziaływania III-rzędowe w 26S rRNA, z białkami rybosomalnymi lub/i z innymi cząsteczkami aktywnymi w procesie translacji. Obserwowałam znaczny wzrost poziomu hybrydyzacji w przypadku obsadzenia miejsca P



przez D-tRNA, mini-tRNA T $\Psi$ C oraz mini-tRNA antykodonowe w stanie PRE-AP. Wynika z tego, że po utworzeniu wiązania peptydowego, mają miejsce zmiany konformacyjne w obrębie helis H70 i H71. W konsekwencji rybosom przybiera bardziej otwartą strukturę.



**Rysunek 68.** Porównanie stopnia hybrydyzacji oligonukleotydu #9 do rybosomów obsadzonych mini-tRNA lub D-tRNA.

Oznaczenia: D-tRNA – deacylowany tRNA; ANT – mini-tRNA antykodonowe; DHU – mini-tRNA DHU; T $\Psi$ C – mini-tRNA T $\Psi$ C.

W stanie posttranslokacyjnym POST-P, efektywność hybrydyzacji utrzymywała się na wysokim poziomie w porównaniu ze stanem pretranslokacyjnym (w przypadku miejsca P obsadzonego przez D-tRNA) lub stopniowo zaczynała maleć (w przypadku obsadzenia miejsca P przez mini-tRNA T $\Psi$ C i DHU; Rysunek 68). Kiedy miejsce P w tym stanie było obsadzone mini-tRNA T $\Psi$ C, następowało zwiększenie stopnia hybrydyzacji a-DNA #9 o 12%. Takie różnice w hybrydyzacji wynikają zapewne z różnic strukturalnych między cząsteczkami mini-tRNA.

Natomiast przy przejściu do stanu POST-PE we wszystkich przypadkach obserwowałam znaczny spadek hybrydyzacji oligonukleotydu #9, dochodzący do 20% różnicy. **Wynik ten wskazuje na zmianę konformacji rybosomu po translokacji cząsteczki tRNA do miejsca E, która prowadzi do mniejszej dostępności jednoniciowego fragmentu pomiędzy helisami H70 i H71.**

Porównując procent hybrydyzacji dla rybosomów obsadzonych różnymi mini-tRNA oraz D-tRNA, zauważyłam, że w każdym stanie hybrydyzacja oligonukleotydu #9 zachodziła ze znacznie mniejszą wydajnością przy obsadzeniu rybosomów przez cząsteczkę tRNA. Jednoznacznie obserwowałam nieco odmienną konformację rybosomów, gdy miejsce P lub E zajęte były przez różne cząsteczki mini-tRNA lub tRNA. **Na podstawie tego wyniku**

Wyniki z badań nad rolą miRNA w regulacji ekspresji genów w tkance tłuszczowej. W tym celu wykorzystano technikę RT-PCR z analizą ilościową (qPCR) oraz techniki sekwencjonowania. Wyniki wykazały, że ekspresja niektórych miRNA jest zwiększona w tkance tłuszczowej, co może być związane z procesami metabolicznymi i regulacją genów. Szczegółowe dane i analizy przedstawiono w dalszej części pracy.



Wykres 1. Wykres słupkowy przedstawiający względną ekspozycję miRNA w tkance tłuszczowej. Oś pionowa przedstawia wartość względną ekspozycji miRNA. Oś pozioma przedstawia nazwy miRNA: miR-143, miR-145, miR-103, miR-101. Wyniki są przedstawione dla dwóch grup: kontrolnej (szary) i tkanki tłuszczowej (żółty). Wyniki wykazują, że ekspozycja miR-143 i miR-145 jest znacznie wyższa w tkance tłuszczowej niż w grupie kontrolnej.

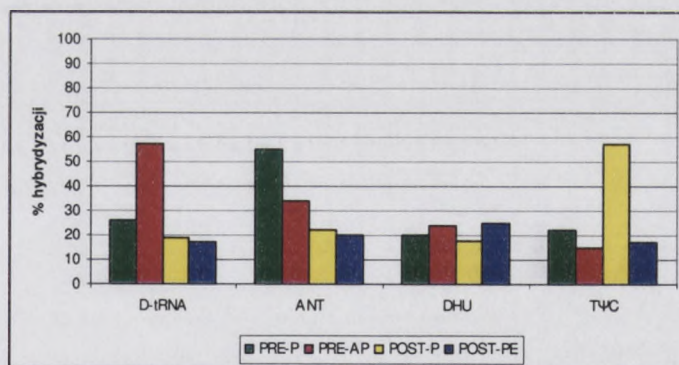
W celu potwierdzenia roli miRNA w regulacji ekspresji genów w tkance tłuszczowej, przeprowadzono badania na modelach zwierzęcych. Wyniki wykazały, że ekspozycja miRNA na poziomie tkanki tłuszczowej jest powiązana z procesami metabolicznymi i regulacją genów. Szczegółowe dane i analizy przedstawiono w dalszej części pracy.

Podsumowanie: Wyniki badań nad rolą miRNA w regulacji ekspresji genów w tkance tłuszczowej wykazały, że ekspozycja niektórych miRNA jest zwiększona w tkance tłuszczowej, co może być związane z procesami metabolicznymi i regulacją genów. Wyniki te mają istotne znaczenie dla zrozumienia mechanizmów regulacji genów w tkance tłuszczowej.

Podkreślenie: Wyniki badań nad rolą miRNA w regulacji ekspresji genów w tkance tłuszczowej wykazały, że ekspozycja niektórych miRNA jest zwiększona w tkance tłuszczowej, co może być związane z procesami metabolicznymi i regulacją genów. Wyniki te mają istotne znaczenie dla zrozumienia mechanizmów regulacji genów w tkance tłuszczowej.

wyciągnęłam wniosek, że nukleotydy w pozycjach 72 i 73 cząsteczki tRNA zajmującej miejsce A oraz fragment 26S rRNA pomiędzy helisami H70 i H71 oddziałujący z tRNA w tych pozycjach, znajdują się w podobnej konformacji na każdym etapie biosyntezy białka. Jednocześnie połączenie między nimi jest na tyle silne, że badana część L-rRNA nie jest w dużej mierze dostępna dla innych oddziaływań, na przykład z komplementarnym oligodeoksynukleotydem. Ogólnie, gdy rybosomalne miejsca P lub E były zajęte przez cząsteczki mini-tRNA, konformacja rybosomu wydawała się być bardziej rozluźniona, „otwarta” w regionie między helisami H70 i H71 26S rRNA. Moim zdaniem jest to spowodowane faktem, że pełnej długości cząsteczka tRNA posiada więcej miejsc oddziaływań z 26S rRNA. Występowanie tych interakcji może czynić miejsce docelowe dla oligodeoksynukleotydu mniej dostępnym dla hybrydyzacji. Natomiast wykluczenie z cząsteczki tRNA kilku bądź kilkunastu miejsc interakcji z L-rRNA powoduje większą dostępność sekwencji docelowej dla oligonukleotydu, co obserwowałam jako większy stopień hybrydyzacji.

We wszystkich stanach translokacyjnych obserwowałam duże różnice pomiędzy stopniem hybrydyzacji oligonukleotydu #16 przy obsadzonych miejscach P lub E przez różne molekuly (Rysunek 69). Wyniki te wskazują na istnienie odmiennych wzorów zmian konformacyjnych rybosomu w zależności od cząsteczki obsadzającej rybosom.



**Rysunek 69. Porównanie stopnia hybrydyzacji oligonukleotydu #16 do rybosomów obsadzonych mini-tRNA lub D-tRNA.**

Oznaczenia: D-tRNA – deacylowany tRNA; ANT – mini-tRNA antykodonowe; DHU – mini-tRNA DHU; TYC – mini-tRNA TYC.

W stanie PRE-P w rybosomie obsadzonym przez mini-tRNA antykodonowe, sekwencja docelowa a-DNA #16 była wysoce dostępna (50 % hybrydyzacji). Po obsadzeniu również miejsca A przez AA-tRNA badany fragment pętli centralnej domeny V 26S rRNA stał się mniej dostępnym (34 %). W stanie posttranslokacyjnym, w obu przypadkach, zarówno



The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that every entry should be supported by a valid receipt or invoice. This ensures transparency and allows for easy verification of the data. The second part of the document provides a detailed breakdown of the financial data for the period from January to December. It includes a table showing the monthly income and expenses, along with a summary of the total revenue and costs for the year. The final part of the document concludes with a statement of the net profit and a recommendation for the future. It suggests that the company should continue to focus on reducing expenses and increasing sales to improve its overall financial performance.

W. J. [Name]

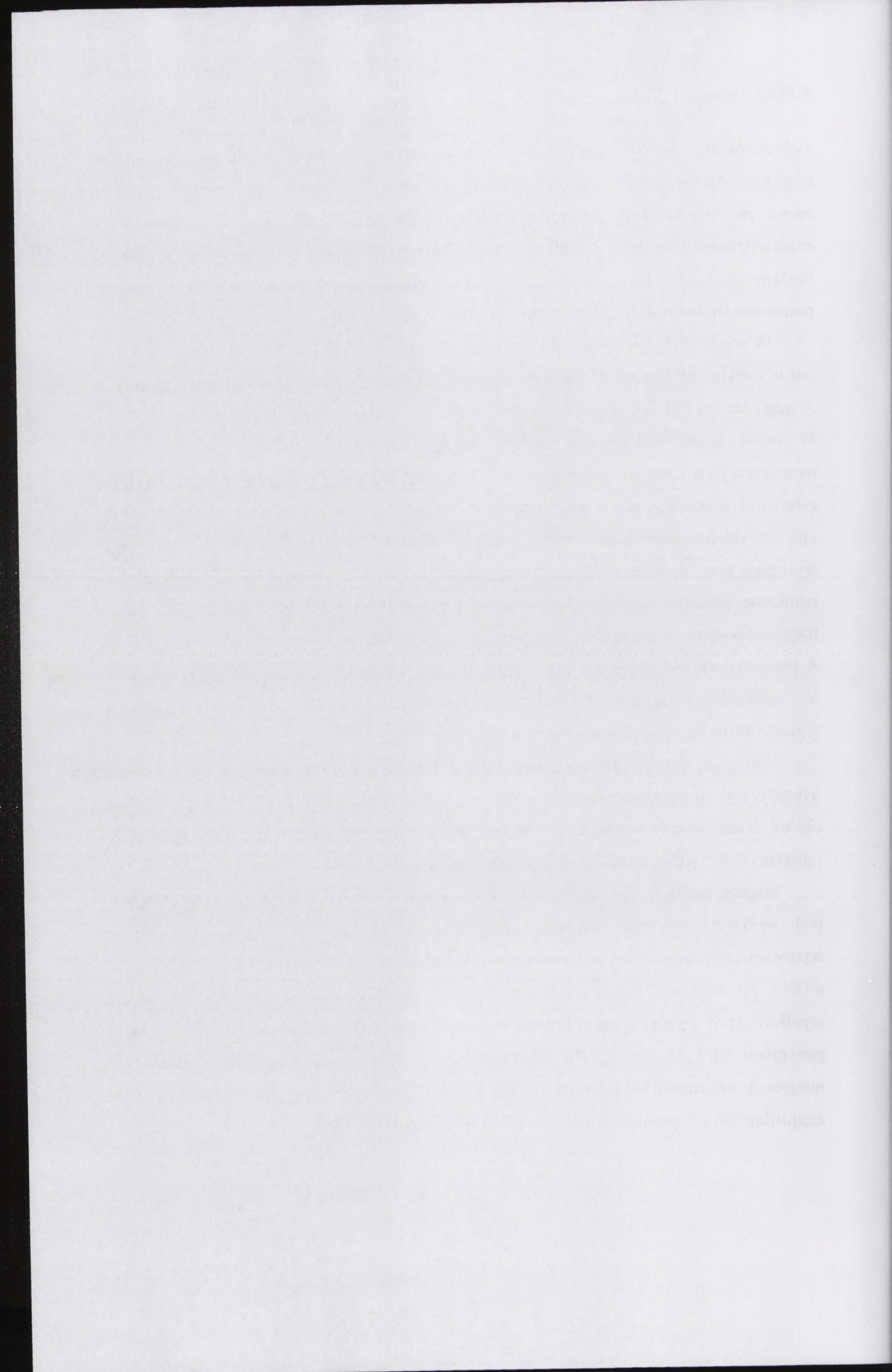
The following table shows the monthly income and expenses for the year 2023. The total revenue for the year was \$1,200,000 and the total expenses were \$800,000, resulting in a net profit of \$400,000. It is recommended that the company continue to focus on reducing expenses and increasing sales to improve its overall financial performance.

z obsadzonym tylko miejscem P jak i z obsadzonymi miejscami P i E, dostępność tego fragmentu nie zmieniła się (stopień hybrydyzacji wynosił 22 % i 21 %). Wynika z tego, że **zaraz po translokacji nastąpiła zmiana konformacji pętli centralnej domeny V w sąsiedztwie helis H74 i H89 na zamkniętą. Konformacja ta utrzymuje się aż do następnego cyklu elongacyjnego, gdzie po zajęciu miejsca P przez AA-tRNA, rybosom ponownie rozluźni strukturę w tym regionie.**

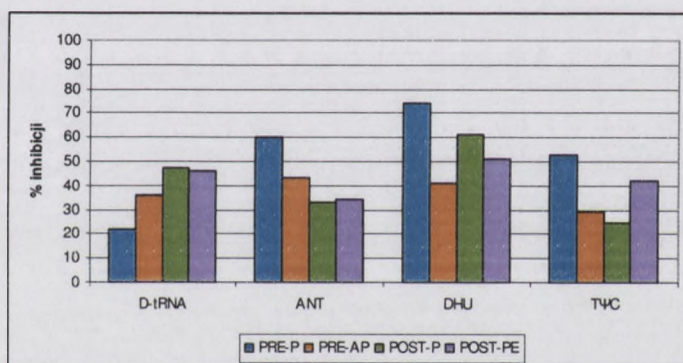
W stanie PRE-P w rybosomie obsadzonym przez mini-tRNA TΨC sekwencja docelowa jest w niewielkim stopniu dostępna dla oligonukleotydu #16, a po obsadzeniu również miejsca A fragment ten stał się jeszcze mniej dostępny (zmiana stopnia hybrydyzacji z 22% do 15 %). W stanie posttranslokacyjnym nastąpił wzrost dostępności docelowej sekwencji (57% hybrydyzacji) a następnie jej spadek aż o 30%. Wskazuje to na istnienie otwartej struktury rybosomu w stanie posttranslokacyjnym przy obsadzonym miejscu P przez mini-tRNA TΨC i jej zamykanie się po dodatkowym obsadzeniu miejsca E. Podobne zmiany w stanie POST-występują przy obsadzeniu miejsca P przez D-tRNA. Jednak w tym przypadku mają miejsce odmienne zmiany konformacyjne w stanie pretranslokacyjnym. W stanie PRE-P badany fragment domeny V jest w 27% dostępny dla oligonukleotydu. Po obsadzeniu również miejsca A przez AA-tRNA dostępność tego miejsca ulega zwiększeniu ponad dwukrotnie (do 57%). Nastąpiła zmiana konformacji w bliskim sąsiedztwie helis H74 i H89 i rybosom przyjął w tym regionie strukturę bardziej rozluźnioną.

Natomiast w przypadku obsadzenia miejsca P przez mini-tRNA DHU, najwyższy stopień hybrydyzacji oligonukleotydu #16 obserwowałam w stanie PRE-P (20%) oraz POST-PE (25%). Taki wynik wskazuje na zmianę konformacji rybosomu zaraz po translokacji i utrzymywanie się jej aż do następnego cyklu elongacyjnego.

Stopień inhibicji wiązania AA-tRNA do rybosomów obsadzonych cząsteczką D-tRNA pod wpływem zhybrydyzowanego oligonukleotydu #9 lub #16 utrzymywał się na wyrównanym poziomie we wszystkich stanach translokacyjnych (Rysunek 70 i Rysunek 71). a-DNA #9 inhibował proces biosyntezy białka w 22-46%, a-DNA #16 – w 23-42%. **Z wyników tych wyciągnęłam wniosek, że przed i po reakcji translokacji, nukleotydy w pozycjach 72 i 73 oraz 74-76 ramienia akceptorowego cząsteczki tRNA zajmującej miejsce A nie muszą oddziaływać z fragmentami pętli centralnej domeny V 26S rRNA znajdującymi się, pomiędzy helisami H70 i H71 oraz H74 i H89.**



Porównując procent inhibicji reakcji wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup> dla rybosomów obsadzonych różnymi mini-tRNA oraz D-tRNA, zauważyłam, że nie dla każdego mini-tRNA obserwowany efekt inhibitorowy a-DNA #9 lub #16 był wyższy niż przy obsadzeniu rybosomów przez cząsteczkę tRNA (Rysunek 70 i Rysunek 71). Kiedy w rybosomalnych miejscach P lub E znajdowała się cząsteczką mini-tRNA DHU, we wszystkich stanach translokacyjnych obserwowałam znacznie wyższą inhibicję reakcji wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup> przez a-DNA #9 lub #16, w porównaniu z rybosomami z przyłączoną cząsteczką D-tRNA. Podobna sytuacja miała miejsce, kiedy rybosomy obsadzone były przez cząsteczkę mini-tRNA antykodonowe w stanach PRE-P i PRE-AP oraz mini-tRNA TΨC w stanach PRE-P oraz POST-P. Wyniki te, w połączeniu z wyższą wydajnością hybrydyzacji oligonukleotydów #9 oraz #16 w tych stanach, wskazują na różnice konformacyjne rybosomu w zależności od molekuly obsadzającej miejsce P.



**Rysunek 70. Porównanie stopnia inhibicji reakcji wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup> powodowanej przez oligonukleotyd #9 w rybosomach obsadzonych mini-tRNA lub D-tRNA.**

Oznaczenia: D-tRNA – deacylowany tRNA; ANT – mini-tRNA antykodonowe; DHU – mini-tRNA DHU; TΨC – mini-tRNA TΨC.

Wykazałam, że oligonukleotydy #9 oraz #16 skutecznie inhibują reakcję wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup> do rybosomu, zwłaszcza w stanie pretranslokacyjnym z obsadzonym miejscem P przez mini-tRNA DHU (odpowiednio, 74% i 62% inhibicji). W stanie PRE-AP oligonukleotydy #9 i #16 hybrydyzowały z podobną wydajnością jak w stanie PRE-P, jednak stopień inhibicji reakcji wiązania AA-tRNA do rybosomu był znacznie niższy w obu przypadkach. Prawdopodobnie regiony między helisami H70 i H71 oraz między helisami H74 i H89, angażując się w wiązanie AA-tRNA do miejsca A, wzmacniają oddziaływanie z cząsteczką mini-tRNA DHU zajmującą miejsce P i dzięki temu dostęp do niej staje się utrudniony.

W czterech testowanych przypadkach zaobserwowałam słabsze inhibitorowe działanie a-DNA #9 w porównaniu do jego efektu w rybosomach z przyłączoną cząsteczką D-tRNA. Są

Technologia produkcji takich reagentów jakimi są *Pro-RNA<sup>32</sup>* dla systemów odczytujących mino-RNA oraz D-RNA, umożliwia to nie tylko odczytanie sekwencji genów, ale także monitorowanie ich ekspresji w czasie rzeczywistym. W tym celu wykorzystano systemy oparte na *Pro-RNA<sup>32</sup>* i D-RNA, które umożliwiają odczytanie sekwencji genów i monitorowanie ich ekspresji w czasie rzeczywistym. W tym celu wykorzystano systemy oparte na *Pro-RNA<sup>32</sup>* i D-RNA, które umożliwiają odczytanie sekwencji genów i monitorowanie ich ekspresji w czasie rzeczywistym.

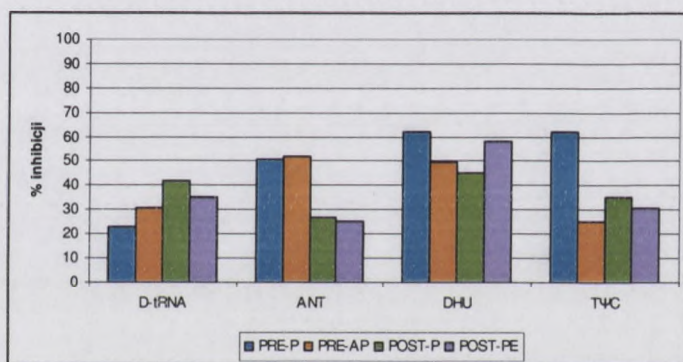


Wykres 1. Wyniki analizy ekspresji genów w komórkach traktowanych D-RNA. Wykres przedstawia zmiany w poziomie ekspresji różnych genów w stosunku do wartości początkowych. Wyniki są przedstawione jako średnie wartości z błędami standardowymi.

Wyniki te sugerują, że ekspozycja na D-RNA może prowadzić do zmiany poziomu ekspresji niektórych genów. Wyniki te są zgodne z oczekiwaniami, że D-RNA może działać jako czynniki regulacyjne. Wyniki te są zgodne z oczekiwaniami, że D-RNA może działać jako czynniki regulacyjne. Wyniki te są zgodne z oczekiwaniami, że D-RNA może działać jako czynniki regulacyjne.

W celu potwierdzenia tych wyników przeprowadzono dodatkowe badania. Wyniki te są zgodne z oczekiwaniami, że D-RNA może działać jako czynniki regulacyjne. Wyniki te są zgodne z oczekiwaniami, że D-RNA może działać jako czynniki regulacyjne.

to następujące przypadki: w stanie PRE-AP z mini-tRNA TΨC w miejscu P (5% różnicy dla a-DNA #9 oraz 6% dla a-DNA #16), w stanie POST-P z mini-tRNA antykodonowym w miejscu E (14% różnicy dla a-DNA #9 oraz 15% dla a-DNA #16) oraz w stanie POST-PE z mini-tRNA TΨC (6% różnicy dla a-DNA #9 oraz 4% dla a-DNA #16) lub mini-tRNA antykodonowym w miejscu E (12% różnicy dla a-DNA #9 oraz 10% dla a-DNA #16). Różnice w stopniu inhibicji wiązania AA-tRNA do rybosomu obsadzonego mini-tRNA TΨC lub D-tRNA nie wydają się być statystycznie istotne, dlatego wyciągnęłam wniosek, że w obu tych przypadkach rybosom znajduje się w podobnej konformacji. Natomiast niemal dwukrotnie wyższy poziom hybrydyzacji a-DNA #9 lub #16 do rybosomów obsadzonych mini-tRNA TΨC wynika zapewne z mniejszych rozmiarów tej cząsteczki w porównaniu z D-tRNA.



**Rysunek 71. Porównanie stopnia inhibicji reakcji wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup> powodowanej przez oligonukleotyd #16 w rybosomach obsadzonych mini-tRNA lub D-tRNA.**

Oznaczenia: D-tRNA – deacylowany tRNA; ANT – mini-tRNA antykodonowe; DHU – mini-tRNA DHU; TΨC – mini-tRNA TΨC.

Dość duże różnice w inhibicji reakcji wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup> rybosomów z mini-tRNA antykodonowym oraz D-tRNA w stanie posttranslokacyjnym jednoznacznie świadczą o ich odmiennej konformacji. Jednocześnie ponad dwukrotnie wyższa hybrydyzacja oligonukleotydu #9 w tym stanie sugeruje konformację bardziej „rozluźnioną” w obrębie helis H70 i H71, kiedy w rybosomie znajduje się cząsteczka mini-tRNA antykodonowe. Jak należało się spodziewać, wynik ten spowodowany jest zapewne mniejszym rozmiarem cząsteczki mini-tRNA. Ze względu na brak ramienia i pętli DHU oraz TΨC, w mini-tRNA antykodonowym nie występuje 5 oddziaływań z 26S rRNA, typowych dla cząsteczek tRNA zajmujących miejsce P (pozycje 1910, 1923, 1924 26S rRNA) lub E (pozycje 2112 oraz 2117 26S rRNA) pozostawiając te rejony wolne dla oddziaływania z a-DNA. Ma to swoje odzwierciedlenie również w niższym stopniu inhibicji wiązania AA-tRNA, dlatego, że z miejscami tymi mogą oddziaływać pozostałe czynniki biorące udział w procesie translacji. Skutkiem tego byłaby

in badzianach przysiadli w stanie P2R-AP z mini-RNA T1C w miejscu P (2P) tzn. dla a-DNA 50 oraz 62 dla a-DNA 510; w stanie P2STP z mini-RNA antykodonowym w miejscu P (14P) tzn. dla a-DNA 50 oraz 137 dla a-DNA 510 oraz w stanie P2ST-2E z mini-RNA T1C (6E) tzn. dla a-DNA 50 oraz 48 dla a-DNA 510) lub mini-RNA antykodonowa w miejscu E (15E) tzn. dla a-DNA 50 oraz 105 dla a-DNA 510). Reakcje w miejscu odbioru wstania AA-RNA do rybosomu obciachowego mini-RNA T1C lub D-10EA nie wywoly nie byl rozpoznanie istniejace, dlatego wyzyskaniem wniosk, ze w obu grup przysiadach rybosom znajduje sie w podobnej konfiguracji. Niekoniecznie jednakie rozwiazanie rybosomu przy wyzyskaniu a-DNA 50 lub 510 do rybosomu obciachowego mini-RNA T1C wyzyskujemy z nastepujacych powodow: (1) czestosci w porownaniu z D-10EA



Figura 7. Procentowa liczba rybosomów w stanach P2R-AP (T1C) i P2STP (D-10EA) w rybosomach obciachowych mini-RNA T1C i D-10EA. Stan P2R-AP (T1C) - stan odbioru wstania AA-RNA do rybosomu obciachowego mini-RNA T1C; stan P2STP (D-10EA) - stan odbioru wstania AA-RNA do rybosomu obciachowego mini-RNA D-10EA.

Dane z tej tabeli widać, że w obu przypadkach (dla a-DNA 50 i 510) rybosomy w stanie P2R-AP (T1C) i P2STP (D-10EA) w stanie posttranslacyjnym (po zakończeniu syntezy białka) znajdują się w podobnym stanie. W tym stanie rybosomy zawierają białko "rozpuszczone" w formie białka H70 i H71, kiedy w rybosomie znajduje się cząsteczka mini-RNA antykodonowa. Jak nastąpiło się podobieństwo (lub różnica) w stanie posttranslacyjnym (po zakończeniu syntezy białka) w rybosomach obciachowych mini-RNA T1C i D-10EA? W tym celu wykonano badania, które miały na celu określenie, czy w rybosomach obciachowych mini-RNA T1C i D-10EA występuje różnica w stanie posttranslacyjnym (po zakończeniu syntezy białka). Wyniki tych badań przedstawiono w tabeli 8. Jak widać, w rybosomach obciachowych mini-RNA T1C i D-10EA występuje różnica w stanie posttranslacyjnym (po zakończeniu syntezy białka). Wyniki tych badań przedstawiono w tabeli 8. Jak widać, w rybosomach obciachowych mini-RNA T1C i D-10EA występuje różnica w stanie posttranslacyjnym (po zakończeniu syntezy białka).

dalsza możliwość przeprowadzania biosyntezy białka, niezależnie od a-DNA obecnego w rybosomie.

Duże różnice pomiędzy stopniem hybrydyzacji oligonukleotydów #9 i #16 świadczą jednoznacznie o odmiennych wzorach zmian konformacyjnych rybosomu w pozycjach 2265-2276 i 2265-2276. Jednak podobna inhibicja powodowana przez te a-DNA we wszystkich stanach translokacyjnych świadczy, że regiony te ogrywają istotną rolę w wiązaniu ramienia akceptorowego cząsteczki tRNA w miejscu A na tych samych etapach biosyntezy białka.

### Oligonukleotydy #10 i #11

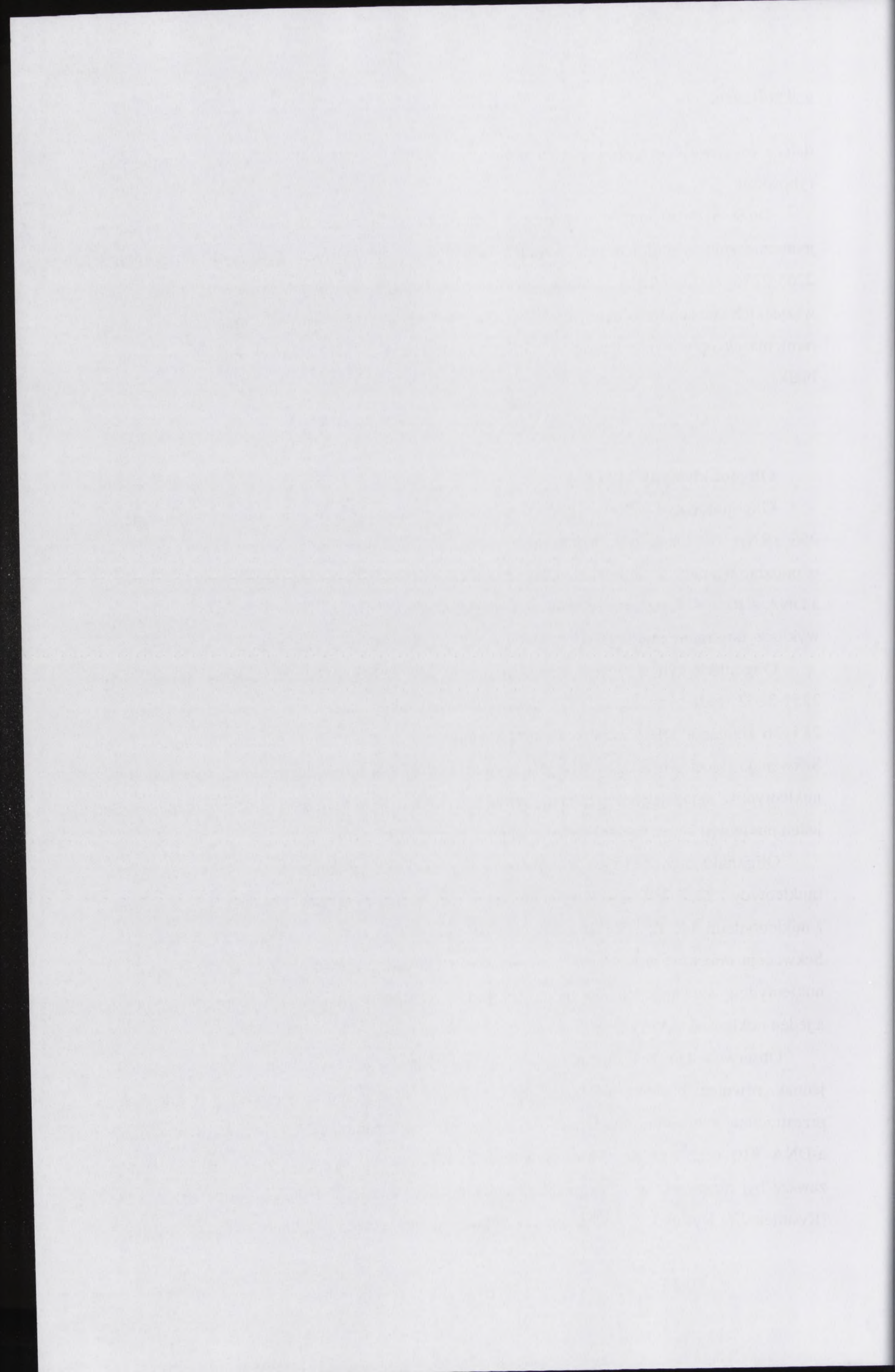
Oligonukleotydy #10 i #11 są komplementarne do dwóch różnych miejsc w domenie IV 26S rRNA (Rysunek 63), jednak w obu przypadkach miejsca te odgrywają istotną rolę w oddziaływaniach z ramieniem DHU cząsteczki tRNA. Z tego względu do badań wpływu a-DNA #10 i #11 na proces translacji, zastosowałam D-tRNA oraz cząsteczki, z których wykluczyłam ramię i pętlę DHU, to jest mini-tRNA antykodonowe oraz mini-tRNA TΨC.

Oligonukleotyd #10 jest komplementarny do helisy H70 26S rRNA (nukleotydy 2251-2262 według numeracji *O. sativa*), odpowiedzialnej za oddziaływanie z nukleotydami 25 i 26 ramienia DHU cząsteczki tRNA zajmującej rybosomalne miejsce P (Tabela 21). Sekwencja docelowa a-DNA #10 jest wysoce zachowawcza ewolucyjnie, aż 10 spośród 12 nukleotydów składających się na tą sekwencję wykazuje ponad 98% konserwatywności, a jeden nukleotyd – powyżej 90% (dane na podstawie [22]).

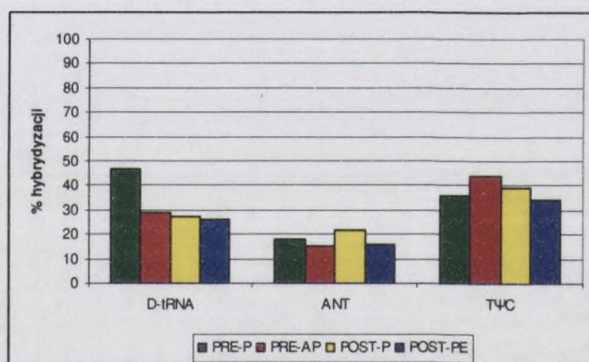
Oligonukleotyd #11 jest komplementarny do pętli apikalnej helisy H69 26S rRNA (nukleotydy 2236-3347 według numeracji *O. sativa*), odpowiedzialnej za interakcje z nukleotydami 11, 12, 25 i 26 ramienia DHU cząsteczki tRNA w miejscu A (Tabela 21). Sekwencja docelowa a-DNA #11 jest wysoce zachowawcza ewolucyjnie, aż 10 spośród 12 nukleotydów składających się na tą sekwencję wykazuje ponad 98% konserwatywności, a jeden nukleotyd – powyżej 80% (dane na podstawie [22]).

Obserwowałam znaczące różnice w stopniu hybrydyzacji tych dwóch oligonukleotydów, jednak również pewne zależności jednoznacznie świadczące o odmiennej konformacji przestrzennej rybosomu obsadzonego cząsteczką tRNA lub mini-tRNA. Stopień hybrydyzacji a-DNA #10 oraz #11 do rybosomów obsadzonych cząsteczką mini-tRNA antykodonowe zawsze był niższy niż w rybosomach obsadzonych cząsteczką D-tRNA lub mini-tRNA TΨC (Rysunek 72 i Rysunek 73). Kluczem do wyjaśnienia tej sytuacji jest liczba oddziaływań, jakie





może tworzyć cząsteczka mini-tRNA antykodonowe w porównaniu do pełnej długości cząsteczki tRNA lub mini-tRNA TΨC. Mini-tRNA antykodonowe jest pozbawione 7 oddziaływań, obecnych w cząsteczce tRNA oraz mini-tRNA TΨC, w ramieniu TΨC. Są to oddziaływania nukleotydów w pozycjach 49-53 tRNA w miejscu A z nukleotydami 2470 i 2472 26S rRNA oraz nukleotydów 63-64 tRNA w miejscu A z nukleotydami 2482-2484 26S rRNA (Rysunek 66D). W konsekwencji, kiedy w miejscach P lub E znajduje się cząsteczka mini-tRNA antykodonowe, w rybosomie istnieje więcej możliwości oddziaływań z innymi cząsteczkami biorącymi udział w translacji. W pozostawionej przez mini-tRNA antykodonowe wolnej przestrzeni mogą również wystąpić dodatkowe oddziaływania III-rzędowe w 26S rRNA. W takiej sytuacji, a-DNA #10 ma mniejszy dostęp do komplementarnego miejsca w H70, stąd też obserwowałam niższy niż w przypadku D-tRNA lub mini-tRNA TΨC stopień hybrydyzacji.



**Rysunek 72. Porównanie stopnia hybrydyzacji oligonukleotydu #10 do rybosomów obsadzonych mini-tRNA lub D-tRNA.**

Oznaczenia: D-tRNA – deacylowany tRNA; ANT – mini-tRNA antykodonowe; TΨC – mini-tRNA TΨC.

W przypadku obsadzenia rybosomu przez mini-tRNA TΨC, stopień hybrydyzacji a-DNA #10 we wszystkich stanach translokacyjnych utrzymywał się na wyrównanym poziomie, w przedziale 15-22%. W obecności mini-tRNA TΨC, helisa H70 ma podobną konformację podczas wszystkich etapów biosyntezy białka. Natomiast w przypadku obsadzenia rybosomu przez D-tRNA, jedyną znaczną różnicę w stopniu hybrydyzacji pomiędzy poszczególnymi stanami obserwowałam w stanie PRE-P. Skuteczność hybrydyzacji a-DNA #10 sięgała w tym stanie 47% (w pozostałych – 26-29%). Największy stopień hybrydyzacji jest jednocześnie wyznacznikiem największej dostępności badanego regionu w helisie H70 26S rRNA dla oligonukleotydu #10.

W tym celu wykonano analizę... (text describing the study's objective and methods, mentioning the use of specific RNA types and measurement techniques).

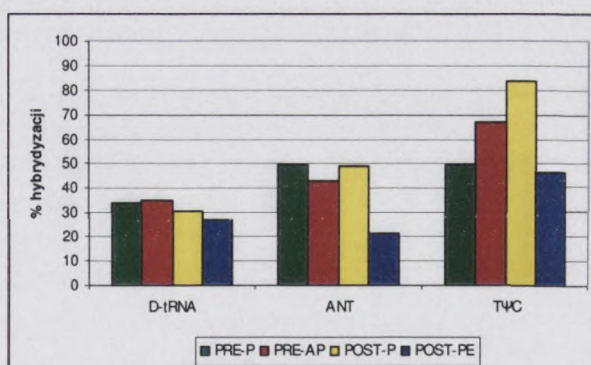


Wykres 1. Wyniki pomiarów... (Caption for the bar chart, detailing the variables measured and the significance of the results).

W tym celu wykonano analizę... (Detailed description of the experimental procedures, including the preparation of RNA samples and the methods used for quantification and analysis).

