

**Daria Sobańska**

**Wydział Biologii**

**Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu**

**Znaczenie sekwencji i struktury mRNA  
i anty-sRNA w ich oddziaływaniach  
z niekodującymi RNA bakterii**

**Promotor: dr hab. Mikołaj Olejniczak, prof. UAM**

**Poznań 2018**

Pracę doktorską wykonano w ramach projektów finansowanych ze środków:

- Narodowego Centrum Nauki – granty OPUS: 2011/01/B/NZ1/05325 „Bakteryjne białko opiekuńcze Hfq w regulacji translacji przez niekodujące RNA” oraz 2014/15/B/NZ1/03330 „Regulacja translacji na etapie elongacji przez niekodujące RNA bakterii”.
- Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej – projekt TEAM: 2011-8/5 „Molecular mechanisms of translation regulation by small RNAs of pathogenic bacteria”.
- Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu - grant Dziekana Wydziału Biologii: GDWB-02/2015 „Analiza zależności pomiędzy kinetyką asocjacji sRNA do mRNA a wydajnością represji translacji”.

***Pragnę złożyć serdeczne podziękowania:***

*Mojemu promotorowi Profesorowi Mikołajowi Olejniczakowi za powierzenie mi wielu ciekawych zadań badawczych, opiekę merytoryczną oraz cenne uwagi i sugestie udzielane mi podczas powstawania tej pracy,*

*Wszystkim Koleżankom i Kolegom z Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii oraz Zakładu Biochemii za wszelką pomoc oraz stworzenie miłej i przyjaznej atmosfery pracy,*

*W szczególności dziękuję:*

*Doktor Ewelinie Małeckiej-Grajek za powierzenie mi kontynuacji projektu dotyczącego oddziaływań z anty-sRNA oraz za pomoc, cenne porady i inspirujące dyskusje nie tylko na tematy naukowe,*

*Magister inżynier Agacie Groszewskiej oraz Magister Joannie Mazur za udostępnienie mi wyników swoich badań, które były niezwykle przydatne w trakcie przygotowywania dyskusji w ramach niniejszej pracy,*

*Magister Ewie Stein za nieocenioną pomoc w sprawdzaniu pracy,*

*Pracownikom Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN: Profesorowi Ryszardowi Kierzkowi, Profesor Elżbiecie Kierzek, Profesor Annie Pasternak, Doktor Marcie Szabat, Doktor Weronice Kotkowiak oraz Magistrowi Tomaszowi Czapikowi za przekazaną wiedzę i pomoc w zakresie technik eksperymentalnych dotyczących odblokowywania i oczyszczania oligorybonukleotydów oraz topień UV,*

*Szczególne wyrazy wdzięczności składam moim Rodzicom i Mężowi, za wsparcie, cierpliwość, wyrozumiałość i niezawodność.*

## SPIS TREŚCI

<b>1. STRESZCZENIE .....</b>	<b>1</b>
<b>2. ABSTRACT .....</b>	<b>3</b>
<b>3. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW .....</b>	<b>5</b>
<b>4. WSTĘP .....</b>	<b>8</b>
<b>4.1 Regulatorowe RNA bakterii.....</b>	<b>8</b>
4.1.1 Klasyfikacja regulatorowych RNA bakterii .....	8
4.1.2 Rola biologiczna <i>trans</i> -kodowanych sRNA.....	11
4.1.3 Biogeneza i struktura sRNA .....	15
4.1.4 Oddziaływania cząsteczek sRNA z regulowanymi mRNA .....	16
4.1.5 Regulacja aktywności sRNA przez cząsteczki anty-sRNA.....	21
<b>4.2 Białko opiekuńcze Hfq jako regulator ekspresji genów.....</b>	<b>26</b>
4.2.1 Struktura i specyficzność rozpoznawania sekwencji RNA przez białko Hfq .....	26
4.2.2 Rola białka Hfq w regulacji ekspresji genów.....	31
4.2.3 Mechanizm działania białka Hfq w oddziaływaniach pomiędzy sRNA a mRNA .....	35
<b>5. CELE PRACY.....</b>	<b>39</b>
<b>6. MATERIAŁY.....</b>	<b>41</b>
<b>6.1 Aparatura .....</b>	<b>41</b>
6.1.1 Urządzenia .....	41
6.1.2 Drobnny sprzęt laboratoryjny .....	42
6.1.3 Kolumny chromatograficzne do izolacji białek .....	43
<b>6.2 Odczynniki chemiczne i zestawy dostępne komercyjnie .....</b>	<b>43</b>
<b>6.2 Enzymy i markery wielkości .....</b>	<b>45</b>
<b>6.3 Oczyszczone białka/ekstrakty bakteryjne .....</b>	<b>45</b>
<b>6.4 Syntetyczne oligonukleotydy.....</b>	<b>46</b>
6.4.1 Syntetyczne oligonukleotydy DNA.....	46
6.4.2 Syntetyczne oligorybonukleotydy.....	48
<b>6.5 Szczepy i plazmidy bakteryjne .....</b>	<b>48</b>
6.5.1 Szczepy bakteryjne .....	48
6.5.2 Plazmidy bakteryjne.....	49
<b>6.6 Podłoża i pożywki .....</b>	<b>49</b>
<b>6.7 Antybiotyki i suplementy dodawane do pożywek .....</b>	<b>50</b>
<b>6.8 Bufory i roztwory .....</b>	<b>50</b>
6.8.1 Bufory i roztwory wykorzystywane do elektroforezy kwasów nukleinowych .....	50
6.8.2 Bufory i roztwory wykorzystywane do elektroforezy białek .....	51
6.8.3 Bufory wykorzystywane do izolacji i analizy oddziaływań z RNA .....	52
6.8.4 Bufory wykorzystywane do hydrolizy enzymatycznej RNA .....	53
6.8.5 Roztwory wykorzystywane do translacji <i>in vitro</i> .....	54
6.8.6 Bufory wykorzystywane do oczyszczania polimerazy z faga T7 .....	55
6.8.7 Bufory wykorzystywane do oczyszczania wariantów białka Hfq z mutacjami .....	56
<b>7. METODY .....</b>	<b>57</b>
<b>7.1 Metody mikrobiologiczne .....</b>	<b>57</b>
7.1.1 Standardowe warunki wzrostu .....	57
7.1.2 Otrzymywanie komórek kompetentnych .....	57
7.1.3 Transformacja komórek kompetentnych .....	58
<b>7.2 Metody biologii molekularnej.....</b>	<b>59</b>
7.2.1 Precypitacja kwasów nukleinowych .....	59

7.2.2	Oczyszczanie oligonukleotydów .....	59
7.2.3	Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) .....	59
7.2.4	Elektroforeza w żelu agarozowym.....	61
7.2.5	Klonowanie do wektora pGEM .....	62
<b>7.3</b>	<b>Metody pracy z RNA.....</b>	<b>62</b>
7.3.1	Transkrypcja <i>in vitro</i> .....	62
7.3.2	Oczyszczanie RNA na żelu denaturującym .....	63
7.3.3	Synteza chemiczna oligorybonukleotydów .....	63
7.3.4	Znakowanie radioaktywne RNA na 5' końcu .....	64
7.3.5	Wyznaczanie parametrów termodynamicznych krótkich dupleksów RNA.....	65
7.3.6	Wyznaczanie stałej równowagi reakcji dysocjacji kompleksów RNA.....	65
7.3.7	Wyznaczanie wartości IC <sub>50</sub> z reakcji kompetycji w równowadze.....	66
7.3.8	Wyznaczanie obserwowanej szybkości asocjacji i stałej szybkości asocjacji kompleksów ..	67
7.3.9	Wyznaczanie struktury RNA – hydroliza enzymatyczna .....	68
7.3.10	Translacja <i>in vitro</i> .....	69
<b>7.4</b>	<b>Metody pracy z białkami .....</b>	<b>70</b>
7.4.1	Liza komórek .....	70
7.4.2	Elektroforeza SDS-PAGE.....	71
7.4.3	Izolacja białek z zastosowaniem chromatografii metalopowinowactwa .....	71
7.4.4	Izolacja białek z zastosowaniem filtracji żelowej.....	72
7.4.5	Trawienie nukleazami .....	72
7.4.6	Dializa.....	72
7.4.7	Oznaczanie stężenia białek.....	73
7.4.8	Skrócona procedura izolacji polimerazy RNA z faga T7/białka Hfq.....	73
<b>8.</b>	<b>WYNIKI .....</b>	<b>75</b>
<b>8.1</b>	<b>Znaczenie sekwencji mRNA sąsiadującej z miejscem wiązania regulatorowego sRNA RybB dla ich oddziaływania oraz represji translacji <i>in vitro</i> .....</b>	<b>75</b>
8.1.1	Badane cząsteczki RNA .....	75
8.1.2	Obecność reszty purynowej w pozycji 3' względem miejsca wiązania sRNA RybB w różnych cząsteczkach mRNA zwiększa stabilność termodynamiczną ich oddziaływań .....	78
8.1.3	Szybkość wiązania sRNA RybB do różnych cząsteczek mRNA zależy od rodzaju reszty nukleotydowej w pozycji 3' .....	83
8.1.4	Analiza strukturalna cząsteczek mRNA potwierdza silniejsze oddziaływanie RybB z cząsteczkami posiadającymi resztę purynową w pozycji 3' .....	87
8.1.5	W obecności białka opiekuńczego Hfq szybkość asocjacji sRNA RybB do różnych cząsteczek mRNA jest podobna .....	89
8.1.6	Wydajność represji translacji mRNA <i>ompC in vitro</i> jest zależna od sekwencji mRNA sąsiadującej z miejscem wiązania sRNA RybB.....	92
<b>8.2</b>	<b>Porównanie roli białka Hfq w oddziaływaniach cząsteczek sRNA z cząsteczkami anty-sRNA oraz mRNA.....</b>	<b>95</b>
8.2.1	Wprowadzenie .....	95
8.2.2	Analiza struktury drugorzędowej cząsteczek: sRNA GcvB oraz anty-sRNA <i>chbBC-IGR</i> , 3'ETS <sup>leuZ</sup> i AgvB.....	98
8.2.3	Cząsteczki anty-sRNA inaczej oddziałują z miejscami wiązania RNA na powierzchni Hfq niż cząsteczki sRNA .....	102
8.2.4	Białko opiekuńcze Hfq uczestniczy w oddziaływaniach sRNA z cząsteczkami anty-sRNA w sposób podobny jak w oddziaływaniach sRNA klasy I i klasy II z regulowanymi przez nie cząsteczkami mRNA.....	105
<b>9.</b>	<b>DYSKUSJA .....</b>	<b>119</b>
<b>9.1</b>	<b>Znaczenie sekwencji mRNA w oddziaływaniach z sRNA .....</b>	<b>119</b>
9.1.1	Rola sekwencji mRNA w stabilizowaniu kompleksu sRNA-mRNA .....	119
9.1.2	Znaczenie sekwencji mRNA w przyspieszaniu asocjacji sRNA do mRNA .....	122
9.1.3	Udział białka Hfq w tworzeniu kompleksu sRNA z mRNA.....	123
<b>9.2</b>	<b>Występowanie podobnych motywów sekwencji w cząsteczkach anty-sRNA i mRNA jest ważne dla zależnych od Hfq oddziaływań z regulatorowymi sRNA .....</b>	<b>126</b>

9.2.1	Znaczenie struktury anty-sRNA i sRNA dla ich oddziaływań .....	126
9.2.2	Podobne motywy w sekwencjach anty-sRNA i mRNA.....	128
9.2.3	Rola białka Hfq w oddziaływaniu sRNA z anty-sRNA oraz z mRNA.....	130
<b>10.</b>	<b>WNIOSKI .....</b>	<b>134</b>
<b>11.</b>	<b>REFERENCJE .....</b>	<b>136</b>

## 1. STRESZCZENIE

W przedstawionej pracy doktorskiej badano znaczenie sekwencji i struktury regulowanych mRNA oraz cząsteczek anty-sRNA w ich oddziaływaniach z niekodującymi RNA bakterii (sRNA). Do tej pory nie określono jednoznacznie znaczenia zachowanych ewolucyjnie sekwencji mRNA znajdujących się w sąsiedztwie miejsca wiązania sRNA. Niewiele wiadomo także na temat sposobu działania białka Hfq w promowaniu oddziaływań cząsteczek sRNA z regulującymi ich poziom w komórce cząsteczkami anty-sRNA. Aby wyjaśnić pierwsze zagadnienie dotyczące roli sekwencji mRNA w wiązaniu regulatorowych sRNA, w niniejszej pracy zbadano oddziaływania sRNA RybB z *S. enterica* z komplementarnymi mRNA posiadającymi różne reszty nukleotydowe w pozycji 3' względem miejsca wiązania RybB. Druga część pracy dotyczyła poznania znaczenia sekwencji i struktury mRNA i anty-sRNA w zależnych od białka Hfq oddziaływaniach sRNA z cząsteczkami anty-sRNA oraz z regulowanymi przez nie mRNA. Badania wykonano, porównując oddziaływania z *E. coli*: sRNA klasy II ChiX z anty-sRNA *chbBC*-IGR oraz mRNA *chiP*, a także sRNA klasy I RybB z komplementarnym anty-sRNA 3'ETS<sup>leuZ</sup> oraz mRNA *tsx*. Ponadto zbadano udział białka Hfq w asocjacji sRNA klasy I GcvB z regulatorowym anty-sRNA AgvB z *E. coli*.

Wyniki badań dotyczących pierwszego zagadnienia pokazały, że obecność reszty purynowej w pozycji 3' względem miejsca wiązania sRNA w mRNA zwiększa stabilność termodynamiczną zarówno krótkich dupleksów RNA odpowiadających miejscom oddziaływania sRNA RybB z mRNA *ompC*, *tsx* i *ompW*, jak i kompleksów tworzonych przez naturalną cząsteczkę RybB z fragmentami mRNA *ompC*, *tsx*, *ompW*, *ompS* i *ompA*. Zostało to potwierdzone przez analizę struktury mRNA *ompC* związanego z RybB. Ponadto ustalono, że rodzaj reszty nukleotydowej w pozycji 3' względem miejsca wiązania sRNA w mRNA wpływa na szybkość asocjacji sRNA RybB do mRNA. Określono, że obecność białka Hfq zmniejsza znaczenie sekwencji mRNA sąsiadującej z miejscem wiązania sRNA dla oddziaływań cząsteczki RybB z regulowanymi mRNA. Co więcej, wskazano, że cząsteczki mRNA *ompC* posiadające resztę purynową w pozycji 3' ulegają bardziej

wydajnej represji translacji w obecności RybB, niż te, które posiadają resztę pirymidynową.