Gdy rybosomalne miejsca P lub E były obsadzone przez mini-tRNA antykodonowe, obserwovałam większe wahania w stopniu hybrydyzacji oligonukleotydu #10. W stanie PRE-AP następował nieznaczny wzrost wydajności hybrydyzacji a-DNA względem stanu z obsadzonym tylko miejscem P (z 36% do 44%). Natomiast w stanie posttranslokacyjnym widoczny był 5% spadek efektywności hybrydyzacji, która wynosiła 39% dla stanu z obsadzonym miejscem P i 34 % dla stanu z obsadzonymi miejscami P i E. Wyniki te wyraźnie wskazują na zmianę konformacji rybosomu obsadzonego mini-tRNA antykodonowym, której skutkiem jest stopniowe odsłanianie helisy H70 w stanie pre- i zasłanianie w stanie posttranslokacyjnym. Najwyższy poziom hybrydyzacji obserwowany był w stanie PRE-AP, z czego wyciągnęłam wniosek o największej dostępności badanego regionu w helisie H70 26S rRNA dla oligonukleotydu #10.

Porównując wydajność hybrydyzacji oligonukleotydu #11 dla rybosomów obsadzonych różnymi mini-tRNA oraz D- tRNA, zauważyłam, że w każdym stanie hybrydyzacja a-DNA #11 zachodziła ze znacznie mniejszą wydajnością przy obsadzeniu rybosomów przez cząsteczkę tRNA (sięgającą nawet do 33% różnicy; Rysunek 73). **Jednocześnie obserwovałam odmienną konformację przestrzenną w obrębie helisy H70 rybosomu obsadzonego cząsteczką tRNA lub mini-tRNA.** Ponadto, kiedy miejsce P lub E obsadzone były przy pomocy D-tRNA, nie obserwovałam znacznych różnic w hybrydyzacji a-DNA #11 w poszczególnych stanach translokacyjnych. Pętla apikalna helisy H69, była jednakowo dostępna przed i po translokacji, a obsadzenie dodatkowych miejsc w rybosomie przez cząsteczki AA-tRNA nie zmieniło jej dostępności.



**Rysunek 73. Porównanie stopnia hybrydyzacji oligonukleotydu #11 do rybosomów obsadzonych mini-tRNA lub D-tRNA.**

Oznaczenia: D-tRNA – deacylowany tRNA; ANT – mini-tRNA antykodonowe; TΨC – mini-tRNA TΨC.

Objaśnienie: Wykres przedstawia dane dotyczące aktywności kinazy P-1E w różnych warunkach. Oś pionowa reprezentuje aktywność kinazy w jednostkach (0-100). Oś pozioma przedstawia trzy warunki: TFC, AIT i D-18A. Dla każdego warunku przedstawiono trzy słupki: pierwszy (ciemny szary) reprezentuje kontrolę, drugi (ciemny szary) reprezentuje mini-RNA, a trzeci (ciemny szary) reprezentuje mini-RNA + D-18A. W przypadku TFC, aktywność kinazy jest wysoka (ok. 80) i nie zmienia się znacząco. W przypadku AIT, aktywność kinazy jest niższa (ok. 40) i nie zmienia się znacząco. W przypadku D-18A, aktywność kinazy jest niska (ok. 10) i nie zmienia się znacząco.

Wyniki: Wyniki badań przedstawiają, że aktywność kinazy P-1E jest wysoka w warunkach TFC i AIT, natomiast w warunkach D-18A jest niska. Nie stwierdzono istotnych różnic między grupami mini-RNA i mini-RNA + D-18A w żadnym z warunków. Wyniki te sugerują, że mini-RNA może działać selektywnie na inne elementy układu enzymatycznego niż kinaza P-1E.

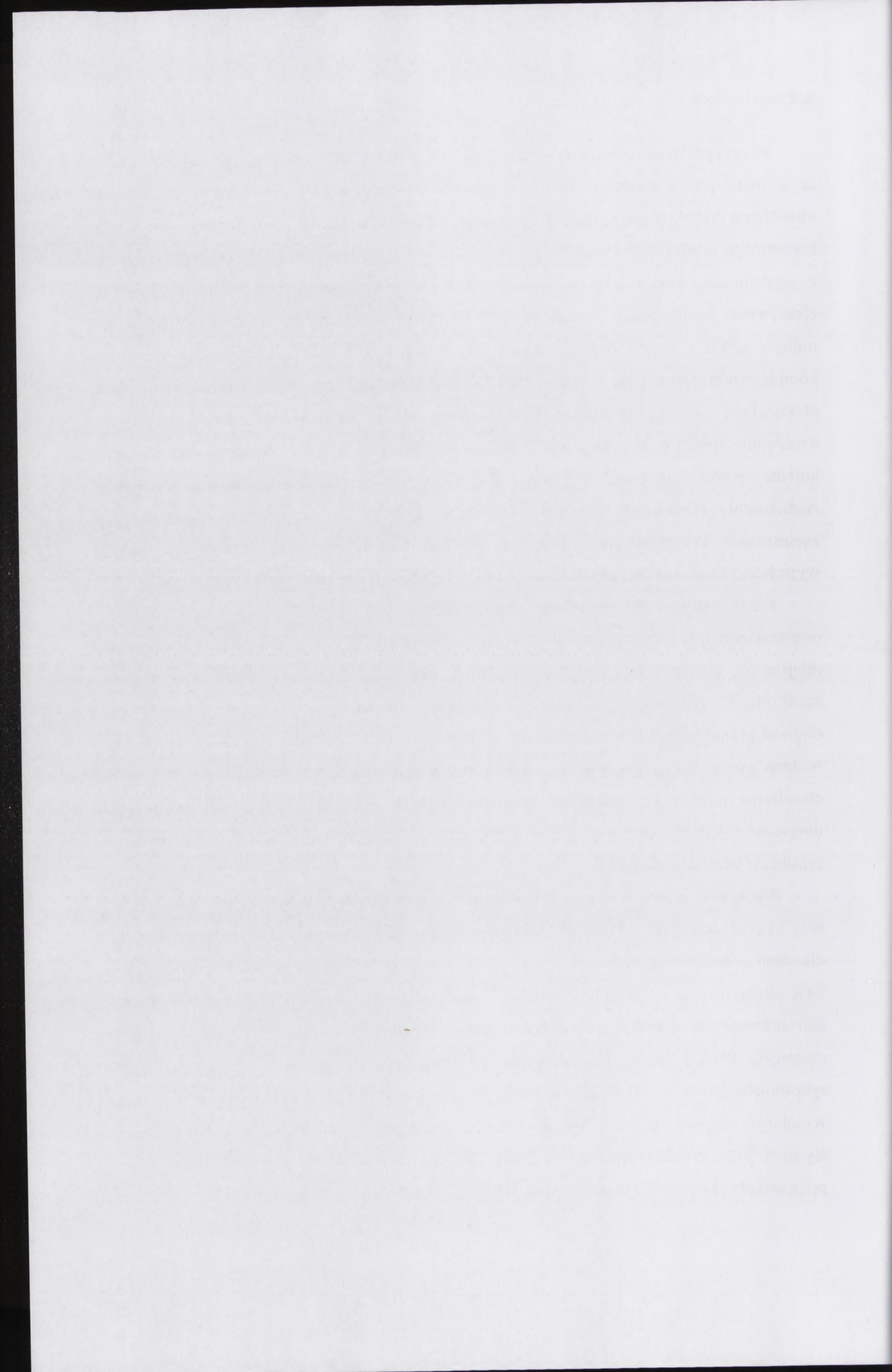


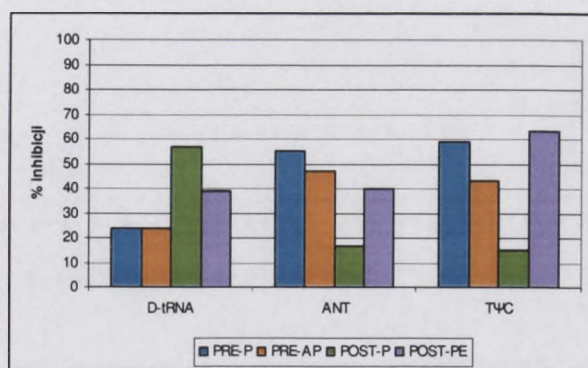
Wykres 75. Wyniki badań dotyczące aktywności kinazy P-1E w różnych warunkach. Oś pionowa reprezentuje aktywność kinazy w jednostkach (0-100). Oś pozioma przedstawia trzy warunki: TFC, AIT i D-18A. Dla każdego warunku przedstawiono trzy słupki: pierwszy (ciemny szary) reprezentuje kontrolę, drugi (ciemny szary) reprezentuje mini-RNA, a trzeci (ciemny szary) reprezentuje mini-RNA + D-18A.

W przypadku obsadzenia rybosomu przez mini-tRNA antykodonowe, zaobserwowałam, że w stanie pre- i posttranslokacyjnym następował spadek efektywności hybrydyzacji przy obsadzaniu dodatkowego miejsca w rybosomie. Świadczy to o bardzo dynamicznych zmianach konformacji rybosomu podczas poszczególnych etapów elongacji. A-DNA #11 hybrydyzował z wydajnością równą 50% w stanie PRE-P. Gdy dodatkowo obsadziłam miejsce A, efektywność hybrydyzacji zmalała do 43%. Sugeruje to zmianę konformacji rybosomu na mniej otwartą, powodującą mniejszą hybrydyzację oligodeoksynukleotydu do komplementarnego miejsca w helisie H69 26S rRNA. Natomiast w stanie posttranslokacyjnym efektywność hybrydyzacji ponownie wzrosła do 49% w przypadku obsadzenia miejsca P, a następnie spadła o 3% dla stanu z obsadzonymi miejscami E i P. Musiały więc nastąpić kolejne zmiany konformacji rybosomu. **Po utworzeniu wiązania peptydowego następuje rozluźnienie struktury rybosomu w obrębie H69, a po translokacji ponowne jej zacieśnienie. Po obsadzeniu miejsca E, podjednostki rybosomalne wracają do swojej wyjściowej konformacji, aby zacząć nowy cykl elongacji łańcucha polipeptydowego.**

Kiedy miejsce P obsadzone zostało przez mini-tRNA TΨC w stanie PRE-P, oligonukleotyd #11 hybrydyzował z wydajnością równą 50%. Gdy dodatkowo obsadziłam miejsce A, efektywność hybrydyzacji wzrosła do 67%. Sugeruje to powstanie zmiany konformacji rybosomu na bardziej otwartą, umożliwiającą lepszą hybrydyzację oligodeoksynukleotydu do komplementarnego miejsca w helisie H69 26S rRNA. Natomiast w stanie posttranslokacyjnym efektywność hybrydyzacji nadal wzrastała do 84% w przypadku obsadzenia miejsca P, a następnie znacznie spadła aż do 21% dla stanu z obsadzonymi miejscami E i P. Musiała więc nastąpić kolejna zmiana konformacji rybosomu, po translokacji cząsteczki tRNA do miejsca E.

Wydajność reakcji wiązania AA-tRNA do rybosomów obsadzonych cząsteczką D-tRNA przy hybrydyzowanym a-DNA #10 utrzymywała się na niezbyt wysokim poziomie zarówno dla stanu z obsadzonym miejscem P jak i miejscami A i P. W obu przypadkach obserwowałam 24% inhibicji reakcji wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup> przez oligonukleotyd #10 (Rysunek 74). Wynik taki sugeruje, że w stanie rybosomalnym przed translokacją oddziaływanie ramienia DHU cząsteczki tRNA w miejscu P w pozycjach 25 i 26 nie jest konieczne. W przypadku obsadzenia rybosomalnego miejsca P przez cząsteczkę tRNA w stanie PRE-P, nie obserwowałam również wysokiego stopnia inhibicji reakcji wiązania przez oligonukleotyd #11 (18% inhibicji, Rysunek 745). Wynik taki nasuwa wniosek, że cząsteczka AA-tRNA nie musi oddziaływać z pętlą apikalną helisy H69 poprzez ramię DHU na tym etapie biosyntezy białka.





Rysunek 74. Porównanie stopnia inhibicji reakcji wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup> powodowanej przez oligonukleotydy #10 w rybosomach obsadzonych mini-tRNA lub D-tRNA.

Oznaczenia: D-tRNA – deacylowany tRNA; ANT – mini-tRNA antykodonowe; DHU – mini-tRNA DHU; TYC – mini-tRNA TYC.

Po obsadzeniu dodatkowo miejsca A w stanie pretranslokacyjnym, zwiększała się ilość przyłączanego a-DNA i jednocześnie jego efekt inhibitorowy. Reakcja wiązania AA-tRNA mogła jednak nadal częściowo zachodzić. **Moim zdaniem oddziaływania między nukleotydami 11,12, 25 i 26 cząsteczki tRNA z rybosomem, przed utworzeniem wiązania peptydowego nie są silne i może dochodzić do ich częściowego rozluźnienia wskutek dynamiki rybosomu.** Wniosek ten potwierdza również wysoki stopień inhibicji translacji powodowanej przez oligonukleotydy #10 i #11 zhybrydyzowane do rybosomów obsadzonych mini-tRNA antykodonowym lub mini-tRNA TYC. Brak ramienia i pętli DHU, a co z tym idzie oddziaływać ramię DHU-rybosom, powoduje inhibicję reakcji wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup> w stanie pretranslokacyjnym na poziomie 43-59%. **Fakt ten również świadczy o tym, że przed utworzeniem wiązania peptydowego i translokacją, oddziaływania między nukleotydami 11,12, 25 i 26 cząsteczki tRNA zajmującej miejsce A lub P z rybosomem, są konieczne dla prawidłowego procesu biosyntezy białka. Jednocześnie interakcje te są na tyle słabe, że na skutek zmian konformacji rybosomu może dochodzić do ich częściowego rozluźnienia.**

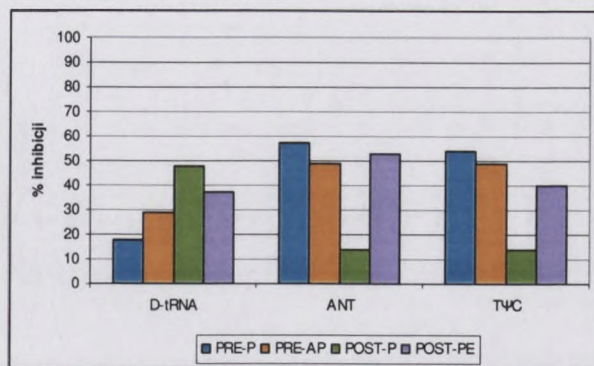
Po utworzeniu wiązania peptydowego, w stanie POST-P wydajność reakcji inhibicji spowodowanej zarówno przez a-DNA #10 jak i #11 wzrosła: do 57% dla a-DNA #10 oraz do 48% dla a-DNA #11. Jednak w przypadku rybosomów obsadzonych cząsteczkami mini-tRNA pozbawionymi ramienia i pętli DHU, obserwowałam w tym stanie dość dużą wydajność reakcji wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup>. **Po połączeniu tych faktów wyciągnęłam wniosek, że dla prawidłowego procesu biosyntezy białka, oddziaływania rybosomu z nukleotydami 11,12, 25 i 26 cząsteczki tRNA nie są niezbędne po utworzeniu wiązania peptydowego.**





Wykres 7. Wzrost bakterii *E. coli* w obecności różnych rodzajów RNA. AA-RNA - RNA kwasu asparagowego; B-RNA - RNA kwasu glutamicznego; C-RNA - RNA kwasu glutaminowego; DHI - RNA kwasu dodekanoowego; DII - RNA kwasu dodekanoowego; DIII - RNA kwasu dodekanoowego.

Wzrost bakterii *E. coli* w obecności różnych rodzajów RNA. Wyniki przedstawiono na wykresie słupkowym. Wyniki wykazują, że wzrost bakterii *E. coli* jest hamowany przez obecność RNA kwasu asparagowego (AA-RNA), RNA kwasu glutamicznego (B-RNA) oraz RNA kwasu glutaminowego (C-RNA). Wzrost bakterii *E. coli* jest natomiast zwiększony przez obecność RNA kwasu dodekanoowego (DHI, DII, DIII). Wyniki te są zgodne z wcześniejszymi badaniami, które wykazały, że RNA kwasu dodekanoowego działa jako czynnik wzrostowy dla bakterii *E. coli*. Wyniki te są również zgodne z badaniami, które wykazały, że RNA kwasu asparagowego, RNA kwasu glutamicznego oraz RNA kwasu glutaminowego działają jako czynniki hamujące wzrost bakterii *E. coli*. Wyniki te są zgodne z teorią, że RNA kwasu dodekanoowego działa jako czynnik wzrostowy, ponieważ zawiera sekwencje, które są zdolne do wiązania z czynnikiem wzrostowym bakterii *E. coli*. Wyniki te są również zgodne z teorią, że RNA kwasu asparagowego, RNA kwasu glutamicznego oraz RNA kwasu glutaminowego działają jako czynniki hamujące, ponieważ zawierają sekwencje, które są zdolne do wiązania z czynnikiem hamującym bakterii *E. coli*.



**Rysunek 75. Porównanie stopnia inhibicji reakcji wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup> powodowanej przez oligonukleotyd #11 w rybosomach obsadzonych mini-tRNA lub D-tRNA.**

Oznaczenia: D-tRNA – deacylowany tRNA; ANT – mini-tRNA antykodonowe; DHU – mini-tRNA DHU; TΨC – mini-tRNA TΨC.

W stanie POST-PE oligonukleotydy #10 i #11 powodowały w wysokim stopniu inhibicję wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup>, zarówno w rybosomach obsadzonych mini-tRNA jak i D-tRNA (39% - 63%). Jednocześnie obserwowałam niezbyt wysoką wydajność hybrydyzacji a-DNA w tym stanie. Wyniki te jasno wskazują, że po translokacji cząsteczki tRNA do miejsca E, ramię DHU jest ściśle związane z rybosomem i kontakt ten jest niezbędny dla przyłączenia cząsteczki AA-tRNA do miejsca A.

#### Oligonukleotydy #12, #13 i #17

Sekwencje docelowe dla oligonukleotydów #12, #13 i #17 zlokalizowane są w domenie V 26S rRNA (Rysunek 63) i odpowiadają za interakcje z końcem CCA cząsteczki tRNA w miejscu P (Tabela 22). Zajmują one następujące pozycje 26S rRNA (numeracja *O. sativa*):

- (1) 2954-2965 w helisie H89 dla oligonukleotydu #12;
- (2) 2938-2949 w helisie H89 dla oligonukleotydu #13;
- (3) 2606-2617 w helisie H80 dla oligonukleotydu #17.

Sekwencja docelowa a-DNA #12 jest wysoce zachowawcza ewolucyjnie, aż 11 spośród 12 nukleotydów składających się na tą sekwencję wykazuje ponad 98% konserwatywności, a jeden nukleotyd – powyżej 90%. 8 z 12 nukleotydów sekwencji docelowej oligonukleotydu #13 jest konserwatywnych w niemal 100%, a 5 nukleotydów sekwencji do której komplementarny jest a-DNA #17 – w ponad 98% (dane na podstawie [22]).

Sekwencje docelowe dla oligonukleotydów #12, #13 i #17 pełnią takie same funkcje podczas biosyntezy białka. Jednak ich lokalizacja, struktura I i II-rzędowa, a także w niektórych przypadkach pozycja w cząsteczce tRNA, z którą oddziałują, są różne.



Wykres 2. Efekt oligonukleotydów PFT-TC na ekspresję genów p53, Bcl-2 i GAPDH w komórkach ludzkich. Wykres przedstawia zmiany w ekspresji genów p53, Bcl-2 i GAPDH w komórkach ludzkich, które zostały poddane działaniu oligonukleotydów PFT-TC. Wykres przedstawia zmiany w ekspresji genów p53, Bcl-2 i GAPDH w komórkach ludzkich, które zostały poddane działaniu oligonukleotydów PFT-TC. Wykres przedstawia zmiany w ekspresji genów p53, Bcl-2 i GAPDH w komórkach ludzkich, które zostały poddane działaniu oligonukleotydów PFT-TC.

W celu sprawdzenia, czy oligonukleotyd 412/417 powodował w wysokim stopniu inhibicję ekspresji p53, w komórkach ludzkich, które zostały poddane działaniu oligonukleotydów 412/417, wyznaczono poziom ekspresji p53 metodą RT-PCR. Wyniki te przedstawiono na wykresie 2. Wykres ten pokazuje, że ekspresja p53 w komórkach ludzkich, które zostały poddane działaniu oligonukleotydów 412/417, była znacznie niższa niż w komórkach kontrolnych. Dodanie oligonukleotydów 412/417 do komórek, które zostały poddane działaniu oligonukleotydów 412/417, spowodowało częściową odbudowę ekspresji p53.

### Oligonukleotydy 412/417 i 413/417

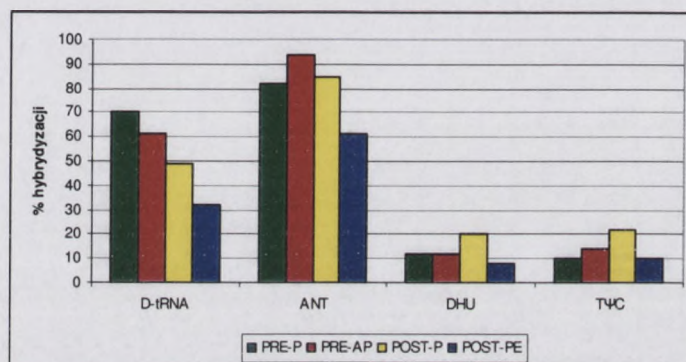
Skonieczniono, że oligonukleotydy 412/417 i 413/417 stabilizowane są w domenie 5' 30S rRNA (rynek 63) i odpowiadają za instalację i dobowanie GCA ekspozycji rRNA w rybozomach (Tabela 2). Wyniki te przedstawiono na wykresie 3. Wyniki te przedstawiono na wykresie 3. Wyniki te przedstawiono na wykresie 3.

Skonieczniono, że oligonukleotydy 412/417 i 413/417 stabilizowane są w domenie 5' 30S rRNA (rynek 63) i odpowiadają za instalację i dobowanie GCA ekspozycji rRNA w rybozomach (Tabela 2). Wyniki te przedstawiono na wykresie 3. Wyniki te przedstawiono na wykresie 3. Wyniki te przedstawiono na wykresie 3.

Skonieczniono, że oligonukleotydy 412/417 i 413/417 stabilizowane są w domenie 5' 30S rRNA (rynek 63) i odpowiadają za instalację i dobowanie GCA ekspozycji rRNA w rybozomach (Tabela 2). Wyniki te przedstawiono na wykresie 3. Wyniki te przedstawiono na wykresie 3. Wyniki te przedstawiono na wykresie 3.

Sekwencje docelowe oligonukleotydów #12 i #13 oddziałują z nukleotydem 75 końca 3' tRNA, natomiast sekwencja docelowa oligonukleotydu #17 wykazuje interakcje z nukleotydami 73 i 74 [5, 61, 62, 256]. Z tego względu do badań wpływu a-DNA #12, #13 i #17 na proces translacji, zastosowałam cząsteczki mini-tRNA antykodonowe, mini-tRNA DHU, mini-tRNA TΨC oraz D-tRNA.

Stopień hybrydyzacji oligonukleotydu #12 był bardzo zróżnicowany w zależności od cząsteczki, która obsadzała miejsce P (Rysunek 76).



**Rysunek 76. Porównanie stopnia hybrydyzacji oligonukleotydu #12 w rybosomach obsadzonych przez mini-tRNA i D-tRNA.**

Oznaczenia: D-tRNA – deacylowany tRNA; ANT – mini-tRNA antykodonowe; DHU – mini-tRNA DHU; TΨC – mini-tRNA TΨC.

We wszystkich stanach translokacyjnych w rybosomach z obsadzonym miejscem P przez D-tRNA, zawsze obserwowałam niższy stopień hybrydyzacji a-DNA #12 niż w rybosomach obsadzonych przez mini-tRNA antykodonowe, chociaż hybrydyzacja do rybosomów obsadzonych D-tRNA zachodziła na dość wysokim poziomie. W stanie PRE-AP oligonukleotyd #12 hybrydyzował z bardzo wysoką wydajnością, wynoszącą 95% w rybosomach obsadzonych mini-tRNA antykodonowym lub 61% w rybosomach obsadzonych D-tRNA. Kiedy obsadzone było tylko miejsce P, a-DNA #12 hybrydyzował z równie wysoką wydajnością (odpowiednio, 82% i 70%). Wynika z tego, że **rybosom po przejściu w całkowity stan pretranslokacyjny zmienia swoją konformację na bardziej otwartą w regionie helisy H93**. W stanie posttranslokacyjnym z obsadzonym miejscem P, rybosom nadal utrzymuje otwartą konformację, ale następuje jej zmiana, gdyż poziom hybrydyzacji nieznacznie spada. Obserwowałam również spadek stopnia hybrydyzacji aż o 23% przy przejściu do stanu POST-PE. **Rozluźniona struktura helisy H93 ulega nieznacznemu zacieśnieniu po utworzeniu wiązania peptydowego i silnemu po etapie translokacji**. W rybosomach z obsadzonym miejscem P przez mini-tRNA TΨC lub

W celu sprawdzenia, czy w tym czasie nie nastąpiła zmiana w poziomie ekspresji genów, w tym samym czasie, co w poprzednim, wykonano pomiary poziomu mRNA dla genów: *act1*, *act2*, *act3*, *act4*, *act5*, *act6*, *act7*, *act8*, *act9*, *act10*, *act11*, *act12*, *act13*, *act14*, *act15*, *act16*, *act17*, *act18*, *act19*, *act20*, *act21*, *act22*, *act23*, *act24*, *act25*, *act26*, *act27*, *act28*, *act29*, *act30*, *act31*, *act32*, *act33*, *act34*, *act35*, *act36*, *act37*, *act38*, *act39*, *act40*, *act41*, *act42*, *act43*, *act44*, *act45*, *act46*, *act47*, *act48*, *act49*, *act50*, *act51*, *act52*, *act53*, *act54*, *act55*, *act56*, *act57*, *act58*, *act59*, *act60*, *act61*, *act62*, *act63*, *act64*, *act65*, *act66*, *act67*, *act68*, *act69*, *act70*, *act71*, *act72*, *act73*, *act74*, *act75*, *act76*, *act77*, *act78*, *act79*, *act80*, *act81*, *act82*, *act83*, *act84*, *act85*, *act86*, *act87*, *act88*, *act89*, *act90*, *act91*, *act92*, *act93*, *act94*, *act95*, *act96*, *act97*, *act98*, *act99*, *act100*.

Wszystkie pomiary wykonano w tym samym czasie, co w poprzednim, w celu sprawdzenia, czy w tym czasie nie nastąpiła zmiana w poziomie ekspresji genów, w tym samym czasie, co w poprzednim, wykonano pomiary poziomu mRNA dla genów: *act1*, *act2*, *act3*, *act4*, *act5*, *act6*, *act7*, *act8*, *act9*, *act10*, *act11*, *act12*, *act13*, *act14*, *act15*, *act16*, *act17*, *act18*, *act19*, *act20*, *act21*, *act22*, *act23*, *act24*, *act25*, *act26*, *act27*, *act28*, *act29*, *act30*, *act31*, *act32*, *act33*, *act34*, *act35*, *act36*, *act37*, *act38*, *act39*, *act40*, *act41*, *act42*, *act43*, *act44*, *act45*, *act46*, *act47*, *act48*, *act49*, *act50*, *act51*, *act52*, *act53*, *act54*, *act55*, *act56*, *act57*, *act58*, *act59*, *act60*, *act61*, *act62*, *act63*, *act64*, *act65*, *act66*, *act67*, *act68*, *act69*, *act70*, *act71*, *act72*, *act73*, *act74*, *act75*, *act76*, *act77*, *act78*, *act79*, *act80*, *act81*, *act82*, *act83*, *act84*, *act85*, *act86*, *act87*, *act88*, *act89*, *act90*, *act91*, *act92*, *act93*, *act94*, *act95*, *act96*, *act97*, *act98*, *act99*, *act100*.

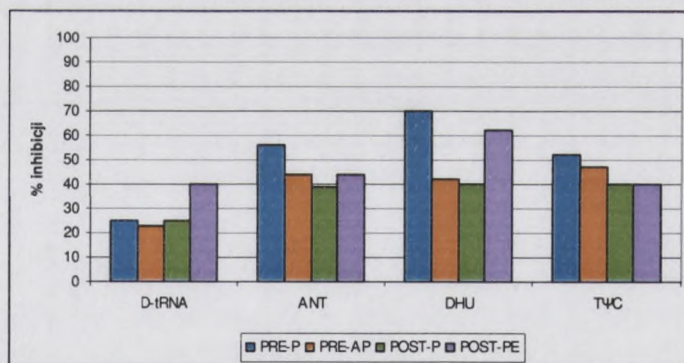


Wykres 76. Wykres słupkowy przedstawiający poziom ekspresji genów *act1* - *act100* w tym samym czasie, co w poprzednim, w celu sprawdzenia, czy w tym czasie nie nastąpiła zmiana w poziomie ekspresji genów, w tym samym czasie, co w poprzednim, wykonano pomiary poziomu mRNA dla genów: *act1*, *act2*, *act3*, *act4*, *act5*, *act6*, *act7*, *act8*, *act9*, *act10*, *act11*, *act12*, *act13*, *act14*, *act15*, *act16*, *act17*, *act18*, *act19*, *act20*, *act21*, *act22*, *act23*, *act24*, *act25*, *act26*, *act27*, *act28*, *act29*, *act30*, *act31*, *act32*, *act33*, *act34*, *act35*, *act36*, *act37*, *act38*, *act39*, *act40*, *act41*, *act42*, *act43*, *act44*, *act45*, *act46*, *act47*, *act48*, *act49*, *act50*, *act51*, *act52*, *act53*, *act54*, *act55*, *act56*, *act57*, *act58*, *act59*, *act60*, *act61*, *act62*, *act63*, *act64*, *act65*, *act66*, *act67*, *act68*, *act69*, *act70*, *act71*, *act72*, *act73*, *act74*, *act75*, *act76*, *act77*, *act78*, *act79*, *act80*, *act81*, *act82*, *act83*, *act84*, *act85*, *act86*, *act87*, *act88*, *act89*, *act90*, *act91*, *act92*, *act93*, *act94*, *act95*, *act96*, *act97*, *act98*, *act99*, *act100*.

W tym samym czasie, co w poprzednim, wykonano pomiary poziomu mRNA dla genów: *act1*, *act2*, *act3*, *act4*, *act5*, *act6*, *act7*, *act8*, *act9*, *act10*, *act11*, *act12*, *act13*, *act14*, *act15*, *act16*, *act17*, *act18*, *act19*, *act20*, *act21*, *act22*, *act23*, *act24*, *act25*, *act26*, *act27*, *act28*, *act29*, *act30*, *act31*, *act32*, *act33*, *act34*, *act35*, *act36*, *act37*, *act38*, *act39*, *act40*, *act41*, *act42*, *act43*, *act44*, *act45*, *act46*, *act47*, *act48*, *act49*, *act50*, *act51*, *act52*, *act53*, *act54*, *act55*, *act56*, *act57*, *act58*, *act59*, *act60*, *act61*, *act62*, *act63*, *act64*, *act65*, *act66*, *act67*, *act68*, *act69*, *act70*, *act71*, *act72*, *act73*, *act74*, *act75*, *act76*, *act77*, *act78*, *act79*, *act80*, *act81*, *act82*, *act83*, *act84*, *act85*, *act86*, *act87*, *act88*, *act89*, *act90*, *act91*, *act92*, *act93*, *act94*, *act95*, *act96*, *act97*, *act98*, *act99*, *act100*.

mini-tRNA DHU, w stanie pretranslokacyjnym hybrydyzacja oligonukleotydu #12 jest bardzo słaba w obu badanych przypadkach (10 - 14%). Zapewne, kiedy obsadzone jest tylko miejsce P konformacja rybosomu jest nadal zamknięta i dlatego oligonukleotydy hybrydują z niską wydajnością. Natomiast przy obsadzonych obu miejscach, być może koniec CCA ma inną konformację, lub rybosom nie udostępnia tego miejsca dla a-DNA. Stąd niska wydajność reakcji w obu stanach pośrednich. W stanie posttranslokacyjnym oligonukleotyd #12 hybryduował z nieco wyższą wydajnością jedynie w stanie z obsadzonym miejscem P (odpowiednio 22 i 20%). W tym stanie rybosom jest już po translacji i przybiera konformację otwartą. Kolejna zmiana konformacyjna powoduje spadek wydajności hybrydyzacji (do 10 i 8%) i zamknięcie struktury rybosomu.

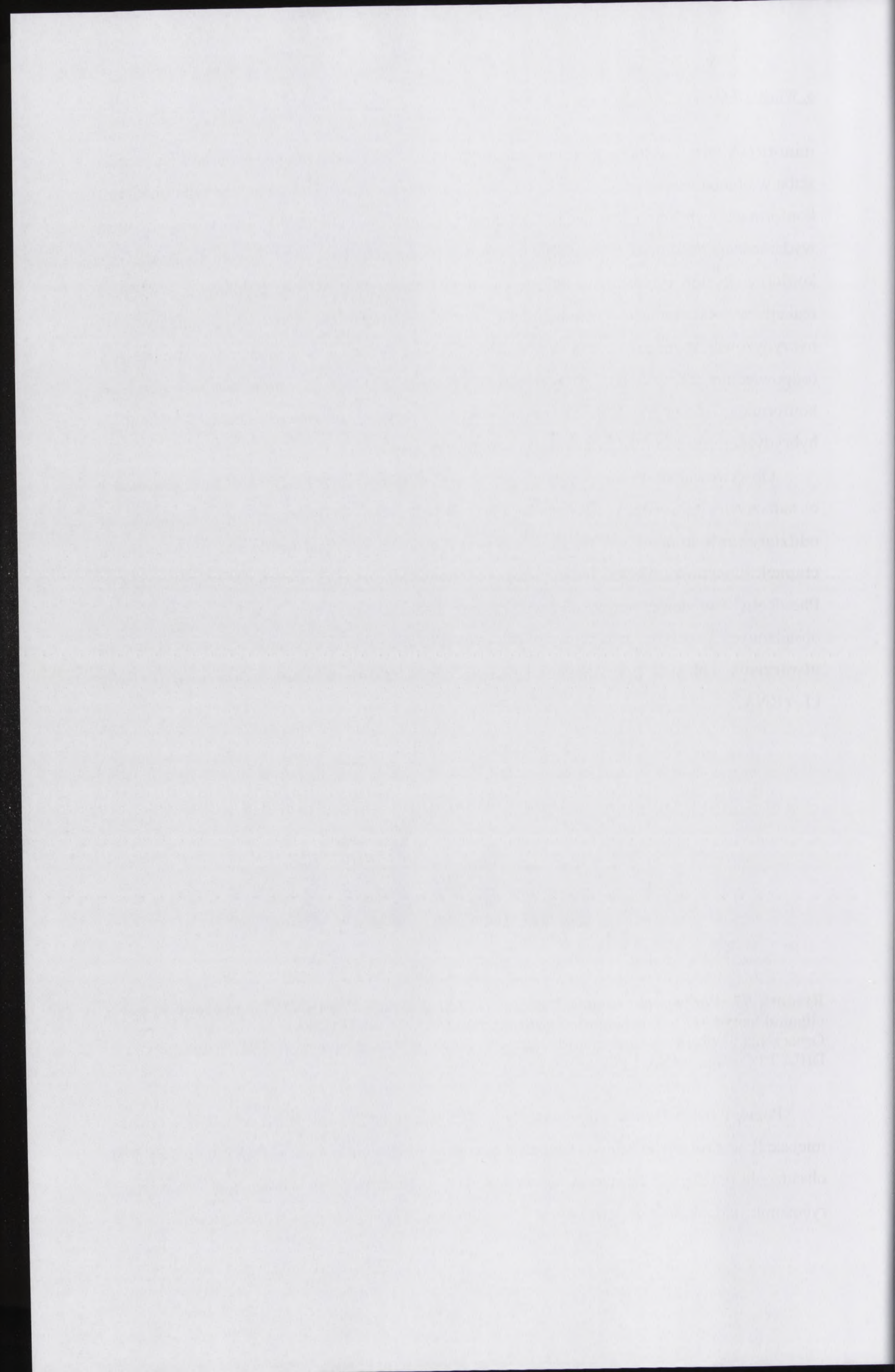
Obserwowałam wysoką inhibicję wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup> przez a-DNA #12 w rybosomach obsadzonych mini-tRNA (Rysunek 77). **Wynik ten jednoznacznie wskazuje, że oddziaływanie końca CCA tRNA w miejscu P z helisą H93 jest konieczne na wszystkich etapach biosyntezy białka.** Jednocześnie obserwowałam wysoką wydajność reakcji wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup> w stanie pretranslokacyjnym oraz posttranslokacyjnym POST-P w rybosomach obsadzonych D-tRNA. Oznacza to, że **dla prawidłowego umiejscowienia substratów w celu utworzenia wiązania peptydowego są konieczne wszystkie oddziaływania między tRNA i L-rRNA.**



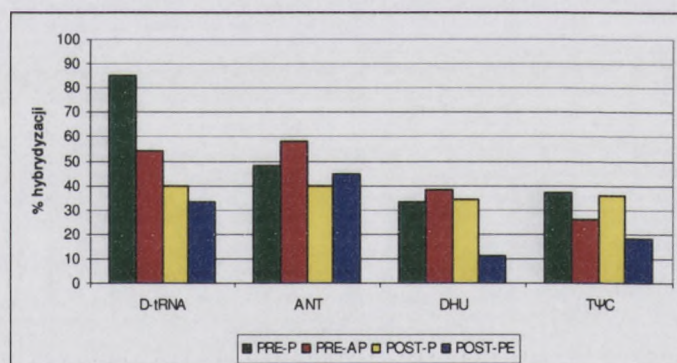
**Rysunek 77. Porównanie stopnia inhibicji reakcji wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup> powodowanej przez oligonukleotyd #12 w rybosomach obsadzonych mini-tRNA lub D-tRNA.**

Oznaczenia: D-tRNA – deacylowany tRNA; ANT – mini-tRNA antykodonowe; DHU – mini-tRNA DHU; TΨC – mini-tRNA TΨC.

Poziom hybrydyzacji oligonukleotydu #13 w zależności od cząsteczki, która obsadza miejsce P, jest równie zróżnicowany jak w przypadku oligonukleotydu #12 (Rysunek 78). Przy obsadzeniu każdej z cząsteczek obserwowałam odmienny wzór zmian konformacyjnych rybosomu, jednak stopień hybrydyzacji jest dla poszczególnych przypadków porównywalny.



Różni je jedynie poziom hybrydyzacji w poszczególnych stanach translokacyjnych. W dwóch z badanych możliwości najwyższy poziom hybrydyzacji a-DNA #13 obserwowałam w stanie PRE-AP (gdy cząsteczką obsadzającą miejsce P była mini-tRNA antykodonowe lub mini-tRNA DHU). Jednak w tym drugim przypadku obserwowałam mniejszą różnicę w hybrydyzacji w porównaniu do stanu PRE-P. Wynosiła ona jedynie 4% (w pierwszym przypadku - 11%). **Taka zmiana w stopniu hybrydyzacji a-DNA #13 może sugerować, że rybosom po przejściu w całkowity stan pretranslokacyjny (z obsadzonymi miejscami A i P) zmienia swoją konformację na bardziej otwartą w pętli centralnej domeny V w regionie między helisami H92 i H93.** Natomiast gdy cząsteczką obsadzającą rybosomalne miejsce P była mini-tRNA TΨC lub D-tRNA, najwyższy poziom hybrydyzacji oligonukleotydu #13 obserwowałam w stanie PRE-P (odpowiednio 37% i 85%). W pozostałych stanach wartość hybrydyzacji jest niższa. Dane te wskazują na to, że **w miarę następowania kolejnych etapów biosyntezy białka następuje stopniowe zamykanie struktury rybosomu między helisami H92 i H93.**



**Rysunek 78. Porównanie stopnia hybrydyzacji oligonukleotydu #13 w rybosomach obsadzonych przez mini-tRNA i D-tRNA.**

Oznaczenia: D-tRNA – deacylowany tRNA; ANT – mini-tRNA antykodonowe; DHU - mini-tRNA DHU; TΨC – mini-tRNA TΨC.

W stanie posttranslokacyjnym również wnioskowałam o dynamicznych zmianach konformacyjnych rybosomu. W stanie POST-P, rybosom znajduje się w konformacji po translokacji, ale jeszcze otwartej, bardziej dostępnej dla oligonukleotydu. Obserwowałam spadek stopnia hybrydyzacji przy przejściu do stanu POST-PE w przypadku obsadzenia rybosomów mini-tRNA DHU (trzykrotny), mini-tRNA TΨC (dwukrotny) oraz tRNA (o 5%). Na tej podstawie wnioskuję, że **dopiero zakończenie translokacji powoduje poważną zmianę konformacji rybosomu. Rybosom zamyka się lub/i do miejsc tych silnie związanych jest koniec CCA tRNA.** W konsekwencji miejsca te stają się niedostępne dla a-DNA #13.



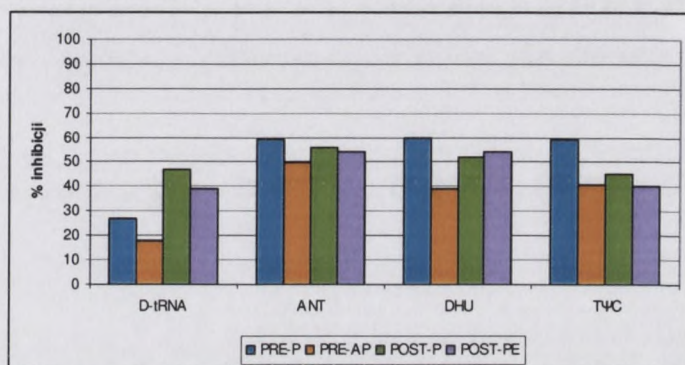
W tym celu wykorzystano następującą strategię: w pierwszej kolejności zidentyfikowano regiony kodujące dla białka H23 i wyznaczono jego strukturę przestrzenną. Następnie zbadano, czy białko H23 może działać jako czynniki transkrypcyjne, które regulują ekspresję innych genów. W tym celu przebadano, czy białko H23 może wiązać się z DNA i czy może indukować ekspresję innych genów. Wyniki tych badań przedstawiono w tabeli 1. Jak widać, białko H23 może wiązać się z DNA i może indukować ekspresję innych genów. Wyniki te sugerują, że białko H23 może działać jako czynnik transkrypcyjny i regulować ekspresję innych genów. W tym celu przebadano, czy białko H23 może wiązać się z DNA i czy może indukować ekspresję innych genów. Wyniki tych badań przedstawiono w tabeli 1. Jak widać, białko H23 może wiązać się z DNA i może indukować ekspresję innych genów.



Fig. 1. Relative activity of H23 protein in different tissues. The Y-axis represents 'Relative Activity (%)' ranging from 0 to 100. The X-axis lists four tissues: Liver, Kidney, Heart, and Brain. The bars show varying levels of activity, with the highest activity observed in the Brain.

W tym celu wykorzystano następującą strategię: w pierwszej kolejności zidentyfikowano regiony kodujące dla białka H23 i wyznaczono jego strukturę przestrzenną. Następnie zbadano, czy białko H23 może działać jako czynnik transkrypcyjny, które regulują ekspresję innych genów. W tym celu przebadano, czy białko H23 może wiązać się z DNA i czy może indukować ekspresję innych genów. Wyniki tych badań przedstawiono w tabeli 1. Jak widać, białko H23 może wiązać się z DNA i może indukować ekspresję innych genów. Wyniki te sugerują, że białko H23 może działać jako czynnik transkrypcyjny i regulować ekspresję innych genów. W tym celu przebadano, czy białko H23 może wiązać się z DNA i czy może indukować ekspresję innych genów. Wyniki tych badań przedstawiono w tabeli 1. Jak widać, białko H23 może wiązać się z DNA i może indukować ekspresję innych genów.

Niewielką dostępność można zaobserwować jedynie w przypadku obsadzenia miejsca P przez D-tRNA. Następuje wówczas ponowne otwieranie się rybosomu. Może to sugerować przygotowanie się tego fragmentu rybosomu na kolejny cykl elongacyjny już na tym etapie.



**Rysunek 79.** Porównanie stopnia inhibicji reakcji wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup> powodowanej przez oligonukleotyd #13 w rybosomach obsadzonych mini-tRNA lub D-tRNA.

Oznaczenia: D-tRNA – deacylowany tRNA; ANT – mini-tRNA antykodonowe; DHU – mini-tRNA DHU; TΨC – mini-tRNA TΨC.

Obserwowałam wysoką inhibicję wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup> przez α-DNA #13 w rybosomach obsadzonych mini-tRNA (Rysunek 79). **Oddziaływanie końca CCA tRNA w miejscu P z pętlą centralną domeny V pomiędzy helisami H92 i H93, jest konieczne na wszystkich etapach biosyntezy białka.** Jednocześnie obserwowałam dość wysoką wydajność reakcji wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup> w stanie pretranslokacyjnym w rybosomach obsadzonych D-tRNA. **Do prawidłowego umiejscowienia substratów do utworzenia wiązania peptydowego są konieczne wszystkie oddziaływania między tRNA i L-rRNA.**

Stopień hybrydyzacji oligonukleotydu #17, w zależności od cząsteczki, która obsadzała miejsce P, był bardziej zrównoważony niż w przypadku oligonukleotydów #12 i #13. Przy obsadzeniu miejsca P przez mini-tRNA antykodonowe lub D-tRNA, we wszystkich stanach oprócz POST-PE stopień hybrydyzacji był znacząco wyższy niż przy obsadzeniu rybosomu przez mini-tRNA TΨC lub mini-tRNA DHU. W stanie pretranslokacyjnym, różnica hybrydyzacji między stanami z obsadzonym miejscem P i obsadzonymi miejscami A i P była najbardziej zróżnicowana i wynosiła 5 – 14%. Stopień hybrydyzacji wykazywał tendencję do wzrostu (obsadzenie rybosomu przez mini-tRNA DHU lub D-tRNA) lub do spadku (obsadzenie rybosomu przez mini-tRNA antykodonowe lub mini-tRNA TΨC). Sugeruje to powstanie zmiany konformacji rybosomu na, odpowiednio: bardziej lub mniej otwartą i zmianę dostępności miejsca komplementarnego w 26S rRNA dla oligonukleotydu #17.

Należy pamiętać, że przy doborze obiektów do analizy cyfryzacji, nie należy brać pod uwagę...

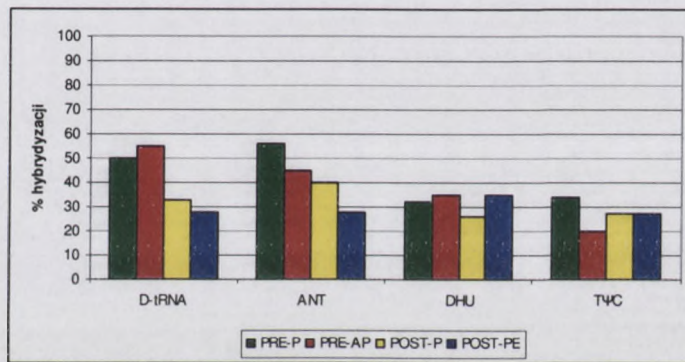


Wykres 1. Wyniki analizy... (Detailed description of the chart's data and context)

Wskazano, że... (Detailed text describing the analysis results and methodology)

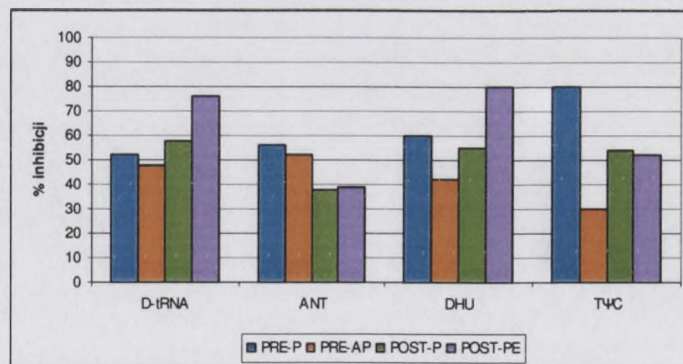
Wskazano, że... (Continuation of the text, discussing further findings and implications)

W stanie posttranslokacyjnym w przypadku obsadzenia miejsca E przez mini-tRNA TΨC, stopień hybrydyzacji pozostawał bez zmian (27%). Konformacja rybosomu w obrębie helisy H80 przy obsadzeniu miejsca E przez mini-tRNA TΨC nie ulega dużym zmianom w czasie translacji. Zmiany wydajności hybrydyzacji obserwowałam w przypadku obsadzenia miejsca P przez mini-tRNA antykodonowe i D-tRNA (spadek, odpowiednio z 40% do 29% oraz z 33% do 29%) oraz mini-tRNA DHU (wzrost z 26% do 35%). Pierwszy wynik wskazuje na zamykanie się struktury rybosomu w obrębie helisy H80 po utworzeniu wiązania peptydowego w rybosomie i translacji. Natomiast drugi wynik może sugerować przygotowywanie się tego fragmentu rybosomu na kolejny cykl elongacyjny już na tym etapie.



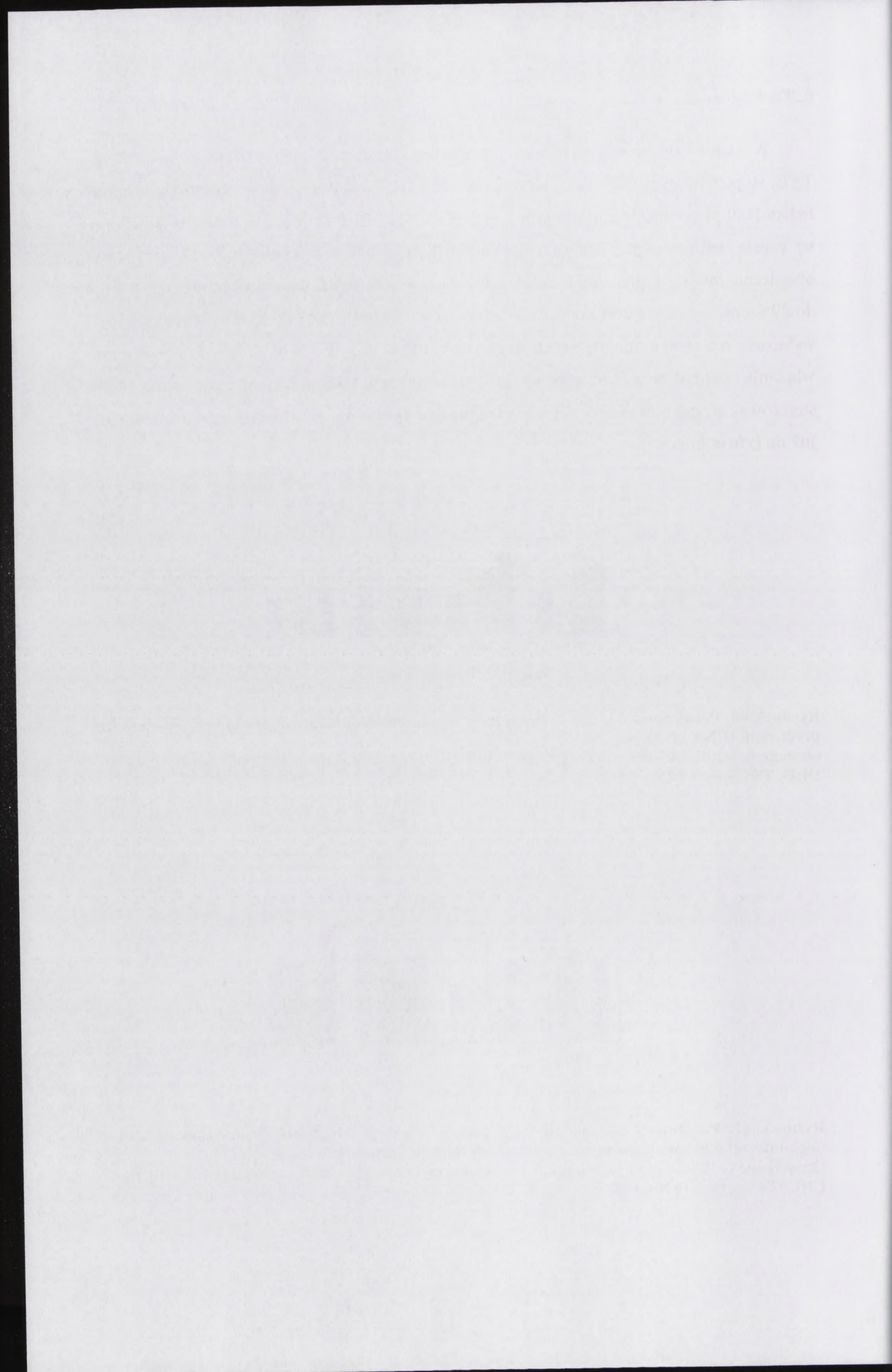
Rysunek 80. Porównanie stopnia hybrydyzacji oligonukleotydu #17 w rybosomach obsadzonych przez mini-tRNA i D-tRNA.

Oznaczenia: D-tRNA – deacylowany tRNA; ANT – mini-tRNA antykodonowe; DHU – mini-tRNA DHU; TΨC – mini-tRNA TΨC.



Rysunek 81. Porównanie stopnia inhibicji reakcji wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup> powodowanej przez oligonukleotyd #17 w rybosomach obsadzonych mini-tRNA lub D-tRNA.

Oznaczenia: D-tRNA – deacylowany tRNA; ANT – mini-tRNA antykodonowe; DHU – mini-tRNA DHU; TΨC – mini-tRNA TΨC.

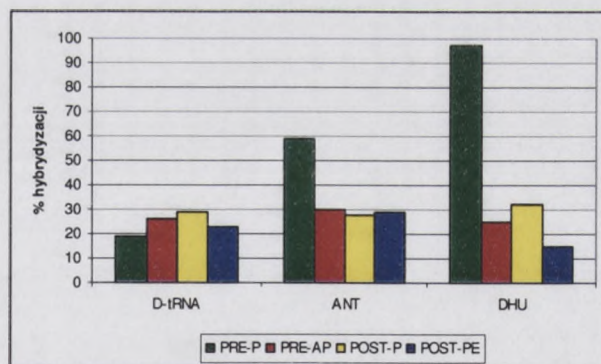


Inhibicję wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup> przez a-DNA #17 była na wszystkich etapach translokacyjnych rybosomu bardzo wysoka (Rysunek 81). **Wynik ten jednoznacznie wskazuje, że oddziaływanie końca CCA tRNA w miejscu P z helisą H80 jest niezbędne na wszystkich etapach biosyntezy białka.**

### Oligonukleotydy #14 i #15

Sekwencje docelowe dla oligonukleotydów #14 i #15 zlokalizowane są w domenie V 26S rRNA (w pozycjach odpowiednio: 2836-2847 oraz 2823-2834, Rysunek 63). Obydwie sekwencje są odpowiedzialne za interakcje z ramieniem TΨC cząsteczki tRNA w miejscu A (Tabela 22). a-DNA #14 jest komplementarny do miejsca oddziałującego z nukleotydami w pozycjach 64-65 tRNA, natomiast a-DNA #15 – do miejsca oddziałującego z nukleotydami 50-53 cząsteczki tRNA [5]. Z tego względu do badań wpływu a-DNA #14 i #15 na proces translacji, zastosowałam cząsteczkę D-tRNA oraz mini-tRNA, z których usunęłam ramię TΨC: mini-tRNA antykodonowe i mini-tRNA DHU.

Nukleotydy oddziałujące z cząsteczką tRNA w obrębie sekwencji docelowych a-DNA #14 i #15 są wysoce zachowawcze ewolucyjnie i wykazują 90-98% konserwatywności (dane na podstawie [22]).



**Rysunek 82. Porównanie stopnia hybrydyzacji oligonukleotydu #14 do rybosomów obsadzonych mini-tRNA lub D-tRNA.**

Oznaczenia: D-tRNA – deacylowany tRNA; ANT – mini-tRNA antykodonowe; DHU – mini-tRNA DHU.

Fragmenty domeny V, do której komplementarne są oligonukleotydy #14 i #15, w stanie PRE-P są wysoce dostępne dla tych a-DNA kiedy rybosomalne miejsce P obsadziłam mini-tRNA (55-97% hybrydyzacji; Rysunek 82 i Rysunek 83). Obsadzenie miejsca A przez AA-tRNA powodowało nieco słabsze udostępnienie docelowych miejsc w 26S rRNA. **Nastąpiła**

Wyniki badań nad wpływem 5' i 3' UTR na efektywność translacji białka w komórce eukariotycznej. Wyniki te wskazują na to, że sekwencje 5' i 3' UTR mogą być miejscami, gdzie następuje regulacja translacji białka.

### Ogólny opis 5' i 3' UTR

Właściwości 5' i 3' UTR mRNA są bardzo różnorodne. W 5' UTR znajdują się sekwencje, które mogą być miejscami, gdzie następuje regulacja translacji białka. W 3' UTR znajdują się sekwencje, które mogą być miejscami, gdzie następuje regulacja translacji białka. W 5' UTR znajdują się sekwencje, które mogą być miejscami, gdzie następuje regulacja translacji białka. W 3' UTR znajdują się sekwencje, które mogą być miejscami, donde następuje regulacja translacji białka.

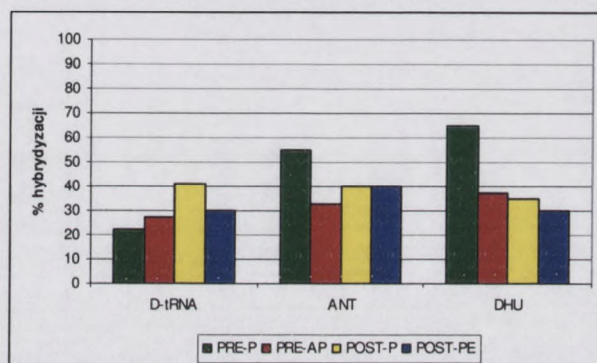
Wyniki badań nad wpływem 5' i 3' UTR na efektywność translacji białka w komórce eukariotycznej. Wyniki te wskazują na to, że sekwencje 5' i 3' UTR mogą być miejscami, gdzie następuje regulacja translacji białka.



Wykres 2. Wzrost efektywności translacji białka w komórce eukariotycznej w zależności od obecności 5' i 3' UTR. Wyniki te wskazują na to, że sekwencje 5' i 3' UTR mogą być miejscami, gdzie następuje regulacja translacji białka.

Wyniki badań nad wpływem 5' i 3' UTR na efektywność translacji białka w komórce eukariotycznej. Wyniki te wskazują na to, że sekwencje 5' i 3' UTR mogą być miejscami, gdzie następuje regulacja translacji białka.

wyraźna zmiana konformacji rybosomu w helisie H89 pod wpływem przyłączenia czynnika elongacyjnego EF-1 i obsadzenia miejsca A przez AA-tRNA. Po translokacji, badane fragmenty domeny V są również dostępne dla oligonukleotydów. **Widoczne są jednak zmiany konformacyjne helisy H89 świadczące o zamykaniu się rybosomu po zakończeniu elongacji.** Taki wniosek jest wynikiem obserwowanego spadku stopnia hybrydyzacji przy przejściu ze stanu POST-P do POST-PE w przypadku rybosomów obsadzonych przez mini-tRNA DHU lub D-tRNA.



**Rysunek 83. Porównanie stopnia hybrydyzacji oligonukleotydu #15 do rybosomów obsadzonych mini-tRNA lub D-tRNA.**

Oznaczenia: D-tRNA – deacylowany tRNA; ANT – mini-tRNA antykodonowe; DHU – mini-tRNA DHU.

Stopień inhibicji wiązania AA-tRNA do rybosomów obsadzonych cząsteczką D-tRNA pod wpływem zhybrydowanego oligonukleotydu #14 lub #15 utrzymywał się na wyrównanym poziomie we wszystkich stanach translokacyjnych (Rysunek 84 i Rysunek 85). a-DNA #14 inhibował proces biosyntezy białka w 21-47%, a-DNA #15 – w 28-37%. Wyniki te sugerują, że przed i po reakcji translokacji, nukleotydy w pozycjach 64-65 oraz 50-53 ramienia TΨC cząsteczki tRNA zajmującej miejsce A nie muszą oddziaływać z helisą H89. Jednak w przypadku obsadzenia rybosomalnego miejsca P lub cząsteczkami mini-tRNA, z których usunęłam ramię TΨC, obserwowałam znaczną inhibicję powodowaną przez a-DNA #14 w stanach PRE-P, PRE-AP i POST-P oraz przez a-DNA #15 w stanach PRE-P i PRE-AP. Ponadto, w stanie PRE-P oba oligonukleotydy hybrydują w bardzo wysoką wydajnością do rybosomów z obsadzonym miejscem P przez mini-tRNA. **Aby reakcja wiązania AA-tRNA do miejsca A zaszła prawidłowo, niezbędne są oddziaływania nukleotydów w pozycjach 64-65 oraz 50-53 tRNA z helisą H89 przed utworzeniem wiązania peptydowego.** Po utworzeniu wiązania peptydowego i translokacji, nukleotydy w pozycjach 50-53 nie muszą

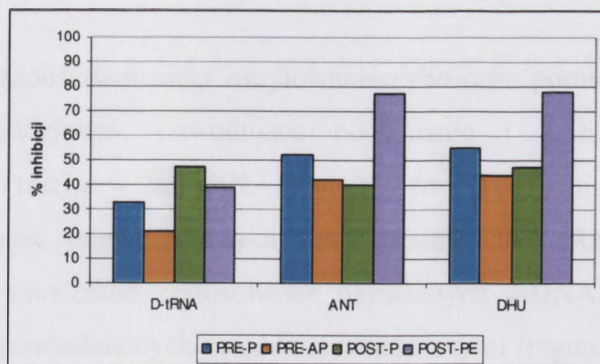


The first part of the paper discusses the general theory of the subject, and the second part discusses the particular case of the subject.

The first part of the paper discusses the general theory of the subject, and the second part discusses the particular case of the subject.

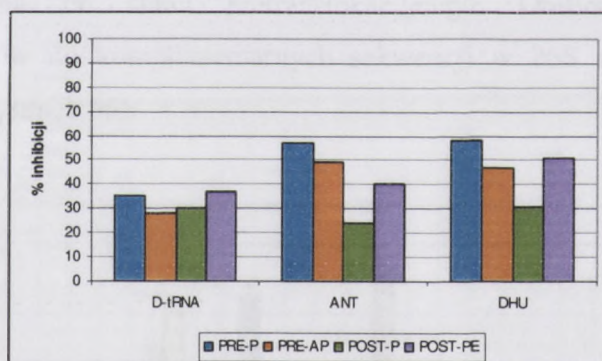
The first part of the paper discusses the general theory of the subject, and the second part discusses the particular case of the subject.

oddziaływać z rybosomem. Dla prawidłowego uwalniania D-tRNA z miejsca E konieczne są oddziaływania nukleotydów 64 i 65 tRNA w miejscu A z helisą H89.



Rysunek 84. Porównanie stopnia inhibicji reakcji wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup> powodowanej przez oligonukleotyd #14 w rybosomach obsadzonych mini-tRNA lub D-tRNA.

Oznaczenia: D-tRNA – deacylowany tRNA; ANT – mini-tRNA antykodonowe; DHU – mini-tRNA DHU.



Rysunek 85. Porównanie stopnia inhibicji reakcji wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup> powodowanej przez oligonukleotyd #15 w rybosomach obsadzonych mini-tRNA lub D-tRNA.

Oznaczenia: D-tRNA – deacylowany tRNA; ANT – mini-tRNA antykodonowe; DHU – mini-tRNA DHU.

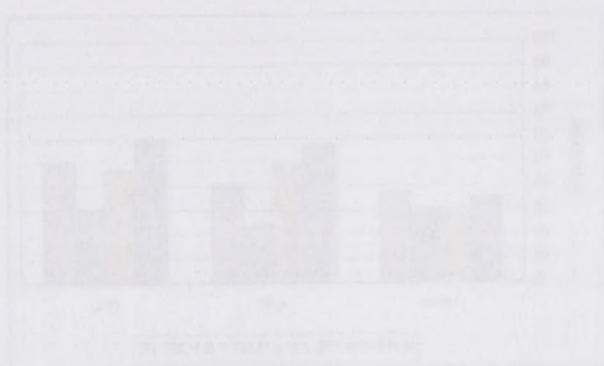
### Oligonukleotyd #8

Jako kontrolę stosowałam oligonukleotyd #8, ponieważ jego sekwencja nie jest komplementarna do żadnego fragmentu rRNA (Tabela 11). Niemal we wszystkich stanach konformacyjnych rybosomu nie obserwowałam hybrydyzacji tego oligonukleotydu. Fakt, że reakcja wiązania Phe-tRNA<sup>Phe</sup> do miejsca A w rybosomie zachodzi niemal w 100% w obecności oligonukleotydu #8 w mieszaninie reakcyjnej dowodzi tego, że nie jest on w stanie hybrydyzować do rybosomu, ani też nie inhibuje reakcji wiązania w sposób

oblasti, a z tym samym, dla prawidłowego ocieplenia D-RNA z miejsc B i C, natomiast w odniesieniu do miejsc A i B, nie ma różnic.



Wykres 84. Procent zwierząt z gorączką w zależności od miejsca i rodzaju leczenia D-RNA<sup>SM</sup> (powodzenie) oraz D-RNA<sup>SM</sup> + ANT (powodzenie) i D-RNA<sup>SM</sup> + CHL (powodzenie) w odniesieniu do miejsc A, B i C.



Wykres 85. Procent zwierząt z gorączką w zależności od miejsca i rodzaju leczenia D-RNA<sup>SM</sup> (powodzenie) oraz D-RNA<sup>SM</sup> + ANT (powodzenie) i D-RNA<sup>SM</sup> + CHL (powodzenie) w odniesieniu do miejsc A, B i C.

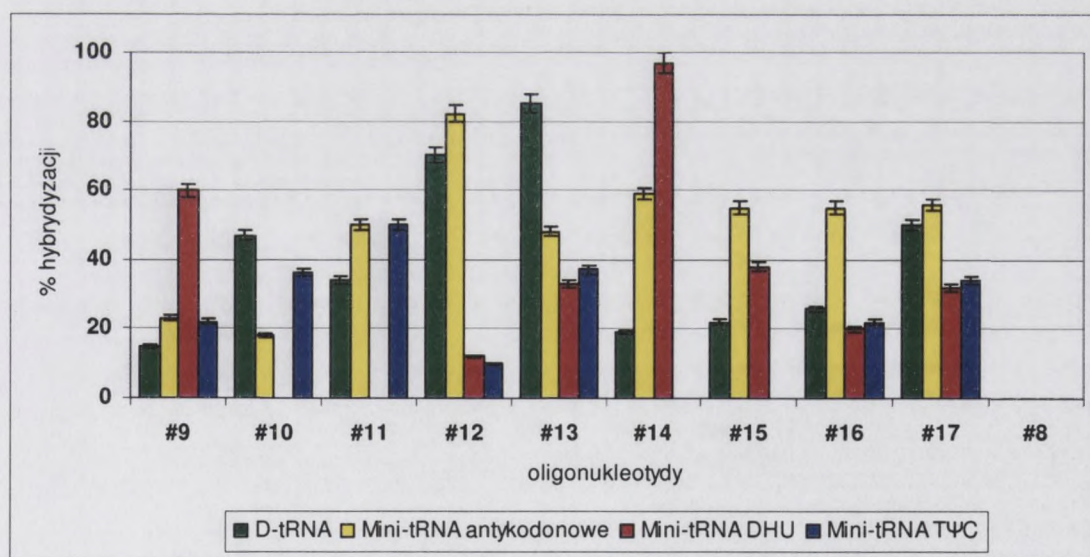
### Wnioski

Jako konsekwencję powyższych badań, należy stwierdzić, że w odniesieniu do miejsc A i B, nie ma różnic w odniesieniu do rodzaju leczenia, natomiast w odniesieniu do miejsc B i C, różnice są istotne. W odniesieniu do miejsc A i B, nie ma różnic, natomiast w odniesieniu do miejsc B i C, różnice są istotne. W odniesieniu do miejsc A i B, nie ma różnic, natomiast w odniesieniu do miejsc B i C, różnice są istotne.

niespecyficzny. Zakładam zatem, że obserwowana hybrydyzacja wszystkich pozostałych oligonukleotydów zachodzi specyficznie do wybranych przeze mnie komplementarnych miejsc w 18S rRNA, a obserwowane zmiany są spowodowane właśnie tym procesem.

Podsumowując, zaobserwowałam oscylowanie rybosomu pomiędzy głównymi stanami podczas cyklu elongacyjnego, powodujące odsłanianie i zasłanianie poszczególnych funkcjonalnie ważnych miejsc w 26S rRNA. Konsekwencją tych zmian konformacyjnych jest niejednakowa dostępność miejsc ważnych funkcjonalnie 26S rRNA dla antysensowych oligonukleotydów. Równoczesne zastosowanie określonych a-DNA komplementarnych do rejonów 26S rRNA odpowiedzialnych za oddziaływanie z tymi fragmentami cząsteczki tRNA, które zostały wykluczone z mini-tRNA, pozwoliło na precyzyjne opisanie zmian konformacyjnych rybosomu eukariotycznego w korelacji do funkcji, jakie pełnią te strategiczne sekwencje.

Gdy zablokowałam miejsce P deacylowanym tRNA lub mini-tRNA, wymusiłam zmiany konformacji rybosomu do stanu pretranslokacyjnego. Obserwowałam przyłączenie oligodeoksynukleotydów do komplementarnych sekwencji w 26S rRNA w rybosomie na wysokim poziomie (Rysunek 86).



**Rysunek 86. Procent hybrydyzacji oligonukleotydów do rybosomu w stanie pretranslokacyjnym PRE-P.**

Miejsce P obsadzone przez D-tRNA, mini-tRNA antykodonowe, mini-tRNA DHU lub mini-tRNA TΨC. Rezultaty obarczone są odchyleniem standardowym ( $\pm 3\%$ ) z trzech niezależnych eksperymentów.

The first part of the report deals with the general conditions of the country, and the second part with the details of the various districts. The first part is divided into two sections, the first of which deals with the general conditions of the country, and the second with the details of the various districts. The second part is divided into three sections, the first of which deals with the details of the various districts, the second with the details of the various districts, and the third with the details of the various districts.

The first part of the report deals with the general conditions of the country, and the second part with the details of the various districts. The first part is divided into two sections, the first of which deals with the general conditions of the country, and the second with the details of the various districts. The second part is divided into three sections, the first of which deals with the details of the various districts, the second with the details of the various districts, and the third with the details of the various districts.

The first part of the report deals with the general conditions of the country, and the second part with the details of the various districts. The first part is divided into two sections, the first of which deals with the general conditions of the country, and the second with the details of the various districts. The second part is divided into three sections, the first of which deals with the details of the various districts, the second with the details of the various districts, and the third with the details of the various districts.

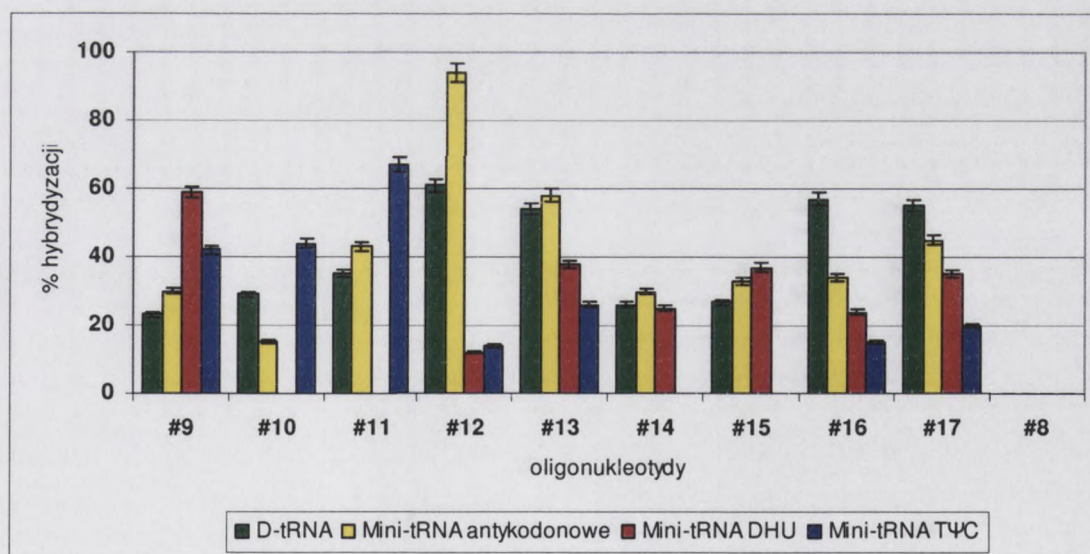
Przyłączenie to było możliwe, gdyż następujące miejsca w rybosomie są w tym stanie udostępniane dla antysensowych oligomerów: helisy H69, H93, H80, H89 oraz fragmenty pętli centralnej domeny V między helisami H92 i H93 oraz H74 i H89.

Zablokowanie dodatkowo miejsca A poprzez aminoacylo-tRNA spowodowało całkowite przekształcenie rybosomów do stanu pretranslokacyjnego (Rysunek 87). Obserwowałam wówczas:

- zwiększenie ilości przyłączonych oligodeoksynukleotydów do komplementarnych miejsc w helisach: H69, H70 i H80 oraz w odcinkach jednoniciowych 26S rRNA pomiędzy helisami H70 i H71 oraz H74 i H89;

- zmniejszanie ilości hybrydizowanych a-DNA do komplementarnych miejsc w helisach: H93, H89 i pomiędzy helisami H92 i H93.

Wyniki te potwierdzają doniesienia na temat kompleksowych zmian strukturalnych w dużej podjednostce rybosomalnej po przyłączeniu czynnika elongacyjnego EF-G [145, 149]. Obserwowano wówczas poszerzenie tunelu wyjścia polipeptydu. Uzyskane przez mnie wyniki wskazują, że zmiany te mogą również prowadzić do rozluźnienia struktury rybosomu w obrębie helis H89, H92 i H93, zlokalizowanych w bliskim sąsiedztwie w regionie centralnej pętli domeny V 26S rRNA, stanowiącej centrum peptydylotransferazowe.



**Rysunek 87. Procent hybrydyzacji oligonukleotydów do rybosomu w stanie pretranslokacyjnym PRE-AP.**

Miejsce P obsadzone przez D-tRNA, mini-tRNA antykodonowe, mini-tRNA DHU lub mini-tRNA TΨC. Rezultaty obarczone są odchyleniem standardowym ( $\pm 3\%$ ) z trzech niezależnych eksperymentów.

Wskazywane jest, że w tym czasie dochodzi do zwiększenia aktywności genów, które w tym czasie są wyrażane w tkance śluzowej nosa. Wskazywane jest, że w tym czasie dochodzi do zwiększenia aktywności genów, które w tym czasie są wyrażane w tkance śluzowej nosa.

Zaburzenia w procesie dojrzewania komórek w tkance śluzowej nosa. Wskazywane jest, że w tym czasie dochodzi do zwiększenia aktywności genów, które w tym czasie są wyrażane w tkance śluzowej nosa.

Wskazywane jest, że w tym czasie dochodzi do zwiększenia aktywności genów, które w tym czasie są wyrażane w tkance śluzowej nosa. Wskazywane jest, że w tym czasie dochodzi do zwiększenia aktywności genów, które w tym czasie są wyrażane w tkance śluzowej nosa.

Wskazywane jest, że w tym czasie dochodzi do zwiększenia aktywności genów, które w tym czasie są wyrażane w tkance śluzowej nosa. Wskazywane jest, że w tym czasie dochodzi do zwiększenia aktywności genów, które w tym czasie są wyrażane w tkance śluzowej nosa.

Wskazywane jest, że w tym czasie dochodzi do zwiększenia aktywności genów, które w tym czasie są wyrażane w tkance śluzowej nosa. Wskazywane jest, że w tym czasie dochodzi do zwiększenia aktywności genów, które w tym czasie są wyrażane w tkance śluzowej nosa.