Badania w drugiej części pracy wykazały, że struktury anty-sRNA AgvB oraz 3'ETS<sup>leuZ</sup> przypominają te tworzone przez sRNA, ponieważ zawierają spinkę terminatorową na końcu 3', za którą następuje sekwencja oligo(U), podczas gdy struktura anty-sRNA *chbBC*-IGR nie zawiera stabilnych struktur drugorzędowych. Co więcej, wskazano, że sekwencje odpowiedzialne za oddziaływanie z komplementarnymi RNA w strukturach anty-sRNA AgvB, 3'ETS<sup>leuZ</sup> i *chbBC*-IGR oraz sRNA GcvB są zlokalizowane w dostępnych dla wiązania regionach jednoniciowych. Z kolei sekwencje rozpoznawane przez białko Hfq w cząsteczkach anty-sRNA i mRNA wiążących się z tą samą cząsteczką sRNA zawierają podobne motywy, co może wyjaśniać podobieństwo w ich oddziaływaniach z Hfq. Określono, że oddziaływania sRNA klasy II ChiX z anty-sRNA *chbBC*-IGR, jak i z mRNA *chiP* wykazują porównywalny mechanizm działania białka Hfq. Z kolei oddziaływanie sRNA klasy I RybB z anty-sRNA 3'ETS<sup>leuZ</sup> przejawia zbliżony sposób interakcji z białkiem Hfq, co podczas wiązania RybB z mRNA *tsx*. Natomiast oddziaływanie sRNA klasy I GcvB z anty-sRNA AgvB z w kompleksie z Hfq jest podobne do wiązania sRNA klasy II z regulowanymi mRNA, w którym rolę sRNA pełni AgvB, a GcvB zachowuje się jak mRNA

Podsumowując, wyniki niniejszej pracy stanowią wkład w poznanie znaczenia sekwencji i struktury cząsteczek RNA w oddziaływaniach sRNA bakterii z cząsteczkami mRNA oraz anty-sRNA. Zaproponowano, że ewolucyjna preferencja reszt purynowych w sekwencjach mRNA w pobliżu miejsca oddziaływania z sRNA umożliwia wydajną interakcję tych RNA, co prowadzi do efektywnej represji translacji mRNA. Ponadto scharakteryzowano sposób oddziaływania anty-sRNA z regulowanymi sRNA w kompleksie z białkiem Hfq. Ustalono, że zależne od Hfq wiązanie sRNA z cząsteczkami anty-sRNA oraz mRNA wykazuje zbliżony mechanizm, co może wynikać z podobieństwa w sekwencjach rozpoznawanych przez mRNA i anty-sRNA oraz białko Hfq.

## 2. ABSTRACT

In the presented PhD dissertation, the significance of sequence and structure of regulated mRNAs, and anti-sRNA molecules for their interactions with bacterial noncoding RNAs (sRNAs) was examined. So far, the significance of the evolutionally conserved mRNA sequence located in the neighborhood to the sRNA binding sites was not resolved. Little is known about the mode of Hfq action in promotion of sRNA interactions with anti-sRNAs, which regulate sRNA level in the cell. To elucidate the first issue about the role of mRNA sequence for binding of regulatory sRNAs in the presented PhD thesis, *S. enterica* RybB sRNA interactions with complementary mRNAs containing different nucleotides located 3' to the RybB binding sites were analyzed. The second part of the dissertation applied to the determination of the importance of mRNA and anti-sRNA sequence and structure for Hfq-dependent sRNA interactions with anti-sRNAs. Research was done by comparison of *E. coli* interactions: class II sRNA ChiX binding with anti-sRNA *chbBC*-IGR and with *chiP* mRNA, and class I sRNA RybB with anti-sRNA 3'ETS<sup>leuZ</sup>, and with *tsx* mRNA. Moreover, the contribution of the Hfq protein in class I sRNA GcvB association with regulatory anti-sRNA from *E. coli* was examined.

Results applied to the first issue pointed out that the presence of the purine residue 3' to the sRNA binding site in the mRNA sequence increases the thermodynamic stability of not only short RNA duplexes corresponding to the RybB interaction sites with *ompC*, *tsx* and *ompW* mRNAs, but also natural RybB with *ompC*, *tsx*, *ompW*, *ompS* and *ompA* mRNA fragments. It was also confirmed by footprinting analysis of RybB bound to *ompC* mRNA. Moreover, it was determined that the identity of the nucleotide residue located 3' to the sRNA binding sites in the mRNA sequence influences the rate of RybB association to mRNA targets. It was also evaluated that the presence of the Hfq protein decreases the significance of the mRNA sequence neighboring the sRNA binding sites for RybB interactions with regulated mRNAs. Moreover, it was pointed out that *ompC* mRNAs containing purines in the 3' position are more efficiently repressed by RybB sRNA than those with pyrimidines.

Examination of the second part of this thesis evaluated that anti-sRNA AgvB, and 3'ETS<sup>leuZ</sup> structures are similar to those formed by sRNAs, because contain terminator stem loop at the 3' end followed by oligo(U) sequence, while anti-sRNA

*chbBC*-IGR doesn't form stable secondary structures. Moreover, it was determined that sequences responsible for interactions with complementary RNAs in anti-sRNA AgvB, 3'ETS<sup>leuZ</sup>, and *chbBC*-IGR, and in GcvB sRNA are localized in the single stranded, available for binding regions. In turn, sequences recognized by Hfq protein in anti-sRNAs and mRNAs complementary to the same sRNAs contain similar motifs, which can explain their resemblance in interactions with Hfq. It was evaluated that the mechanism of class II sRNA ChiX binding with both *chbBC*-IGR anti-sRNA and *chiP* mRNA is similar. Moreover, class II sRNA RybB interaction with both 3'ETS<sup>leuZ</sup> and *tsx* mRNA display resemblance in the way of Hfq binding. By contrast, class I sRNA GcvB interaction with AgvB anti-sRNA in the complex with Hfq is comparable to class II sRNAs interactions with regulated mRNAs, in which AgvB plays a role of class II sRNA, and GcvB behaves as if it were mRNA.

Overall, results presented in this dissertation provide contribution to the knowledge about the RNA sequence and structure for bacterial sRNAs interactions with mRNA molecules and with regulatory anti-sRNAs. It was proposed that the evolutionary preference for purine residues in the mRNA sequences close to the sRNA binding sites enables efficient interactions of those RNAs, which leads to effective mRNA translation repression. Moreover, the mode of anti-sRNAs interactions with regulatory sRNAs in a complex with the Hfq protein was characterized. It was determined that Hfq-dependent sRNA binding with anti-sRNAs and mRNAs shows similar mechanism, which can be explained by the resemblance of sequences recognized by sRNAs and Hfq in mRNAs and anti-sRNAs.

**3. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW**

% (v/v)	stężenie procentowe objętościowe
% (w/v)	stężenie procentowe objętościowo-masowe
A	adenozyna
ABC	kaseta wiązania ATP (ang. <i>ATP-binding cassette</i> )
AMP	adenozyno-5'-monofosforan
anty-sRNA	regulatorowe małe RNA oddziałujące z sRNA
APS	nadsiarczan amonu
ATP	adenozyno-5'-trifosforan
C	cytydina
cAMP	cykliczny adenozyno-3',5'-monofosforan
ceRNA	RNA regulujące poziom sRNA (ang. <i>competing endogenous RNA</i> )
CLASH	sieciowanie krzyżowe, ligacja i sekwencjonowanie hybryd
CLIP-seq	immunoprecypitacja poprzedzona sieciowaniem krzyżowym i sekwencjonowanie
Co-IP	koimmunoprecypitacja
CP	fosforan kreatyny
CRP	białko C-reaktywne
CTP	cytydino-5'-trifosforan
Da	Dalton
DMF	dimetyloformamid
DNA	kwasy deoksyrybonukleinowe
DTT	ditiotreitol
EDTA	kwasy etylenodiaminotetraoctowe
EMSA	metoda różnicowej migracji w żelu poliakrylamidowym (EMSA – ang. <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> )
G	guanozyna
g	przyspieszenie grawitacyjne
G6P	glukoza-6-fosforan
GFP	białko zielonej fluorescencji (ang. <i>green fluorescent protein</i> )
Grad-seq	profilowanie gradientowe z użyciem RNA-seq
GRIL-seq	globalna identyfikacja regulowanych mRNA dla danego sRNA przez ligację i sekwencjonowanie

GTP	guanozyno-5'-trifosforan
H	entalpia
HEPES	N-(2-hydroksyetylo)piperazyna-N'-2-kwas 2-etanosulfonowy
HF	kwaz fluorowodorowy
$IC_{50}$	stężenie RNA wywołujące inhibicję wiązania o 50% (ang. <i>half maximal inhibitory concentration</i> )
IMP	poryny błony wewnętrznej (ang. <i>inner membrane proteins</i> )
IPTG	izopropylotiogalaktozyd
$K_d$	równowagowa stała dysocjacji (ang. <i>equilibrium dissociation constant</i> )
$k_{obs}$	obserwowana szybkość asocjacji
$k_{off}$	stała szybkość dysocjacji
$k_{on}$	stała szybkość asocjacji
LA	Podłoże hodowlane Lennox Broth z agarem
LB	Podłoże hodowlane Lennox Broth
M	molowy
MAPS	oczyszczanie z wykorzystaniem powinowactwa do białka MS2
min	minuta
mRNA	matrycowy RNA (ang. <i>messenger RNA</i> )
N	dowolny nukleotyd
nt	nukleotyd
°C	stopnie Celsjusza
OD	gęstość optyczna (ang. <i>optical density</i> )
OMP	poryny błony zewnętrznej (ang. <i>outer membrane proteins</i> )
PCR	łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. <i>polymerase chain reaction</i> )
PEG 8000	glikol polietylenowy 8000
PNK	kinaza polinukleotydowa
PTS	system fosfotransferazy
R	puryna
RBS	miejsce wiązania rybosomu (ang. <i>ribosome binding site</i> )
RIL-seq	oddziaływanie RNA przez ligację i sekwencjonowanie
RIP-seq	immunoprecypitacja RNA w warunkach natywnych i RNA-seq
RNA	kwaz rybonukleinowy

RNA-seq	sekwencjonowanie RNA
rpm	obroty na minutę (ang. <i>revolutions per minute</i> )
S	entropia
SANS	technika małokątowego rozpraszania neutronów (ang. <i>small-angle neutron scattering</i> )
SAXS	rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego pod małymi kątami (ang. <i>small-angle X-ray scattering</i> )
SD	sekwencja Shine-Dalgarno
SDS	laurylosiarczan sodu
SDS-PAGE	elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących
SHAPE	technika chemicznego badania struktury drugorzędowej (ang. <i>selective 2'-hydroxyl acylation and primer extension</i> )
sRNA	małe regulatorowe RNA bakterii
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametyloetylenodiamina
Tris	tris(hydroksymetylo)aminometan
tRNA	transferowy RNA
U	urydyna
U	jednostka enzymatyczna (ang. <i>unit</i> )
UTP	urydino-5'-trifosforan
UTR	region RNA niepodlegający translacji (ang. <i>untranslated region</i> )
UV	światło ultrafioletowe
WT	typ dziki (ang. <i>wild type</i> )
$\Delta G$	zmiana entalpii swobodnej

## 4. WSTĘP

Małe niekodujące RNA są regulatorami występującymi we wszystkich królestwach organizmów. U bakterii małe regulatorowe RNA (sRNA) odgrywają szczególną rolę w adaptacji do zmieniających się warunków środowiska, odpowiedzi na stres oraz wirulencji. sRNA oddziałują z mRNA za pomocą komplementarnych sekwencji i regulują translację lub stabilność mRNA. W oddziaływaniach tych uczestniczą białka pomocnicze, których przykładem jest białko opiekuńcze Hfq. Pośredniczy ono w regulacji przy udziale sRNA stabilizując RNA, przyspieszając powstawanie kompleksów sRNA-mRNA oraz wpływając na zmianę struktury RNA.

### 4.1 Regulatorowe RNA bakterii

#### 4.1.1 Klasyfikacja regulatorowych RNA bakterii

Regulatorowe RNA bakterii są odpowiedzialne za kontrolę ekspresji genów na różnych poziomach – oddziałują z DNA, wpływają na stabilność mRNA, transkrypcję i translację. Wśród RNA bakterii, które pełnią funkcje regulatorowe wyróżniamy ryboprzełączniki (ang. *riboswitches*), małe regulatorowe RNA (sRNA) oraz CRISPR RNA.

Ryboprzełączniki kontrolują ekspresję genów przez oddziaływanie ze specyficznymi małymi cząsteczkami, co powoduje allosteryczne zmiany struktury regulowanego mRNA. Proces ten nie jest zależny od oddziaływania z czynnikami białkowymi. Sekwencje ryboprzełączników są zazwyczaj zlokalizowane w regionie 5'UTR cząsteczki mRNA, która jest przez nie regulowana (Dambach i Winkler, 2009, Garst i Batey, 2009, Smith i wsp., 2010, Serganov i Nudler, 2013). Cząsteczki te posiadają dwie domeny: aptamer oraz platformę ekspresyjną. Aptamer zawiera domenę wiążącą ligand o długości od około 30 do 200 nukleotydów (Winkler i wsp., 2002, Roth i wsp., 2007, Rieder i wsp., 2010). Po związaniu ligandu platforma ekspresyjna ulega konformacyjnym zmianom struktury, co wywołuje zmiany w ekspresji na poziomie transkrypcji lub translacji. Ryboprzełączniki regulujące transkrypcję zazwyczaj zawierają wzajemnie się wykluczające struktury antyterminatorowe i terminatorowe, powodujące terminację transkrypcji. Z kolei ryboprzełączniki kontrolujące translację powodują zmianę struktury regulowanego mRNA w sposób, który uniemożliwia wiązanie rybosomu.