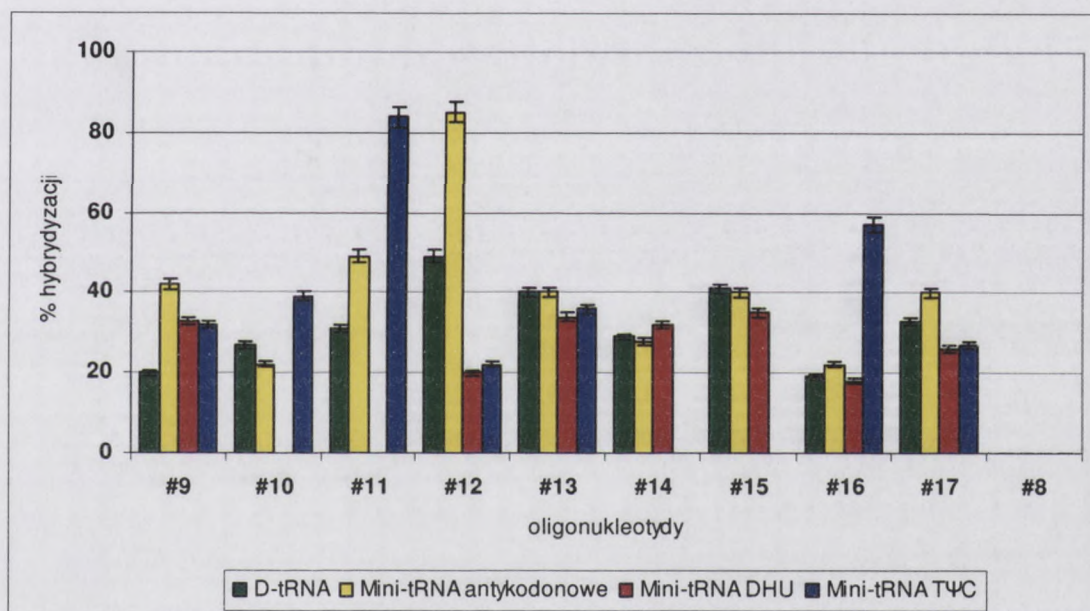
Wskazywane jest, że w tym czasie dochodzi do zwiększenia aktywności genów, które w tym czasie są wyrażane w tkance śluzowej nosa. Wskazywane jest, że w tym czasie dochodzi do zwiększenia aktywności genów, które w tym czasie są wyrażane w tkance śluzowej nosa.



Wyrażenie genów w tkance śluzowej nosa. Wyrażenie genów w tkance śluzowej nosa. Wyrażenie genów w tkance śluzowej nosa. Wyrażenie genów w tkance śluzowej nosa.

Ciekawą zależność daje się zauważyć dla a-DNA #14, #15, #16 oraz #17. Mianowicie, gdy miejsce P obsadzone było przez D-tRNA, wówczas następowało zwiększenie stopnia hybrydyzacji tych oligonukleotydów. Natomiast, gdy molekułą zajmującą miejsce P była jedna z cząsteczek mini-tRNA, obserwowałam niższy niż w stanie PRE-P procent hybrydyzacji. Moim zdaniem wynika to z faktu, że w porównaniu z pełnej długości tRNA, cząsteczki mini-tRNA nie angażują wszystkich oddziaływań z rRNA. Prawdopodobnie nukleotydy w obrębie helis H80 i H89 26S rRNA, które nie oddziałują z mini-tRNA (tylko z tRNA) pozostają wolne dla interakcji z innymi nukleotydami rRNA.

Podobne zmiany obserwowałam odnośnie stanu posttranslokacyjnego.



**Rysunek 88. Procent hybrydyzacji oligonukleotydów do rybosomu w stanie posttranslokacyjnym POST-P.**

Rezultaty obarczone są odchyleniem standardowym ( $\pm 3\%$ ) z trzech niezależnych eksperymentów.

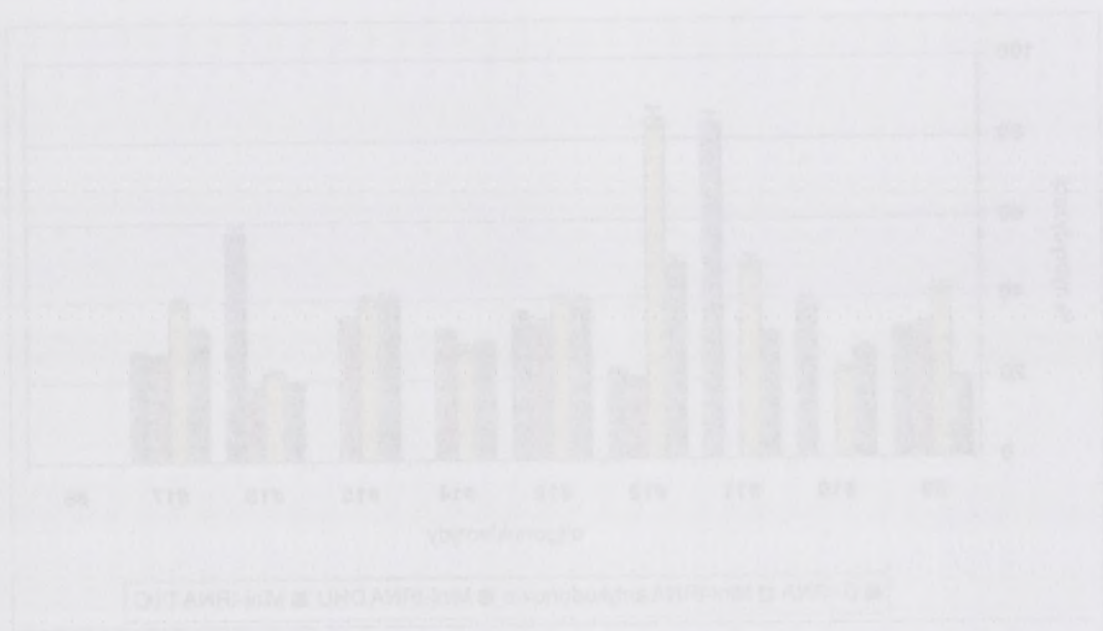
Zablokowanie miejsca P aminoacylo-tRNA powodowało zwiększenie stopnia hybrydyzacji a-DNA jedynie do części helisy H89 26S rRNA (Rysunek 88). W pozostałych badanych przeze mnie miejscach obserwowałam zamykanie się struktury dużej podjednostki rybosomalnej. Rozluźnienie struktury rybosomu w regionie H89 wiąże się ze zmniejszeniem odległości między innymi regionami i ściślejsze upakowanie helis H69, H70, H71, H74, H92 i H93.

Obsadzenie obu miejsc jednocześnie, to jest miejsca P przez aminoacylo-tRNA i miejsca E przez D-tRNA lub mini-tRNA nie dawało wysokich wartości stopnia hybrydyzacji (Rysunek



... w celu ...

Tablica 1. Wyniki ...

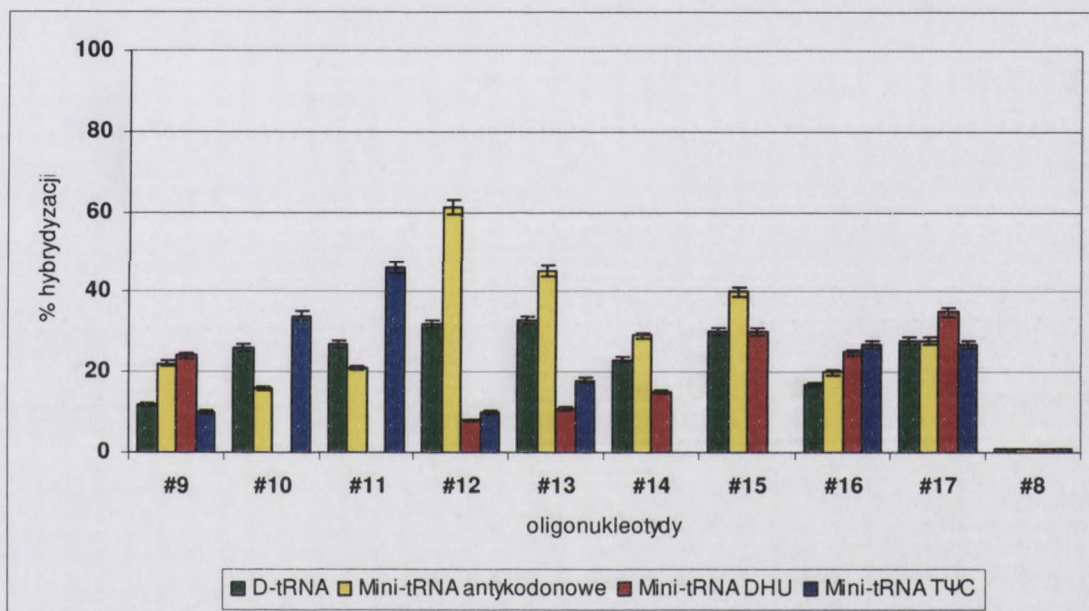


Wykres 1. Wyniki ...

... Wyniki ...

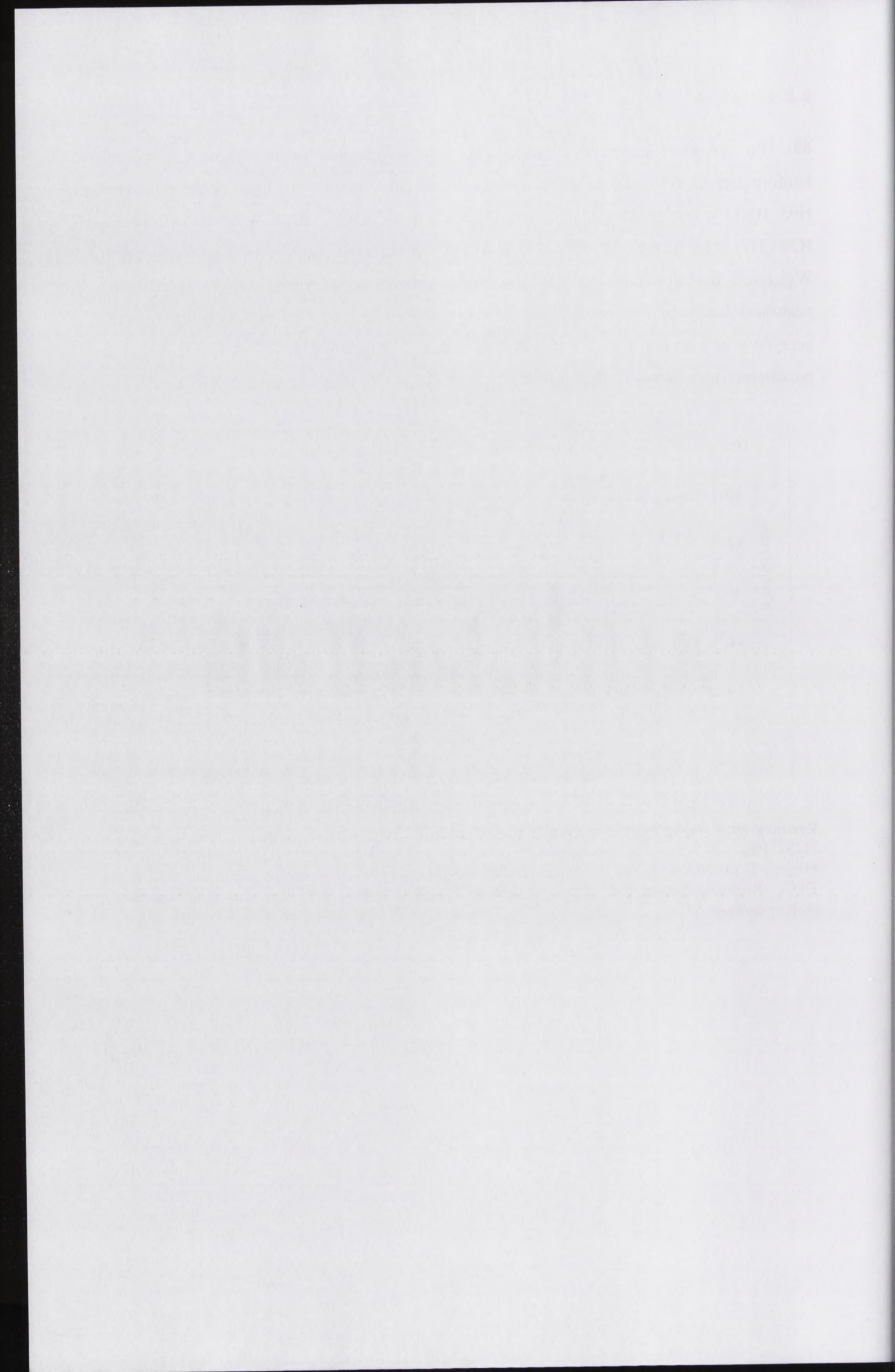
... Wyniki ...

89). Po zakończeniu etapu elongacji łańcucha polipeptydowego, rybosom przyjmuje konformację na tyle zamkniętą, że ważne funkcjonalnie miejsca w obrębie helis H70, H89, H93, H80 i w odcinkach jednoniciowych rRNA między helisami H92 i H93, H74 i H89 oraz H70 i H71 stają się mniej dostępne dla wprowadzonych komplementarnych oligonukleotydów. Wyjątkiem był oligonukleotyd #10, dla którego stopień hybrydyzacji w obu etapach stanu posttranslokacyjnego był porównywalny. Wyciągnęłam wniosek, że po utworzeniu wiązania peptydowego i po translokacji helisa H70 nie zmienia swej orientacji przestrzennej względem pozostałych elementów strukturalnych rybosomu.



**Rysunek 89. Procent hybrydyzacji oligonukleotydów do rybosomu w stanie posttranslokacyjnym POST-PE.**

Miejsce E obsadzone przez D-tRNA, mini-tRNA antykodonowe, mini-tRNA DHU lub mini-tRNA TΨC. Rezultaty obarczone są odchyleniem standardowym ( $\pm 3\%$ ) z trzech niezależnych eksperymentów.



## 7. WNIOSKI

- **Zmiany konformacyjne rybosomu podczas biosyntezy białka**

Zastosowanie strategii antysensu doprowadziło mnie do konkluzji na temat zmian konformacyjnych rybosomu podczas procesu translacji. W wyniku przekształcenia rybosomów w stan pre- lub posttranslokacyjny, charakteryzują się one odmienną konformacją przestrzenną. Konsekwencją występowania tych stanów jest niejednakowa dostępność miejsc ważnych funkcjonalnie w rRNA dla antysensowych oligonukleotydów (Rysunki 90 i 91). Jest to nowy dowód na istnienie zmian strukturalnych rybosomu, niezwykle ważnych dla procesu translacji.

Rybosom z obsadzonym miejscem P znajduje się w stanie pretranslokacyjnym, jednak niepełnym. Obserwowałam przyłączanie oligodeoksynukleotydów do komplementarnych sekwencji w 18S rRNA lub 26S rRNA w rybosomie na wysokim poziomie w kilku przypadkach. Przyłączanie to było możliwe, gdyż następujące miejsca w rybosomie są w tym stanie udostępniane dla a-DNA: helisy h18, h23 i h24 18S rRNA oraz helisy H70, H69, H93, H89, H80 i fragment pętli centralnej domeny V między helisami H92 i H93 26S rRNA.

Po obsadzeniu dodatkowo miejsca A przez Phe-tRNA<sup>Phe</sup> rybosom przyjmuje pełny stan pretranslokacyjny i w wyniku zmian ułożenia przestrzennego poszczególnych fragmentów rRNA, zmienia swą konformację na bardziej „otwartą” w następujących regionach:

- w 18S rRNA – w obrębie helis h13, h18, h23, h24 oraz h44;
- w 26S rRNA – w obrębie helis H69, H93, H80 oraz w pętli centralnej domeny V między helisami H92 i H93 oraz H74 i H89.

W stanie posttranslokacyjnym, kiedy w rybosomie obsadzone jest miejsce P, jego konformacja nadal utrzymywana jest w stanie „otwartym” w następujących regionach:

- w obrębie helis h13, h18, h23, h24 oraz h44 18S rRNA;
- w regionie helisy H93 26S rRNA.

Nastąpiła wzajemna rotacja podjednostek oraz przejście do mniej zwartej struktury rybosomu, która utrzymuje się podczas tworzenia wiązania peptydowego i translokacji.

Zajęcie miejsca E przez tRNA<sup>Phe</sup> jest sygnałem do zakończenia cyklu elongacyjnego i przyjęcia przez rybosom struktury bardziej „zamkniętej”. Taką konformację rybosomu obserwowałam w następujących fragmentach rRNA:

- w 18S rRNA – w obrębie helis h13, h24 oraz w części h44;
- w 26S rRNA – w obrębie helis H70, H89, H93, H80 oraz w odcinkach jednoniciowych rRNA między helisami H92 i H93, H74 i H89 oraz H70 i H71.

Z WYDZIAŁU

\* Zależny konformacyjny rybosomu podczas biosyntezy białka

Zastosowanie nowego sposobu dowodzenia na to, że konformacja rybosomu zmienia się w czasie biosyntezy białka. W wyniku przekształcenia rybosomu w stan jak posttranslacyjny, obserwowano, że niektóre białka przetrwały w stanie posttranslacyjnym, mimo że nie miały one jeszcze czasu na wyłączenie z rybosomu. Wyniki te dowodzą, że konformacja rybosomu zmienia się w czasie biosyntezy białka.

Rybosom z obrotową podjednostką 50S i podjednostką 30S, jak i podjednostki 50S i 30S, w czasie biosyntezy białka wykazują zmiany konformacyjne. Wyniki te dowodzą, że konformacja rybosomu zmienia się w czasie biosyntezy białka. Wyniki te dowodzą, że konformacja rybosomu zmienia się w czasie biosyntezy białka.

W czasie biosyntezy białka, rybosom zmienia swoją konformację. Wyniki te dowodzą, że konformacja rybosomu zmienia się w czasie biosyntezy białka.

W czasie biosyntezy białka, rybosom zmienia swoją konformację. Wyniki te dowodzą, że konformacja rybosomu zmienia się w czasie biosyntezy białka.

W czasie biosyntezy białka, rybosom zmienia swoją konformację. Wyniki te dowodzą, że konformacja rybosomu zmienia się w czasie biosyntezy białka.

W czasie biosyntezy białka, rybosom zmienia swoją konformację. Wyniki te dowodzą, że konformacja rybosomu zmienia się w czasie biosyntezy białka.

W czasie biosyntezy białka, rybosom zmienia swoją konformację. Wyniki te dowodzą, że konformacja rybosomu zmienia się w czasie biosyntezy białka.

W czasie biosyntezy białka, rybosom zmienia swoją konformację. Wyniki te dowodzą, że konformacja rybosomu zmienia się w czasie biosyntezy białka.

W czasie biosyntezy białka, rybosom zmienia swoją konformację. Wyniki te dowodzą, że konformacja rybosomu zmienia się w czasie biosyntezy białka.

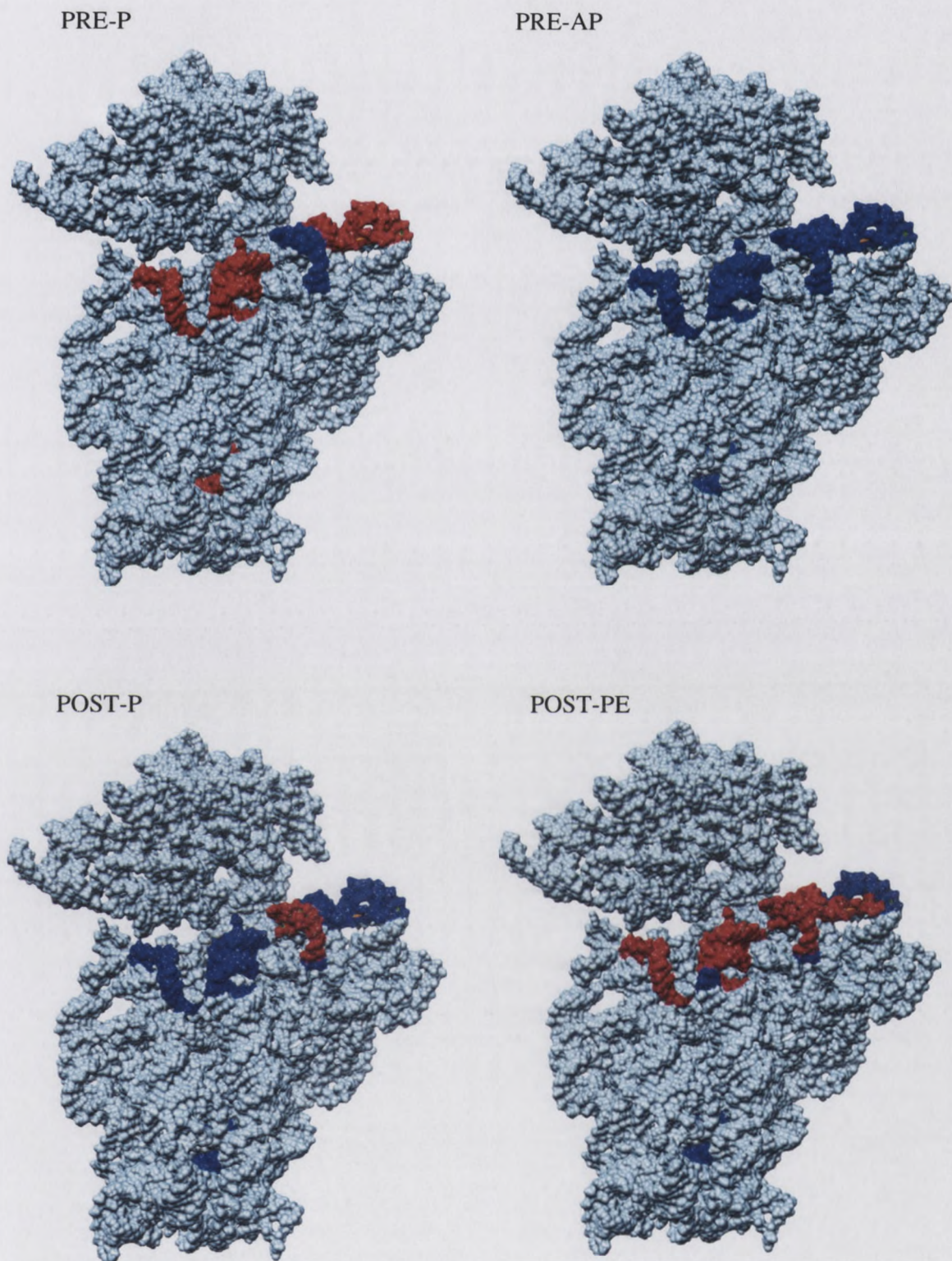
W drugim etapie translokacji, następuje rotacja małej podjednostki w odwrotnym kierunku niż w stanie pretranslokacyjnym, wskutek czego zajmuje ona pozycję wyjściową, taką jak przed zmianami konformacyjnymi.

Ponadto wykazałam istnienie skorelowanych zmian konformacyjnych rybosomu podczas kolejnych etapów procesu biosyntezy białka, przy użyciu mieszanin antysensowych oligodeoksynukleotydów. Zgodnie z moimi wynikami, w rybosomie mają miejsce skumulowane zmiany konformacyjne helisy h23 i h24 18S rRNA przed utworzeniem wiązania peptydowego oraz po translokacji. Ponadto, ułożenie przestrzenne dwóch przeciwbieżnych fragmentów helisy h44 tworzących centrum dekodujące małej podjednostki rybosomalnej, jest ze sobą ściśle skorelowane przed utworzeniem wiązania peptydowego.

W drugim etapie analizy, wszystkie rodzaje danych podległy w odwróconym kierunku niż w etapie proteololizacji, wstrząsk czego najmniej one zostały wyłączone.

W tym celu zmieniono kierunek analizy.

Wszystkie wyznaczone dane stanowiących zmian konformacyjnych i poziom podcałkowitego stopnia procesów biologicznych były uśredniane w grupach oligonukleotydów. Zgodnie z modelami wyznaczone w tym celu miejsca zmian oraz zmiany konformacyjne były 123 i 124 125 RNA przed utworzeniem wiązania peptydowego oraz po transkrypcji. Ponadto, istotne przekształcenie dwóch przeciwnych kierunków były 124 i 125 RNA przed utworzeniem wiązania peptydowego. W tym celu zmieniono kierunek analizy.

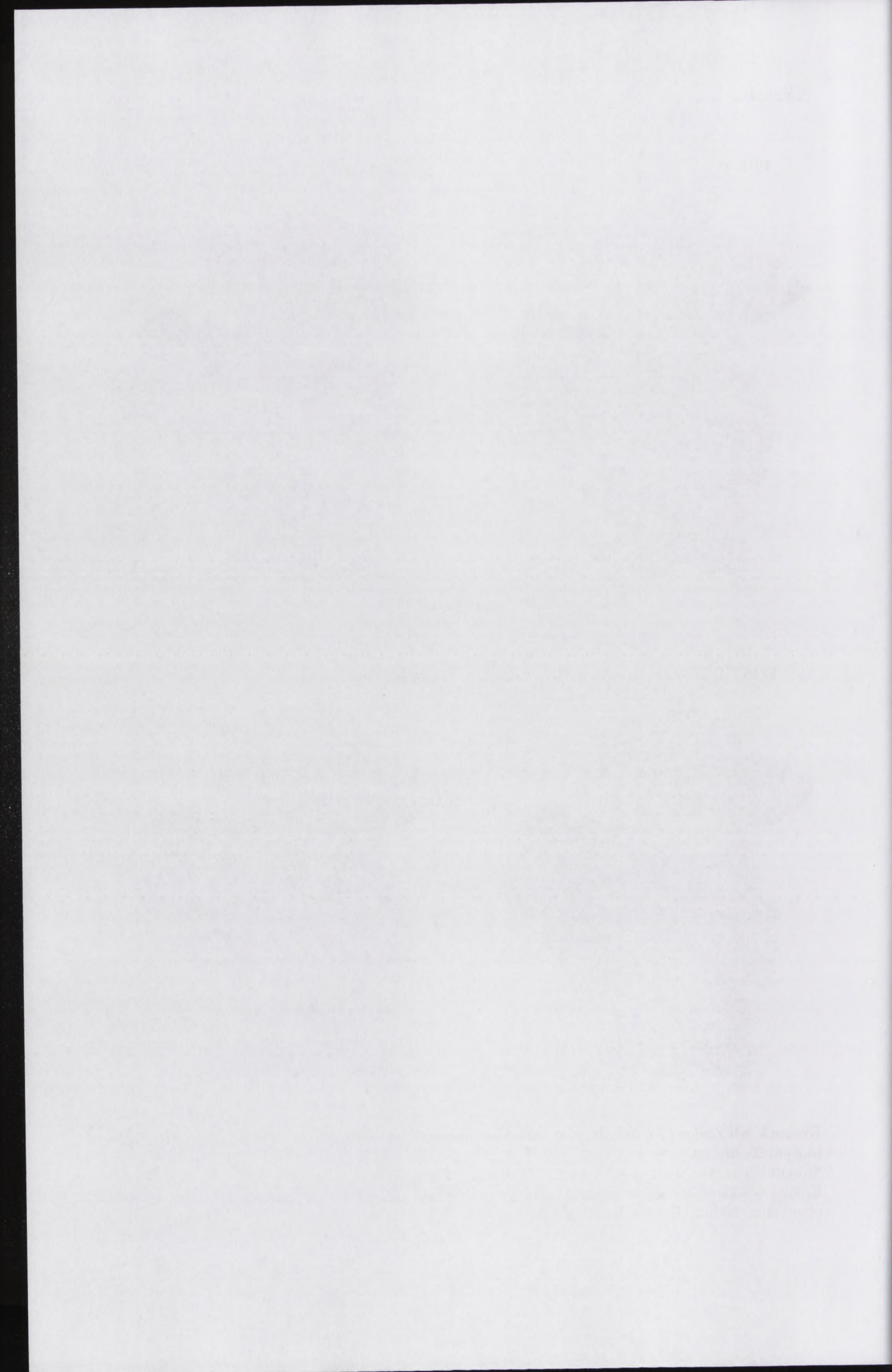


**Rysunek 90. Zmiany konformacyjne małej podjednostki rybosomalnej podczas kolejnych etapów biosyntezy białka.**

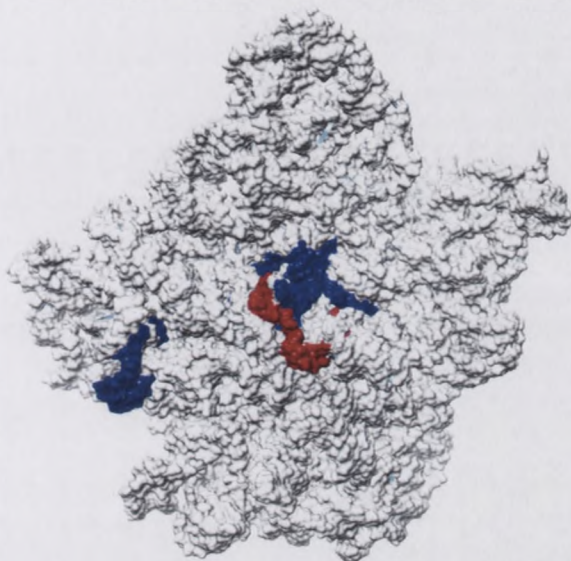
Struktura 30S utworzona na podstawie [23], numer 1FKA.

Kolory wskazują tendencje poszczególnych fragmentów 18S rRNA do zamykania (czerwony) lub otwierania (niebieski) struktury rybosomu.

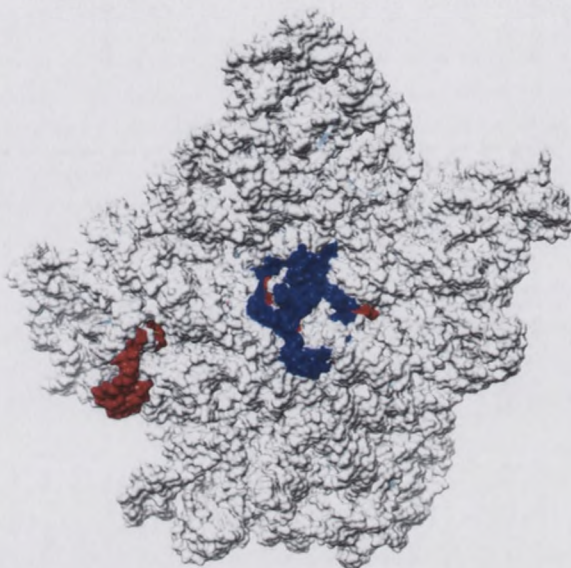




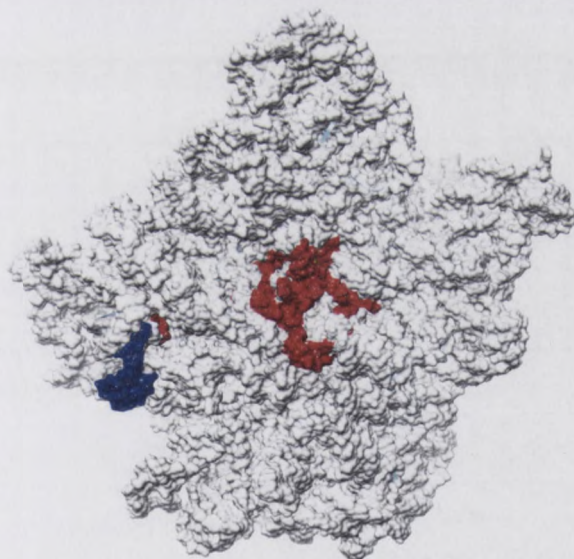
PRF-P



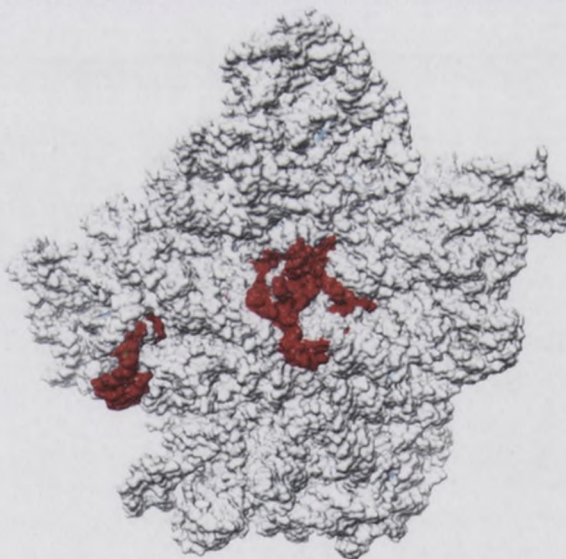
PRF-AP



POST-P



POST-PE



**Rysunek 91. Zmiany konformacyjne dużej podjednostki rybosomalnej podczas biosyntezy białka.** Struktura 50S utworzona na podstawie [23], numer 1FFK. Kolory wskazują tendencje poszczególnych fragmentów 26S rRNA do zamykania (czerwony) lub otwierania (niebieski) struktury rybosomu.



- **Funkcja wybranych fragmentów rRNA w procesie biosyntezy białka.**

Zastosowanie strategii antysensu pozwoliło mi odpowiedzieć na pytanie o funkcjonalną ważność wybranych fragmentów rRNA podczas procesu biosyntezy białka. Uzyskane wyniki skłoniły mnie do następujących konkluzji:

- 1) Interakcje helis h13 i h23 18S rRNA z eEF-2, tRNA w miejscu P oraz 26S rRNA są konieczne dla prawidłowego związania AA-tRNA do rybosomu.
- 2) Po utworzeniu wiązania peptydowego i translokacji czynnik elongacyjny eEF-2 nie musi oddziaływać z pętlą apikalną helisy h13.
- 3) Oddziaływania nukleotydów w pozycjach 530 i 532 18S rRNA z cząsteczką mRNA w pozycjach +11 i +12 są istotne na każdym etapie biosyntezy białka.
- 4) Po translokacji ramię antykodonowe cząsteczki tRNA zajmującej miejsce P (pozycje 32 i 47) lub E (pozycje 32, 37-39) nie jest ściśle związane z 18S rRNA w pozycjach 693-696 oraz 701. Oddziaływanie to nie jest niezbędne dla związania cząsteczki tRNA w miejscu A.
- 5) Dla związania cząsteczki AA-tRNA do rybosomu, niezbędne są oddziaływania ramienia antykodonowego tRNA zajmującego miejsce P (pozycja 39) lub E (pozycje 37 i 38) z helisą h24 18S rRNA.
- 6) Prawidłowa konformacja centrum dekodującego 18S rRNA, a także oddziaływania z cząsteczkami tRNA w miejscach A i P, są niezwykle ważne podczas przyłączenia cząsteczki AA-tRNA do rybosomalnego miejsca A.
- 7) Po translokacji niezbędne są oddziaływania rybosomu z mRNA w pozycji +4 a także z tRNA w miejscu P w pozycji 34 z helisą h44 18S rRNA.
- 8) Przed i po reakcji translokacji, nukleotydy w pozycjach 72-76 ramienia akceptorowego cząsteczki tRNA zajmującej miejsce A nie muszą oddziaływać z fragmentami pętli centralnej domeny V 26S rRNA znajdującymi się pomiędzy helisami H70 i H71 oraz H74 i H89.
- 9) Przed utworzeniem wiązania peptydowego, oddziaływania rybosomu z nukleotydami 11-12 i 25-26 cząsteczki tRNA zajmującej miejsce A lub P, są konieczne dla prawidłowego procesu biosyntezy białka. Interakcje te są jednak słabe i wskutek zmian konformacji rybosomu może dochodzić do ich częściowego rozluźnienia.
- 10) Dla prawidłowego procesu biosyntezy białka, oddziaływania rybosomu z nukleotydami 11, 12, 25 i 26 cząsteczki tRNA nie są niezbędne po utworzeniu wiązania peptydowego.

THE HISTORY OF THE UNITED STATES

CHAPTER I

SECTION I

SECTION II

SECTION III

SECTION IV

SECTION V

SECTION VI

SECTION VII

SECTION VIII

SECTION IX

SECTION X

SECTION XI

SECTION XII

SECTION XIII

SECTION XIV

SECTION XV

SECTION XVI

SECTION XVII

SECTION XVIII

SECTION XIX

SECTION XX

- 11) Po translokacji cząsteczki tRNA do miejsca E, ramię DHU jest ściśle związane z rybosomem i kontakt ten jest niezbędny dla przyłączenia kolejnej cząsteczki AA-tRNA do miejsca A.
- 12) Oddziaływanie końca CCA tRNA w miejscu P z helisą H93, pętlą centralną domeny V pomiędzy helisami H92 i H93, jak i helisą H80, jest konieczne na wszystkich etapach biosyntezy białka.
- 13) Do prawidłowego umiejscowienia substratów do utworzenia wiązania peptydowego konieczne są wszystkie oddziaływania między tRNA i L-rRNA.
- 14) Aby reakcja wiązania AA-tRNA do miejsca A zaszła prawidłowo, niezbędne są oddziaływania nukleotydów w pozycjach 64-65 oraz 50-53 tRNA w miejscu A z helisą H89.
- 15) Dla prawidłowego uwalniania D-tRNA z miejsca E konieczne są oddziaływania nukleotydów 64 i 65 tRNA w miejscu A z helisą H89.



## 8. STRESZCZENIE

Z mechanizmu biosyntezy białka wynika, że rybosom zawiera podlegające zmianom konformacyjnym fragmenty, które umożliwiają jego prawidłowe funkcjonowanie. Badania metodą mikroskopii krioelektronowej wskazują na zmianę konformacji zarówno w małej jak i w dużej podjednostce.

Celem mojej pracy było określenie korelacji między strukturą i funkcją wybranych fragmentów rybosomalnych kwasów nukleinowych (26S rRNA oraz 18S rRNA) w trakcie etapu wydłużania łańcucha polipeptydowego, z zastosowaniem strategii antysensowych oligodeoksynukleotydów oraz cząsteczek mini-tRNA.

Strategia antysensu jest jedną z metod pozwalającą badać miejsca oddziaływania rRNA z innymi czynnikami, ważnymi w biosyntezie białka. W swojej rozprawie doktorskiej wykorzystałam jeden z wariantów tej strategii. Polega on na wprowadzeniu do rybosomu krótkich jednoniciowych łańcuchów DNA (antysensowe DNA, a-DNA) o sekwencji komplementarnej do wybranego fragmentu rRNA i utworzeniu między nimi heterodupleksu. Hybrydyzacja a-DNA do specyficznej sekwencji rRNA uczestniczącej w procesie biosyntezy białka hamuje proces translacji. Zaobserwowałam, że inhibicja biosyntezy białka przez zhybrydyzowane a-DNA zachodzi z różną wydajnością w różnych stanach translokacyjnych. Jest to nowy dowód na istnienie zmian strukturalnych rybosomu, niezwykle ważnych dla procesu translacji. Natomiast szczegółowa analiza stopnia inhibicji powodowanej przez specyficzne a-DNA, pozwoliła mi odpowiedzieć na pytanie o funkcjonalną ważność poszczególnych fragmentów rRNA w procesie biosyntezy białka.