Ryboprzełączniki wiążą metabolity komórkowe takie jak: aminokwasy i ich pochodne, kwasy karboksylowe, koenzymy, nukleozasady oraz ich pochodne (Barrick i Breaker, 2007, Sudarsan i wsp., 2008). Ponadto takie cząsteczki RNA oddziałują z jonami:  $Mg^{2+}$  (Cromie i wsp., 2006, Dann i wsp., 2007),  $Mn^{2+}$  (Dambach i wsp., 2015, Price i wsp., 2015),  $Ni^{2+}/Co^{2+}$  (Furukawa i wsp., 2015) lub  $F^{-}$  (Baker i wsp., 2012).

Małe regulatorowe RNA (sRNA) oddziałują bezpośrednio z białkami i regulują ich aktywność lub wiążą RNA na zasadzie komplementarnego parowania i kontrolują ekspresję genów. Część sRNA oddziałujących z białkami posiada aktywność enzymatyczną np. M1 RNA, który wraz z białkiem C5 tworzy enzym endonukleolityczny RNAzę P. Rolą innych małych regulatorowych RNA jest tworzenie nieaktywnego rusztowania kompleksu rybonukleoproteinowego np. 4.5S i tmRNA. Innym przykładem są sRNA, które regulują aktywność białek przez naśladowanie struktury innych kwasów nukleinowych. Należą do nich sRNA z rodziny CsrB/RsmZ (Romeo i wsp., 2013). Używają one krótkich sekwencji o określonym motywie, które oddziałują z wieloma cząsteczkami białka CsrA. Nadekspresja tego białka powoduje represję wielu mRNA, co prowadzi do plejotropowych efektów fenotypowych. Kolejnym przykładem RNA wpływającego bezpośrednio na aktywność białka jest powszechnie występujące w komórce bakteryjnej RNA 6S (Steuten i wsp., 2014, Chen i wsp., 2017). Dowiedziono, że formuje ono stabilny kompleks z formą holoenzymu  $\sigma^{70}$  polimerazy RNA ( $\sigma^{70}$ -RNAPol) (Wassarman i Storz, 2000). Oddziaływanie polega na imitowaniu struktury otwartego kompleksu promotorowego przez RNA 6S, co powoduje inhibicję transkrypcji z promotorów zależnych od  $\sigma^{70}$ . Ciekawym przykładem bezpośredniego oddziaływania sRNA z białkiem jest system regulacji sRNA GlmY/GlmZ u *E. coli* (Gopel i wsp., 2014). sRNA GlmZ aktywuje mRNA kodujące enzym GlmS (Kalamorz i wsp., 2007), którego wysoki poziom prowadzi z kolei do uruchomienia mechanizmów stresu błony komórkowej. W efekcie RNaza E degradowuje GlmZ, w czym pośredniczy białko adaptorowe RapZ. Kiedy poziom enzymu GlmS jest niski, dochodzi do akumulacji homologicznego sRNA GlmY, które dzięki podobieństwu do sRNA GlmZ sekwestruje RapZ. W efekcie GlmZ nie ulega degradacji i pozytywnie reguluje enzym GlmS przywracając jego homeostazę (Gopel i wsp., 2013).

Mechanizmem chroniącym bakterie przed bakteriofagami oraz plazmidami jest system CRISPR-Cas bazujący na działaniu RNA CRISPR (crRNA) (Marraffini, 2015). Ulega ono ekspresji z genomowego *loci* zawierającego sekwencję pochodzącą z kwasów nukleinowych wprowadzonych do komórki podczas poprzednich infekcji. crRNA jest swoistym „przewodnikiem” dla białek Cas, które hydrolizują wirusowe RNA. To skutkuje wytworzeniem odporności adaptacyjnej na kolejne infekcje. Systemy CRISPR dzielą się na pięć typów różniących się pozycją CRISPR na chromosomie, a zależy ona od składu białka Cas (Makarova i wsp., 2015).

Kolejną grupą małych RNA (sRNA) są RNA działające na zasadzie komplementarnego parowania z regulowanym mRNA. Ze względu na usytuowanie względem sekwencji kodującej mRNA, z którymi oddziałują dzieli się je na kodowane w pozycji *cis* lub *trans*.

Transkrypty sRNA kodowanych *cis* powstają na matrycy nici DNA antysensownej w stosunku do regulowanego mRNA, co skutkuje powstaniem długiego regionu komplementarnego w miejscu ich oddziaływania (Wagner i wsp., 2002, Brantl, 2007). Większość dobrze scharakteryzowanych *cis*-kodowanych sRNA znajduje się w sekwencji plazmidów lub innych mobilnych elementów genetycznych, jednak znane są również przykłady ich wersji chromosomalnych. Rolą większości sRNA kodowanych *cis* ulegających ekspresji z bakteriofagów, plazmidów i transpozonów jest utrzymanie odpowiedniej liczby kopii mobilnych elementów genetycznych (Wagner i wsp., 2002, Brantl, 2007). Przykładem jest RNA Cole1 powstające na matrycy DNA plazmidu, który hamuje tworzenie miejsca inicjacji replikacji. Z kolei RNA Tn10 pOUT hamuje translację transpozazy. Do chromosomalnie *cis*-kodowanych sRNA należą cząsteczki scharakteryzowane jako toksyny należące do systemu toksyna-antytoksyna typu I (SibA-E, SymR) (Kawano i wsp., 2007, Fozo i wsp., 2008). Ich transkrypty powstają antysensownie do regulowanych mRNA kodujących białko toksyny. Kolejnym przykładem jest sRNA GadY u *E. coli*, które oddziałuje komplementarnie z mRNA *gadX* kodującym aktywator transkrypcji systemu odpowiedzi na środowisko kwasowe (Opdyke i wsp., 2004). Ponadto na wyspach patogenności u *S. Typhimurium* zidentyfikowano liczne *cis*-kodowane sRNA regulujące procesy infekcji i wirulencji (Padalon-Brauch i wsp., 2008).

Sekwencje kodujące sRNA w pozycji *trans* znajdują się w miejscach odległych od regulowanego przez nie mRNA. Parowanie z regulowanym mRNA odbywa się przy pomocy krótkiego, nie w pełni komplementarnego, konserwatywnego regionu. Większość tego typu małych regulatorowych RNA oddziałuje z białkiem opiekuńczym Hfq, które jest niezbędne do utrzymania ich stabilności oraz zdolności do asocjacji z regulowanymi mRNA (Vogel i Luisi, 2011, De Lay i wsp., 2013, Updegrave i wsp., 2016). *Trans*-kodowane sRNA są przedmiotem niniejszej pracy i zostaną szczegółowo scharakteryzowane w kolejnych podrozdziałach.

#### 4.1.2 Rola biologiczna *trans*-kodowanych sRNA

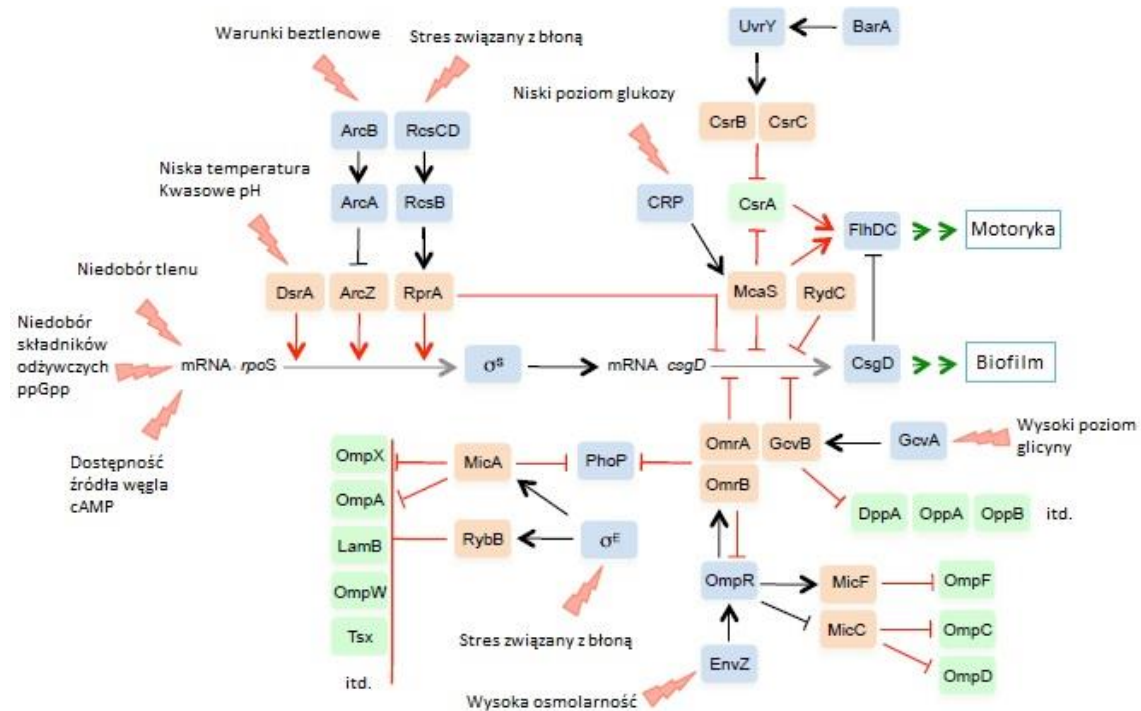
Ekspresja małych *trans*-kodowanych sRNA bakterii jest indukowana w odpowiedzi na zmieniające się warunki środowiska, a także w procesach związanych z patogennością bakterii. Wiele z nich reguluje ekspresję białek błonowych (CyaR, MicA, MicC, MicF, OmrA, OmrB i RybB) lub transporterowych (SgrS, RydC, GcvB), a także związanych z metabolizmem. Do szlaków odpowiedzi komórkowej regulowanych przez sRNA należą: homeostaza żelaza, remodelowanie membrany, tworzenie biofilmu, metabolizm cukrów, regulacja czynników transkrypcyjnych, kontrola ekspresji genów wirulencji, udział w systemach toksyna-antytoksyna oraz wiele innych (Ryc. 1). Poniżej opisano dwa wybrane szlaki odpowiedzi komórkowej, w których uczestniczą sRNA.

#### Stres związany z błoną komórkową

Odpowiedź na stres wywołany uszkodzeniami błony komórkowej jest zależna od aktywności sRNA związanych z czynnikiem  $\sigma^E$  dla białek błony zewnętrznej (Ryc. 2A) lub z systemem Cpx dla białek zlokalizowanych w błonie wewnętrznej (Ryc. 2B).

Działanie  $\sigma^E$  polega na aktywacji genów, które kodują proteazy oraz białka opiekuńcze, umożliwiając degradację lub renaturację źle sfałdowanych poryn błonowych OMP (ang. *outer membrane proteins*) (Rhodius i wsp., 2006). Jednakże  $\sigma^E$  nie może bezpośrednio hamować produkcji białek OMP. Dlatego czynnik ten indukuje ekspresję trzech represorowych sRNA: MicA, RybB i MicL, których działanie polega na oddziaływaniu i degradacji mRNA kodujących poryny błonowe i lipoproteiny (Papenfert i wsp., 2006, Gogol i wsp., 2011, Guo i wsp., 2014). Zaletą

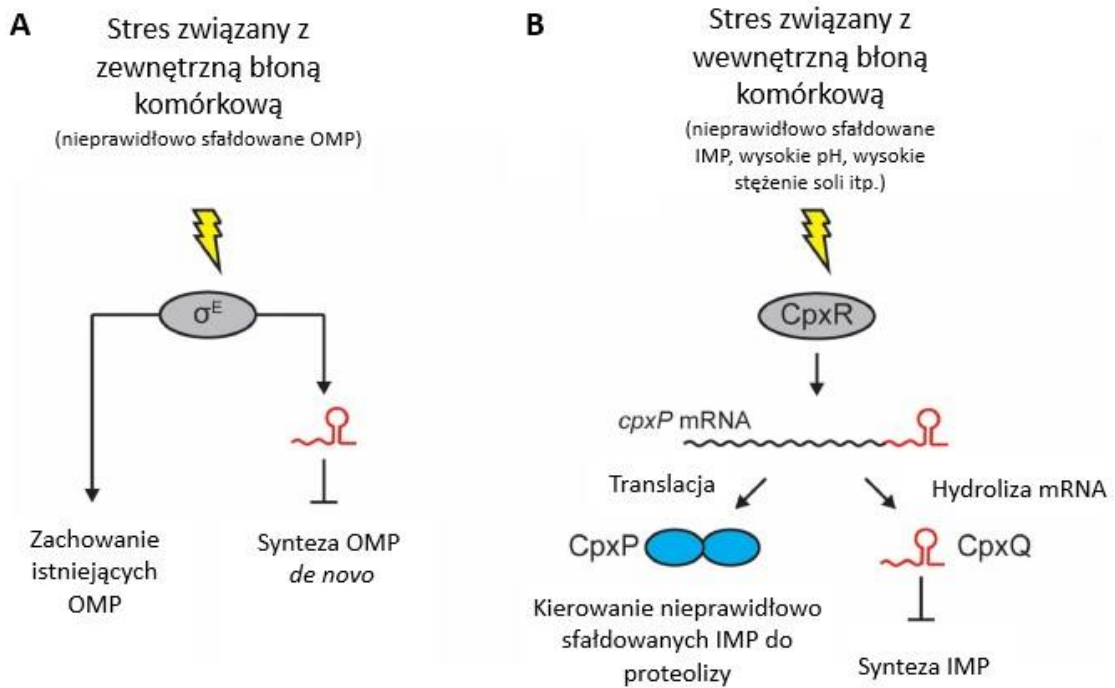
takiej regulacji jest krótki czas odpowiedzi na warunki środowiska, ponieważ mRNA OMP ulegają degradacji w czasie kilku minut od indukcji sRNA. Ma to przewagę nad kontrolą ekspresji na poziomie DNA, w przypadku której powstałe wcześniej mRNA nadal ulegają translacji.



**Rycina 1 Schemat poglądowy części szlaków regulacyjnych u *E. coli/S. enterica*.** Rycina przedstawia kompleksowość szlaków regulacyjnych ukazując wpływ odpowiedzi na warunki środowiska na cechy fenotypowe z uwzględnieniem czynników transkrypcyjnych, sRNA i regulowanych białek. Zilustrowane oddziaływania są tylko skróconym, schematycznym przedstawieniem kompleksowych szlaków komórkowych. Na niebiesko zaznaczono czynniki transkrypcyjne i czynniki  $\sigma$ , na zielono regulowane białka, Czynniki środowiska powodujące odpowiedź komórkową oznaczono symbolami błyskawicy. Kontrola z udziałem czynnika transkrypcyjnego została oznaczona czarną linią, a z udziałem sRNA czerwoną linią. Strzałki symbolizują aktywację, a linie zakończone poprzecznikiem represję. Wiele znanych regulowanych białek, sRNA i niektórych czynników transkrypcyjnych zostało dla uproszczenia pominiętych. Opracowano na podstawie Wagner i Romby, 2015.

Innym przykładem stresu związanego z błoną jest reakcja na stres w wewnętrznej błonie komórkowej, w której bierze udział dwuczęściowy system CpxAR. Do reakcji tej dochodzi w odpowiedzi na stres zewnętrzny związany z akumulacją białek błonowych IMP (ang. *inner membrane proteins*) (Snyder i wsp., 1995, Nevesinjac i Raivio, 2005, Hunke i wsp., 2012). Działanie systemu CpxAR polega na tym, że białko CpxP kieruje nieprawidłowo sfałdowane białka peryplazmatyczne do degradacji przez proteazę DegP (Isaac i wsp., 2005) i hamuje dalszą odpowiedź związaną z systemem Cpx przez oddziaływanie z białkiem CpxA

(Raivio i wsp., 1999, Zhou i wsp., 2011). Co ciekawe, mRNA kodujące białko CpxP ulega hydrolizie przez RNazę E, której produktem jest sRNA CpxQ, które oddziałuje z mRNA kodującymi białka peryplazmy oraz błony wewnętrznej (Chao i Vogel, 2016, Grabowicz i wsp., 2016). Ten przykład ilustruje jak z jednego transkryptu powstają jednocześnie mRNA oraz sRNA, które pełnią rolę w tym samym szlaku odpowiedzi na stres.

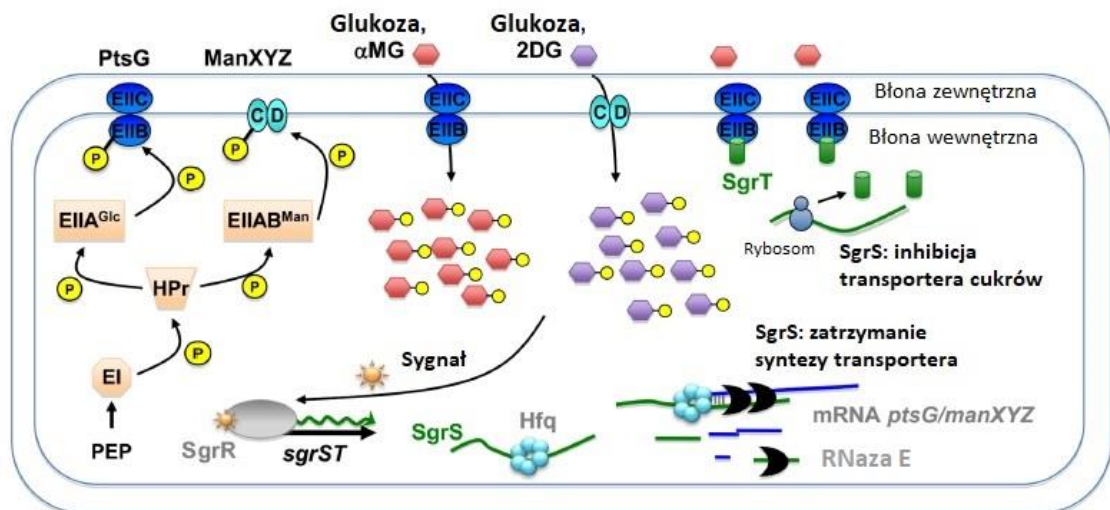


**Rycina 2 Regulatorowe sRNA w odpowiedzi na stres związany z błoną.** (A) Stres związany z błoną zewnętrzną jest wywołany przez obecność nieprawidłowo sfałdowanych białek błonowych (OMP) w przestrzeni peryplazmatycznej. Uwolnienie czynnika  $\sigma^E$  powoduje aktywację genów odpowiedzialnych za zachowanie OMP. Ponieważ  $\sigma^E$  nie może bezpośrednio hamować ekspresji genów, powoduje indukcję trzech sRNA (RybB, MicA oraz MicL), które wyciszają syntezę poryn błonowych *de novo*. Strzałki oznaczają aktywację a linie zakończone poprzecznie represję. (B) Odpowiedź na stres związany z błoną wewnętrzną jest kontrolowana przez system CpxAR. Fosforylowane białko CpxR aktywuje ekspresję mRNA *cpxP*, które pełni podwójną funkcję. Koduje białko CpxP, które kieruje nieprawidłowo sfałdowane białka IMP do degradacji a jego hydroliza powoduje powstanie sRNA CpxQ, które hamuje syntezę IMP. Opracowano na podstawie: Holmqvist i Wagner, 2017.

### Stres związany z nagromadzeniem ufosforylowanych cukrów

Przykładem uczestnictwa sRNA w przystosowywaniu komórek bakterii do warunków stresowych jest regulacja homeostazy glukozy (Ryc. 3). Glukoza pobierana przez komórkę bakteryjną ulega konwersji do glukozy-6-fosforanu (G6P) przy udziale systemu fosfotransferazy (PTS), aby zapobiegać dyfuzji glukozy z komórki (Kadner i wsp., 1992). Jednak zbyt wysoki poziom G6P powoduje

uszkodzenia DNA i zahamowanie wzrostu (Kadner i wsp., 1992, Vanderpool i Gottesman, 2004), dlatego musi on ulegać dokładnej regulacji. Za kontrolę poziomu G6P w komórce odpowiada sRNA SgrS, które działa potranskrypcyjnie na kilka procesów (Vanderpool i Gottesman, 2004). Po pierwsze SgrS prowadzi do hamowania translacji mRNA kodującego transportery glukozy (*ptsG* i *manXYZ*), co powoduje zredukowanie akumulacji G6P wewnątrz komórki (Vanderpool i Gottesman, 2004, Kawamoto i wsp., 2006, Rice i wsp., 2012). Po drugie sRNA stabilizuje mRNA *yigl* kodujące fosfatazę, która defosforyluje nagromadzone fosfocukry i umożliwia ich wydalenie z komórki (Papenfort i wsp., 2013). Poza tym SgrS zawiera otwartą ramkę odczytu (ORF) genu *sgrT*, z którego powstaje małe białko hydrofobowe, które specyficznie oddziałuje z transporterem glukozy PtsG prowadząc do inhibicji jego działania (Wadler i Vanderpool, 2007, Lloyd i wsp., 2017).

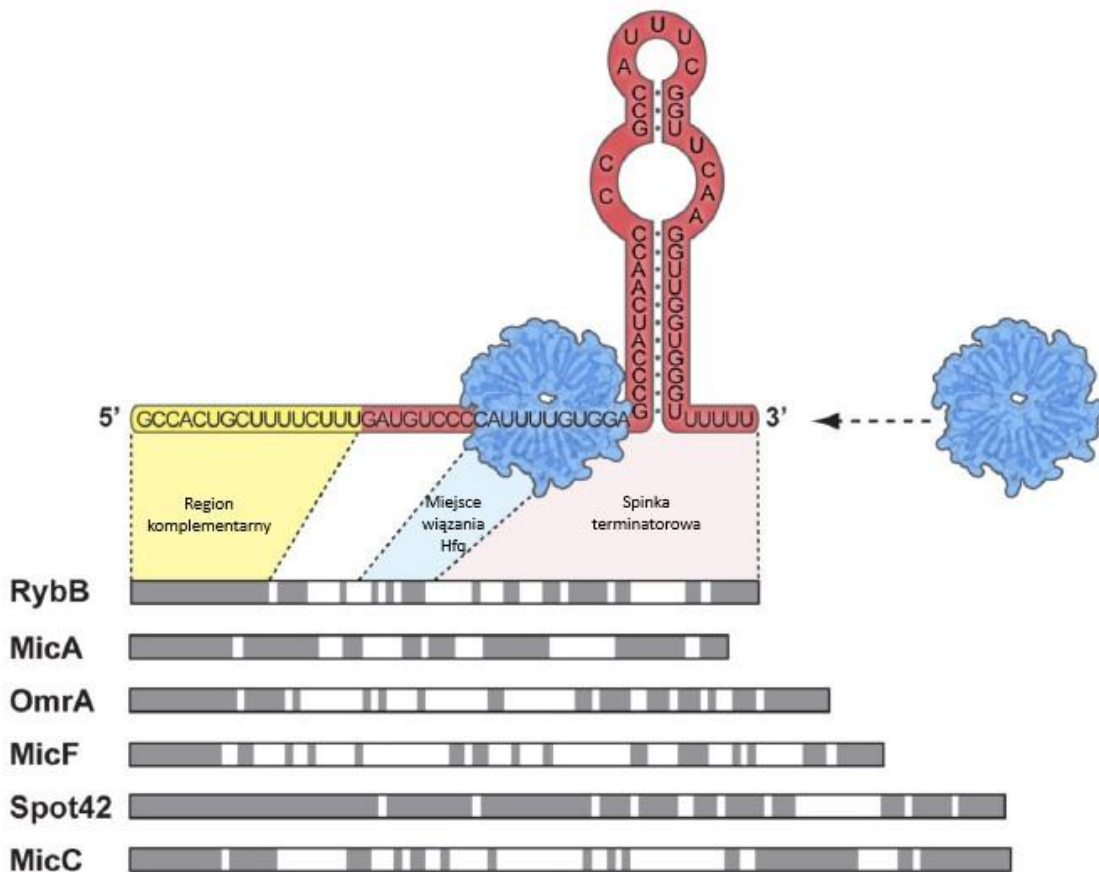


**Rycina 3 Regulacja i fizjologia odpowiedzi na stres związany z nagromadzeniem ufosforylowanej glukozy.** System fosfotransferazy PTS (pomarańczowy) powoduje aktywację przez fosforylację (żółte okręgi) zarówno PtsG (ciemnoniebieski) jak i ManXYZ (jasnoniebieski). Do stresu dochodzi, gdy glukoza lub jej analogi  $\alpha$ MG (czerwone sześciiany) i 2DG (fioletowe sześciiany) ulegają fosforylacji wewnątrz komórki, co prowadzi do ich akumulacji. Nieznany sygnał (symbol słońca) aktywuje regulator transkrypcji SgrR (szary), który następnie aktywuje transkrypcję sRNA SgrS (zielona linia). SgrS przy udziale białka Hfq (jasnoniebieski heksamer) oddziałuje z mRNA *ptsG* i *manXYZ*, blokując ich translację i kierując do degradacji przez RNazę E (czarne półksiężyce). Ponadto SgrS koduje mały peptyd SgrT (zielony cylinder), który hamuje aktywność transportową PtsG. Opracowano na podstawie Richards i Vanderpool, 2011.

### 4.1.3 Biogeneza i struktura sRNA

Prawie wszystkie gatunki bakterii posiadają mechanizmy potranskrypcyjnej kontroli ekspresji genów przy udziale małych regulatorowych RNA. U najlepiej poznanych, modelowych organizmów *Escherichia coli* oraz *Salmonella enterica*, zidentyfikowano około 200-300 sRNA. Regulatorowe RNA bakterii są heterogenne pod względem struktury i sekwencji, a ich długość wynosi od 50 do 200 nukleotydów (Storz i wsp., 2011). Większość sRNA ulega transkrypcji z niezależnych jednostek transkrypcyjnych zlokalizowanych w regionach międzygenowych. Ich ekspresja jest indukowana w ściśle określonych warunkach i funkcjonują one jako transkrypty pierwotne zawierające grupę trójfosforową na 5' końcu oraz spinę terminatorową na 3' końcu. Co więcej, sRNA powstają również w wyniku hydrolizy dłuższych transkryptów lub z regionów 3'UTR mRNA. Takie regulatorowe RNA posiadają grupę monofosforową na końcu 5' (Storz i wsp., 2011, Miyakoshi i wsp., 2015b, Chao i wsp., 2017).

Struktury sRNA kodowanych *trans* są zróżnicowane, ale posiadają wspólne cechy (Ryc. 4). Regulatorowe RNA zazwyczaj tworzą jedną lub kilka struktur typu spinka rozdzielonych regionami jednoniciowymi, często zawierającymi sekwencje bogate w reszty AU zaangażowane w oddziaływanie z białkiem Hfq (Zhang i wsp., 2002). Na końcu 3' znajduje się sekwencja terminatorowa niezależna od Rho o strukturze spinki, po której następuje region bogaty w reszty urydyn, do którego wiąże się Hfq (Otake i wsp., 2011, Ishikawa i wsp., 2012, Holmqvist i wsp., 2016). Większość sRNA posiada region konserwatywny odpowiedzialny za komplementarne oddziaływanie z regulowanym mRNA (Balbontin i wsp., 2010, Papenfort i wsp., 2010). Charakterystyka tworzenia kompleksu sRNA-mRNA została przedstawiona w kolejnym podrozdziale. Pomimo podobieństw w strukturze sRNA, różnią się one długością oraz sekwencją regionów jednoniciowych, a także ilością spinek.



**Rycina 4** Schemat ilustrujący modularną strukturę sRNA kodowanych *trans*. Najbardziej konserwatywne regiony sRNA siedmiu gatunków enterobakterii zostały zaznaczone na szaro. Zazwyczaj regiony te są odpowiedzialne za parowanie z regulowanym mRNA i często zlokalizowane są na końcu 5'. Opracowano na podstawie Storz i wsp., 2011.