Na podstawie wyników przeprowadzonych przeze mnie badań stwierdziłam, że:

- 1) W wyniku przekształcenia rybosomów w stan pretranslokacyjny lub posttranslokacyjny podczas procesu biosyntezy białka, charakteryzują się one odmienną konformacją przestrzenną.
- 2) Zmiany ułożenia przestrzennego w jednych regionach rRNA powodują odmienną konformację innych fragmentów rybosomalnego RNA.
- 3) Nie wszystkie kontakty rybosomu z cząsteczkami tRNA są niezbędne dla prawidłowego przebiegu biosyntezy białka



The first part of the report deals with the general situation of the country and the progress of the work during the year. It is followed by a detailed account of the various projects and the results achieved. The report concludes with a summary of the work done and the plans for the future.

1. The first part of the report deals with the general situation of the country and the progress of the work during the year.
2. It is followed by a detailed account of the various projects and the results achieved.
3. The report concludes with a summary of the work done and the plans for the future.

- 4) Uniwersalny we wszystkich domenach organizmów żywych mechanizm biosyntezy białka jest konsekwencją zachowawczego charakteru niektórych fragmentów 26S i 18S rRNA.
- 5) Zmiany konformacyjne towarzyszące procesowi biosyntezy białka są podobne w rybosomach prokariotycznych i eukariotycznych.

- 1) Wskazać, w jakich warunkach zachodzi reakcja:  $2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}_2$
- 2) Wskazać, w jakich warunkach zachodzi reakcja:  $\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$

## 9. WYKAZ SKRÓTÓW

AA-tRNA	aminoacylo-tRNA
a-DNA	antysensowy oligonukleotyd
ASF	palec miejsca A
ATP	5'-trifosforan adenozyne
D-tRNA	deacylowany tRNA
EF-G	prokariotyczny czynnik elongacyjny G
EF-Tu	prokariotyczny czynnik elongacyjny Tu
EF-Ts	prokariotyczny czynnik elongacyjny Ts
EF-1	eukariotyczny czynnik elongacyjny 1
EF-2	eukariotyczny czynnik elongacyjny 2
FRET	rezonansowy transfer energii Förster'a
FRS	płaska powierzchnia rybosomu
GAC	centrum GTPazowe rybosomu
GDP	5'-difosforan guanozyne
GTP	5'-trifosforan guanozyne
eIF	eukariotyczny czynnik inicjatorowy
L-rRNA	rRNA dużej podjednostki rybosomalnej
mRNA	matrycowy RNA
nt	nukleotyd
Phe-tRNA <sup>Phe</sup>	fenylalanylo-tRNA <sup>Phe</sup>
PIC	kompleks preinicjatorowy
poli(U)	kwasy poliurydylowy
POPS	metoda kalkulacji dostępności powierzchni
POST	stan rybosomalny posttranslokacyjny
PRE	stan rybosomalny pretranslokacyjny
PTC	centrum peptydylotransferazowe rybosomu
P-tRNA	peptydylo-tRNA
RF	czynnik uwalniający
RIP	białko inaktywujące rybosomy
RRF	czynnik odzyskujący rybosomu
rRNA	rybosomalny RNA

INDEX

ADAMS

ADAMS

ADAMS

ADAMS

ADAMS

ADAMS

ADAMS

ADAMS

ADAMS

ADAMS

ADAMS

ADAMS

ADAMS

ADAMS

ADAMS

ADAMS

ADAMS

ADAMS

ADAMS

ADAMS

ADAMS

ADAMS

ADAMS

ADAMS

ADAMS

ADAMS

ADAMS

ADAMS

ADAMS

---

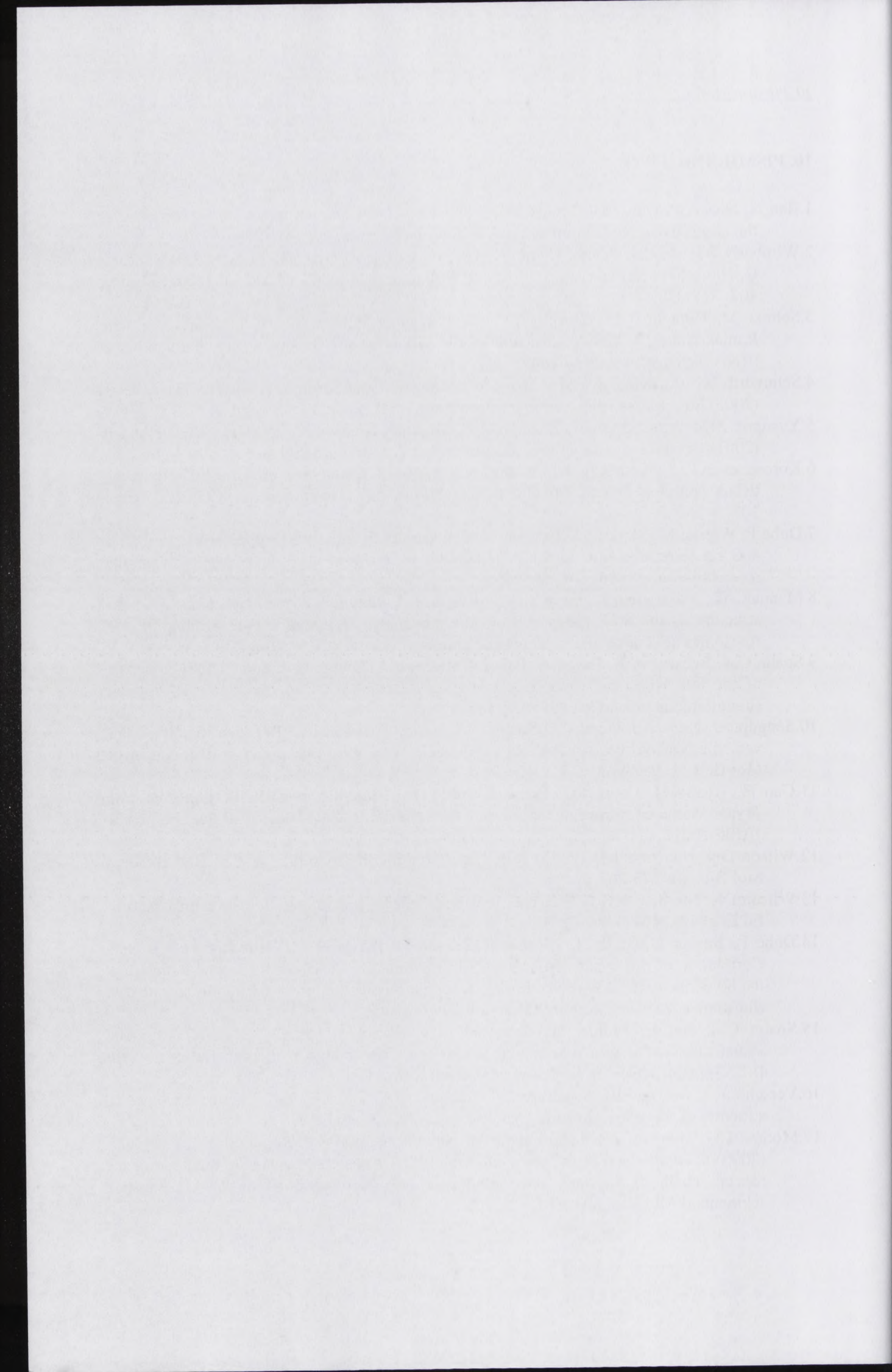
RW	reakcja enzymatycznego wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> do poli(U) rybosomów
SRL	pętla sarcyny-rycyny
TCA	kwask trichlorooctowy
TF	czynnik transkrypcyjny
tRNA	transferowy RNA
tRNA <sup>Phe</sup>	tRNA specyficzny dla fenyloalaniny
UTR	region mRNA nie ulegający translacji
70S	rybosom prokariotyczny
80S	rybosom eukariotyczny



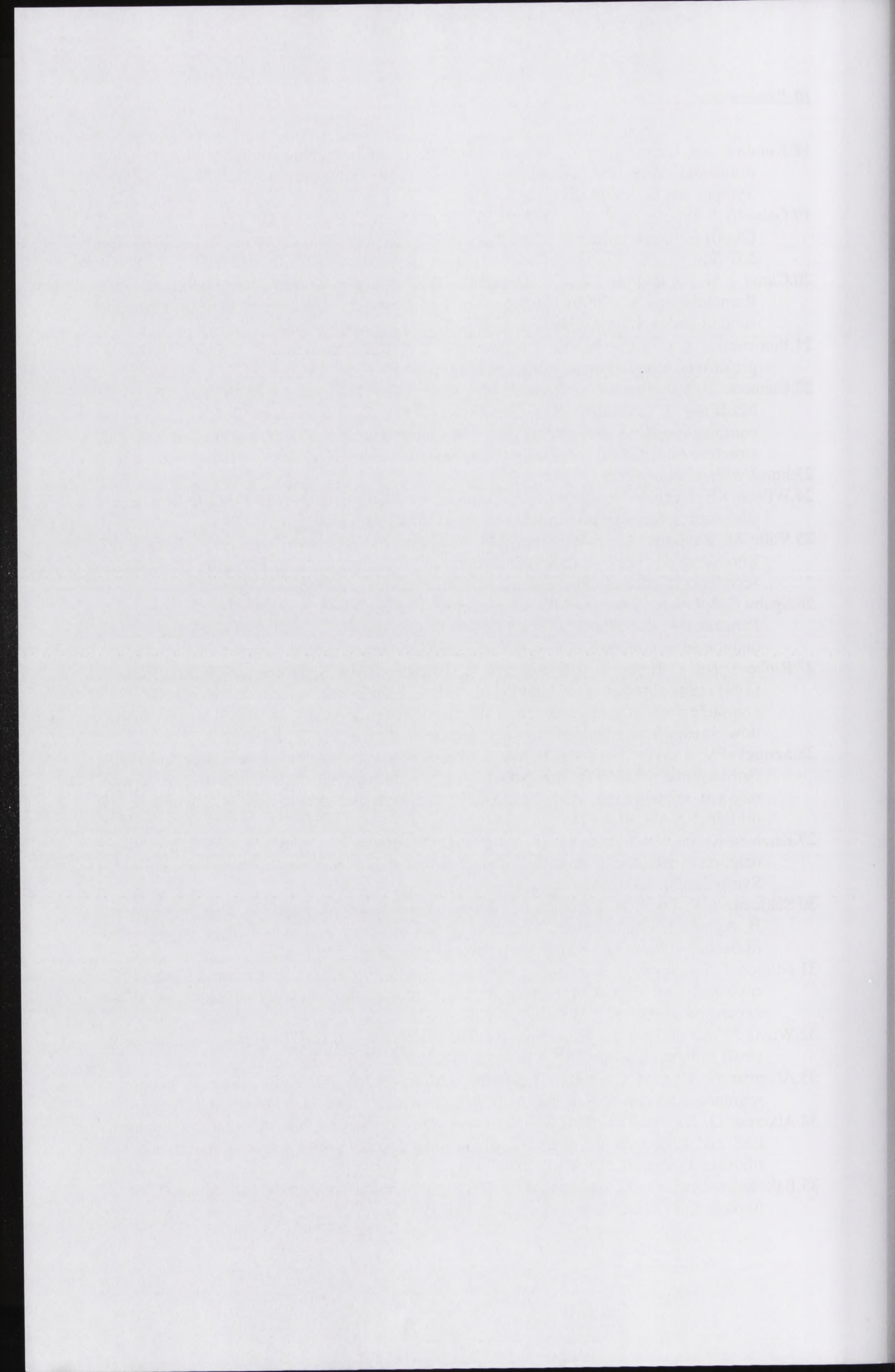
**10. PIŚMIENNICTWO**

1. Ban N, Nissen P, Hansen J, Moore PB, Steitz TA (2000) The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* 289: 905-920
2. Wimberly BT, Brodersen DE, Clemons WM, Jr., Morgan-Warren RJ, Carter AP, Vornheim C, Hartsch T, Ramakrishnan V (2000) Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* 407: 327-339
3. Selmer M, Dunham CM, Murphy FVt, Weixlbaumer A, Petry S, Kelley AC, Weir JR, Ramakrishnan V (2006) Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. *Science* 313: 1935-1942
4. Schuwirth BS, Borovinskaya MA, Hau CW, Zhang W, Vila-Sanjurjo A, Holton JM, Cate JH (2005) Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science* 310: 827-834
5. Yusupov MM, Yusupova GZ, Baucom A, Lieberman K, Earnest TN, Cate JH, Noller HF (2001) Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science* 292: 883-896
6. Korostelev AT, S., Laurberg, M., Noller, H.F. (2006) Crystal structure of a 70S ribosome-tRNA complex reveals functional interactions and rearrangements. *Cell* 126: 1065-1077
7. Dube P, Wieske M, Stark H, Schatz M, Stahl J, Zemlin F, Lutsch G, van Heel M (1998) The 80S rat liver ribosome at 25 Å resolution by electron cryomicroscopy and angular reconstitution. *Structure* 6: 389-399
8. Manuell AL, Yamaguchi K, Haynes PA, Milligan RA, Mayfield SP (2005) Composition and structure of the 80S ribosome from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: 80S ribosomes are conserved in plants and animals. *J Mol Biol* 351: 266-279
9. Spahn CM, Beckmann R, Eswar N, Penczek PA, Sali A, Blobel G, Frank J (2001) Structure of the 80S ribosome from *Saccharomyces cerevisiae*--tRNA-ribosome and subunit-subunit interactions. *Cell* 107: 373-386
10. Sengupta J, Nilsson J, Gursky R, Spahn CM, Nissen P, Frank J (2004) Identification of the versatile scaffold protein RACK1 on the eukaryotic ribosome by cryo-EM. *Nat Struct Mol Biol* 11: 957-962
11. Gao H, Ayub MJ, Levin MJ, Frank J (2005) The structure of the 80S ribosome from *Trypanosoma cruzi* reveals unique rRNA components. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 10206-10211
12. Wilson DN, Nierhaus KH (2005) Ribosomal proteins in the spotlight. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 40: 243-267
13. Wilson DN, Nierhaus KH (2003) The ribosome through the looking glass. *Angew Chem Int Ed Engl* 42: 3464-3486
14. Dube P, Bacher G, Stark H, Mueller F, Zemlin F, van Heel M, Brimacombe R (1998) Correlation of the expansion segments in mammalian rRNA with the fine structure of the 80 S ribosome; a cryoelectron microscopic reconstruction of the rabbit reticulocyte ribosome at 21 Å resolution. *J Mol Biol* 279: 403-421
15. Spahn CM, Jan E, Mulder A, Grassucci RA, Sarnow P, Frank J (2004) Cryo-EM visualization of a viral internal ribosome entry site bound to human ribosomes: the IRES functions as an RNA-based translation factor. *Cell* 118: 465-475
16. Verschoor A, Warner JR, Srivastava S, Grassucci RA, Frank J (1998) Three-dimensional structure of the yeast ribosome. *Nucleic Acids Res* 26: 655-661
17. Morgan DG, Menetret JF, Radermacher M, Neuhof A, Akey IV, Rapoport TA, Akey CW (2000) A comparison of the yeast and rabbit 80 S ribosome reveals the topology of the nascent chain exit tunnel, inter-subunit bridges and mammalian rRNA expansion segments. *J Mol Biol* 301: 301-321

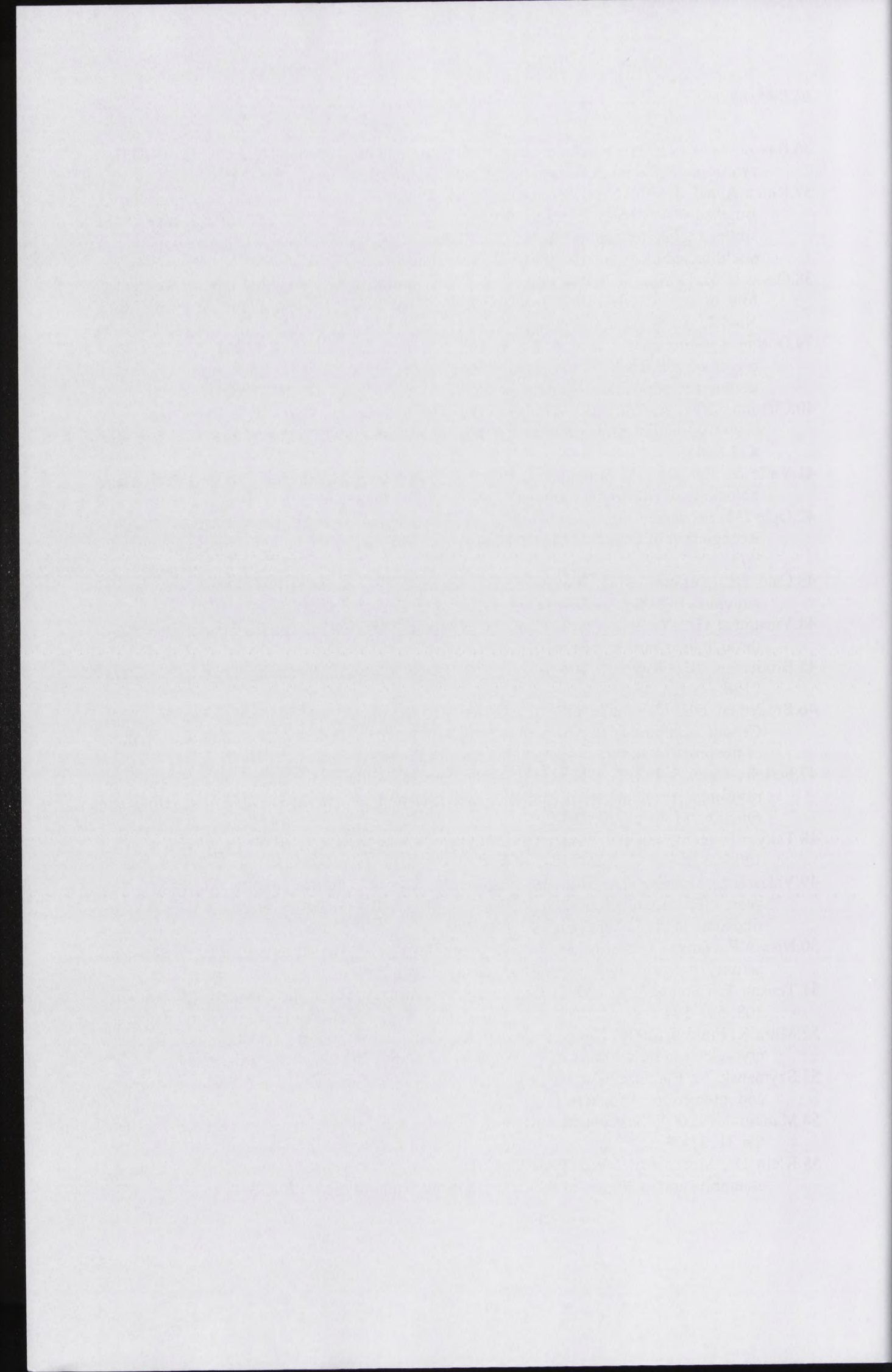




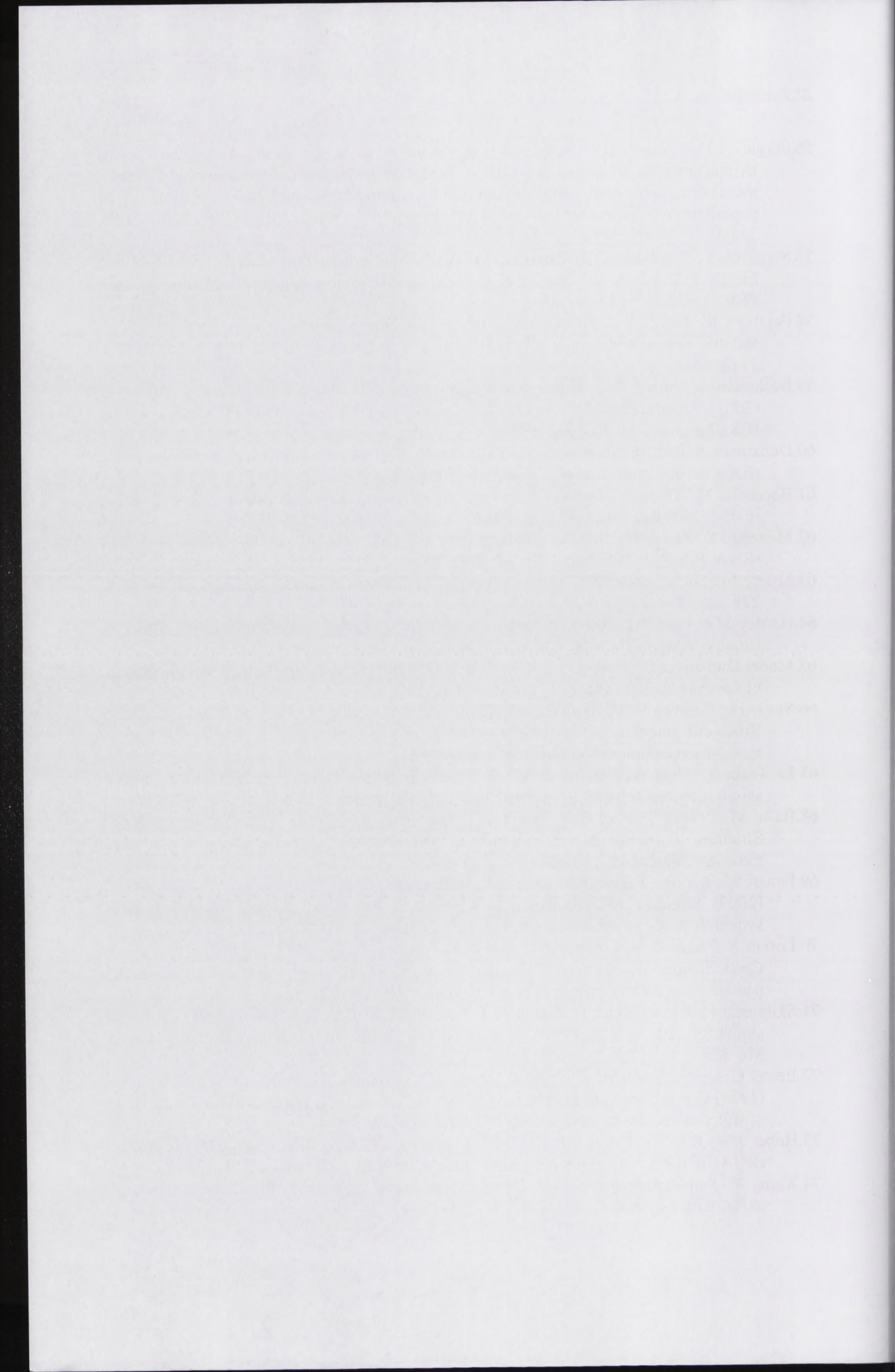
18. Kondo J, FB, Urzhumstev A., Westhof E (2005) Crystallographic studies of Homo sapiens ribosomal decoding A site complexed with aminoglycosides. *Nucleic Acids Symposium Series* 49: 253-254
19. Gabashvili IS, Agrawal RK, Spahn CM, Grassucci RA, Svergun DI, Frank J, Penczek P (2000) Solution structure of the E. coli 70S ribosome at 11.5 Å resolution. *Cell* 100: 537-549
20. Carter AP, Clemons WM, Brodersen DE, Morgan-Warren RJ, Wimberly BT, Ramakrishnan V (2000) Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature* 407: 340-348
21. Piotrowska I, Dudzińska B, Twardowski T (2002) Struktura i funkcja rybosomu prokariotycznego. *Postępy Biochemii* 48: 2-19
22. Cannone JJ, Subramanian S, Schnare MN, Collett JR, D'Souza LM, Du Y, Feng B, Lin N, Madabusi LV, Muller KM, Pande N, Shang Z, Yu N, Gutell RR (2002) The comparative RNA web (CRW) site: an online database of comparative sequence and structure information for ribosomal, intron, and other RNAs. *BMC Bioinformatics* 3: 2
23. <http://www.rcsb.org/pdb>
24. Wilson KS, Nechifor R (2004) Interactions of translational factor EF-G with the bacterial ribosome before and after mRNA translocation. *J Mol Biol* 337: 15-30
25. Valle M, Zavialov A, Li W, Stagg SM, Sengupta J, Nielsen RC, Nissen P, Harvey SC, Ehrenberg M, Frank J (2003) Incorporation of aminoacyl-tRNA into the ribosome as seen by cryo-electron microscopy. *Nat Struct Biol* 10: 899-906
26. Spahn CM, Gomez-Lorenzo MG, Grassucci RA, Jorgensen R, Andersen GR, Beckmann R, Penczek PA, Ballesta JP, Frank J (2004) Domain movements of elongation factor eEF2 and the eukaryotic 80S ribosome facilitate tRNA translocation. *Embo J* 23: 1008-1019
27. Rinke-Appel J, Junke N, Brimacombe R, Dukudovskaya S, Dontsova O, Bogdanov A (1993) Site-directed cross-linking of mRNA analogues to 16S ribosomal RNA; a complete scan of cross-links from all positions between '+1' and '+16' on the mRNA, downstream from the decoding site. *Nucleic Acids Res* 21: 2853-2859
28. Sergiev PV, Lavrik IN, Wlasoff VA, Dokudovskaya SS, Dontsova OA, Bogdanov AA, Brimacombe R (1997) The path of mRNA through the bacterial ribosome: a site-directed crosslinking study using new photoreactive derivatives of guanosine and uridine. *RNA* 3: 464-475
29. Kitahara K, Sato, N.S., Namba, N., Yokota, T., Tsujimura, T., Suzuki, T. (2006) Systematic deletion of rRNAs for investigation of ribosome architecture and function. *Nucleic Acids Symp Ser* 50: 287-288
30. Schlutzen F, Tocilj A, Zarivach R, Harms J, Gluehmann M, Janell D, Bashan A, Bartels H, Agmon I, Franceschi F, Yonath A (2000) Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 Å resolution. *Cell* 102: 615-623
31. Nilsson J, Sengupta, J., Gursky, R., Nissen, P., Frank, J. (2007) Comparison of fungal 80S ribosomes by Cryo-EM reveals diversity in structure and conformation of rRNA expansion segments. *J Mol Biol* 369: 429-438
32. Wuyts J, Van de Peer Y, Winkelmanns T, De Wachter R (2002) The European database on small subunit ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res* 30: 183-185
33. Alkemar G, Nygard O (2003) A possible tertiary rRNA interaction between expansion segments ES3 and ES6 in eukaryotic 40S ribosomal subunits. *RNA* 9: 20-24
34. Alkemar G, Nygard O (2004) Secondary structure of two regions in expansion segments ES3 and ES6 with the potential of forming a tertiary interaction in eukaryotic 40S ribosomal subunits. *RNA* 10: 403-411
35. Bąkowska-Żywicka K, Kietrys A. (2007) Molekularne podstawy biosyntezy białka - funkcja 23S rRNA. *Biotechnologia* 1: 186-196



36. Bąkowska K (2005) Funkcja wybranych fragmentów 16S rRNA małej podjednostki rybosomalnej w procesie biosyntezy białka. *Biotechnologia* 2: 206-214
37. Rinke-Appel J, Junke N, Brimacombe R, Lavrik I, Dokudovskaya S, Dontsova O, Bogdanov A (1994) Contacts between 16S ribosomal RNA and mRNA, within the spacer region separating the AUG initiator codon and the Shine-Dalgarno sequence; a site-directed cross-linking study. *Nucleic Acids Res* 22: 3018-3025
38. Osswald M, Doring T, Brimacombe R (1995) The ribosomal neighbourhood of the central fold of tRNA: cross-links from position 47 of tRNA located at the A, P or E site. *Nucleic Acids Res* 23: 4635-4641
39. Doring T, Mitchell P, Osswald M, Bochkariov D, Brimacombe R (1994) The decoding region of 16S RNA; a cross-linking study of the ribosomal A, P and E sites using tRNA derivatized at position 32 in the anticodon loop. *EMBO J* 13: 2677-2685
40. Clemons WM, Jr., May JL, Wimberly BT, McCutcheon JP, Capel MS, Ramakrishnan V (1999) Structure of a bacterial 30S ribosomal subunit at 5.5 Å resolution. *Nature* 400: 833-840
41. Valle M, Zavialov A, Sengupta J, Rawat U, Ehrenberg M, Frank J (2003) Locking and unlocking of ribosomal motions. *Cell* 114: 123-134
42. Ogle JM, Brodersen DE, Clemons WM, Jr., Tarry MJ, Carter AP, Ramakrishnan V (2001) Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science* 292: 897-902
43. Cate JH, Yusupov MM, Yusupova GZ, Earnest TN, Noller HF (1999) X-ray crystal structures of 70S ribosome functional complexes. *Science* 285: 2095-2104
44. Yusupova GZ, Yusupov MM, Cate JH, Noller HF (2001) The path of messenger RNA through the ribosome. *Cell* 106: 233-241
45. Brodersen DE, Nissen P (2005) The social life of ribosomal proteins. *Febs J* 272: 2098-2108
46. Brodersen DE, Clemons WM, Jr., Carter AP, Wimberly BT, Ramakrishnan V (2002) Crystal structure of the 30 S ribosomal subunit from *Thermus thermophilus*: structure of the proteins and their interactions with 16 S RNA. *J Mol Biol* 316: 725-768
47. Ferreira-Cerca S, Poll G, Gleizes PE, Tschochner H, Milkereit P (2005) Roles of eukaryotic ribosomal proteins in maturation and transport of pre-18S rRNA and ribosome function. *Mol Cell* 20: 263-275
48. Takyar S, Hickerson RP, Noller HF (2005) mRNA helicase activity of the ribosome. *Cell* 120: 49-58
49. Valasek L, Mathew AA, Shin BS, Nielsen KH, Szamecz B, Hinnebusch AG (2003) The yeast eIF3 subunits TIF32/a, NIP1/c, and eIF5 make critical connections with the 40S ribosome in vivo. *Genes Dev* 17: 786-799
50. Nissen P, Hansen J, Ban N, Moore PB, Steitz TA (2000) The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* 289: 920-930
51. Tenson T, Ehrenberg M (2002) Regulatory nascent peptides in the ribosomal tunnel. *Cell* 108: 591-594
52. Mitra K, Frank J (2006) Ribosome dynamics: insights from atomic structure modeling into cryo-electron microscopy maps. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 35: 299-317
53. Szymanski M, Barciszewska MZ, Erdmann VA, Barciszewski J (2003) 5 S rRNA: structure and interactions. *Biochem J* 371: 641-651
54. Mankin AS (2006) Nascent peptide in the "birth canal" of the ribosome. *Trends Biochem Sci* 31: 11-13
55. Klein DJ, Moore PB, Steitz TA (2004) The roles of ribosomal proteins in the structure assembly, and evolution of the large ribosomal subunit. *J Mol Biol* 340: 141-177



56. Sergiev PV, Lesnyak DV, Burakovskiy DE, Kiparisov SV, Leonov AA, Bogdanov AA, Brimacombe R, Dontsova OA (2005) Alteration in location of a conserved GTPase-associated center of the ribosome induced by mutagenesis influences the structure of peptidyltransferase center and activity of elongation factor G. *J Biol Chem* 280: 31882-31889
57. Sergiev PV, Bogdanov AA, Dontsova OA (2005) How can elongation factors EF-G and EF-Tu discriminate the functional state of the ribosome using the same binding site? *FEBS Lett* 579: 5439-5442
58. Feinberg JS, Joseph S (2001) Identification of molecular interactions between P-site tRNA and the ribosome essential for translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 11120-11125
59. Beckmann R, Spahn CM, Eswar N, Helters J, Penczek PA, Sali A, Frank J, Blobel G (2001) Architecture of the protein-conducting channel associated with the translating 80S ribosome. *Cell* 107: 361-372
60. Dudzinska-Bajorek B, Bakowska K, Twardowski T (2006) Conformational changes of L-rRNA during elongation of polypeptide. *J Plant Physiol* 163: 463-474
61. Bocchetta M, Xiong L, Mankin S. (1998) 23S rRNA positions essential for tRNA binding in ribosomal functional sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3525-3530
62. Moazed D NH (1991) Sites of interaction of the CCA end of peptidyl-tRNA with 23S rRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 3725-3728
63. Moore PB, Steitz TA (2002) The involvement of RNA in ribosome function. *Nature* 418: 229-235
64. Hartley MR, Lord JM (2004) Cytotoxic ribosome-inactivating lectins from plants. *Biochim Biophys Acta* 1701: 1-14
65. Madej-Dudzińska B, Nawrot, M., Twardowski, T. (2000) Structure of alpha-sarcosine domain of *Lupinus luteus*. *J Plant Physiol* 156: 567-569
66. Stark H, Rodnina MV, Wieden HJ, Zemlin F, Wintermeyer W, van Heel M (2002) Ribosome interactions of aminoacyl-tRNA and elongation factor Tu in the codon-recognition complex. *Nat Struct Biol* 9: 849-854
67. La Teana A, Gualerzi CO, Dahlberg AE (2001) Initiation factor IF 2 binds to the alpha-sarcosine loop and helix 89 of *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA. *RNA* 7: 1173-1179
68. Halic M, Becker T, Pool MR, Spahn CM, Grassucci RA, Frank J, Beckmann R (2004) Structure of the signal recognition particle interacting with the elongation-arrested ribosome. *Nature* 427: 808-814
69. Funari SS, Rapp G, Perbandt M, Dierks K, Vallazza M, Betzel C, Erdmann VA, Svergun DI (2000) Structure of free *Thermus flavus* 5 S rRNA at 1.3 nm resolution from synchrotron X-ray solution scattering. *J Biol Chem* 275: 31283-31288
70. Lorenz S, Perbandt M, Lippmann C, Moore K, DeLucas LJ, Betzel C, Erdmann VA (2000) Crystallization of engineered *Thermus flavus* 5S rRNA under earth and microgravity conditions. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56: 498-500
71. Skibinska L, Banachowicz E, Gapinski J, Patkowski A, Barciszewski J (2004) Structural similarity of *E. coli* 5S rRNA in solution and within the ribosome. *Biopolymers* 73: 316-325
72. Betzel C, Lorenz S, Furste JP, Bald R, Zhang M, Schneider TR, Wilson KS, Erdmann VA (1994) Crystal structure of domain A of *Thermus flavus* 5S rRNA and the contribution of water molecules to its structure. *FEBS Lett* 351: 159-164
73. Huber PW, Rife JP, Moore PB (2001) The structure of helix III in *Xenopus* oocyte 5 S rRNA: an RNA stem containing a two-nucleotide bulge. *J Mol Biol* 312: 823-832
74. Xiong Y, Sundaralingam M (2000) Two crystal forms of helix II of *Xenopus laevis* 5S rRNA with a cytosine bulge. *RNA* 6: 1316-1324



75. Vallazza M, Banumathi S, Perbandt M, Moore K, DeLucas L, Betzel C, Erdmann VA (2002) Crystallization and structure analysis of *Thermus flavus* 5S rRNA helix B. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 58: 1700-1703
76. Harms J, Schluenzen F, Zarivach R, Bashan A, Gat S, Agmon I, Bartels H, Franceschi F, Yonath A (2001) High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium. *Cell* 107: 679-688
77. Kiparisov S, Petrov A, Meskauskas A, Sergiev PV, Dontsova OA, Dinman JD (2005) Structural and functional analysis of 5S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics* 274: 235-247
78. Smith MW, Meskauskas A, Wang P, Sergiev PV, Dinman JD (2001) Saturation mutagenesis of 5S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 21: 8264-8275
79. Ammons D, Rampersad J (2001) An *E. coli* 5S rRNA deletion mutant useful for the study of 5S rRNA structure/function relationships. *Curr Microbiol* 43: 89-92
80. Barciszewska MZ, Wyszko E, Bald R, Erdmann VA, Barciszewski J (2003) 5S rRNA is a leadzyme. A molecular basis for lead toxicity. *J Biochem (Tokyo)* 133: 309-315
81. Scripture JB, Huber PW (1995) Analysis of the binding of *Xenopus* ribosomal protein L5 to oocyte 5S rRNA. The major determinants of recognition are located in helix III-loop C. *J Biol Chem* 270: 27358-27365
82. Perederina A, Nevskaya N, Nikonov O, Nikulin A, Dumas P, Yao M, Tanaka I, Garber M, Gongadze G, Nikonov S (2002) Detailed analysis of RNA-protein interactions within the bacterial ribosomal protein L5/5S rRNA complex. *Rna* 8: 1548-1557
83. Romaniuk PJ, de Stevenson IL, Ehresmann C, Romby P, Ehresmann B (1988) A comparison of the solution structures and conformational properties of the somatic and oocyte 5S rRNAs of *Xenopus laevis*. *Nucleic Acids Res* 16: 2295-2312
84. Perbandt M, Vallazza M, Lippmann C, Betzel C, Erdmann VA (2001) Structure of an RNA duplex with an unusual G.C pair in wobble-like conformation at 1.6 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57: 219-224
85. Szymanski M, Barciszewska MZ, Erdmann VA, Barciszewski J (2000) An analysis of G-U base pair occurrence in eukaryotic 5S rRNAs. *Mol Biol Evol* 17: 1194-1198
86. Perbandt M, Nolte A, Lorenz S, Bald R, Betzel C, Erdmann VA (1998) Crystal structure of domain E of *Thermus flavus* 5S rRNA: a helical RNA structure including a hairpin loop. *FEBS Lett* 429: 211-215
87. Lu M, Steitz TA (2000) Structure of *Escherichia coli* ribosomal protein L25 complexed with a 5S rRNA fragment at 1.8-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 2023-2028
88. Correll CC, Freeborn B, Moore PB, Steitz TA (1997) Metals, motifs, and recognition in the crystal structure of a 5S rRNA domain. *Cell* 91: 705-712
89. Dallas A, Moore PB (1997) The loop E-loop D region of *Escherichia coli* 5S rRNA: the solution structure reveals an unusual loop that may be important for binding ribosomal proteins. *Structure* 5: 1639-1653
90. Correll CC, Munishkin A, Chan YL, Ren Z, Wool IG, Steitz TA (1998) Crystal structure of the ribosomal RNA domain essential for binding elongation factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 13436-13441
91. Correll CC, Wool IG, Munishkin A (1999) The two faces of the *Escherichia coli* 23S rRNA sarcin/ricin domain: the structure at 1.11 Å resolution. *J Mol Biol* 292: 275-287
92. Szewczak AA, Moore PB (1995) The sarcin/ricin loop, a modular RNA. *J Mol Biol* 247: 81-98
93. Tchorzewski M, Boldyreff B, Issinger O, Grankowski N (2000) Analysis of the protein-protein interactions between the human acidic ribosomal P-proteins: evaluation by the two hybrid system. *Int J Biochem Cell Biol* 32: 737-746



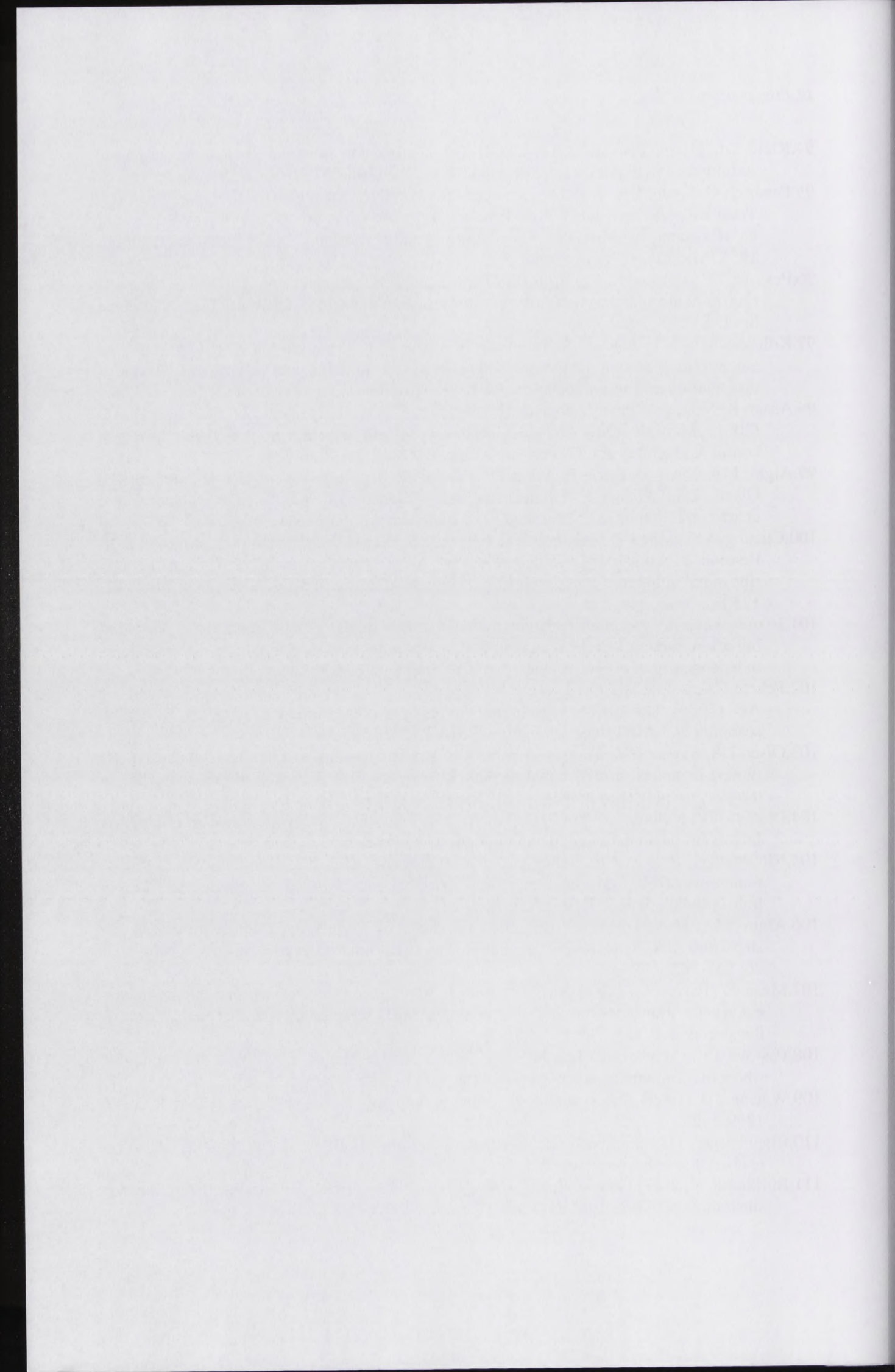
The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that every entry should be supported by a valid receipt or invoice. This ensures transparency and allows for easy verification of the data.