#### 4.1.4 Oddziaływania cząsteczek sRNA z regulowanymi mRNA

##### 4.1.4.1 Właściwości kompleksu sRNA-mRNA

Do oddziaływania mRNA z sRNA często niezbędne jest białko Hfq. Mechanizm działania tego białka w tworzeniu kompleksu sRNA-mRNA został szczegółowo opisany w podrozdziale 4.2.3. Większość bakteryjnych sRNA oddziałuje z wieloma regulowanymi mRNA za pomocą komplementarnego parowania w obrębie krótkiego, zazwyczaj jednoniciowego regionu tzw. „seed” (Ryc. 4). Takie specyficzne sekwencje są odpowiedzialne za przeszukiwanie oraz wiązanie mRNA (Kawamoto i wsp., 2006, Balbontin i wsp., 2010, Papenfort i wsp., 2010, Rutherford i wsp., 2015, Melamed i wsp., 2016). Przykładem jest sRNA SgrS ulegające ekspresji w warunkach stresu związanego z nagromadzeniem

ufosforylowanych cukrów, co zostało opisane w podrozdziale 4.1.2. Z około 220-nukleotydowej sekwencji SgrS, 32-nukleotydowy region jest odpowiedzialny za komplementarne parowanie z mRNA, jednak dla aktywności regulacyjnej niezbędna jest 6-nukleotydowa sekwencja zlokalizowana w części 3' (Kawamoto i wsp., 2006). Dzięki tej sekwencji SgrS z *S. enterica* jest w stanie rozróżnić dwa mRNA - *sopD* i *sopD2* na podstawie różnicy w umiejscowieniu jednego wiązania wodorowego (Papenfort i wsp., 2012). sRNA RybB z *S. enterica* i *E. coli*, które ulega ekspresji podczas stresu związanego z błoną opisanego w podrozdziale 4.1.2, posiada wysoce konserwatywny region komplementarny do mRNA na końcu 5'. Siedem nukleotydów tej sekwencji pozwala na regulację wielu mRNA porzyn błonowych (*omp*) (Balbontin i wsp., 2010, Papenfort i wsp., 2010). Inne sRNA posiadają region komplementarny wewnątrz cząsteczki (Geissmann i Touati, 2004, Prevost i wsp., 2007) lub w pobliżu spinki terminatorowej (Figueroa-Bossi i wsp., 2009, Otaka i wsp., 2011). Część regulatorowych sRNA wiąże mRNA za pomocą jednego regionu komplementarnego (Sharma i wsp., 2007, Papenfort i wsp., 2010), a inne oddziałują z jednym transkryptem używając kilku regionów jednocześnie (Argaman i Altuvia, 2000). Miejsca wiązania mRNA w sekwencji sRNA charakteryzują się ewolucyjną konserwacją i są zazwyczaj jednoniciowe (Peer i Margalit, 2011, Richter i Backofen, 2012). Ponadto analiza wyników sekwencjonowania nowej generacji dla kompleksów RNA-RNA tworzonych przy udziale białka Hfq pozwoliła na określenie motywów w sekwencji mRNA odpowiedzialnych za oddziaływanie z poszczególnymi sRNA. Wyszukiwanie takich motywów w innych transkryptach pozwoliło na zidentyfikowanie nowych mRNA regulowanych przez małe RNA bakterii (Melamed i wsp., 2016).

#### 4.1.4.2 Mechanizmy regulacji ekspresji mRNA

##### Regulacja negatywna

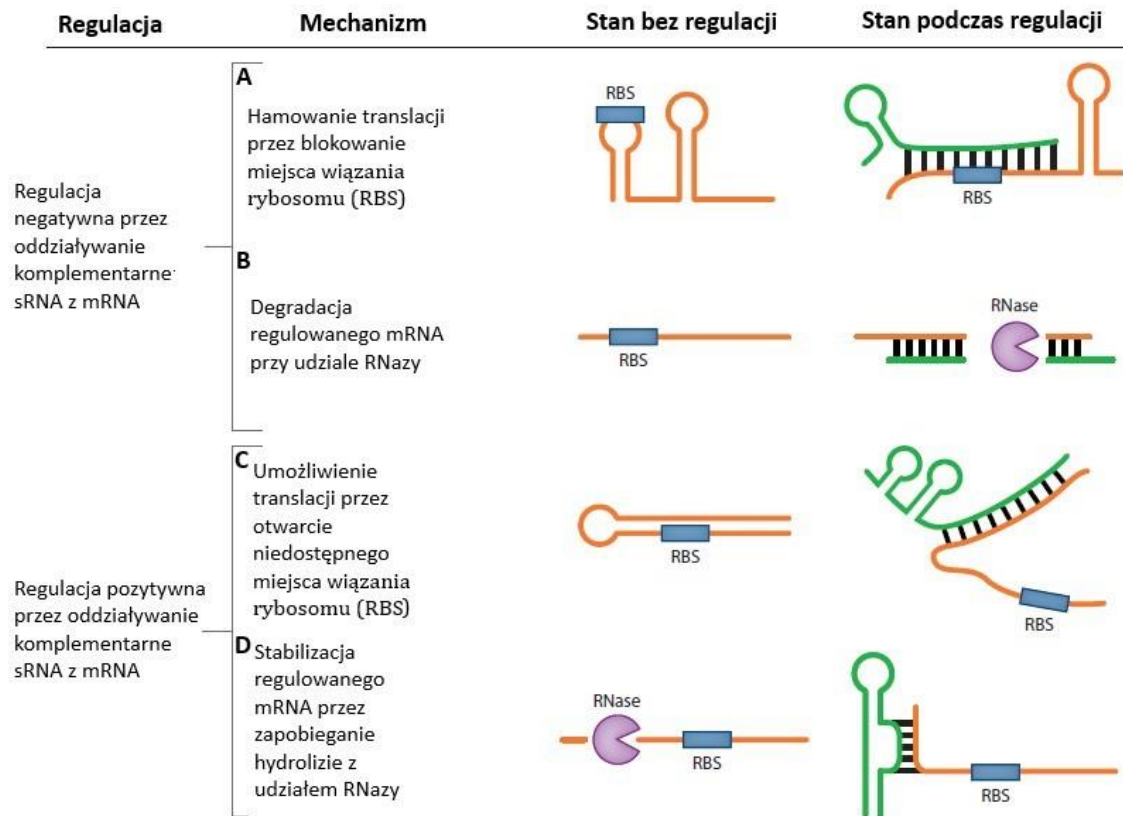
Oddziaływanie sRNA kodowanych *trans* z mRNA prowadzi do pozytywnej lub negatywnej regulacji translacji. Większość sRNA kodowanych *trans* hamuje translację mRNA (Gottesman, 2005, Aiba, 2007). Komplementarne oddziaływanie sRNA z mRNA prowadzi zazwyczaj do represji syntezy białka przez inhibicję translacji lub degradację mRNA (Ryc. 5 A). Większość regulatorowych małych RNA wiąże się z w regionie 5' UTR mRNA w pobliżu lub bezpośrednio w obrębie

sekwencji miejsca wiązania rybosomu (RBS). Oddziaływanie sRNA z RBS blokuje wtedy przestrzennie dostęp dla podjednostki 30S rybosomu, co uniemożliwia translację. Zazwyczaj miejsce wiązania sRNA w mRNA pokrywa się z sekwencją Shine-Dalgarno (SD) i/lub z kodonem start. Przykładem takiej regulacji są oddziaływania SgrS z *ptsG* (Kawamoto i wsp., 2006), MicA z *ompA* (Udekwu i wsp., 2005), DapZ i GcvB z *oppA* (Chao i wsp., 2012) oraz DsrA z *hns* (Lalaouna i wsp., 2015b). Jednakże inhibicja wiązania podjednostki 30S zachodzi także wtedy, gdy miejsce wiązania sRNA znajduje się w innej pozycji w zasięgu 55 nt od kodonu start (Huttenhofer i Noller, 1994). Analizy oddziaływań sRNA z mRNA wykazały, że najczęściej do inhibicji translacji dochodzi, gdy miejsce oddziaływania z niekodującym RNA jest zlokalizowane w obrębie 5' UTR lub pierwszych pięciu kodonów (Bouvier i wsp., 2008). Co ciekawe, zidentyfikowano sRNA, które wiążą się w dużej odległości od regionu pokrywającego się z miejscem oddziaływania podjednostki 30S rybosomu, a wpływają na inhibicję translacji. W przypadku regulacji *tisB* przez IstR wynika to z wiązania do miejsca, w którym rybosom się zatrzymuje (ang. *ribosome standby*) opisanego w modelu Smita i van Duina (de Smit i van Duin, 1994, de Smit i van Duin, 2003). Model ten zakłada, że rybosomy wiążą się niespecyficznie do nieustrukturyzowanych regionów w mRNA, co umożliwia proces inicjacji w znajdującym się w pobliżu RBS, ponieważ krótkie otwarcie struktury RNA pozwala na „ześlizgnięcie się” zatrzymanego rybosomu do miejsca inicjacji translacji. Bez etapu zatrzymania stabilna struktura nie może być pokonana przez rybosom w krótkim czasie. Model ten został także potwierdzony badaniami *in vitro* (Hauryliuk i Ehrenberg, 2006). W przypadku mRNA *tisB*, pomimo stabilnej struktury RBS translacja jest możliwa przez zatrzymywanie się rybosomu w regionie obecnym jedynie w procesowanej, aktywnej formie tego mRNA. Oddziaływanie sRNA IstR z tym regionem, powoduje, że jest on dwuniciowy, co uniemożliwia zatrzymanie rybosomu i inicjację translacji (Wagner i Unoson, 2012). Inny mechanizm negatywnej regulacji translacji polega na wiązaniu sRNA do wzmacniaczy translacji (ang. *enhancers*). Przykładem jest sRNA GcvB, który za pomocą sekwencji bogatych w urydyny i guanozyny oddziałuje z elementami wzmacniaczy translacji o sekwencji bogatej w cytydyny i adenozyne znajdującymi się zazwyczaj w dużej odległości przed sekwencją SD w kierunku 5' (Sharma i wsp., 2007).

Poza hamowaniem translacji przez zmienianie struktury mRNA, sRNA powodują również jego degradację (Ryc. 5 B). mRNA, których translacja została zablokowana i nie wykazują one oddziaływania z rybosomem są substratem dla endorybonukleaz. Dla kilku opisanych przykładów oddziaływań sRNA-mRNA inhibicja wiązania rybosomu powodowała zmniejszanie poziomu białka, podczas gdy hydroliza kompleksu sRNA-mRNA zwiększała wydajność represji czyniąc ją nieodwracalną (Morita i wsp., 2006). Degradacja może być efektem pośrednim zablokowania translacji lub bezpośrednim przez tworzenie kompleksu sRNA-mRNA rozpoznawanego przez RNazę. Przykładem regulacji, w której hydroliza mRNA jest następstwem inhibicji translacji jest oddziaływanie sRNA SgrS z mRNA *ptsG*. SgrS blokuje syntezę białka i powoduje szybką degradację mRNA przy udziale Hfq i RNazy E (Vanderpool i Gottesman, 2004, Morita i wsp., 2005, Kawamoto i wsp., 2006). Jednakże analiza szczepu z mutacją RNazy E powodującą jej inaktywację wykazała, że inhibicja translacji, która nie powoduje degradacji mRNA, również prowadziła do represji powstawania białka (Morita i wsp., 2005). Podobnym mechanizmem, w który zaangażowane jest białko Hfq i RNaza E jest regulacja mRNA *sodB* przez sRNA RyhB (Geissmann i Touati, 2004, Masse i wsp., 2005). Czasami do wydajnej, negatywnej regulacji translacji niezbędne jest połączenie procesów inhibicji translacji i degradacji mRNA. Jest tak w przypadku kilku mRNA z *S. aureus*, które są wiązane przez sRNA w obrębie sekwencji SD, co wywołuje zarówno hamowanie translacji jak i powstanie miejsc cięcia rozpoznawanych przez RNazę III (Chevalier i wsp., 2010, Romilly i wsp., 2012).

Czasami degradacja mRNA jest jedynym skutkiem oddziaływania z sRNA. Ten sposób regulacji poziomu transkryptów jest szybszy od uniemożliwiania wiązania rybosomu (Papenfort i wsp., 2006). Najczęściej w mechanizmach negatywnej regulacji translacji przy udziale sRNA kodowanych *trans* uczestniczy RNaza E, która hydrolizuje jednoniciowe RNA. RNaza E jest częścią degradosomu, czyli kompleksu składającego się z wielu białek wpływającego globalnie na stabilność mRNA i oddziałującego z białkiem Hfq (Carpousis i wsp., 2009). Przykładem hydrolizy mRNA przez RNazę E na skutek oddziaływania z sRNA jest regulacja mRNA *ompD* przez sRNA MicC u *S. enterica* (Pfeiffer i wsp., 2009, Wagner, 2009). Jego mechanizm polega na tworzeniu trójskładnikowego kompleksu zawierającego MicC, Hfq i RNazę E, który następnie wiąże się z

regulowanym mRNA. Jednak do hydrolizy mRNA dochodzi tylko wtedy, gdy sRNA posiada grupę monofosforową na końcu 5', co powoduje aktywację RNazy (Garrey i wsp., 2009). W przypadku niskiego poziomu regulowanego mRNA, RNaza hydrolizuje sRNA, kontrolując w ten sposób jego ilość.



**Rycina 5 Mechanizmy regulacji mRNA przez kodowane *trans* sRNA.** (A) sRNA oddziałują z regulowanymi mRNA w pobliżu miejsca wiązania rybosomu, przez co hamują translację, ponieważ uniemożliwiają oddziaływanie rybosomu z mRNA. (B) sRNA w kompleksie z mRNA stanowią substrat dla RNazy. (C) Oddziaływanie z sRNA powoduje otwarcie niedostępnego miejsca wiązania rybosomu i aktywację translacji. (D) sRNA stabilizuje regulowane mRNA przez hamowanie hydrolizy jednoniciowych fragmentów mRNA. Opracowano na podstawie Nitzan i wsp., 2017.

### Regulacja pozytywna

sRNA nie tylko hamują translację regulowanych mRNA, ale także powodują aktywację translacji. Istnieją dwa mechanizmy, które prowadzą do pozytywnej regulacji translacji. Pierwszy z nich polega na zmianie struktury mRNA po związaniu sRNA, co umożliwia wiązanie rybosomu (Ryc. 5 C). W tym przypadku mRNA posiada długą sekwencję 5' UTR, która tworzy stabilną strukturę spinki, w którą uwikłane jest miejsce wiązania rybosomu, co uniemożliwia translację. Wiązanie sRNA od strony 5' struktury spinki prowadzi do jej otwarcia i uwolnienia

RBS. Klasycznym przykładem takiego oddziaływania jest regulacja mRNA *hla* przez RNAIII (Morfeldt i wsp., 1995) oraz mRNA *rpoS* przez trzy sRNA: DsrA, ArcZ i RprA (Majdalani i wsp., 1998, Majdalani i wsp., 2002, Mandin i Gottesman, 2010). Mechanizm aktywacji translacji *rpoS* wymaga wiązania tego mRNA przez białko Hfq (Peng i wsp., 2014), co zostało opisane w podrozdziale 4.2.3.