In the second section, the author outlines the various methods used to collect and analyze the data. This includes both primary and secondary data collection techniques. The analysis focuses on identifying trends and patterns over time, which is crucial for making informed decisions.

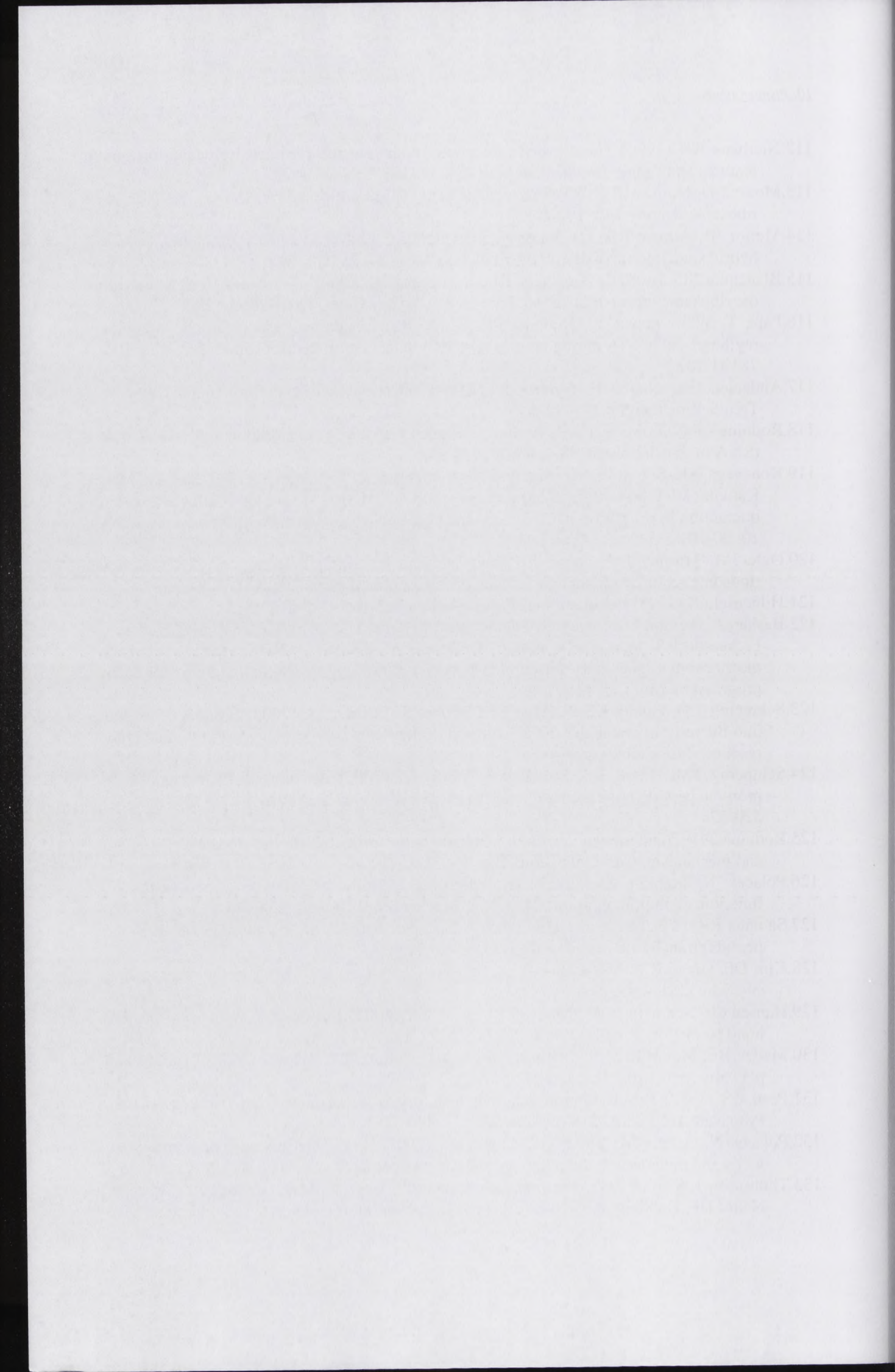
The third part of the report details the challenges encountered during the data collection process. These include issues related to data quality, such as missing values and inconsistencies. The author provides strategies to address these challenges, such as data cleaning and validation procedures.

Finally, the document concludes with a summary of the findings and recommendations. It highlights the key insights gained from the analysis and suggests areas for future research. The author stresses the need for continuous monitoring and evaluation to ensure the long-term success of the project.

94. Klein DJ, Moore PB, Steitz TA (2004) The contribution of metal ions to the structural stability of the large ribosomal subunit. *RNA* 10: 1366-1379
95. Diedrich G, Spahn CM, Stelzl U, Schafer MA, Wooten T, Bochkariov DE, Cooperman BS, Traut RR, Nierhaus KH (2000) Ribosomal protein L2 is involved in the association of the ribosomal subunits, tRNA binding to A and P sites and peptidyl transfer. *EMBO J* 19: 5241-5250
96. Pestova TV, Kolupaeva VG, Lomakin IB, Pilipenko EV, Shatsky IN, Agol VI, Hellen CU (2001) Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 7029-7036
97. Kolupaeva VG, Unbehaun A, Lomakin IB, Hellen CU, Pestova TV (2005) Binding of eukaryotic initiation factor 3 to ribosomal 40S subunits and its role in ribosomal dissociation and anti-association. *RNA* 11: 470-486
98. Asano K, Shalev A, Phan L, Nielsen K, Clayton J, Valasek L, Donahue TF, Hinnebusch AG (2001) Multiple roles for the C-terminal domain of eIF5 in translation initiation complex assembly and GTPase activation. *EMBO J* 20: 2326-2337
99. Algire MA, Maag D, Savio P, Acker MG, Tarun SZ, Jr., Sachs AB, Asano K, Nielsen KH, Olsen DS, Phan L, Hinnebusch AG, Lorsch JR (2002) Development and characterization of a reconstituted yeast translation initiation system. *RNA* 8: 382-397
100. Cheung YN, Maag D, Mitchell SF, Fekete CA, Algire MA, Takacs JE, Shirokikh N, Pestova T, Lorsch JR, Hinnebusch AG (2007) Dissociation of eIF1 from the 40S ribosomal subunit is a key step in start codon selection in vivo. *Genes Dev* 21: 1217-1230
101. Jivotovskaya AV, Valasek L, Hinnebusch AG, Nielsen KH (2006) Eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF3) and eIF2 can promote mRNA binding to 40S subunits independently of eIF4G in yeast. *Mol Cell Biol* 26: 1355-1372
102. Fekete CA, Applefield DJ, Blakely SA, Shirokikh N, Pestova T, Lorsch JR, Hinnebusch AG (2005) The eIF1A C-terminal domain promotes initiation complex assembly, scanning and AUG selection in vivo. *EMBO J* 24: 3588-3601
103. Olsen DS, Savner EM, Mathew A, Zhang F, Krishnamoorthy T, Phan L, Hinnebusch AG (2003) Domains of eIF1A that mediate binding to eIF2, eIF3 and eIF5B and promote ternary complex recruitment in vivo. *EMBO J* 22: 193-204
104. Pestova TV, Kolupaeva VG (2002) The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. *Genes Dev* 16: 2906-2922
105. Nielsen KH, Szamecz B, Valasek L, Jivotovskaya A, Shin BS, Hinnebusch AG (2004) Functions of eIF3 downstream of 48S assembly impact AUG recognition and GCN4 translational control. *EMBO J* 23: 1166-1177
106. Algire MA, Maag D, Lorsch JR (2005) Pi release from eIF2, not GTP hydrolysis, is the step controlled by start-site selection during eukaryotic translation initiation. *Mol Cell* 20: 251-262
107. Maag D, Fekete CA, Gryczynski Z, Lorsch JR (2005) A conformational change in the eukaryotic translation preinitiation complex and release of eIF1 signal recognition of the start codon. *Mol Cell* 17: 265-275
108. Pestova TV, Lomakin IB, Lee JH, Choi SK, Dever TE, Hellen CU (2000) The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B. *Nature* 403: 332-335
109. Watson JD (1965) The synthesis of proteins upon ribosomes. *Bull Soc Chim Biol* 46: 1399-1425
110. Rheinberger HJ, Sternbach H, Nierhaus KH (1981) Three tRNA binding sites on *Escherichia coli* ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 5310-5314
111. Burkhardt N, Junemann R, Spahn CM, Nierhaus KH (1998) Ribosomal tRNA binding sites: three-site models of translation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 33: 95-149



112. Nierhaus KH (1990) The allosteric three-site model for the ribosomal elongation cycle: features and future. *Biochemistry* 29: 4997-5008
113. Moazed D, Noller HF (1989) Intermediate states in the movement of transfer RNA in the ribosome. *Nature* 342: 142-148
114. Munro JB, Altman RB, O'Connor N, Blanchard SC (2007) Identification of two distinct hybrid state intermediates on the ribosome. *Mol Cell* 25: 505-517
115. Blanchard SC, Kim HD, Gonzalez RL, Jr., Puglisi JD, Chu S (2004) tRNA dynamics on the ribosome during translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 12893-12898
116. Pape T, Wintermeyer W, Rodnina MV (2000) Conformational switch in the decoding region of 16S rRNA during aminoacyl-tRNA selection on the ribosome. *Nat Struct Biol* 7: 104-107
117. Andersen GR, Nissen P, Nyborg J (2003) Elongation factors in protein biosynthesis. *Trends Biochem Sci* 28: 434-441
118. Rodnina MV, Gromadski KB, Kothe U, Wieden HJ (2005) Recognition and selection of tRNA in translation. *FEBS Lett* 579: 938-942
119. Konevega AL, Soboleva NG, Makhno VI, Semenov YP, Wintermeyer W, Rodnina MV, Katunin VI (2004) Purine bases at position 37 of tRNA stabilize codon-anticodon interaction in the ribosomal A site by stacking and Mg<sup>2+</sup>-dependent interactions. *RNA* 10: 90-101
120. Ogle JM, Murphy FV, Tarry MJ, Ramakrishnan V (2002) Selection of tRNA by the ribosome requires a transition from an open to a closed form. *Cell* 111: 721-732
121. Hilgenfeld R (1995) Regulatory GTPases. *Curr Opin Struct Biol* 5: 810-817
122. Bashan A, Agmon I, Zarivach R, Schlutzen F, Harms J, Berisio R, Bartels H, Franceschi F, Auerbach T, Hansen HA, Kossoy E, Kessler M, Yonath A (2003) Structural basis of the ribosomal machinery for peptide bond formation, translocation, and nascent chain progression. *Mol Cell* 11: 91-102
123. Schmeing TM, Huang KS, Kitchen DE, Strobel SA, Steitz TA (2005) Structural insights into the roles of water and the 2' hydroxyl of the P site tRNA in the peptidyl transferase reaction. *Mol Cell* 20: 437-448
124. Schmeing TM, Huang KS, Strobel SA, Steitz TA (2005) An induced-fit mechanism to promote peptide bond formation and exclude hydrolysis of peptidyl-tRNA. *Nature* 438: 520-524
125. Rodnina MV, Wintermeyer W (2003) Peptide bond formation on the ribosome: structure and mechanism. *Curr Opin Struct Biol* 13: 334-340
126. Polacek N, Mankin AS (2005) The ribosomal peptidyl transferase center: structure, function, evolution, inhibition. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 40: 285-311
127. Samaha RR, Green R, Noller HF (1995) A base pair between tRNA and 23S rRNA in the peptidyl transferase centre of the ribosome. *Nature* 377: 309-314
128. Kim DF, Green R (1999) Base-pairing between 23S rRNA and tRNA in the ribosomal A site. *Mol Cell* 4: 859-864
129. Hansen JL, Schmeing TM, Moore PB, Steitz TA (2002) Structural insights into peptide bond formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 11670-11675
130. Maden BE, Monro RE (1968) Ribosome-catalyzed peptidyl transfer. Effects of cations and pH value. *Eur J Biochem* 6: 309-316
131. Pestka S (1972) Peptidyl-puromycin synthesis on polyribosomes from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69: 624-628
132. Polacek N, Gaynor M, Yassin A, Mankin AS (2001) Ribosomal peptidyl transferase can withstand mutations at the putative catalytic nucleotide. *Nature* 411: 498-501
133. Thompson J, Kim DF, O'Connor M, Lieberman KR, Bayfield MA, Gregory ST, Green R, Noller HF, Dahlberg AE (2001) Analysis of mutations at residues A2451 and G2447 of



- 23S rRNA in the peptidyltransferase active site of the 50S ribosomal subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 9002-9007
134. Erlacher MD, Lang K, Shankaran N, Wotzel B, Huttenhofer A, Micura R, Mankin AS, Polacek N (2005) Chemical engineering of the peptidyl transferase center reveals an important role of the 2'-hydroxyl group of A2451. *Nucleic Acids Res* 33: 1618-1627
135. Beringer M, Bruell C, Xiong L, Pfister P, Bieling P, Katunin VI, Mankin AS, Bottger EC, Rodnina MV (2005) Essential mechanisms in the catalysis of peptide bond formation on the ribosome. *J Biol Chem* 280: 36065-36072
136. Sievers A, Beringer M, Rodnina MV, Wolfenden R (2004) The ribosome as an entropy trap. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 7897-7901
137. Erlacher MD, Lang K, Wotzel B, Rieder R, Micura R, Polacek N (2006) Efficient ribosomal peptidyl transfer critically relies on the presence of the ribose 2'-OH at A2451 of 23S rRNA. *J Am Chem Soc* 128: 4453-4459
138. Weinger JS, Strobel SA (2007) Exploring the mechanism of protein synthesis with modified substrates and novel intermediate mimics. *Blood Cells Mol Dis* 38: 110-116
139. Weinger JS, Strobel SA (2006) Participation of the tRNA A76 hydroxyl groups throughout translation. *Biochemistry* 45: 5939-5948
140. Weinger JS, Parnell KM, Dorner S, Green R, Strobel SA (2004) Substrate-assisted catalysis of peptide bond formation by the ribosome. *Nat Struct Mol Biol* 11: 1101-1106
141. Steitz TA (2005) On the structural basis of peptide-bond formation and antibiotic resistance from atomic structures of the large ribosomal subunit. *FEBS Lett* 579: 955-958
142. Trobro S, Aqvist J (2006) Analysis of predictions for the catalytic mechanism of ribosomal peptidyl transfer. *Biochemistry* 45: 7049-7056
143. Trobro S, Aqvist J (2005) Mechanism of peptide bond synthesis on the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 12395-12400
144. McGarry KG, Walker SE, Wang H, Fredrick K (2005) Destabilization of the P site codon-anticodon helix results from movement of tRNA into the P/E hybrid state within the ribosome. *Mol Cell* 20: 613-622
145. Frank J, Agrawal RK (2000) A ratchet-like inter-subunit reorganization of the ribosome during translocation. *Nature* 406: 318-322
146. Noller HF, Yusupov MM, Yusupova GZ, Baucom A, Cate JH (2002) Translocation of tRNA during protein synthesis. *FEBS Lett* 514: 11-16
147. Nechifor R, Wilson KS (2007) Crosslinking of translation factor EF-G to proteins of the bacterial ribosome before and after translocation. *J Mol Biol* 368: 1412-1425
148. Connell SR, Takemoto C, Wilson DN, Wang H, Murayama K, Terada T, Shirouzu M, Rost M, Schuler M, Giesebrecht J, Dabrowski M, Mielke T, Fucini P, Yokoyama S, Spahn CM (2007) Structural basis for interaction of the ribosome with the switch regions of GTP-bound elongation factors. *Mol Cell* 25: 751-764
149. Stark H, Rodnina MV, Wieden HJ, van Heel M, Wintermeyer W (2000) Large-scale movement of elongation factor G and extensive conformational change of the ribosome during translocation. *Cell* 100: 301-309
150. Jorgensen R, Ortiz PA, Carr-Schmid A, Nissen P, Kinzy TG, Andersen GR (2003) Two crystal structures demonstrate large conformational changes in the eukaryotic ribosomal translocase. *Nat Struct Biol* 10: 379-385
151. Gomez-Lorenzo MG, Spahn CM, Agrawal RK, Grassucci RA, Penczek P, Chakraborty K, Ballesta JP, Lavandera JL, Garcia-Bustos JF, Frank J (2000) Three-dimensional cryo-electron microscopy localization of EF2 in the *Saccharomyces cerevisiae* 80S ribosome at 17.5 Å resolution. *EMBO J* 19: 2710-2718

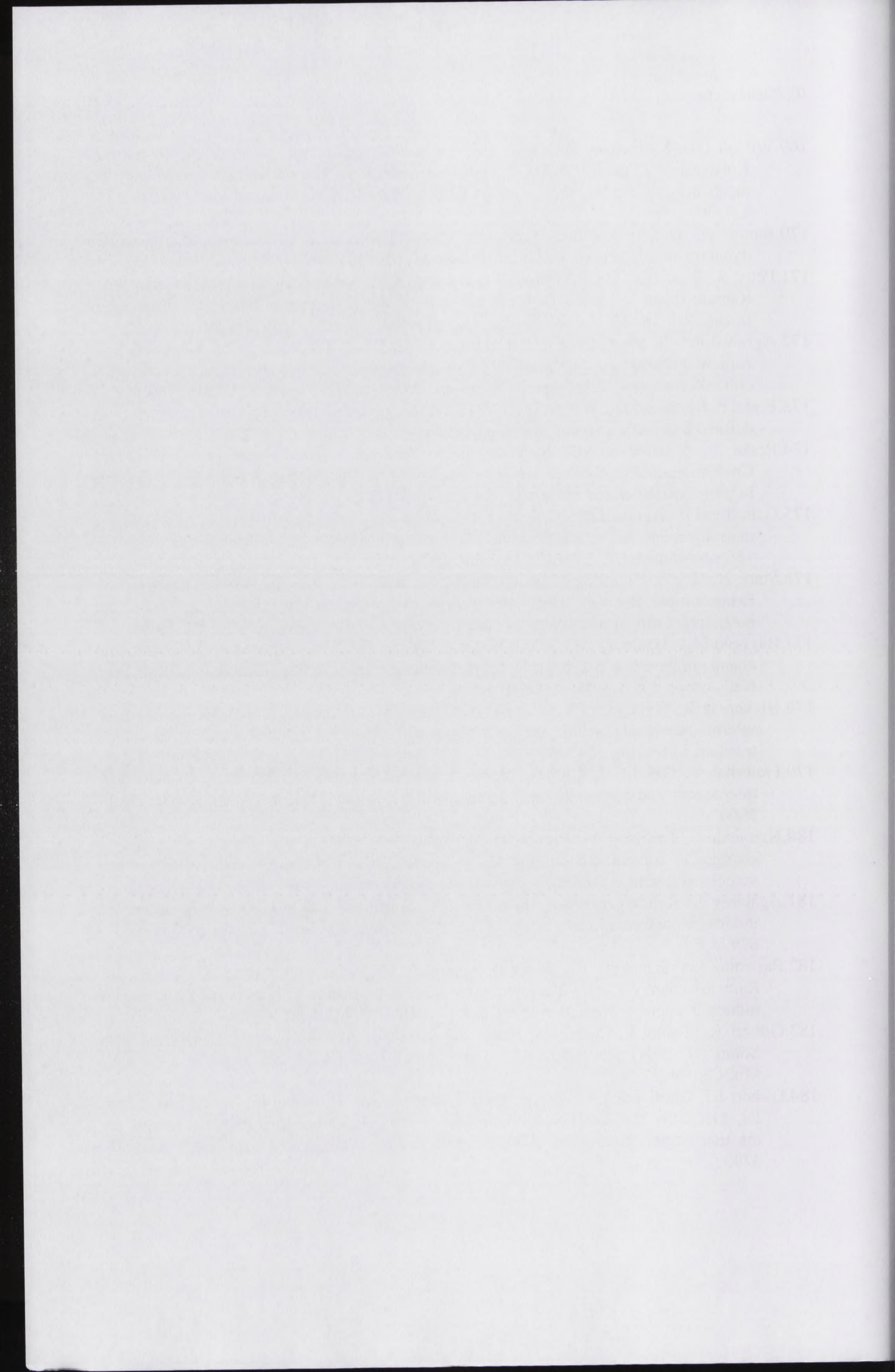
- 128 RNA in the polyribosomes during the 20S ribosomal subunit from rat liver. *J Biol Chem* 268: 1000-1005
- 129 M. Kozlov, E. Kozlov, N. Wood, B. Matuszewska, A. Miron, R. Martin, A. S. Piaty, J. (2007) Chemical synthesis of the peptide ribosome entry tunnel in the 20S ribosomal subunit of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 35: 1618-1627
- 130 M. Kozlov, M. Kozlov, C. Kozlov, J. Piaty, Y. Bering, E. Kozlov, V. Martin, A. S. Piaty, J. (2007) Chemical synthesis of the catalytic head formation on the ribosome. *J Biol Chem* 282: 3667-3675
- 131 M. Kozlov, A. Piaty, M. Kozlov, N. Wood, B. Matuszewska, R. Martin, A. S. Piaty, J. (2007) The ribosome as an enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 7907-7911
- 132 M. Kozlov, E. Kozlov, R. Martin, R. Kozlov, R. Kozlov, N. Wood, B. Matuszewska, A. S. Piaty, J. (2007) Chemical synthesis of the 20S ribosomal subunit in the presence of the 30S subunit. *J Biol Chem* 282: 4457-4465
- 133 M. Kozlov, J. Piaty, J. (2007) Improving the mechanism of protein synthesis with modified substrates and novel ribosome mimics. *Biochim Biophys Acta* 1774: 110-115
- 134 M. Kozlov, J. Piaty, J. (2007) Pathways of the RNA A70 hybrid group throughout translation. *Biochemistry* 46: 7890-7894
- 135 M. Kozlov, J. Piaty, J. (2007) Chemical synthesis of the 20S ribosomal subunit. *Biochim Biophys Acta* 1774: 110-115
- 136 M. Kozlov, J. Piaty, J. (2007) The structure of the peptide head formation and antibiotic resistance from atomic resolution of the large ribosomal subunit. *Biochim Biophys Acta* 1774: 110-115
- 137 M. Kozlov, J. Piaty, J. (2007) Analysis of pathways for the catalytic mechanism of ribosomal peptide synthesis. *Biochemistry* 46: 7890-7894
- 138 M. Kozlov, J. Piaty, J. (2007) Chemical synthesis of the peptide head formation on the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 7907-7911
- 139 M. Kozlov, J. Piaty, J. (2007) Distribution of the P site codon-anticodon base pairs from movement of tRNA into the E site during the ribosome. *Biochim Biophys Acta* 1774: 110-115
- 140 M. Kozlov, J. Piaty, J. (2007) A model for the inter-subunit reorganization of the ribosome during translation. *Nature* 450: 514-522
- 141 M. Kozlov, J. Piaty, J. (2007) Translation of RNA during protein synthesis. *FEBS Lett* 578: 11-15
- 142 M. Kozlov, J. Piaty, J. (2007) Kinetics of translation factor EF-C in presence of the ribosome. *Biochim Biophys Acta* 1774: 110-115
- 143 M. Kozlov, J. Piaty, J. (2007) Kinetics of translation factor EF-C in presence of the ribosome. *Biochim Biophys Acta* 1774: 110-115
- 144 M. Kozlov, J. Piaty, J. (2007) Kinetics of translation factor EF-C in presence of the ribosome. *Biochim Biophys Acta* 1774: 110-115
- 145 M. Kozlov, J. Piaty, J. (2007) Kinetics of translation factor EF-C in presence of the ribosome. *Biochim Biophys Acta* 1774: 110-115
- 146 M. Kozlov, J. Piaty, J. (2007) Kinetics of translation factor EF-C in presence of the ribosome. *Biochim Biophys Acta* 1774: 110-115
- 147 M. Kozlov, J. Piaty, J. (2007) Kinetics of translation factor EF-C in presence of the ribosome. *Biochim Biophys Acta* 1774: 110-115
- 148 M. Kozlov, J. Piaty, J. (2007) Kinetics of translation factor EF-C in presence of the ribosome. *Biochim Biophys Acta* 1774: 110-115
- 149 M. Kozlov, J. Piaty, J. (2007) Kinetics of translation factor EF-C in presence of the ribosome. *Biochim Biophys Acta* 1774: 110-115
- 150 M. Kozlov, J. Piaty, J. (2007) Kinetics of translation factor EF-C in presence of the ribosome. *Biochim Biophys Acta* 1774: 110-115
- 151 M. Kozlov, J. Piaty, J. (2007) Kinetics of translation factor EF-C in presence of the ribosome. *Biochim Biophys Acta* 1774: 110-115
- 152 M. Kozlov, J. Piaty, J. (2007) Kinetics of translation factor EF-C in presence of the ribosome. *Biochim Biophys Acta* 1774: 110-115

152. Agrawal RK, Spahn CM, Penczek P, Grassucci RA, Nierhaus KH, Frank J (2000) Visualization of tRNA movements on the Escherichia coli 70S ribosome during the elongation cycle. *J Cell Biol* 150: 447-460
153. Song H, Mugnier P, Das AK, Webb HM, Evans DR, Tuite MF, Hemmings BA, Barford D (2000) The crystal structure of human eukaryotic release factor eRF1--mechanism of stop codon recognition and peptidyl-tRNA hydrolysis. *Cell* 100: 311-321
154. Tate WP, Brown CM (1992) Translational termination: "stop" for protein synthesis or "pause" for regulation of gene expression. *Biochemistry* 31: 2443-2450
155. Connell S, Nierhaus K (2000) Translational termination not yet at its end. *ChemBiochem* 1: 250-253
156. Scarlett DJ, McCaughan KK, Wilson DN, Tate WP (2003) Mapping functionally important motifs SPF and GGQ of the decoding release factor RF2 to the Escherichia coli ribosome by hydroxyl radical footprinting. Implications for macromolecular mimicry and structural changes in RF2. *J Biol Chem* 278: 15095-15104
157. Frolova LY, Tsivkovskii RY, Sivolobova GF, Oparina NY, Serpinsky OI, Blinov VM, Tatkov SI, Kisselev LL (1999) Mutations in the highly conserved GGQ motif of class 1 polypeptide release factors abolish ability of human eRF1 to trigger peptidyl-tRNA hydrolysis. *RNA* 5: 1014-1020
158. Rawat UB, Zavialov AV, Sengupta J, Valle M, Grassucci RA, Linde J, Vestergaard B, Ehrenberg M, Frank J (2003) A cryo-electron microscopic study of ribosome-bound termination factor RF2. *Nature* 421: 87-90
159. Klaholz BP, Myasnikov AG, Van Heel M (2004) Visualization of release factor 3 on the ribosome during termination of protein synthesis. *Nature* 427: 862-865
160. Mora L, Zavialov A, Ehrenberg M, Buckingham RH (2003) Stop codon recognition and interactions with peptide release factor RF3 of truncated and chimeric RF1 and RF2 from Escherichia coli. *Mol Microbiol* 50: 1467-1476
161. Zavialov AV, Mora L, Buckingham RH, Ehrenberg M (2002) Release of peptide promoted by the GGQ motif of class 1 release factors regulates the GTPase activity of RF3. *Mol Cell* 10: 789-798
162. Vestergaard B, Van LB, Andersen GR, Nyborg J, Buckingham RH, Kjeldgaard M (2001) Bacterial polypeptide release factor RF2 is structurally distinct from eukaryotic eRF1. *Mol Cell* 8: 1375-1382
163. Seit Nebi A, Frolova L, Ivanova N, Poltarau A, Kiselev L (2000) Mutation of a glutamine residue in the universal tripeptide GGQ in human eRF1 termination factor does not cause complete loss of its activity. *Mol Biol (Mosk)* 34: 899-900
164. Seit-Nebi A, Frolova L, Justesen J, Kisselev L (2001) Class-1 translation termination factors: invariant GGQ minidomain is essential for release activity and ribosome binding but not for stop codon recognition. *Nucleic Acids Res* 29: 3982-3987
165. Polacek N, Gomez MJ, Ito K, Xiong L, Nakamura Y, Mankin A (2003) The critical role of the universally conserved A2602 of 23S ribosomal RNA in the release of the nascent peptide during translation termination. *Mol Cell* 11: 103-112
166. Youngman EM, Brunelle JL, Kochaniak AB, Green R (2004) The active site of the ribosome is composed of two layers of conserved nucleotides with distinct roles in peptide bond formation and peptide release. *Cell* 117: 589-599
167. Amort M, Wotzel B., Bakowska-Zywicka K., Erlacher M.D., Micura R., Polacek N. (2007) An intact ribose moiety at A2602 of 23S rRNA is key to trigger peptidyl-tRNA hydrolysis during translation termination. *Nucleic Acids Research* in press:
168. Schmeing TM, Seila AC, Hansen JL, Freeborn B, Soukup JK, Scaringe SA, Strobel SA, Moore PB, Steitz TA (2002) A pre-translocational intermediate in protein synthesis observed in crystals of enzymatically active 50S subunits. *Nat Struct Biol* 9: 225-230

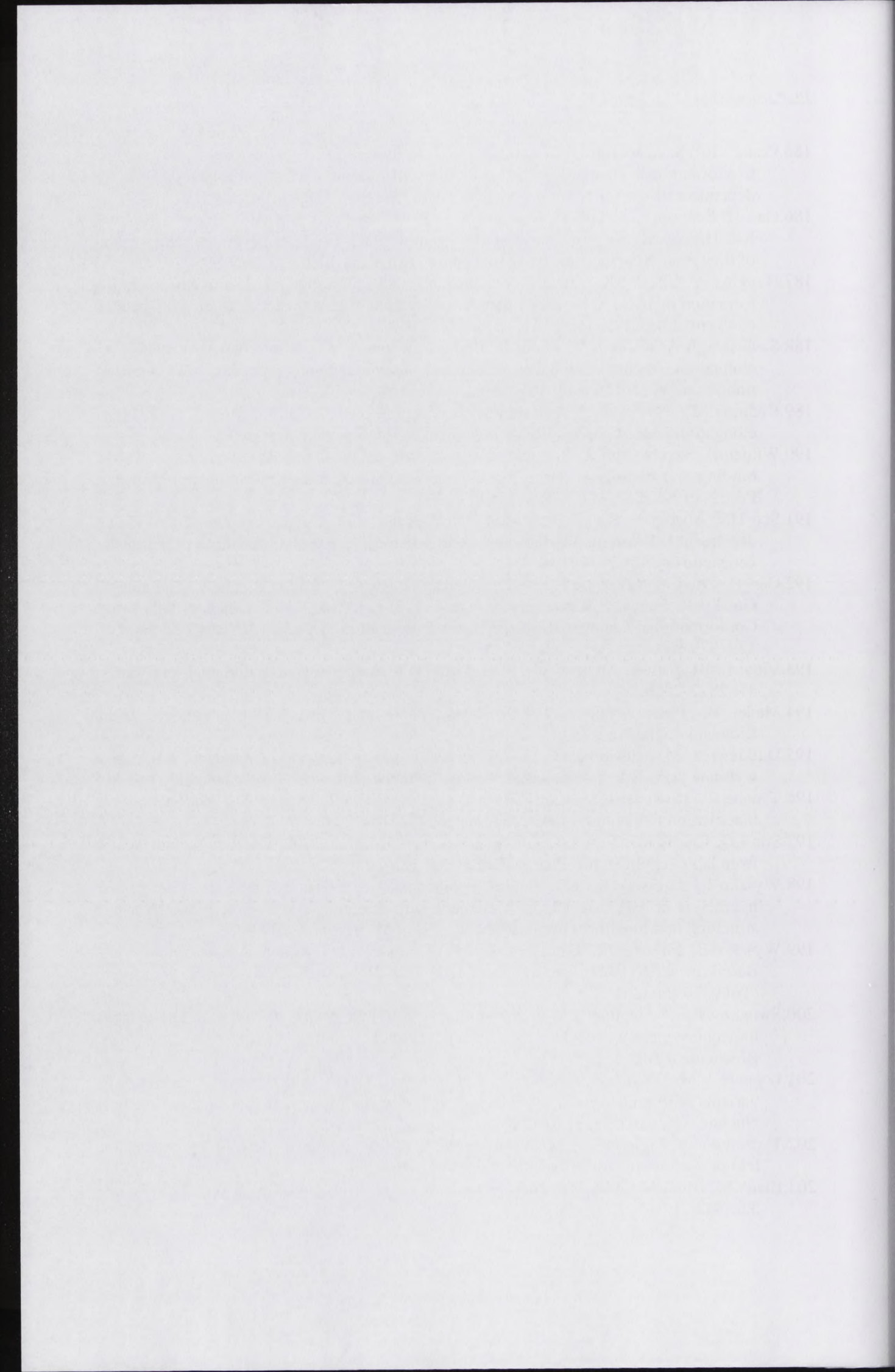


152. Agnew BK, Spein CM, Parnes P, Gussack RA, Nielsen KM, Frank J (2000) Visualization of RNA movement on the Escherichia coli 70S ribosome during the elongation cycle. *J Cell Biol* 150:447-460
153. Song H, Morgan F, Gu AK, Wilson HM, Evans DR, Fain MF, Hamming BA, Bartford D (2000) The crystal structure of bovine eukaryotic release factor eRF1-mechanism of stop codon recognition and poly(A)-RNA hydrolysis. *Cell* 100:311-321
154. Tate WP, Brown CM (1992) Translational termination: "stop" for protein synthesis or "pause" for regulation of gene expression. *Biochemistry* 31:2443-2450
155. Carroll S, Nielsen K (2000) Translational termination not yet at its end. *Chromosome* 1:250-257
156. Sontest DJ, McCaughan KK, Wilson DR, Tate WP (2001) Mapping functionally important motifs 575 and 600 of the eukaryotic release factor eRF1 to the Escherichia coli ribosome by hydroxy radical footprinting: implications for molecular mimicry and structural changes in eRF1. *J Biol Chem* 276:13092-13104
157. Polozov IY, Tarakanov NY, Zivoborova OG, Opina NY, Serebryak OI, Blinov VM, Tatarov EI, Kiselev LI (1999) Motions in the highly conserved GGG motif of class I eukaryotic release factors abolish activity of human eRF1 to trigger poly(A)-RNA hydrolysis. *RNA* 5:1014-1020
158. Kawa TB, Kavator AV, Serebryak I, Valle M, Gussack RA, Lindt J, Vesterlund B, Eberhard M, Frank J (2001) A cryo-electron microscopic study of ribosome-bound eukaryotic eRF1. *Nature* 411:87-90
159. Gajda EP, Serebryak AV, Van Hest M (2000) Visualization of release factor 1 on the ribosome during termination of protein synthesis. *Nature* 407:862-867
160. Kawa J, Kavator A, Eberhard M, Eberhard RH (2001) Stop codon recognition and interactions with eukaryotic release factor eRF1 of conserved and dynamic eRF1 and eRF2 from Escherichia coli. *Mol Microbiol* 38:1467-1475
161. Kavator AV, Kawa J, Eberhard RH, Eberhard M (2002) Release of peptide produced by the GGG motif of class I release factors requires the GTPase activity of eRF1. *Mol Cell* 10:789-798
162. Vesterlund B, Van LB, Anderson GR, Wyoff J, Eberhard RH, Eberhard M (2001) Eukaryotic poly(A) release factor eRF2 is structurally distinct from eukaryotic eRF1. *Mol Cell* 8:1372-1382
163. Serebryak I, Polozov I, Parnes P, Kiselev LI (2001) Mutation of a glutamine residue in the universal eRF1 GGG in human eRF1 termination factor does not cause complete loss of its activity. *Mol Biol (Moscow)* 34:299-300
164. Serebryak I, Polozov I, Kiselev LI (2001) Class I eukaryotic release factor and ribosome binding are not for stop codon recognition. *Nucleic Acids Res* 29:3982-3987
165. Polozov I, Gussack RA, Xiang L, Nielsen KM, Y. Martin A (2001) The critical role of the universally conserved A3801 of 23S ribosomal RNA in the release of the nascent peptide during translation termination. *Mol Cell* 11:100-112
166. Yonigman EM, Hanelle JL, Kockanick AB, Green F (2000) The active site of the ribosome is composed of two layers of conserved nucleotides with distinct roles in peptide bond formation and peptide release. *Cell* 117:289-299
167. Auer M, Wirth B, Bartschke-Schmidt E, Eberhard M, D. Mieser R., Polozov IY (2001) An inner release factor at A3801 of 23S RNA is key to trigger poly(A)-RNA hydrolysis during translation termination. *Nucleic Acids Res* 29:3982-3987
168. Serebryak IY, Serebryak AV, Frank J, Serebryak IY, Serebryak OI, Serebryak SA, Serebryak SA (2001) A pre-translational intermediate in protein synthesis observed in cryo-EM of enzymatically active 70S ribosome. *Mol Struct Biol* 49:227-230