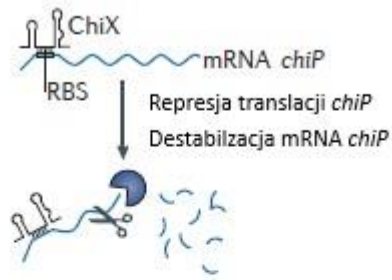
Drugim mechanizmem pozytywnej regulacji translacji mRNA przez sRNA jest stabilizacja mRNA, co prowadzi do wzrostu poziomu białka (Ryc. 5 D). Przykładem takiej regulacji jest oddziaływanie sRNA RydC z *S. enterica* z mRNA *cfa*. RydC wiąże się w dużej odległości od RBS w kierunku 5' i przy udziale Hfq zapobiega hydrolizie mRNA przez RNazę E (Frohlich i wsp., 2013). Z kolei sRNA SgrS stabilizuje mRNA *yigL* przez wiązanie w obrębie sekwencji kodującej cistronu znajdującego się od strony 5' regulowanego mRNA, co powoduje kompetycję z RNazą E o to mRNA (Papenfort i wsp., 2013). Innym przykładem jest sRNA GadY z *E. coli*, które stabilizuje mRNA *gadX* (Opdyke i wsp., 2004). Co ciekawe, u *B. subtilis* zidentyfikowano sRNA SR1, które hamuje translację mRNA *ahrC* przez zmianę jego struktury oraz aktywuje translację mRNA *gapA* stabilizując je (Heidrich i wsp., 2007, Gimpel i wsp., 2010).

#### 4.1.5 Regulacja aktywności sRNA przez cząsteczki anty-sRNA

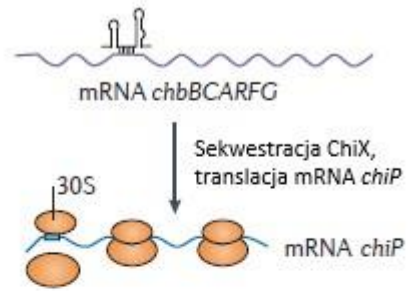
Istnieje wiele mechanizmów kontroli poziomu transkryptów przy pomocy małych RNA bakterii kodowanych *trans*, jednak przez długi czas niewiele było wiadomo na temat regulacji potranskrypcyjnej samych sRNA. Oddziaływanie sRNA z regulowanym mRNA prowadzi do degradacji kompleksu sRNA-mRNA lub małe RNA zostaje ponownie wykorzystane do regulacji innego mRNA (Masse i wsp., 2003, Overgaard i wsp., 2009). Do tej pory nie wyjaśniono, jakie czynniki determinują wybór pomiędzy jednym z tych dwóch szlaków. Badania dowodzą, że to, czy dane sRNA ulegnie degradacji, czy też zostanie wykorzystane ponownie, zależy od regulowanego mRNA, z którym oddziałuje (Figueroa-Bossi i wsp., 2009, Overgaard i wsp., 2009). Wyniki sugerują, że los sRNA zależy od struktury kompleksu sRNA-mRNA. Z kolei analizy ilościowe pozwoliły na opisanie odpowiedzi z udziałem sRNA skokowo-liniowym modelem matematycznym. Model ten określa, że sRNA nie wpływają efektywnie na poziom mRNA do momentu, kiedy szybkość syntezy nowych sRNA przekroczy szybkość syntezy

mRNA. Wtedy sRNA powodują szybkie i całkowite wyciszenie mRNA (Levine i wsp., 2007, Jost i wsp., 2011). W warunkach, gdy szybkość powstawania nowych mRNA jest większa niż szybkość syntezy sRNA, mRNA wiąże i inaktywuje sRNA, więc regulator i regulowane RNA zamieniają się rolami. Inny mechanizm przewiduje, że dla sRNA oddziałujących z wieloma mRNA, wzrost produkcji jednego z tych mRNA będzie powodować spadek dostępności sRNA dla innych mRNA, co prowadzi do obniżenia regulacji tych mRNA (Levine i wsp., 2007, Jost i wsp., 2011). Badania nad eukariotycznymi miRNA, których mechanizm oddziaływania z mRNA jest zbliżony do tego, który występuje u bakterii, wykazały, że miRNA ulegają represji przez inne małe RNA (Ebert i wsp., 2007, Franco-Zorrilla i wsp., 2007, Ebert i Sharp, 2010, Tan i Marques, 2016). Takie małe RNA działają na zasadzie mimikry, przez podobieństwo do sekwencji mRNA rozpoznawanej przez miRNA, w ten sposób konkurując z mRNA o oddziaływanie z regulatorowym RNA. Dwa lata później udowodniono, że w podobny sposób dochodzi do regulacji sRNA ChiX u *E. coli* i *S. enterica* (Ryc. 6 A) (Overgaard i wsp., 2009). Mechanizm ten odpowiada za kontrolę poziomu chitocukrów, które wnikają do komórki przez chitoporynę błonową ChiP, a następnie są przenoszone do cytozolu. Transport chitocukrów do cytozolu wymaga ich fosforylacji przez system fototransferazowy kodowany przez trzy pierwsze geny znajdujące się w operonie *chbBCARFG* (Plumbridge i wsp., 2014). Zarówno ekspresja ChiP jak i ChiX ulega ścisłej regulacji. W warunkach niskiego poziomu chitocukrów mRNA *chiP* jest transkrybowane na niskim poziomie i wyciszane przy udziale sRNA ChiX o konstytutywnej ekspresji. Z kolei ekspresja operonu *chb* jest wtedy hamowana przez represor N-acetyloglukozoaminy (Plumbridge i Pellegrini, 2004). Kiedy chitocukry są dostępne, dochodzi do aktywacji transkrypcji operonu *chb*, którego międzygenowy fragment jest rozpoznawany przez sRNA ChiX i oddziałuje z nim przez komplementarne parowanie. Taki komplementarny do sRNA regulatorowy RNA jest nazywany anty-sRNA lub ceRNA (ang. *competing endogenous RNA*). Oddziaływanie ChiX z anty-sRNA prowadzi do degradacji powstałego kompleksu, co skutkuje zmniejszeniem ilości ChiX i derepresją mRNA *chiP* (Figueroa-Bossi i wsp., 2009, Overgaard i wsp., 2009).

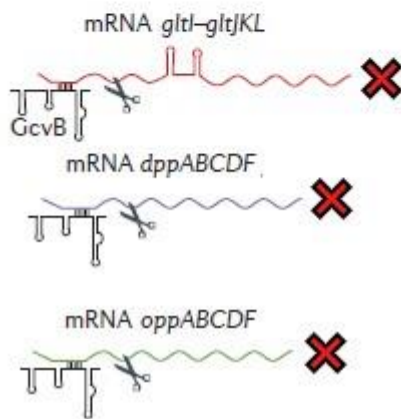
**A Brak indukcji (brak chitocukrów)**



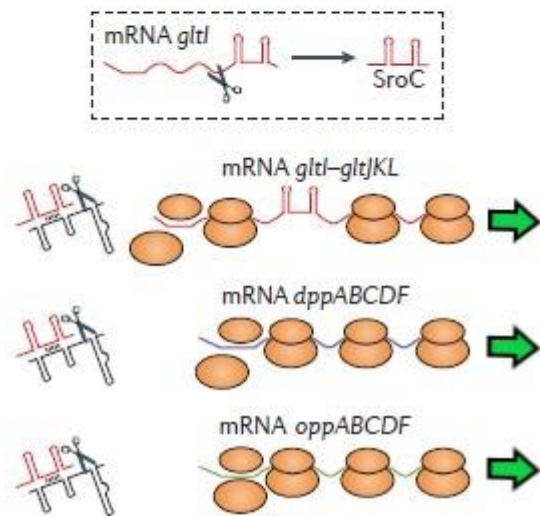
**Indukcja przez chitocukry**



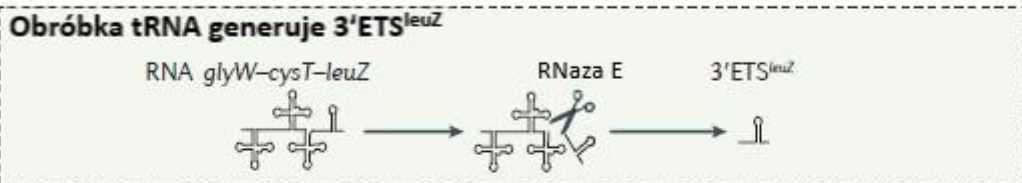
**B Transkrypcja *glt-gltJKL* pełnej długości**



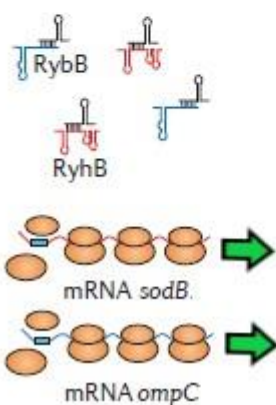
**Terminacja transkrypcji *glt-gltJKL***



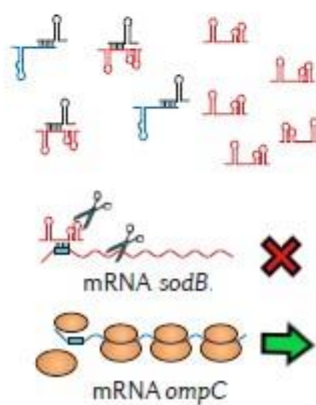
**C**



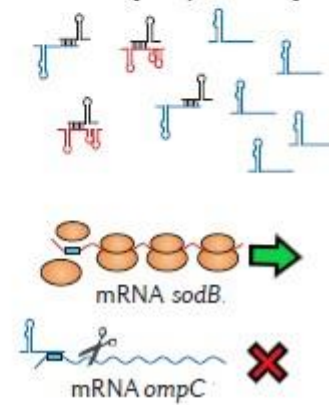
**Brak stresu**



**Niedobór żelaza**



**Stres związany z błoną**



**Rycina 6 Konkurencja pomiędzy RNA o regulatorowe sRNA. (A)** Regulacja pobierania chitocukrów u *S. enterica* i *E. coli*. Gen kodujący chitoporynę (*chiP*) ulega transkrypcji we wszystkich warunkach, niezależnie od poziomu cukrów. Kiedy chitocukry są niedostępne dla komórki, konstytutywnie syntetyzowane sRNA ChiX powoduje inhibicję translacji *chiP*. W obecności chitocukrów dochodzi do transkrypcji operonu *chbBCARFG*, który koduje transporter chitobiozy i enzymy zaangażowane w jej katabolizm. Region międzygenowy *chbB-chbC* operonu zawiera sekwencję, która konkuruje z mRNA *chiP* o wiązanie do sRNA ChiX. Podczas akumulacji mRNA *chbBCARFG* ChiX jest sekwestrowany przez komplementarne parowanie, co powoduje jego degradację. **(B)** Derepresja regulonu GcvB. sRNA GcvB oddziałuje przez komplementarne parowanie zasad z mRNA kodującymi transportery aminokwasów i białek, co powoduje ich represję przez degradację przy udziale RNazy E. Należą do nich transkrypty powstające z operonów *gltIJKL*, *dppABCDF* i *oppABCDF*. Krótsze mRNA powstałe z operonu *gltIJKL* jest generowane przez terminację transkrypcji w regionie międzygenowym pomiędzy *gltI* i *gltJ*. Hydroliza krótszego z transkryptów RNazą E prowadzi do powstania RNA SroC, które oddziałuje z sRNA GcvB i powoduje jego degradację, co wywołuje aktywację całego regulonu GcvB. **(C)** Aktywność anty-sRNA powstającego z prekursora tRNA. sRNA RyhB i RybB są regulatorowymi RNA, do których ekspresji dochodzi w czasie niedoboru żelaza (RyhB) oraz stresu związanego z błoną (RybB). Anty-sRNA 3'ETS<sup>leuZ</sup> powstaje przez hydrolizę RNazą fragmentu od strony 3' prekursora tRNA *glyW-cysT-leuZ* i wychwytuje sRNA RybB i RyhB, które powstały w warunkach pozbawionych stresu w wyniku tzw. „szumu transkrypcyjnego”. Kiedy dochodzi do nadekspresji sRNA, ich poziom przekracza poziom anty-sRNA, co powoduje kontrolę ekspresji regulowanych przez nie mRNA – *ompC* (regulowane przez RybB) i *sodB* (regulowane przez RyhB). Opracowano na podstawie Bossi i Figueroa-Bossi, 2016.

Innym sRNA, które jest regulowane przez anty-sRNA, jest GcvB (Ryc. 6 B). GcvB jest kodowane w genomie enterobakterii i posiada ewolucyjnie konserwatywną sekwencję, a jego rolą biologiczną jest hamowanie ekspresji mRNA kodujących białka zaangażowane w pobieranie i biosyntezę aminokwasów (Sharma i wsp., 2011). Jednym z mRNA regulowanych przez GcvB jest transkrypt pochodzący z operonu *gltIJKL* kodującego transporter ABC dla glutaminianu i asparaginianu. Z operonu *gltIJKL* powstają dwa transkrypty: dłuższy, który obejmuje cały operon oraz krótszy, zakończony terminatorem niezależnym od Rho w regionie międzygenowym pomiędzy *gltI* oraz *gltJ*. sRNA GcvB powoduje represję obu transkryptów. Jednak krótszy transkrypt ulega specyficznej hydrolizie przy udziale RNazy E, co prowadzi do powstania fragmentu od strony 3' o długości 150 nukleotydów - SroC. SroC oddziałuje z Hfq, a także powoduje sekwestrowanie i degradację sRNA GcvB, działając jako anty-sRNA, co w konsekwencji powoduje deregulację całego regulonu GcvB (Miyakoshi i wsp., 2015a). Jednakże mechanizm oddziaływania SroC nie polega na podobieństwie sekwencji do mRNA regulowanego przez GcvB. SroC wiąże się komplementarnie do dwóch regionów GcvB, które są znacznie oddalone od sekwencji zaangażowanych w oddziaływanie z mRNA. Dzięki temu SroC działa efektywnie nawet w niskich stężeniach oraz wiąże się do GcvB także podczas jego komplementarnego parowanie z mRNA.

sRNA GcvB jest także regulowane przez inne anty-sRNA – AgvB, kodowane w genomie dwóch patogennych szczepów *E. coli* (Chao i wsp., 2012). W przeciwieństwie do SroC, AgvB oddziałuje z regionem GcvB odpowiedzialnym za wiązanie regulowanych mRNA, co powoduje kompetycję pomiędzy AgvB i mRNA o oddziaływanie z GcvB. Dzięki temu mechanizmowi nadekspresja AgvB powoduje derepresję regulowanego przez GcvB u *E. coli* i *S. enterica* mRNA *dppA* kodującego element peryplazmatyczny dipeptydu transportera ABC. Delecja genu *agvB* u patogennego szczepu *E. coli* prowadzi do utraty zdolności proliferacji bakterii w śluzie jelita bydłęcego, co sugeruje, że rolą AgvB jest adaptacja do warunków środowiska panujących w jelicie (Tree i wsp., 2014). Jednak mechanizm molekularny tego procesu nie został dotąd wyjaśniony.

Kolejnym przykładem sRNA regulowanych przez anty-sRNA są sRNA RybB i RyhB (Fig. 6 C). Kontrolują one dwa główne szlaki odpowiedzialne za utrzymanie homeostazy u *E. coli* i *S. enterica*. RybB reguluje odpowiedź na stres związany z błoną, co zostało dokładnie opisane w podrozdziale 4.1.2. RyhB jest odpowiedzialne za kontrolę homeostazy żelaza, ponieważ powoduje represję mRNA kodujących białka wiążące żelazo (Masse i wsp., 2005, Jacques i wsp., 2006) oraz aktywację mRNA związanych z biosyntezą i transportem związków chelatujących jony żelaza (sideroforów) (Balbontin i wsp., 2010, Balbontin i wsp., 2016). Zastosowanie metody RNA-seq umożliwiło identyfikację transkryptów, które oddziałują z sRNA RybB i RyhB. Jednym z nich był fragment RNA pochodzący z regionu 3' genu *leuZ* nazwany 3'ETS<sup>leuZ</sup> powstający z operonu *glyW-cysT-leuZ*. Operon ten koduje trzy geny tRNA, które ulegają transkrypcji jako trójcistronowy prekursor, który następnie ulega hydrolizie, co prowadzi do powstania trzech dojrzałych form tRNA (Lalaouna i wsp., 2015a). 3'ETS<sup>leuZ</sup> powstaje w wyniku hydrolizy końca 3' dłuższego transkryptu prekursora tRNA RNazą E. Co więcej, wykazano, że 3'ETS<sup>leuZ</sup> oddziałuje z białkiem Hfq, a jego rolą jest działanie jako anty-sRNA i wychwytywanie sRNA RybB i RyhB w warunkach, kiedy ich ekspresja nie jest indukowana. Mechanizm ten powoduje, że sRNA RybB i RyhB wpływają na ekspresję regulowanych mRNA, tylko wtedy, gdy ich poziom znacznie przekroczy poziom anty-sRNA, co zapobiega tzw. szumowi transkrypcyjnemu (ang. *transcriptional noise*). Co ciekawe, zdolność do wychwytywania jednego z sRNA

przez 3'ETS<sup>leuZ</sup> zależy od poziomu ekspresji drugiego sRNA, co jest wywołane kompetycją RybB i RyhB o wiązanie anty-sRNA.

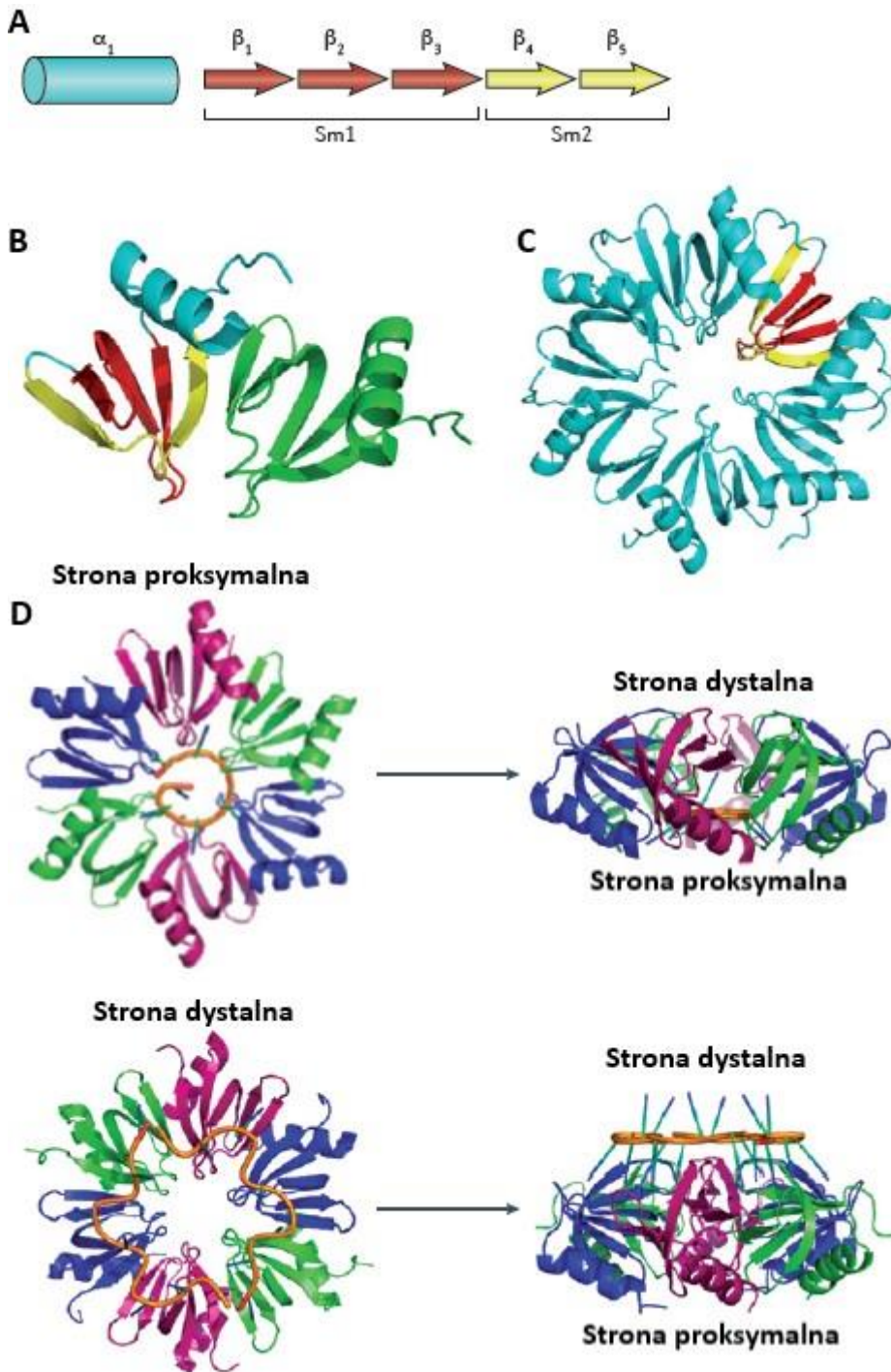
## 4.2 Białko opiekuńcze Hfq jako regulator ekspresji genów

### 4.2.1 Struktura i specyficzność rozpoznawania sekwencji RNA przez białko Hfq

Białko opiekuńcze Hfq zostało zidentyfikowane około 50 lat temu, jako czynnik niezbędny dla replikacji RNA bakteriofaga Q $\beta$  u *E. coli* (Franze de Fernandez i wsp., 1968). Hfq jest ważne dla aktywności małych regulatorowych RNA bakterii (sRNA), co opisano w podrozdziale 4.1.4.2. Początkowe badania struktury krystalicznej Hfq pozwoliły określić, że białko to tworzy homoheksamer o kształcie pierścienia, którego średnica wynosi 65Å (Valentin-Hansen i wsp., 2004, Brennan i Link, 2007, Sauer, 2013). Każdy monomer składa się z N-końcowej  $\alpha$ -helisy, po której następuje pięć silnie skręconych, przeciwrównoległych  $\beta$ -harmonijek, zakończonych nieustrukturyzowanym regionem na C-końcu (Ryc. 7 A-C). Powierzchnia pierścienia z N-końcowymi  $\alpha$ -helisami jest nazywana stroną proksymalną, przeciwna strona – dystalną, a część na zewnątrz pierścienia – boczną lub lateralną (Ryc. 7 D). Sekwencja i struktura Hfq są charakterystyczne dla rodzin białek, z których pochodzi – Sm i Sm-podobnych (Lsm). Są one zaangażowane w różnorodne aspekty metabolizmu RNA u wszystkich eukariontów i archeonów (Mura i wsp., 2013, Wilusz i Wilusz, 2013).

Hfq posiada cztery regiony wystawione na działanie rozpuszczalników – stronę proksymalną, dystalną i boczną oraz koniec karboksylowy. Pierwsze struktury krystaliczne Hfq z *S. aureus* w kompleksie z krótkimi oligorybonukleotydami wykazały, że strona proksymalna wiąże sekwencje poli(U) w taki sposób, że reszty urydyn są uwięzione w kieszeniach pomiędzy sąsiadującymi monomerami wokół centralnego otworu (Mura i wsp., 2013). Podobne badania u *E. coli* pozwoliły określić, że strona dystalna Hfq oddziałuje z oligorybonukleotydami bogatymi w reszty adenzyn i wiąże trzy nukleotydy na podjednostkę Hfq (Link i wsp., 2009). Początkowo sekwencje te zostały opisane jako motyw A-R-N, w którym adenzyna (A) i puryna (R) są wiązane w kieszeniach wyeksponowanych na działanie rozpuszczalnika, podczas gdy trzeci nukleotyd (N)

nie oddziałuje bezpośrednio z białkiem. Nowsze prace pozwoliły na dokładniejsze określenie specyficzności oddziaływania Hfq z RNA.



**Rycina 7** Struktura białka Hfq oraz jego oddziaływanie z RNA. **(A)** Elementy struktury drugorzędowej promotora Hfq z zaznaczonymi motywami sekwencji Sm1 i Sm2. **(B, C)** Każdy promotor jest jednostką złożoną z jednej  $\alpha$ -helisy i pięciu  $\beta$ -harmonijek, które tworzą układ przeciwrównoległych kartek. **(C)** Jedna z  $\beta$ -harmonijek ( $\beta_2$ ) jest skrzyta w taki sposób, że wraz z pozostałymi harmonijkami tworzy samozamykającą się beczułkę. **(D)** Dwie strony Hfq odpowiedzialne za oddziaływanie z RNA (zaznaczone na pomarańczowo) są zlokalizowane po przeciwnych stronach pierścienia białka. Strona proksymalna zawiera reszty aminokwasowe z

motywu sekwencji Sm2. C-końcowa domena ma charakter nieustrukturyzowany i wystaje poza płaszczyznę pierścienia Hfq, przez co może oddziaływać elektrostatycznie z kwasami nukleinowymi. Opracowano na podstawie Vogel i Luisi, 2011.

### **Strona proksymalna – wiązanie sekwencji poli(U)**

Znaczenie strony proksymalnej w wiązaniu sekwencji poli(U), które znajdują się w Rho-niezależnych terminatorach u wszystkich sRNA oddziałujących z Hfq, zostało poparte w kilku niezależnych pracach. Struktura krystaliczna Hfq związanego z oligorybonukleotydami bogatymi w reszty urydyn z *E. coli* (Sauer i Weichenrieder, 2011, Wang i wsp., 2013) i *L. monocytogenes* (Kovach i wsp., 2014) jest bardzo podobna do tej z *S. aureus* (Schumacher i wsp., 2002), gdzie reszty urydyn oddziałują w pobliżu fenyloalaniny w każdym monomerze (Sauer i Weichenrieder, 2011, Wang i wsp., 2013). Powinowactwo strony proksymalnej do sekwencji bogatych w reszty urydyn jest więc konserwatywne dla Hfq z bakterii gram dodatnich i gram ujemnych. Z kolei badania nad akumulacją sRNA i regulacją mRNA u szczepów *E. coli* z ekspresją Hfq posiadającego mutacje pojedynczych reszt aminokwasowych wykazały, że niektóre mutacje po stronie proksymalnej białka (Q8, F42, K56) miały wpływ na wszystkie badane sRNA, podczas gdy efekt innych (D9, F39) zależał od badanego sRNA (Zhang i wsp., 2013). Inne badania dowodzą, że określone reszty aminokwasów o charakterze kwasowym (D9, E18, E37) Hfq z *E. coli* są odpowiedzialne za odróżnianie sRNA od innych RNA. Mutacje tych aminokwasów spowodowały mniej specyficzne wiązanie Hfq z RNA, a także zmniejszyły efektywność asocjacji sRNA z mRNA (Panja i wsp., 2015b). Pomimo że wydaje się, że wszystkie sRNA oddziałują w podobny sposób ze stroną proksymalną Hfq, to wiązanie poszczególnych sRNA do tej strony ma odmienny charakter.