169. Wilson DN, Schluenzen F, Harms JM, Yoshida T, Ohkubo T, Albrecht R, Buerger J, Kobayashi Y, Fucini P (2005) X-ray crystallography study on ribosome recycling: the mechanism of binding and action of RRF on the 50S ribosomal subunit. *EMBO J* 24: 251-260
170. Baram D, Yonath A (2005) From peptide-bond formation to cotranslational folding: dynamic, regulatory and evolutionary aspects. *FEBS Lett* 579: 948-954
171. Petry S, Brodersen DE, Murphy FVt, Dunham CM, Selmer M, Tarry MJ, Kelley AC, Ramakrishnan V (2005) Crystal structures of the ribosome in complex with release factors RF1 and RF2 bound to a cognate stop codon. *Cell* 123: 1255-1266
172. Agrawal RK, Sharma MR, Kiel MC, Hirokawa G, Booth TM, Spahn CM, Grassucci RA, Kaji A, Frank J (2004) Visualization of ribosome-recycling factor on the *Escherichia coli* 70S ribosome: functional implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 8900-8905
173. Peske F, Rodnina MV, Wintermeyer W (2005) Sequence of steps in ribosome recycling as defined by kinetic analysis. *Mol Cell* 18: 403-412
174. Peske F, Matassova NB, Savelsbergh A, Rodnina MV, Wintermeyer W (2000) Conformationally restricted elongation factor G retains GTPase activity but is inactive in translocation on the ribosome. *Mol Cell* 6: 501-505
175. Gabashvili IS, Agrawal RK, Grassucci R, Squires CL, Dahlberg AE, Frank J (1999) Major rearrangements in the 70S ribosomal 3D structure caused by a conformational switch in 16S ribosomal RNA. *EMBO J* 18: 6501-6507
176. Stark H, Orlova EV, Rinke-Appel J, Junke N, Mueller F, Rodnina M, Wintermeyer W, Brimacombe R, van Heel M (1997) Arrangement of tRNAs in pre- and posttranslocational ribosomes revealed by electron cryomicroscopy. *Cell* 88: 19-28
177. Bayfield MA, Dahlberg AE, Schulmeister U, Dorner S, Barta A (2001) A conformational change in the ribosomal peptidyl transferase center upon active/inactive transition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 10096-10101
178. Hickerson R, Majumdar ZK, Baucom A, Clegg RM, Noller HF (2005) Measurement of internal movements within the 30 S ribosomal subunit using Forster resonance energy transfer. *J Mol Biol* 354: 459-472
179. Fraternali F, Cavallo, L. (2002) Parameter optimized surfaces (POPS): analysis of key interactions and conformational changes in the ribosome. *Nucleic Acids Res* 30: 2950-2960
180. Nguyenle T, Laurberg M, Brenowitz M, Noller HF (2006) Following the dynamics of changes in solvent accessibility of 16 S and 23 S rRNA during ribosomal subunit association using synchrotron-generated hydroxyl radicals. *J Mol Biol* 359: 1235-1248
181. Agalarov S, Kalinichenko AA, Kommer AA, Spirin AS (2006) Ribosomal protein S1 induces a conformational change of the 30S ribosomal subunit. *FEBS Lett* 580: 6797-6799
182. Passmore LA, Schmeing TM, Maag D, Applefield DJ, Acker MG, Algire MA, Lorsch JR, Ramakrishnan V (2007) The eukaryotic translation initiation factors eIF1 and eIF1A induce an open conformation of the 40S ribosome. *Mol Cell* 26: 41-50
183. Gilbert RJ, Fucini P, Connell S, Fuller SD, Nierhaus KH, Robinson CV, Dobson CM, Stuart DI (2004) Three-dimensional structures of translating ribosomes by Cryo-EM. *Mol Cell* 14: 57-66
184. Gilbert RJ, Gordiyenko Y, von der Haar T, Sonnen AF, Hofmann G, Nardelli M, Stuart DI, McCarthy JE (2007) Reconfiguration of yeast 40S ribosomal subunit domains by the translation initiation multifactor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 5788-5793



185. Peske F, Savelsbergh A, Katunin VI, Rodnina MV, Wintermeyer W (2004) Conformational changes of the small ribosomal subunit during elongation factor G-dependent tRNA-mRNA translocation. *J Mol Biol* 343: 1183-1194
186. Gao H, Sengupta J, Valle M, Korostelev A, Eswar N, Stagg SM, Van Roey P, Agrawal RK, Harvey SC, Sali A, Chapman MS, Frank J (2003) Study of the structural dynamics of the E coli 70S ribosome using real-space refinement. *Cell* 113: 789-801
187. Huggins W, Ghosh SK, Nanda K, Wollenzien P (2005) Internucleotide movements during formation of 16 S rRNA-rRNA photocrosslinks and their connection to the 30 S subunit conformational dynamics. *J Mol Biol* 354: 358-374
188. Savelsbergh A, Katunin VI, Mohr D, Peske F, Rodnina MV, Wintermeyer W (2003) An elongation factor G-induced ribosome rearrangement precedes tRNA-mRNA translocation. *Mol Cell* 11: 1517-1523
189. Rodnina MV, Savelsbergh A, Katunin VI, Wintermeyer W (1997) Hydrolysis of GTP by elongation factor G drives tRNA movement on the ribosome. *Nature* 385: 37-41
190. Wilden B, Savelsbergh A, Rodnina MV, Wintermeyer W (2006) Role and timing of GTP binding and hydrolysis during EF-G-dependent tRNA translocation on the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 13670-13675
191. Seo HS, Abedin S, Kamp D, Wilson DN, Nierhaus KH, Cooperman BS (2006) EF-G-dependent GTPase on the ribosome. conformational change and fusidic acid inhibition. *Biochemistry* 45: 2504-2514
192. Gao H, Zhou Z, Rawat U, Huang C, Bouakaz L, Wang C, Cheng Z, Liu Y, Zavialov A, Gursky R, Sanyal S, Ehrenberg M, Frank J, Song H (2007) RF3 Induces Ribosomal Conformational Changes Responsible for Dissociation of Class I Release Factors. *Cell* 129: 929-941
193. Vidal L, Blagden S, Attard G, de Bono J (2005) Making sense of antisense. *Eur J Cancer* 41: 2812-2818
194. Madej B, Twardowski, T. (1999) Zastosowanie antysensu w biotechnologii roślin. *Biotechnologia* 3: 62-75
195. Dutkiewicz M, Ciesiolka, J. (2002) Strategia ukierunkowanej degradacji RNA oraz wybrane przykłady zastosowania w terapii przeciwwirusowej. *Biotechnologia* 1: 57-70
196. Tanabe T, Kuwabara T, Warashina M, Tani K, Taira K, Asano S (2000) Oncogene inactivation in a mouse model. *Nature* 406: 473-474
197. Sun LQ, Cairns MJ, Saravolac EG, Baker A, Gerlach WL (2000) Catalytic nucleic acids: from lab to applications. *Pharmacol Rev* 52: 325-347
198. Wyszko E, Barciszewska MZ, Bald R, Erdmann VA, Barciszewski J (2001) The specific hydrolysis of HIV-1 TAR RNA element with the anti-TAR hammerhead ribozyme: structural and functional implications. *Int J Biol Macromol* 28: 373-380
199. Wyszko E, Fuerste JP, Barciszewska M, Szymanski M, Adamiak R, Erdmann VA, Barciszewski J (1999) Preparation of HIV TAR RNA with RNA scissors. *J Biochem (Tokyo)* 126: 326-332
200. Swiatkowska A, Dutkiewicz M, Ciesiolka J (2007) Structural features of target RNA molecules greatly modulate the cleavage efficiency of trans-acting delta ribozymes. *Biochemistry* 46: 5523-5533
201. Legiewicz M, Wichlacz A, Brzezicha B, Ciesiolka J (2006) Antigenomic delta ribozyme variants with mutations in the catalytic core obtained by the in vitro selection method. *Nucleic Acids Res* 34: 1270-1280
202. Tyczewska A, Figlerowicz, M., Twardowski, T. (2003) Aptamery RNA jako potencjalne leki przeciwwirusowe. *Biotechnologia* 2: 153-164
203. Blank M, Blind M (2005) Aptamers as tools for target validation. *Curr Opin Chem Biol* 9: 336-342



204. Nimjee SM, Rusconi CP, Sullenger BA (2005) Aptamers: an emerging class of therapeutics. *Annu Rev Med* 56: 555-583
205. Yan AC, Bell KM, Breeden MM, Ellington AD (2005) Aptamers: prospects in therapeutics and biomedicine. *Front Biosci* 10: 1802-1827
206. Proske D, Blank M, Buhmann R, Resch A (2005) Aptamers--basic research, drug development, and clinical applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 69: 367-374
207. Tyczewska A, Bąkowska-Żywicka, K., Twardowski, T. (2006) Terapeutyczne zastosowania aptamerów. Na pograniczu chemii i biologii, red. J. Barciszewski, H. Koroniak XIV: 176-203
208. Scanlon KJ (2004) Anti-genes: siRNA, ribozymes and antisense. *Curr Pharm Biotechnol* 5: 415-420
209. Potera C (2007) Antisense--down, but not out. *Nat Biotechnol* 25: 497-499
210. Tamm I (2006) Antisense therapy in malignant diseases: status quo and quo vadis? *Clin Sci (Lond)* 110: 427-442
211. Bedikian AY, Millward, M., Pehamberger, H., Conry, R., Gore, M., Trefzer, U., Pavlick, A.C., DeConti, R., Hersh, E.M., Hersey, P., Kirkwood, J.M., Haluska, F.G.; Oblimersen Melanoma Study Group. (2006) Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) plus dacarbazine in patients with advanced melanoma: the Oblimersen Melanoma Study Group. *J Clin Oncol* 24: 4738-4745
212. Wiedenmann N, Koto M, Raju U, Milas L, Mason KA (2007) Modulation of tumor radiation response with G3139, a bcl-2 antisense oligonucleotide. *Invest New Drugs*
213. Chi KN, Eisenhauer E, Fazli L, Jones EC, Goldenberg SL, Powers J, Tu D, Gleave ME (2005) A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of OGX-011, a 2'-methoxyethyl antisense oligonucleotide to clusterin, in patients with localized prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 97: 1287-1296
214. Levine BL, Humeau LM, Boyer J, MacGregor RR, Rebello T, Lu X, Binder GK, Slepushkin V, Lemiale F, Mascola JR, Bushman FD, Dropulic B, June CH (2006) Gene transfer in humans using a conditionally replicating lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 17372-17377
215. Warfield KL, Swenson DL, Olinger GG, Nichols DK, Pratt WD, Blouch R, Stein DA, Aman MJ, Iversen PL, Bavari S (2006) Gene-specific countermeasures against Ebola virus based on antisense phosphorodiamidate morpholino oligomers. *PLoS Pathog* 2: e1
216. Yang J, Bo XC, Ding XR, Dai JM, Zhang ML, Wang XH, Wang SQ (2006) Antisense oligonucleotides targeted against asialoglycoprotein receptor 1 block human hepatitis B virus replication. *J Viral Hepat* 13: 158-165
217. Kari I, Syrjanen S, Johansson B, Peri P, He B, Roizman B, Hukkanen V (2007) Antisense RNA directed to the human papillomavirus type 16 E7 mRNA from herpes simplex virus type 1 derived vectors is expressed in CaSki cells and downregulates E7 mRNA. *Virol J* 4: 47
218. Sobkiewicz A, Twardowski T (1998) Wykorzystanie strategii antysensowych oligonukleotydów w badaniach ekspozycji i lokalizacji rRNA na powierzchni podjednostek rybosomalnych. *Postępy Biochemii* 44: 55-63
219. Nawrot M, Bohun E, Książczak-Kus L, Sobkiewicz A, Polak J, Twardowski T (1998) Functional role of rRNAs in plant translation system tested with antisense strategy. *Acta Biochim Pol* 45: 1053-1066
220. Petyuk VA, Serikov RN, Vlassov VV, Zenkova MA (2004) Hybridization of antisense oligonucleotides with alpha-sarcin loop region of Escherichia coli 23S rRNA. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 23: 895-906



221. Shaikhin S, Sobkiewicz A, Barciszewski J, Twardowski T (1994) Evidence for plant ribosomal 5S RNA involvement in elongation of polypeptide chain biosynthesis. *Acta Biochim Pol* 41: 57-62
222. Abelian A, Walsh AP, Lentzen G, Aboul-Ela F, Gait MJ (2004) Targeting the A site RNA of the *Escherichia coli* ribosomal 30 S subunit by 2'-O-methyl oligoribonucleotides: a quantitative equilibrium dialysis binding assay and differential effects of aminoglycoside antibiotics. *Biochem J* 383: 201-208
223. Azad AA, Failla P, Hanna PJ (1998) Inhibition of ribosomal subunit association and protein synthesis by oligonucleotides corresponding to defined regions of 18S rRNA and 5S rRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 248: 51-56
224. Abou Elela S, Nazar RN (1997) Role of the 5.8S rRNA in ribosome translocation. *Nucleic Acids Res* 25: 1788-1794
225. Bąkowska K, Dudzińska-Bajorek B, Twardowski T (2004) Mini-tRNA jako narzędzie identyfikacji elementów struktury tRNA odpowiedzialnych za aminoacylację. *Postępy Biochemii* 50: 2-10
226. Schulman LH (1991) Recognition of tRNAs by aminoacyl-tRNA synthetases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 41: 23-87
227. Barciszewska MZ, Barciszewski J (1992) Zależność funkcji kwasów nukleinowych od struktury. *Postępy Biochemii* 38: 171-178
228. Frugier M, Florentz C, Giege R (1992) Anticodon-independent aminoacylation of an RNA minihelix with valine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 3990-3994
229. Schimmel P (1991) RNA minihelices and the decoding of genetic information. *Faseb J* 5: 2180-2187
230. McClain WH, Foss K, Jenkins RA, Schneider J (1991) Four sites in the acceptor helix and one site in the variable pocket of tRNA(Ala) determine the molecule's acceptor identity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 9272-9276
231. Frugier M, Helm M, Felden B, Giege R, Florentz C (1998) Sequences outside recognition sets are not neutral for tRNA aminoacylation. Evidence for nonpermissive combinations of nucleotides in the acceptor stem of yeast tRNAPhe. *J Biol Chem* 273: 11605-11610
232. Musier-Forsyth K, Schimmel P (1993) Aminoacylation of RNA oligonucleotides: minimalist structures and origin of specificity. *Faseb J* 7: 282-289
233. Himeno H, Hasegawa T, Ueda T, Watanabe K, Shimizu M (1990) Conversion of aminoacylation specificity from tRNA(Tyr) to tRNA(Ser) in vitro. *Nucleic Acids Res* 18: 6815-6819
234. Hou YM, Westhof E, Giege R (1993) An unusual RNA tertiary interaction has a role for the specific aminoacylation of a transfer RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 6776-6780
235. Beuning PJ, Nagan MC, Cramer CJ, Musier-Forsyth K, Gelpi JL, Bashford D (2002) Efficient aminoacylation of the tRNA(Ala) acceptor stem: dependence on the 2:71 base pair. *Rna* 8: 659-670
236. Pallanck L, Li S, Schulman LH (1992) The anticodon and discriminator base are major determinants of cysteine tRNA identity in vivo. *J Biol Chem* 267: 7221-7223
237. Giege R, Sissler M, Florentz C (1998) Universal rules and idiosyncratic features in tRNA identity. *Nucleic Acids Res* 26: 5017-5035
238. Lipman RS, Hou YM (1998) Aminoacylation of tRNA in the evolution of an aminoacyl-tRNA synthetase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 13495-13500
239. Jakubowski H (2000) Amino acid selectivity in the aminoacylation of coenzyme A and RNA minihelices by aminoacyl-tRNA synthetases. *J Biol Chem* 275: 34845-34848





240. De Rijk P, Wuyts J, Van de Peer Y, Winkelmanns T, De Wachter R (2000) The European large subunit ribosomal RNA database. *Nucleic Acids Res* 28: 177-178
241. Van de Peer Y, De Rijk P, Wuyts J, Winkelmanns T, De Wachter R (2000) The European small subunit ribosomal RNA database. *Nucleic Acids Res* 28: 175-176
242. Wu P, Nakano S, Sugimoto N (2002) Temperature dependence of thermodynamic properties for DNA/DNA and RNA/DNA duplex formation. *Eur J Biochem* 269: 2821-2830
243. Reveal J (1999) Reveal system of classification. PBIO 250 Lecture Notes: Plant Taxonomy [on-line], Department of Plant Biology, University of Maryland
244. Woese CR, Kandler O, Wheelis ML (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 4576-4579
245. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE (2004) UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25: 1605-1612
246. Tocilj A, Schlunzen F, Janell D, Gluhmann M, Hansen HA, Harms J, Bashan A, Bartels H, Agmon I, Franceschi F, Yonath A (1999) The small ribosomal subunit from *Thermus thermophilus* at 4.5 Å resolution: pattern fittings and the identification of a functional site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 14252-14257
247. Rinke-Appel J, Junke N, Osswald M, Brimacombe R (1995) The ribosomal environment of tRNA: crosslinks to rRNA from positions 8 and 20:1 in the central fold of tRNA located at the A, P, or E site. *Rna* 1: 1018-1028
248. Korostelev A, Trakhanov S, Laurberg M, Noller HF (2006) Crystal structure of a 70S ribosome-tRNA complex reveals functional interactions and rearrangements. *Cell* 126: 1065-1077
249. Phelps SS, Jerinic O, Joseph S (2002) Universally conserved interactions between the ribosome and the anticodon stem-loop of A site tRNA important for translocation. *Mol Cell* 10: 799-807
250. Yoshizawa S, Fourmy D, Puglisi JD (1999) Recognition of the codon-anticodon helix by ribosomal RNA. *Science* 285: 1722-1725
251. Wower J, Scheffer P, Sylvers LA, Wintermeyer W, Zimmermann RA (1993) Topography of the E site on the *Escherichia coli* ribosome. *Embo J* 12: 617-623
252. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402
253. Yassin A, Fredrick K, Mankin AS (2005) Deleterious mutations in small subunit ribosomal RNA identify functional sites and potential targets for antibiotics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 16620-16625
254. Noller HF, Hoang L, Fredrick K (2005) The 30S ribosomal P site: a function of 16S rRNA. *FEBS Lett* 579: 855-858
255. Abdi NM, Fredrick K (2005) Contribution of 16S rRNA nucleotides forming the 30S subunit A and P sites to translation in *Escherichia coli*. *Rna* 11: 1624-1632
256. Bocchetta M, Xiong L, Shah S, Mankin AS (2001) Interactions between 23S rRNA and tRNA in the ribosomal E site. *Rna* 7: 54-63
257. Zuker M (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 31: 3406-3415

- 240 De Groot, P., Wray, J., Van de Pelt, Y., Winkler, T., De Wachter, R. (2000) The European large ribosomal subunit RNA database. *Nucleic Acids Res.* 28: 177-178.
- 241 Van de Pelt, Y., Wray, J., Winkler, T., De Wachter, R. (2000) The European small ribosomal subunit RNA database. *Nucleic Acids Res.* 28: 175-176.
- 242 Wu, T., Hwang, S., Zuker, M. (2002) Topological dependence of thermodynamic properties for DNA/RNA and RNA/RNA duplex formation. *Eur. J. Biochem.* 299: 2851-2860.
- 243 Kuvshinov, V. (1999) Novel system of classification. PhD 250 Lecture Notes. Plant Technology for the Department of Plant Biology, University of Maryland.
- 244 Brown, C.R., Kuster, G., Winkler, M. (1999) Towards a natural system of organism grouping for the domains: Animals, plants, and bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 4575-4579.
- 245 Peterson, G.R., Goffinet, T.G., Hany, C.C., Olson, G.S., Gussler, D.M., Meng, B.C., Farris, J.S. (2000) *PhyloCom* - a classification system for exploring taxonomy and analysis. *Conserv. Chem.* 13: 1005-1012.
- 246 Tjallingii, E., Schramm, F., Jahn, B., Gahrman, M., Harnik, H.A., Harnik, J., Harnik, A., Harnik, H., Jahn, J., Tjallingii, E., Jahn, A. (1999) The small ribosomal subunit from *Thermoplasma* sp. 4.2: A resolution of the small ribosomal subunit and the identification of a functional subunit. *Nucleic Acids Res.* 27: 1412-1422.
- 247 Ruff, A., Jahn, A., Jahn, M., Harnik, H. (1999) The ribosomal subunit from *Thermoplasma* sp. 4.2: A resolution of the small ribosomal subunit and the identification of a functional subunit. *Nucleic Acids Res.* 27: 1412-1422.
- 248 Kuvshinov, V., Tjallingii, E., Jahn, M., Harnik, H. (2000) Crystal structure of a 30S ribosomal subunit from *Thermoplasma* sp. 4.2. *Nucleic Acids Res.* 28: 1016-1024.
- 249 Jahn, M., Tjallingii, E., Jahn, A., Jahn, M., Harnik, H. (2002) Unusually conserved interaction between the ribosome and the eukaryotic translation factor eIF4E. *Nucleic Acids Res.* 30: 1016-1024.
- 250 Jahn, M., Tjallingii, E., Jahn, A., Jahn, M., Harnik, H. (1997) Topography of the ribosome and the eukaryotic translation factor eIF4E. *Nucleic Acids Res.* 25: 1712-1722.
- 251 Wray, J., Winkler, T., Jahn, A., Winkler, M., Harnik, H. (1997) Topography of the ribosome and the eukaryotic translation factor eIF4E. *Nucleic Acids Res.* 25: 1712-1722.
- 252 Jahn, M., Tjallingii, E., Jahn, A., Jahn, M., Harnik, H. (1997) Topography of the ribosome and the eukaryotic translation factor eIF4E. *Nucleic Acids Res.* 25: 1712-1722.
- 253 Jahn, M., Tjallingii, E., Jahn, A., Jahn, M., Harnik, H. (1997) Topography of the ribosome and the eukaryotic translation factor eIF4E. *Nucleic Acids Res.* 25: 1712-1722.
- 254 Jahn, M., Tjallingii, E., Jahn, A., Jahn, M., Harnik, H. (1997) Topography of the ribosome and the eukaryotic translation factor eIF4E. *Nucleic Acids Res.* 25: 1712-1722.
- 255 Jahn, M., Tjallingii, E., Jahn, A., Jahn, M., Harnik, H. (1997) Topography of the ribosome and the eukaryotic translation factor eIF4E. *Nucleic Acids Res.* 25: 1712-1722.
- 256 Jahn, M., Tjallingii, E., Jahn, A., Jahn, M., Harnik, H. (1997) Topography of the ribosome and the eukaryotic translation factor eIF4E. *Nucleic Acids Res.* 25: 1712-1722.
- 257 Jahn, M., Tjallingii, E., Jahn, A., Jahn, M., Harnik, H. (1997) Topography of the ribosome and the eukaryotic translation factor eIF4E. *Nucleic Acids Res.* 25: 1712-1722.

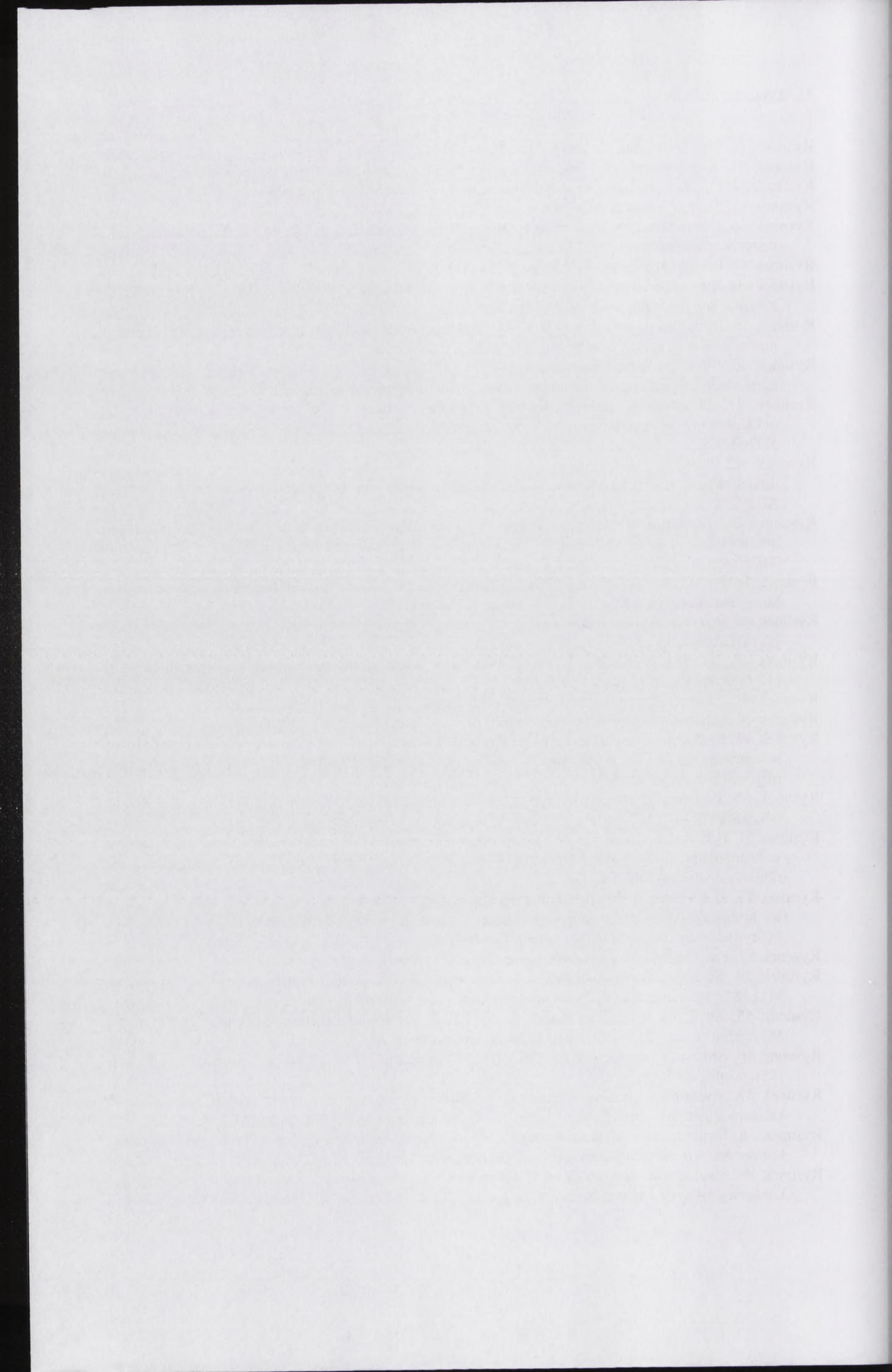
## 11. WYKAZ RYSUNKÓW I TABEL

**Rysunki**

Rysunek 1. Struktura rybosomu prokariotycznego 70S i eukariotycznych 80S. ....	8
Rysunek 2. Struktura małej podjednostki rybosomalnej prokariotycznej 30S i eukariotycznych 40S. ....	10
Rysunek 3. Schemat struktury 16S rRNA (A, na podstawie [22]) i lokalizacja w strukturze krystalicznej małej podjednostki rybosomalnej 30S (B, struktura pobrana z [23], numer 1FKA) i 40S (C, na podstawie [15]). ....	11
Rysunek 4. Położenie domeny 5' w strukturze II-rzędowej i III-rzędowej 16S rRNA <i>T. thermophilus</i> (struktury pobrane odpowiednio z [22], numer X07998 oraz z [23], numer 1FKA). ....	13
Rysunek 5. Struktura małej podjednostki rybosomalnej 40S <i>T. cruzi</i> [11] z zaznaczonymi sekwencjami wstawionymi. ....	14
Rysunek 6. Położenie domeny centralnej w strukturze II-rzędowej oraz III-rzędowej 16S rRNA <i>T. thermophilus</i> (struktury pobrane odpowiednio z [22], numer X07998 oraz z [23], numer 1FKA). ....	16
Rysunek 7. Położenie domeny 3' <i>major</i> w strukturze II-rzędowej oraz III-rzędowej 16S rRNA <i>T. thermophilus</i> (struktury pobrane odpowiednio z [22], numer X07998 oraz z [23], numer 1FKA). ....	18
Rysunek 8. Położenie domeny 3' <i>minor</i> w strukturze II-rzędowej oraz III-rzędowej 16S rRNA <i>T. thermophilus</i> (struktury pobrane odpowiednio z [22], numer X07998 oraz z [23], numer 1FKA). ....	19
Rysunek 9. Struktura trzeciorzędowa małej podjednostki rybosomalnej 30S (struktura pobrana z [23] numer 1FKA). ....	21
Rysunek 10. Położenie białek w małej podjednostce rybosomu drożdżowego [9]. ....	22
Rysunek 11. Położenie białka RACK1 (zaznaczono kolorem czerwonym) w małej podjednostce rybosomu <i>T. lanuginosus</i> (A), <i>S. cerevisiae</i> (B) oraz <i>H. sapiens</i> (C) [10]. ....	23
Rysunek 12. Struktura dużej podjednostki rybosomalnej, prokariotycznej 50S i eukariotycznych 60S. ....	25
Rysunek 13. Architektura rybosomu 70S <i>E. coli</i> (na podstawie [52]). ....	27
Rysunek 14. Schemat struktury 23S rRNA. ....	28
Rysunek 15. Położenie domeny I w strukturze II-rzędowej i III-rzędowej 23S rRNA <i>H. marismortui</i> (struktury pobrane odpowiednio z [22], numer AF034620 oraz [23], numer 1FFK). ....	30
Rysunek 16. Sekwencje wstawione w 26S rRNA <i>S. cerevisiae</i> [9] oraz <i>O. cuniculus</i> [17]. ....	31
Rysunek 17. Położenie domeny II w strukturze II-rzędowej i III-rzędowej 23S rRNA <i>H. marismortui</i> (struktury pobrane odpowiednio z [22], numer AF034620 oraz [23], numer 1FFK). ....	32
Rysunek 18. Położenie domeny III w strukturze II-rzędowej i III-rzędowej 23S rRNA <i>H. marismortui</i> (struktury pobrane odpowiednio z [22], numer AF034620 oraz [23], numer 1FFK). ....	35
Rysunek 19. Położenie domeny IV w strukturze II-rzędowej i III-rzędowej 23S rRNA <i>H. marismortui</i> (struktury pobrane odpowiednio z [22], numer AF034620 oraz [23], numer 1FFK; w helisie H69 brak nukleotydów w pozycjach 1952-1963). ....	36
Rysunek 20. Położenie domeny V w strukturze II-rzędowej i III-rzędowej 23S rRNA <i>H. marismortui</i> . ....	39
Rysunek 21. Położenie domeny VI w strukturze II-rzędowej i III-rzędowej 23S rRNA <i>H. marismortui</i> (struktury pobrane odpowiednio z [22], numer AF034620 oraz [23], numer 1FFK). ....	40
Rysunek 22. 5S rRNA. ....	42
Rysunek 23. Struktura III-rzędowa dużej podjednostki rybosomalnej 50S (struktura pobrana z [23] numer 1FFK). ....	44
Rysunek 24. Położenie białek w dużej podjednostce rybosomu <i>S. cerevisiae</i> [9]. ....	45
Rysunek 25. Umieszczenie mostków między podjednostkami 40S i 60S w rybosomie 80S <i>S. cerevisiae</i> . (na podstawie [9]) ....	48
Rysunek 26. Struktura czynnika elongacyjnego EF1. (na podstawie [117]) ....	55
Rysunek 27. Białka rybosomalne znajdujące się najbliżej PTC. (na podstawie [50]) ....	57
Rysunek 28. Mechanizm syntezy wiązania peptydowego. (zmodyfikowane według [125]) ....	58
Rysunek 29. Translokacja tRNA podczas elongacji biosyntezy białka (na podstawie [145]). ....	62
Rysunek 30. Struktura czynnika elongacyjnego EF2 (na podstawie [117]). ....	64
Rysunek 31. Sekwencja zdarzeń cyklu elongacyjnego w rybosomie 70S. (na podstawie [152]). ....	65

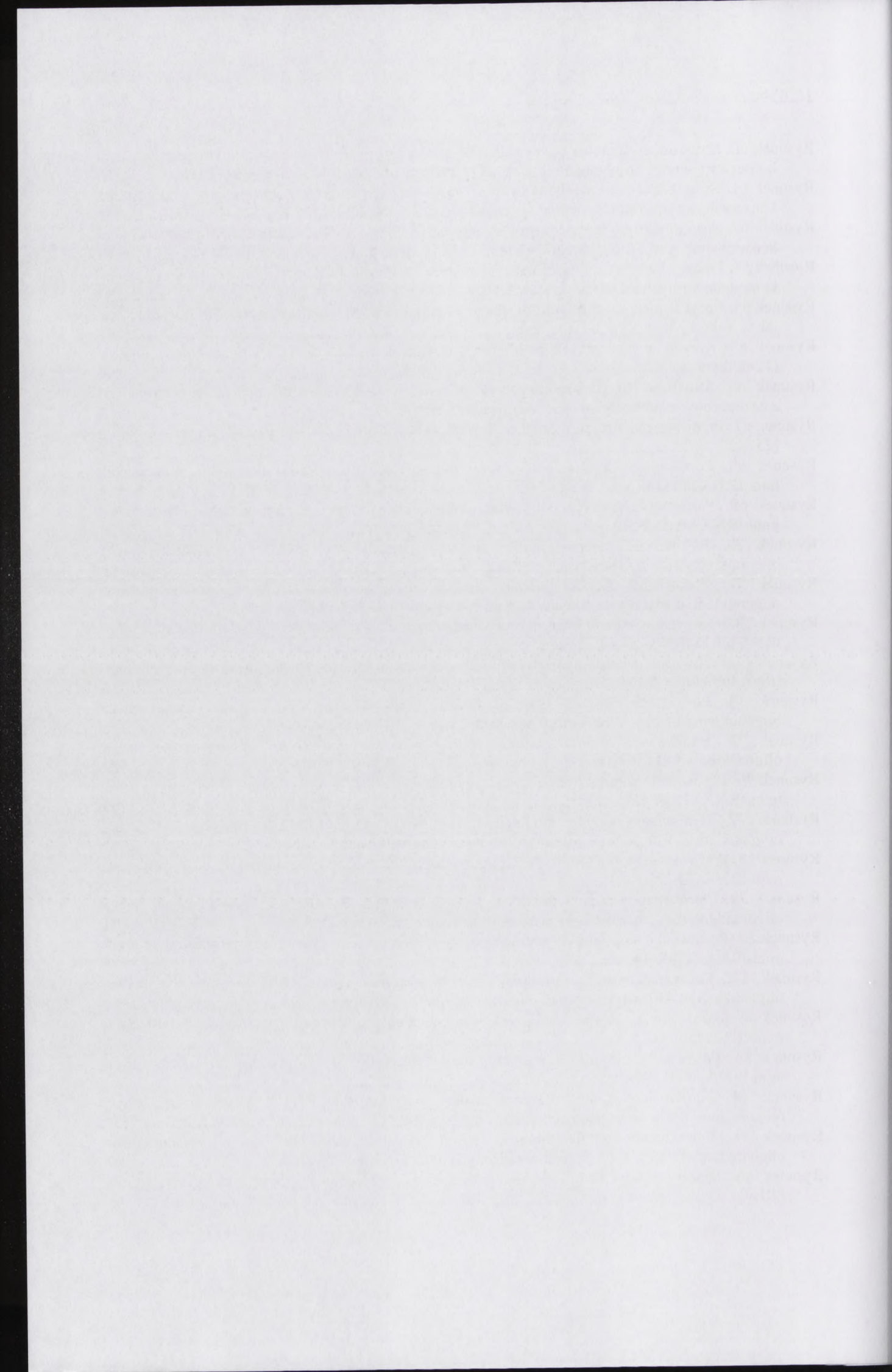


Rysunek 32. Model terminacji translacji katalizowany przez RF. (na podstawie [153]).....	67
Rysunek 33. Model terminacji translacji katalizowanej przez rybosom. (na podstawie [165]).....	68
Rysunek 34. Mechanizm działania antysensowych oligonukleotydów. (na podstawie [194]).....	74
Rysunek 35. Struktura cząsteczki tRNA.....	81
Rysunek 36. Obraz rozdziału elektroforetycznego (10% denaturujący PAA) preparatu pochodzącego z oczyszczania tRNA. ....	102
Rysunek 37. Przebieg rozdziału niskocząsteczkowych RNA na kolumnie wypełnionej BD-Celulozą.....	103
Rysunek 38. Struktura II-rzędowa 18S rRNA <i>G. max</i> (struktura pobrana z [22], numer X02623) z zaznaczonymi nukleotydami konserwatywnymi.....	108
Rysunek 39. Struktura III-rzędowa 16S rRNA <i>T. thermophilus</i> (struktura utworzona na podstawie [23], numer 1FKA) z zaznaczonymi nukleotydami konserwatywnymi. ....	109
Rysunek 40. Struktura II-rzędowa domeny 5' 18S rRNA <i>Glycine max</i> z zaznaczonymi nukleotydami konserwatywnymi i funkcjonalnie ważnymi (struktura pobrana z [22], numer X02623).....	113
Rysunek 41. Struktura II-rzędowa domeny centralnej 18S rRNA <i>Glycine max</i> z zaznaczonymi nukleotydami konserwatywnymi i funkcjonalnie ważnymi (struktura pobrana z [22], numer X02623).....	114
Rysunek 42. Struktura II-rzędowa domeny 3' <i>major</i> 18S rRNA <i>Glycine max</i> z zaznaczonymi nukleotydami konserwatywnymi i funkcjonalnie ważnymi (struktura pobrana z [22], numer X02623).....	115
Rysunek 43. Struktura II-rzędowa domeny 3' <i>minor</i> 18S rRNA <i>Glycine max</i> z zaznaczonymi nukleotydami konserwatywnymi i funkcjonalnie ważnymi (struktura pobrana z [22], numer X02623).....	116
Rysunek 44. Pozycja badanych miejsc, ważnych w procesie translacji (numery odnoszą się do numerów komplementarnych a-DNA). ....	117
Rysunek 45. Pozycja niespecyficznych sekwencji komplementarnych do badanych a-DNA. (numeracja jak w Tabeli 12).....	119
Rysunek 46. Krzywe wysycenia 12 pmoli rybosomu przez wzrastające stężenie oligonukleotydów (12-600 pmoli).....	123
Rysunek 47. Schemat przeprowadzonych reakcji w stanie pretranslokacyjnym rybosomu. ....	127
Rysunek 48. Schemat przeprowadzonych reakcji w stanie posttranslokacyjnym rybosomu.....	128
Rysunek 49. Porównanie stopnia hybrydyzacji oligonukleotydów #1 i #4 stosowanych samodzielnie lub w mieszaninie (A), ze stopniem inhibicji reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> przez zhybrydyzowane oligonukleotydy #1 lub/i #4 (B). ....	134
Rysunek 50. Porównanie stopnia hybrydyzacji oligonukleotydu #2 (A) ze stopniem inhibicji reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> pod wpływem hybrydyzowanego oligonukleotydu #2 (B).....	136
Rysunek 51. Porównanie stopnia hybrydyzacji oligonukleotydów #3 i #5 stosowanych samodzielnie lub w kompozycji (A), ze stopniem inhibicji reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> przez zhybrydyzowane oligonukleotydy #3 lub/i #5 (B). ....	137
Rysunek 52. Porównanie stopnia hybrydyzacji oligonukleotydów #6 i #7 stosowanych samodzielnie lub w kompozycji (A), ze stopniem inhibicji reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> pod wpływem zhybrydyzowanych oligonukleotydów #6 lub/i #7 (B).....	139
Rysunek 53. Procent hybrydyzacji oligonukleotydów do rybosomu.....	142
Rysunek 54. Struktura II-rzędowa części 5' 26S rRNA <i>O. sativa</i> (struktura pobrana z [22], numer M11585m) z zaznaczonymi nukleotydami konserwatywnymi. ....	147
Rysunek 55. Struktura II-rzędowa części 3' 26S rRNA <i>O. sativa</i> (struktura pobrana z [22], numer M11585m) z zaznaczonymi nukleotydami konserwatywnymi. ....	148
Rysunek 56. Struktura trzeciorzędowa 23S rRNA <i>H. marismortui</i> (struktura utworzona na podstawie [23], numer 1FFK) z.....	149
Rysunek 57. Struktura II-rzędowa domeny I 26S rRNA <i>Oryza sativa</i> z zaznaczonymi nukleotydami konserwatywnymi i funkcjonalnie ważnymi (struktura pobrana z [22], numer M11585m). ....	153
Rysunek 58. Struktura II-rzędowa domeny II 26S rRNA <i>Oryza sativa</i> z zaznaczonymi nukleotydami konserwatywnymi i funkcjonalnie ważnymi (struktura pobrana z [22], numer M11585m). ....	154
Rysunek 59. Struktura II-rzędowa domeny III 26S rRNA <i>Oryza sativa</i> z zaznaczonymi nukleotydami konserwatywnymi i funkcjonalnie ważnymi (struktura pobrana z [22], numer M11585m). ....	155



Rysunek 60. Struktura II-rzędowa domeny IV 26S rRNA <i>Oryza sativa</i> z zaznaczonymi nukleotydami konserwatywnymi i funkcjonalnie ważnymi (struktura pobrana z [22], numer M11585m).....	156
Rysunek 61. Struktura II-rzędowa domeny V 26S rRNA <i>Oryza sativa</i> z zaznaczonymi nukleotydami konserwatywnymi i funkcjonalnie ważnymi (struktura pobrana z [22], numer M11585m).....	157
Rysunek 62. Struktura II-rzędowa domeny VI 26S rRNA <i>Oryza sativa</i> z zaznaczonymi nukleotydami konserwatywnymi i funkcjonalnie ważnymi (struktura pobrana z [22], numer M11585m).....	158
Rysunek 63. Pozycja badanych miejsc, ważnych w procesie translacji (numery odnoszą się do numerów komplementarnych a-DNA).....	159
Rysunek 64. Pozycja niespecyficzných sekwencji komplementarných do badanych a-DNA. (numeracja jak w Tabeli 23).....	161
Rysunek 65. Krzywe wysycenia 12 pmoli rybosomu przez wzrastające stężenie oligonukleotydów (12-600 pmoli).....	167
Rysunek 66. Struktura II-rzędowa cząsteczek mini-tRNA (A-C) oraz tRNA <sup>Phe</sup> <i>S. cerevisiae</i> (D) z zaznaczonymi nukleotydami oddziałującymi z rRNA. ....	168
Rysunek 67. Przewidziana struktura drugorzędowa cząsteczek mini-tRNA (z użyciem programu mfold [257]).....	169
Rysunek 68. Porównanie stopnia hybrydyzacji oligonukleotydu #9 do rybosomów obsadzonych mini-tRNA lub D-tRNA.....	179
Rysunek 69. Porównanie stopnia hybrydyzacji oligonukleotydu #16 do rybosomów obsadzonych mini-tRNA lub D-tRNA.....	180
Rysunek 70. Porównanie stopnia inhibicji reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> powodowanej przez oligonukleotyd #9 w rybosomach obsadzonych mini-tRNA lub D-tRNA.....	182
Rysunek 71. Porównanie stopnia inhibicji reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> powodowanej przez oligonukleotyd #16 w rybosomach obsadzonych mini-tRNA lub D-tRNA.....	183
Rysunek 72. Porównanie stopnia hybrydyzacji oligonukleotydu #10 do rybosomów obsadzonych mini-tRNA lub D-tRNA.....	185
Rysunek 73. Porównanie stopnia hybrydyzacji oligonukleotydu #11 do rybosomów obsadzonych mini-tRNA lub D-tRNA.....	186
Rysunek 74. Porównanie stopnia inhibicji reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> powodowanej przez oligonukleotyd #10 w rybosomach obsadzonych mini-tRNA lub D-tRNA.....	188
Rysunek 75. Porównanie stopnia inhibicji reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> powodowanej przez oligonukleotyd #11 w rybosomach obsadzonych mini-tRNA lub D-tRNA.....	189
Rysunek 76. Porównanie stopnia hybrydyzacji oligonukleotydu #12 w rybosomach obsadzonych przez mini-tRNA i D-tRNA.....	190
Rysunek 77. Porównanie stopnia inhibicji reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> powodowanej przez oligonukleotyd #12 w rybosomach obsadzonych mini-tRNA lub D-tRNA.....	191
Rysunek 78. Porównanie stopnia hybrydyzacji oligonukleotydu #13 w rybosomach obsadzonych przez mini-tRNA i D-tRNA.....	192
Rysunek 79. Porównanie stopnia inhibicji reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> powodowanej przez oligonukleotyd #13 w rybosomach obsadzonych mini-tRNA lub D-tRNA.....	193
Rysunek 80. Porównanie stopnia hybrydyzacji oligonukleotydu #17 w rybosomach obsadzonych przez mini-tRNA i D-tRNA.....	194
Rysunek 81. Porównanie stopnia inhibicji reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> powodowanej przez oligonukleotyd #17 w rybosomach obsadzonych mini-tRNA lub D-tRNA.....	194
Rysunek 82. Porównanie stopnia hybrydyzacji oligonukleotydu #14 do rybosomów obsadzonych mini-tRNA lub D-tRNA.....	195
Rysunek 83. Porównanie stopnia hybrydyzacji oligonukleotydu #15 do rybosomów obsadzonych mini-tRNA lub D-tRNA.....	196
Rysunek 84. Porównanie stopnia inhibicji reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> powodowanej przez oligonukleotyd #14 w rybosomach obsadzonych mini-tRNA lub D-tRNA.....	197
Rysunek 85. Porównanie stopnia inhibicji reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> powodowanej przez oligonukleotyd #15 w rybosomach obsadzonych mini-tRNA lub D-tRNA.....	197
Rysunek 86. Procent hybrydyzacji oligonukleotydów do rybosomu w stanie pretranslokacyjnym PRE-P.....	198





Rysunek 87. Procent hybrydyzacji oligonukleotydów do rybosomu w stanie pretranslokacyjnym PRE-AP.....	199
Rysunek 88. Procent hybrydyzacji oligonukleotydów do rybosomu w stanie posttranslokacyjnym POST-P.....	200
Rysunek 89. Procent hybrydyzacji oligonukleotydów do rybosomu w stanie posttranslokacyjnym POST-PE.....	201
Rysunek 90. Zmiany konformacyjne małej podjednostki rybosomalnej podczas kolejnych etapów biosyntezy białka.....	204
Rysunek 91. Zmiany konformacyjne dużej podjednostki rybosomalnej podczas biosyntezy białka. ....	205

## Tabele

Tabela 1. Przykłady eukariotycznych białek małej podjednostki rybosomalnej o znanych funkcjach (na podstawie [12, 45, 46]).....	24
Tabela 2. Przykłady rybosomalnych białek dużej podjednostki eukariotycznej o znanych funkcjach (na podstawie [12, 45, 46]).....	46
Tabela 3. Mostki między podjednostką 40S a 60S (na podstawie [9]).....	50
Tabela 4. Klasyfikacja taksonomiczna <i>Lupinus luteus</i> oraz <i>Glycine max</i> według systemu Reveala [243]. .....	107
Tabela 5. Nukleotydy 16S rRNA oddziałujące z cząsteczką mRNA (numeracja według <i>E. coli</i> ).....	110
Tabela 6. Nukleotydy 16S rRNA biorące udział w wiązaniu czynników elongacyjnych (numeracja według <i>E. coli</i> ).....	110
Tabela 7. Nukleotydy 16S rRNA odpowiedzialne za tworzenie tunelu wejścia mRNA (numeracja według <i>E. coli</i> ).....	110
Tabela 8. Nukleotydy 16S rRNA biorące udział w wiązaniu tRNA w miejscach A, P i E (numeracja według <i>E. coli</i> ).....	111
Tabela 9. Nukleotydy 16S rRNA odpowiedzialne za tworzenie rybosomalnych miejsc A i P w podjednostce 30S (numeracja według <i>E. coli</i> ).....	111
Tabela 10. Nukleotydy 16S rRNA tworzące mostki 16S rRNA- 23S rRNA oraz 16S rRNA –białko (numeracja według <i>E. coli</i> ) [5, 9, 20].....	112
Tabela 11. Oligonukleotydy antysensowe do badań zmian konformacyjnych małej podjednostki rybosomalnej.....	118
Tabela 12. Specyficzność interakcji a-DNA – rybosom.....	120
Tabela 13. Radioaktywność specyficzna [dpm/pmol] oligonukleotydów po znakowaniu [ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]-ATP. .....	121
Tabela 14. Wyniki reakcji hybrydyzacji antysensowych oligonukleotydów do rybosomów przekształconych w stan pre- lub posttranslokacyjny.....	129
Tabela 15. Wyniki reakcji hybrydyzacji mieszanin ekwimolarnych antysensowych oligonukleotydów do rybosomów przekształconych w stan pre- lub posttranslokacyjny.....	130
Tabela 16. Wyniki inhibicji reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> przez zhybrydyzowane antysensowe oligonukleotydy do rybosomów przekształconych w stan pre- lub posttranslokacyjny.....	131
Tabela 17. Wyniki inhibicji reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> przez zhybrydyzowane mieszaniny ekwimolarnie antysensowych oligonukleotydów do rybosomów przekształconych w stan pre- lub posttranslokacyjny.....	132
Tabela 18. Klasyfikacja taksonomiczna <i>Lupinus luteus</i> oraz <i>Oryza sativa</i> według Reveala [243]. ....	146
Tabela 19. Nukleotydy 23S rRNA odpowiedzialne za tworzenie tunelu wyjścia polipeptydu (numeracja według <i>E. coli</i> ).....	150
Tabela 20. Nukleotydy 23S rRNA oddziałujące z cząsteczkami tRNA w miejscach A, P lub E (numeracja według <i>E. coli</i> ).....	152
Tabela 21. Nukleotydy 23S rRNA biorące udział w wiązaniu czynników elongacyjnych (numeracja według <i>E. coli</i> ).....	152

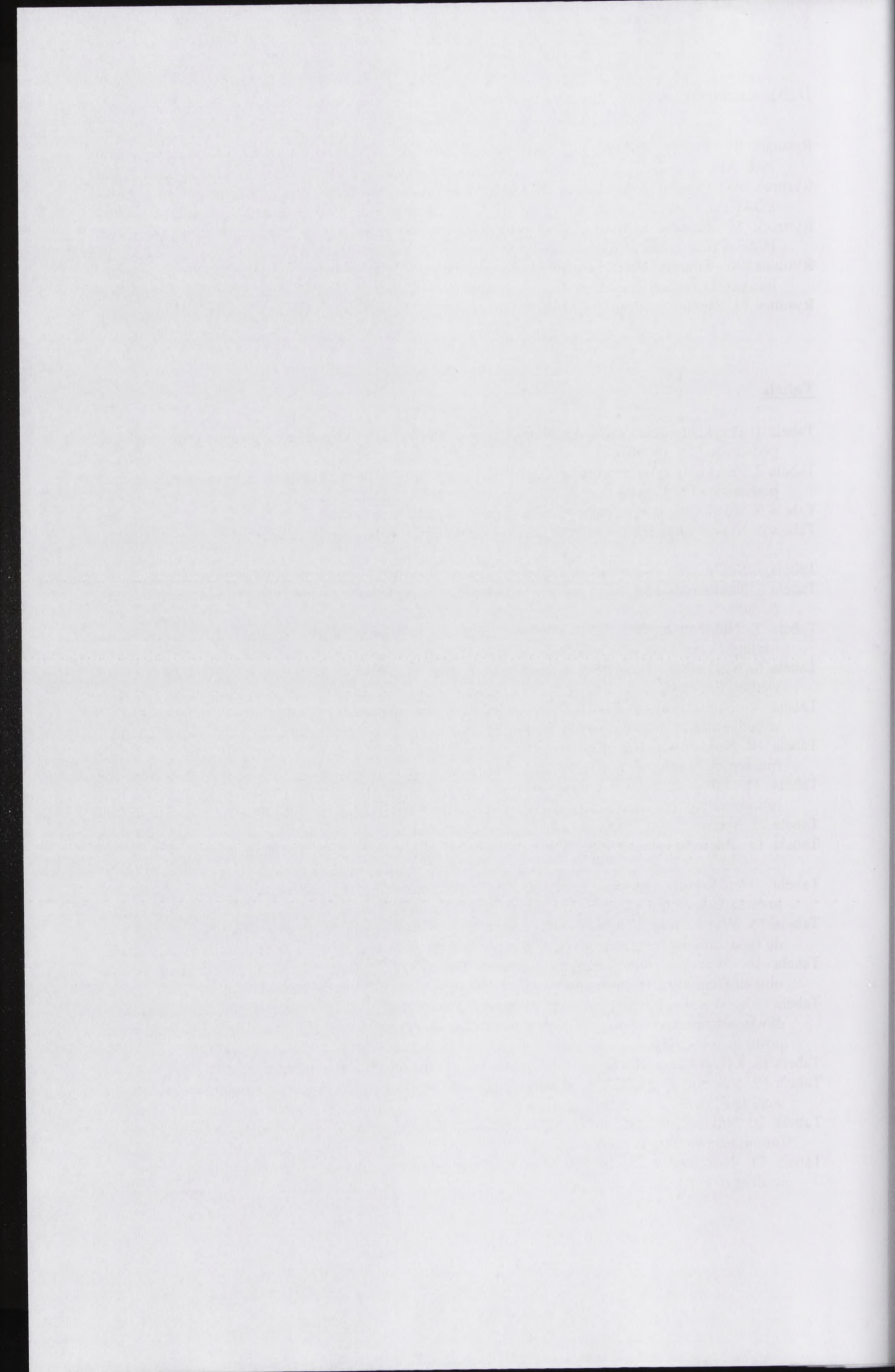


Tabela 22. Oligonukleotydy antysensowe do badań zmian konformacyjnych dużej podjednostki rybosomalnej. ....	160
Tabela 23. Specyficzność interakcji a-DNA – rybosom. ....	162
Tabela 24. Radioaktywność specyficzna [dpm/pmol] oligonukleotydów po znakowaniu .....	163
Tabela 25. Wyniki reakcji wiązania mini-tRNA do rybosomalnych miejsc P lub E. ....	170
Tabela 26. Wyniki reakcji hybrydyzacji antysensowych oligonukleotydów do rybosomów przekształconych w stan pre- lub posttranslokacyjny. Miejsce P lub E obsadzone przez D-tRNA. ....	171
Tabela 27. Wyniki reakcji hybrydyzacji antysensowych oligonukleotydów do rybosomów przekształconych w stan pre- lub posttranslokacyjny. Miejsce P lub E obsadzone przez mini-tRNA antykodonowe. ....	172
Tabela 28. Wyniki reakcji hybrydyzacji antysensowych oligonukleotydów do rybosomów przekształconych w stan pre- lub posttranslokacyjny. Miejsce P lub E obsadzone przez mini-tRNA DHU. ....	173
Tabela 29. Wyniki reakcji hybrydyzacji antysensowych oligonukleotydów do rybosomów przekształconych w stan pre- lub posttranslokacyjny. Miejsce P lub E obsadzone przez mini tRNA TΨC. ....	173
Tabela 30. Wyniki inhibicji reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> przez zhybrydyzowane antysensowe oligonukleotydy do rybosomów przekształconych w stan pre- lub posttranslokacyjny. Miejsce P lub E obsadzone przez D-tRNA. ....	174
Tabela 31. Wyniki inhibicji reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> przez zhybrydyzowane antysensowe oligonukleotydy do rybosomów przekształconych w stan pre- lub posttranslokacyjny. Miejsce P lub E obsadzone przez mini-tRNA antykodonowe. ....	175
Tabela 32. Wyniki inhibicji reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> przez zhybrydyzowane antysensowe oligonukleotydy do rybosomów przekształconych w stan pre- lub posttranslokacyjny. Miejsce P lub E obsadzone przez mini-tRNA DHU. ....	176
Tabela 33. Wyniki inhibicji reakcji wiązania Phe-tRNA <sup>Phe</sup> przez zhybrydyzowane antysensowe oligonukleotydy do rybosomów przekształconych w stan pre- lub posttranslokacyjny. Miejsce P lub E obsadzone przez mini-tRNA TΨC. ....	177

Physiology, 2007

S. A. Kozlov, M.

Wykazywanie

Między innymi

S. K. Rajanick

Correlation of

ribosomal RNA

2007, vol. 164

G. M. Amos, G.

An infant ribo-

during translation



## 12. DOROBEK NAUKOWY

### Artykuły eksperymentalne

1. W. Danielewicz, K. Bąkowska, M. Krzakowa

Variability of downy oak (*Quercus pubescens* Willd.) marginal population in Bielinek (north-western Poland) in morphological traits of leaves, *Annals in Dendrology*, 2003, vol. 50, 43-48

2. M. Krzakowa, K. Bąkowska, W. Danielewicz

Genetic variation patterns in marginal population of pubescent oak (*Quercus pubescens* Willd.) at Bielinek, on the Odra River, *Ecological Questions*, 2004, vol. 4/2004, 77-82

3. T. Twardowski, K. Bąkowska-Żywicka

Conformation and structure correlation of plant ribosomes' RNA, *Acta Biochimica Polonica*, Supplement 2005, vol. 52, 33

4. B. Dudzińska-Bajorek, K. Bąkowska, T. Twardowski

Conformational changes of L-rRNA during elongation of polypeptide, *Journal of Plant Physiology*, 2006, vol. 163, 463-474

5. A. Kietrys, M. Filipiak, K. Bąkowska-Żywicka, T. Twardowski

Wykorzystanie mini-tRNA i strategii antysensu do badania zmian konformacji rybosomu, w: *Młodzi Towaroznawcy 2006*, 2006, 29-32

5. K. Bąkowska-Żywicka, T. Twardowski

Correlation of the structure and conformational changes of selected fragments of plant small ribosomal RNA within the steps of polypeptide chain elongation. *Journal of Plant Physiology*, 2007, vol. 164, 496-504

6. M. Amort, B. Wotzel, K. Bakowska-Zywicka, M.D. Erlacher, R. Micura, N. Polacek

An intact ribose moiety at A2602 of 23S rRNA is key to trigger peptidyl-tRNA hydrolysis during translation termination. *Nucleic Acids Research*, 2007, w druku

12. DĄBROWSKA NAJGŁOŚ

Activity experiments

J.W. Dąbrowska, E. Białowska, M. Kisielewska

Variability of stony oak (*Quercus pedunculata* Willd.) marginal population in Białowieża National Park in morphological traits of leaves, *Annals of Entomology*, 2003, vol. 50, 43-48

Z.M. Kisielewska, E. Białowska, W. Dąbrowska

Genetic variation patterns in marginal population of pedunculate oak (*Quercus pedunculata* Willd.) in Białowieża, on the Głuch River, *Biological Quarterly*, 2004, vol. 43(2004), 77-82

J.T. Twanowski, K. Białowska-Zywicka

Concentration and content of flavonoid compounds in plant rhizomes, *Acta Biologica Polonica Supplement* 2002, vol. 52, 31

E.B. Dąbrowska-Zywicka, T. Twanowski

Conformational changes in t-RNA during elongation of polypeptide, *Journal of Plant Physiology*, 2006, vol. 167, 453-454

Z.A. Kisielewska, M. Kisielewska, K. Białowska-Zywicka, T. Twanowski

Wpływ zmian w strukturze i aktywności kinazy do białka zmiennokształtnej glikolizy, *Wiadomości Botaniczne* 2006, 50(2), 29-32

Z.K. Białowska-Zywicka, T. Twanowski

Conformation of the stony oak and conformational changes of selected fragments of plant small ribosomal RNA within the steps of polypeptide chain elongation, *Journal of Plant Physiology*, 2007, vol. 164, 496-504

E.M. Anwar, H. Wozniak, K. Białowska-Zywicka, M.D. Elshaker, R. Milewska, N. Polonski

An intact ribosome moiety at A-site of 23S rRNA is key to trigger peptidyl-RNA hydrolysis during translation termination, *Biological Chemistry*, 2007, w druku

**Artykuły przeglądowe**

1. K. Bąkowska, B. Dudzińska-Bajorek, T. Twardowski

Mini-tRNA jako narzędzie identyfikacji elementów struktury tRNA odpowiedzialnych za aminoacylację, *Postępy Biochemii*, 2004, vol. 50(1), 2-10

2. K. Bąkowska

Funkcja wybranych fragmentów 16S rRNA małej podjednostki rybosomalnej w procesie biosyntezy białka, *Biotechnologia*, 2005, vol. 2(69), 206-214

3. K. Bąkowska-Żywicka, A. Tyczewska, T. Twardowski

Kontrowersje wokół mechanizmu syntezy wiązania peptydowego w rybosomie, *Postępy Biochemii*, 2006, vol. 52(2), 166-172

4. A. Tyczewska, K. Bąkowska-Żywicka, T. Twardowski

Terapeutyczne zastosowania aptamerów, w: *Na pograniczu chemii i biologii*, 2006, vol. XIV, 175-203

5. K. Bąkowska-Żywicka, A. Kietrys

Molekularne podstawy biosyntezy białka – funkcja 23S rRNA, *Biotechnologia*, 2007, vol. 1(76), 186-196

**Komunikaty konferencyjne ustne**

1. The application of antisense oligonucleotides to the investigation of ribosomal allostery.

Seminarium polsko-niemieckie: Perspectives of structural and computational biology and their practical applications, 25.11.2002, Poznań

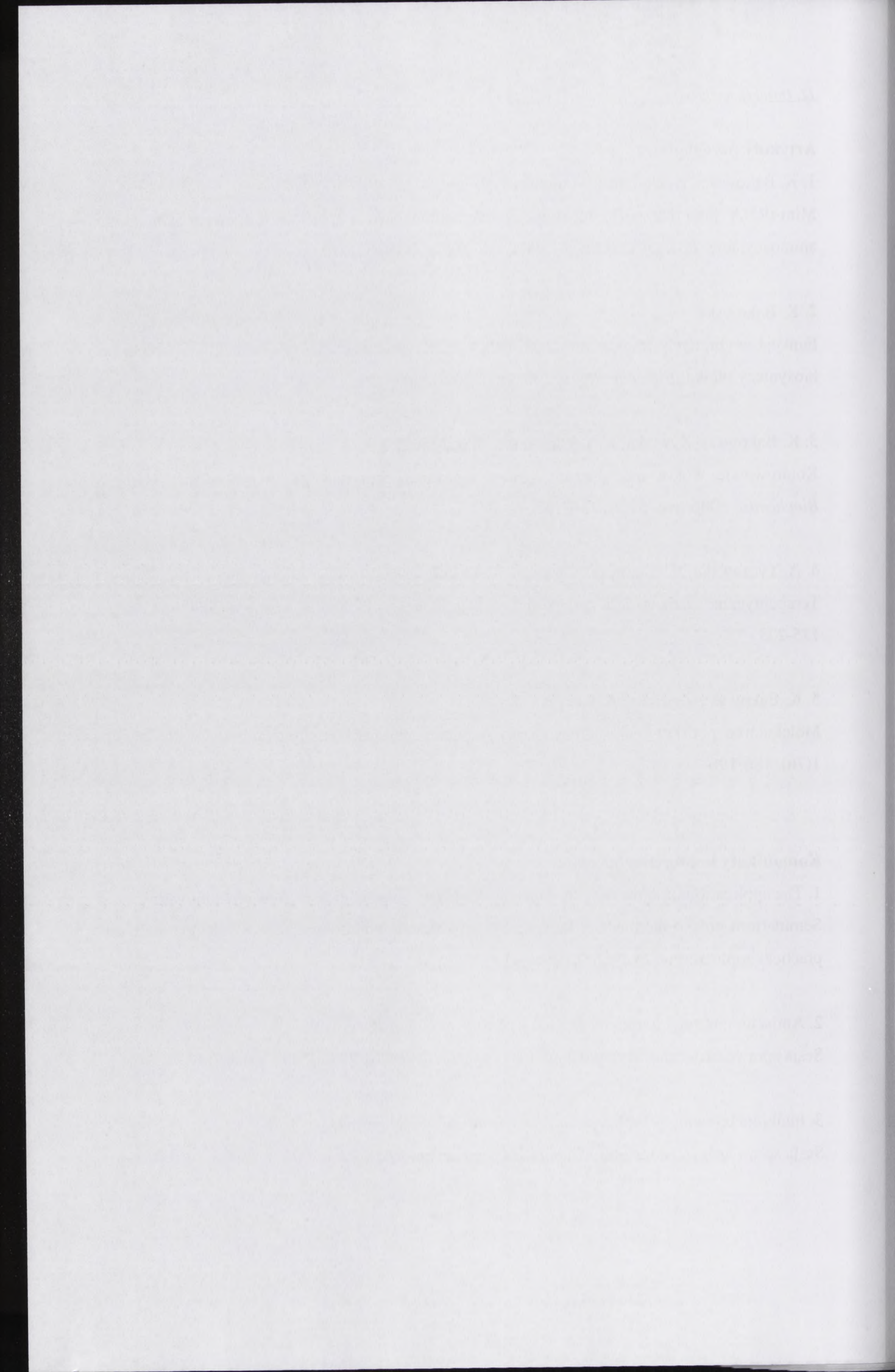
2. Antisense strategy in the investigation of ribosomal allostery.

Sesja sprawozdawcza Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN, 28.04.2003, Poznań

3. Inhibicja biosyntezy białka przez antysensowe oligonukleotydy.

Sesja sprawozdawcza Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN, 1.04.2004, Poznań





4. Is A2602 crucial to termination of translation?

Seminarium Instytutu Higieny oraz Wydziału Genomiki Funkcjonalnej Uniwersytetu w Innsbrucku, 16.07.2004, Innsbruck, Austria

5. Role of the universally conserved A2602 in the ribosomal peptidyl transferase center in translation termination.

Seminarium instytutowe Institute of Molecular Biology, Department of Functional Genomics, Medical University of Innsbruck, 27.08.2004, Innsbruck, Austria

6. Korelacja struktury i funkcji wybranych fragmentów rRNA w regulacji biosyntezy peptydu w układzie roślinnym.

Seminarium instytutowe Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN, 14.12.2004, Poznań

7. Is An intact ribose moiety at A2602 of 23S rRNA is key to trigger peptide release?

Seminarium instytutowe Innsbruck Medical University - Biocenter, Division of Genomics and RNomics, 11.07.2005, Innsbruck, Austria

**Komunikaty konferencyjne pisemne (plakaty)**

1. K. Bąkowska, B. Dudzińska-Bajorek, T. Twardowski

Allosteria rybosomu roślinnego testowana antysensowymi oligonukleotydami.

XXXVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Wrocław, 18-22.09.2002

2. K. Bąkowska, B. Dudzińska-Bajorek, T. Twardowski

Antisense strategy in the investigation of ribosomal allostery.

Sesja sprawozdawcza Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN, Poznań, 28.04.2003

3. K. Bąkowska, B. Dudzińska-Bajorek, T. Twardowski

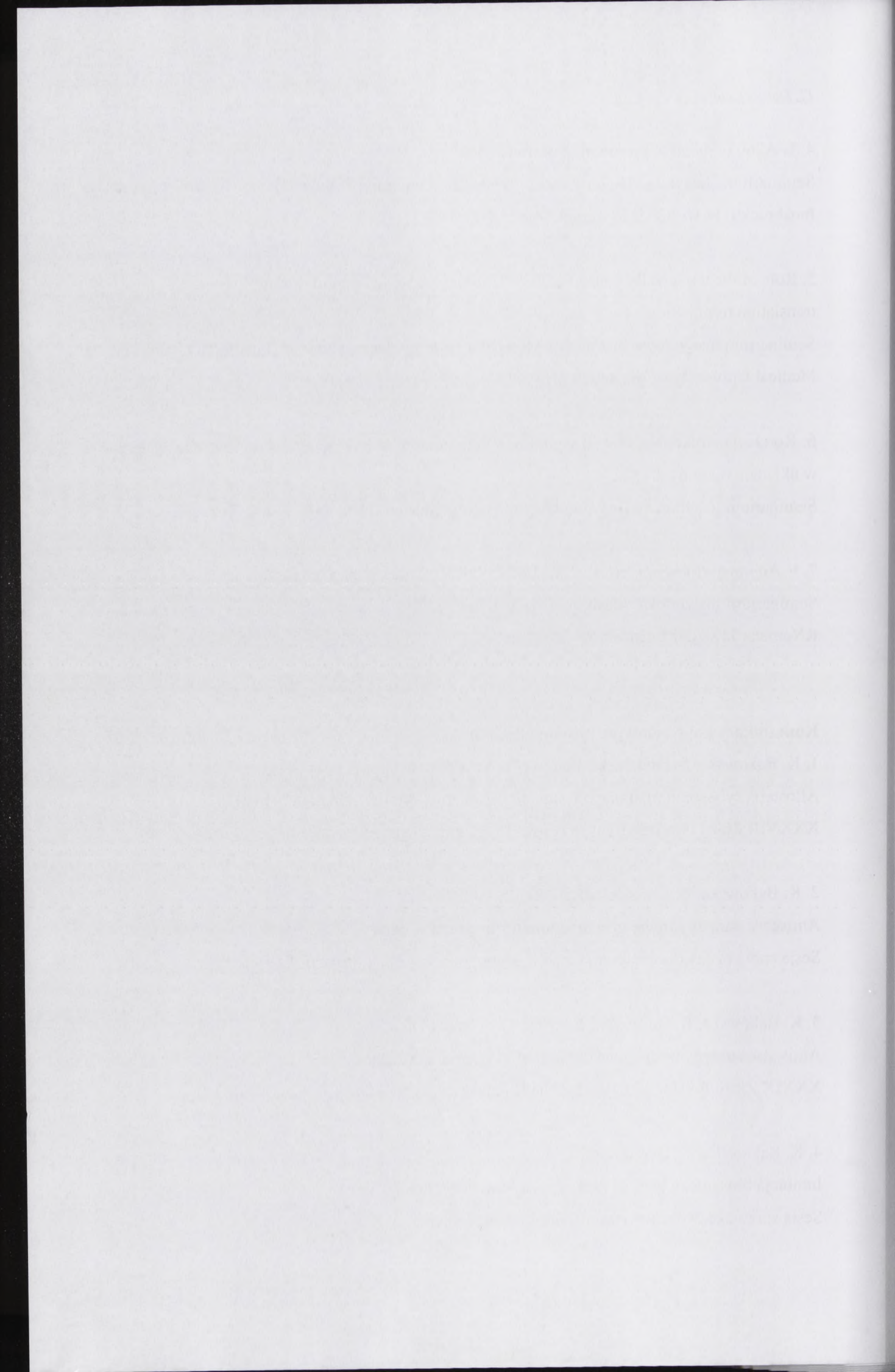
Antisense strategy in the investigation of ribosomal allostery.

XXXIX Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Gdańsk, 16-20.09.2003

4. K. Bąkowska, T. Twardowski

Inhibicja biosyntezy białka przez antysensowe oligonukleotydy.

Sesja sprawozdawcza Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN, Poznań, 1.04.2004



5. B. Wotzel, K. Bąkowska, A. Hütenhofer, N. Polacek

Role of the universally conserved A2602 in the ribosomal peptidyl transferase center in translation termination.

Joint Annual Meeting of Austrian Society for Biochemistry and Molecular Biology, Innsbruck, Austria, 20-22.09.2004

6. K. Bąkowska, R. Polański, T. Twardowski

Structure-function correlation of selected fragments of rRNAs in regulation of translation in plant system.

Sesja sprawozdawcza Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN, Poznań, 2005

7. B. Wotzel, K. Bąkowska, A. Hütenhofer, R. Micura, N. Polacek

Role of the universally conserved A2602 in the ribosomal peptidyl transferase center in translation termination.

Joint Annual Meeting 2005 of the "Austrian Biochemical and Molecular Biology Society", Wiedeń, Austria, 26-28.09.2005

8. K. Bąkowska-Żywicka, A. Kietrys

Korelacja struktury i funkcji wybranych fragmentów rRNA w regulacji biosyntezy peptydu w układzie roślinnym.

Sesja sprawozdawcza Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN, Poznań, 2-3.03.2006

9. A. Kietrys, K. Bąkowska-Żywicka, T. Twardowski

Antisense strategy in the investigation of ribosomal conformational changes.

1st BioScience Partnering Event: Berlin-Brandenburg trifft Poznań, Poznań, 30-31.03.2006

10. K. Bąkowska-Żywicka, T. Twardowski

Structure-function correlation of selected fragments of 18S rRNAs in regulation of translation in plant system.

1st BioScience Partnering Event: Berlin-Brandenburg trifft Poznań, Poznań, 30-31.03.2006

11. K. Bąkowska-Żywicka, T. Twardowski

Conformational changes of small ribosomal subunit rRNA during polipeptide elongation.

XLI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Białystok, 12-15.09.2006

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that this is crucial for ensuring the integrity of the financial data and for facilitating the audit process. The text also mentions the need for regular reconciliations and the use of standardized accounting practices.

In addition, the document highlights the role of internal controls in preventing errors and fraud. It suggests that a robust system of internal controls should be implemented, covering all aspects of the organization's operations. This includes the segregation of duties, the use of authorization procedures, and the implementation of physical security measures.

The second part of the document focuses on the reporting requirements. It details the various financial statements that must be prepared, including the balance sheet, income statement, and cash flow statement. It also discusses the importance of providing clear and concise explanations for any significant changes or unusual items in the financial data.

Furthermore, the document addresses the issue of transparency and communication. It stresses that the organization should be open and forthcoming in its reporting, providing all relevant information to the stakeholders. This includes the timely disclosure of any potential risks or uncertainties that may affect the financial performance.

The final part of the document provides a summary of the key points discussed. It reiterates the importance of accuracy, integrity, and transparency in financial reporting. It also offers some practical advice on how to implement these principles effectively within the organization's accounting system.

In conclusion, the document serves as a comprehensive guide for anyone involved in financial reporting. It provides a clear framework for ensuring that the financial data is reliable, accurate, and transparent. By following the guidelines outlined in this document, organizations can enhance their financial reporting practices and build trust with their stakeholders.

12. A. M. Kietrys, K. Bąkowska-Żywicka, T. Twardowski

Rybosom eukariotyczny jako dynamiczny makrokompleks molekularny.

XLI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Białystok, 12-15.09.2006

12. A. M. Kiselev, K. I. Ponomarev, and V. I. Kiselev, *Izv. Akad. Nauk SSSR Ser. Khim.*, 1977, 1055.  
13. A. M. Kiselev, K. I. Ponomarev, and V. I. Kiselev, *Izv. Akad. Nauk SSSR Ser. Khim.*, 1977, 1055.  
14. A. M. Kiselev, K. I. Ponomarev, and V. I. Kiselev, *Izv. Akad. Nauk SSSR Ser. Khim.*, 1977, 1055.