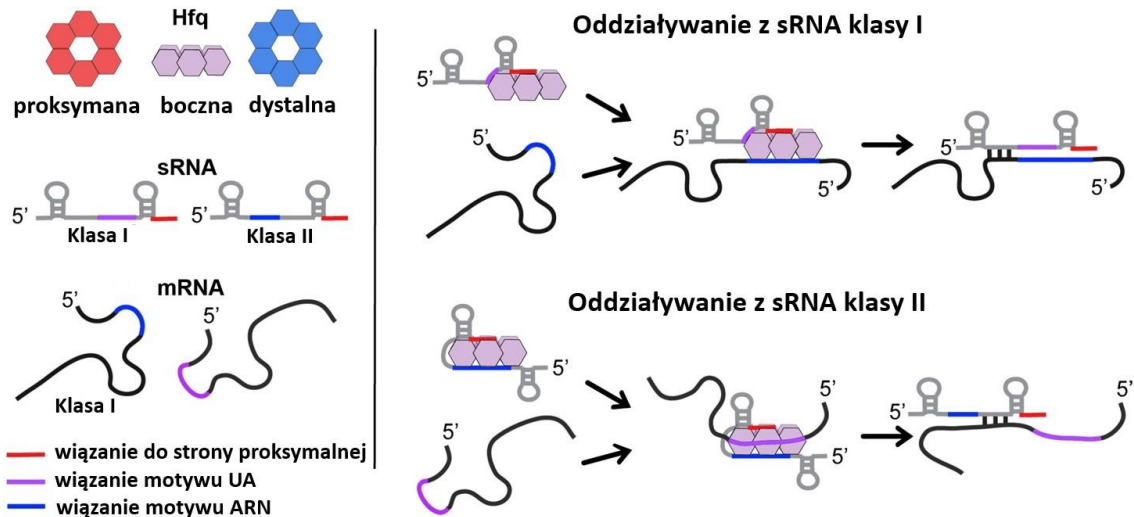
### **Strona dystalna – wiązanie sekwencji bogatych w reszty adenzyn**

Badania nad specyficznością oddziaływań Hfq z RNA wykazały, że wiązanie RNA do strony dystalnej jest znacznie bardziej zróżnicowane niż oddziaływania ze stroną proksymalną. Heksamery Hfq pochodzące zarówno z bakterii gram ujemnych jak i gram dodatnich posiadają miejsca wiązania adenzyn (A) po stronie dystalnej. Analiza zanikania fluorescencji tryptofanu pozwoliła określić, że sekwencja oddziałująca z Hfq *E. coli* zawiera motyw (A-A-N)<sub>n</sub>, podczas gdy Hfq z *S. aureus* wiąże motyw (A-L)<sub>n</sub>, gdzie L jest nukleotydem linkerowym (Robinson i

wsp., 2014). Inne struktury krystaliczne Hfq potwierdziły obserwacje, że oddziaływanie strony dystalnej z RNA nie jest zawężone do motywu A-R-N. Hfq z *E. coli* wiąże się z regionem bogatym w reszty adenzyn w sRNA OxyS (Wang i wsp., 2015), podczas gdy białko z *S. aureus* oddziałuje z oligorybonukleotydami o sekwencji (A-A)<sub>3</sub>-A (Horstmann i wsp., 2012), a *B. subtilis* z sekwencją (A-G)<sub>3</sub>-A (Someya i wsp., 2012).

Dla regulacji zależnej od Hfq ważniejsza od dokładnej sekwencji motywu oddziałującego ze stroną dystalną Hfq okazała się jego pozycja względem miejsca parowania mRNA z sRNA. Wykazano, że sekwencja bogata w reszty adenzyn znajdująca się od strony 3' sekwencji komplementarnej do sondy molekularnej (ang. *molecular beacon*), która emituje fluorescencję po związaniu do komplementarnego RNA, znacznie poprawia asocjację zależną od Hfq *in vitro* (Panja i Woodson, 2012). Jednak kiedy dystans pomiędzy regionem (A-A-N)<sub>n</sub> a sekwencją komplementarną został zwiększony, to utracono efekt poprawy asocjacji. Co więcej, zależna od Hfq aktywacja translacji *rpoS in vivo* oraz asocjacja tego mRNA z sRNA *in vitro* były pogorszone, gdy przenoszono sekwencje (A-A-N)<sub>n</sub> w różne pozycje 5'UTR *rpoS*. Mimo że odległości pomiędzy miejscami wiązania sRNA i Hfq u wielu mRNA wynoszą ponad 20 nukleotydów, to struktury drugo- i trzeciorzędowe RNA umożliwiają umiejscowienie tych regionów obok siebie.

Początkowo uważano, że motywy bogate w reszty adenzyn oddziałujące ze stroną dystalną Hfq znajdują się jedynie w mRNA. Jednakże dalsze analizy wykazały, że wiele sRNA również posiada sekwencje służące im do oddziaływania ze stroną dystalną białka Hfq (Updegrave i wsp., 2008, Zhang i wsp., 2013, Ellis i wsp., 2015, Malecka i wsp., 2015, Schu i wsp., 2015, Wang i wsp., 2015). Właściwości wiązania sRNA z Hfq stanowią podstawę do klasyfikacji sRNA na dwie grupy (Schu i wsp., 2015). Klasa I oddziałuje ze stroną proksymalną i boczną białka Hfq, podczas gdy regulowane przez nie mRNA wiąże się do strony dystalnej. Z kolei sRNA należące do niekanonicznej klasy II oddziałują ze stroną proksymalną i dystalną a regulowane przez nie mRNA wiążą się do strony bocznej (Ryc. 8). Ponadto kilka badanych sRNA wykazywało właściwości pośrednie.



**Rycina 8 Alternatywne sposoby oddziaływania RNA z Hfq.** Schematyczny model przedstawia trzy powierzchnie wiązania RNA przez Hfq: stronę proksymalną (zaznaczoną kolorem czerwonym), boczną (zaznaczoną kolorem fioletowym) oraz dystalną (zaznaczoną kolorem niebieskim). Dla sRNA i mRNA fragmenty zaznaczone kolorem czerwonym odpowiadają za oddziaływanie ze stroną proksymalną, regiony zaznaczone kolorem fioletowym przedstawiają sekwencje bogate w reszty adenozyń i urydyn, które oddziałują ze stroną boczną, a elementy zaznaczone kolorem niebieskim odpowiadają za wiązanie motywu ARN przez stronę dystalną białka Hfq. Opis sposobów oddziaływania sRNA klasy I oraz II znajduje się w tekście. Opracowano na podstawie Schu i wsp., 2015.

### Strona boczna – wiązanie sekwencji bogatych w reszty adenozyń i urydyn

Strona boczna Hfq *E. coli* zawiera regiony pozytywnie naładowanych reszt aminokwasowych (R16, R17 i R19) po stronie zewnętrznej płytkiego rowka wychodzącego z miejsc wiązania sRNA po stronie proksymalnej w każdym z sześciu monomerów. Wykazano, że strona boczna jest drugim miejscem wiązania sRNA zawierających sekwencje bogate w reszty UA (Ishikawa i wsp., 2012, Murina i wsp., 2013, Panja i wsp., 2013, Dimastrogiovanni i wsp., 2014, Malecka i wsp., 2015, Schu i wsp., 2015). Mutacje regionów zawierających pozytywnie naładowane reszty aminokwasowe spowodowały osłabienie wiązania sRNA RybB *in vitro*, a mutacje sekwencji znajdujących się wewnątrz cząsteczek bogatych w reszty UA w sRNA RybB i SgrS uniemożliwiły ich oddziaływanie z Hfq typu dzikiego (Ishikawa i wsp., 2012, Sauer i wsp., 2012). Analiza struktury krystalicznej Hfq w kompleksie z sRNA RydC z *E. coli* i *S. enterica* ujawniła, że dochodzi do bezpośredniego oddziaływania pomiędzy łańcuchami fosforanowymi reszt aminokwasowych R16 i R17 Hfq z resztami nukleotydowymi U23 i U24 w sRNA RydC (Dimastrogiovanni i wsp., 2014). Co więcej, wykazano, że mutacje aminokwasów na powierzchni bocznej Hfq zmniejszają poziom akumulacji sRNA

klasy I *in vivo*, co wskazuje na ich bezpośrednie oddziaływanie z sRNA i wpływ na jego stabilność (Schu i wsp., 2015). Co ciekawe, znane są również przykłady mRNA wiążących się do strony bocznej Hfq. Są to głównie mRNA regulowane przez sRNA klasy II (Peng i wsp., 2014, Schu i wsp., 2015).

### **C-koniec Hfq - oddziaływanie z niektórymi sRNA**

Koniec karboksylowy białka Hfq u bakterii może posiadać różną długość oraz sekwencję, a jego brak organizacji strukturalnej i elastyczność spowodowały, że nie był on widoczny na pierwszych strukturach krystalicznych białka. Początkowo rola C-końcowej domeny Hfq była tematem spornym (Sobrero i Valverde, 2012). Jednakże wzrasta ilość przykładów sRNA, które oddziałują z końcem karboksylowym Hfq. Do tych sRNA należą RydC z *E. coli* oraz Qrr z *V. cholerae*, które traci zdolność oddziaływania *in vitro* z Hfq *E. coli* po usunięciu domeny C-końcowej białka (Dimastrogiovanni i wsp., 2014). Ponadto usunięcie końca karboksylowego Hfq powoduje utratę części właściwości regulacyjnych Hfq z *C. difficile* (Caillet i wsp., 2014). Co ciekawe, najnowsze badania dowodzą, że domena C-końcowa Hfq pełni funkcje autoregulacyjne, przez oddziaływanie z resztami zasadowymi rdzenia Hfq, które są niezbędne dla asocjacji sRNA z mRNA. Koniec karboksylowy Hfq działa wtedy na zasadzie mimikry przez podobieństwo do kwasów nukleinowych. (Santiago-Frangos i wsp., 2017).

### **4.2.2 Rola białka Hfq w regulacji ekspresji genów**

Rola białka Hfq w procesach fizjologicznych bakterii została scharakteryzowana u kilku organizmów modelowych, od mikroorganizmów patogennych, do tych, które prowadzą symbiozę z roślinami. U większości analizowanych organizmów używano szczepów z delecją genu *hfq*, a u kilku z nich gen ten był zidentyfikowany podczas poszukiwania genów związanych z regulacją danego fenotypu (Wu i wsp., 2010, Mulley i wsp., 2011). W większości przypadków brak Hfq powodował plejotropowe efekty fenotypowe, wpływał na przystosowywanie się bakterii do warunków środowiska oraz odpowiedź na czynniki stresowe. Co więcej, wirulencja bakterii patogennych jest osłabiona, gdy gen *hfq* zostanie usunięty lub przerwany.

Poziom białka Hfq w komórce zmienia się w zależności od szybkości wzrostu (Kajitani i wsp., 1994, Vytvytska i wsp., 1998) oraz fazy wzrostu (Kajitani i

wsp., 1994) mikroorganizmów. Ilość oligomerów Hfq w komórce została oszacowana na 5000 – 10000 dla *E. coli* w logarytmicznej fazie wzrostu (Kajitani i wsp., 1994). Gen *hfq* jest częścią superoperonu *amiV-mutL-miaA-hfq-hflX-hflK-hflC* o kompleksowej organizacji transkrypcyjnej, zawierającej trzy promotory zależne od  $\sigma^{32}$  ulegające ekspresji podczas szoku cieplnego oraz cztery promotory zależne od  $\sigma^{70}$  (Tsui i wsp., 1996). Co więcej, w kontrolę poziomu transkryptu *hfq* zaangażowana jest RNaza E (Tsui i Winkler, 1994). Ponadto, ekspresja Hfq ulega regulacji na poziomie translacji. Wykazano, że u *E. coli* i *S. meliloti* Hfq kontroluje translację własnego mRNA (Vecerek i wsp., 2005, Sobrero i Valverde, 2011). U *E. coli* Hfq oddziałuje z własnym mRNA w dwóch regionach, co powoduje represję translacji przez konkurencję z rybosomem o miejsce wiązania rybosomu (Vecerek i wsp., 2005). Pozwala to na utrzymanie poziomu białka Hfq w komórce w stałym zakresie.

Najlepiej poznaną funkcją białka Hfq jest uczestnictwo w oddziaływaniu małych RNA bakterii z regulowanymi przez nie mRNA, co powoduje aktywację lub hamowanie translacji mRNA (Ryc. 9 A). Zostało to szczegółowo opisane w podrozdziale 4.1.4.2.

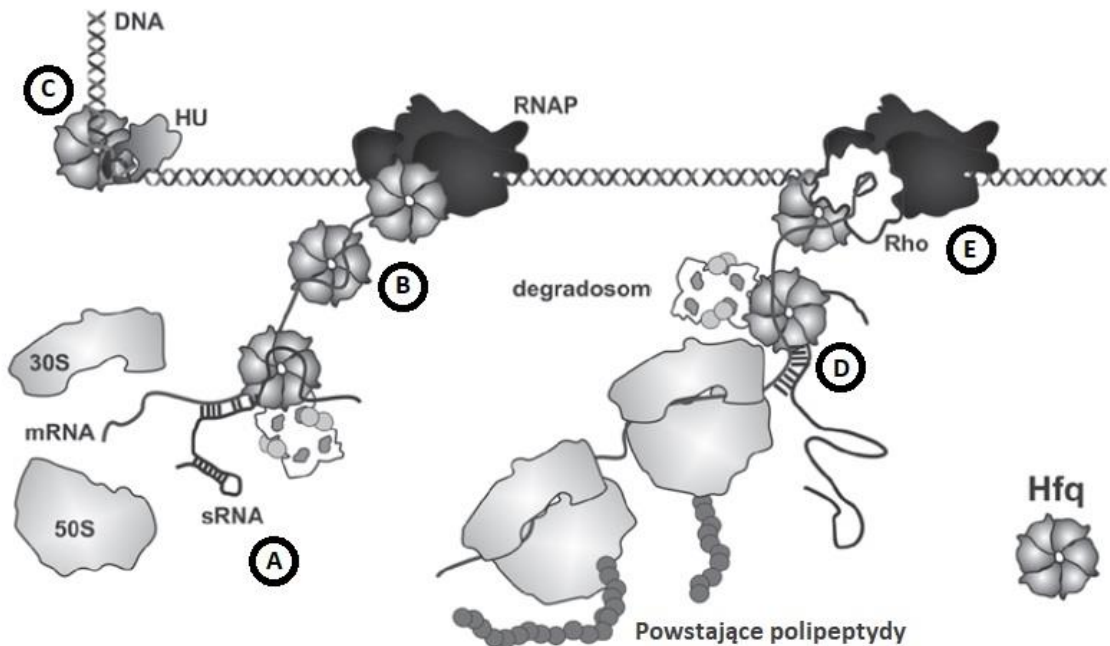
Hfq oddziałuje nie tylko z RNA, ale także z innymi białkami. Najlepiej poznanym białkowym partnerem Hfq jest RNaza E. Oba białka uczestniczą w wielobiałkowym kompleksie odpowiedzialnym za degradację RNA tzw. degradosomie (Aiba, 2007). Rolą oddziaływania Hfq z RNazą E jest jednoczesna represja translacji mRNA i jego nieodwracalna degradacja. Innymi białkami związanymi bezpośrednio z Hfq są białko S1 oraz podjednostka  $\beta$  polimerazy RNA. Precypitują one wraz z Hfq w eksperymentach prowadzonych na ekstraktach komórkowych z *E. coli* z immobilizowanymi sRNA (DsrA, MicF, OxyS, RyhB i Spot42) (Windbichler i wsp., 2008). Badania *in vitro* wykazały, że Hfq nie oddziałuje z rdzeniem polimerazy RNA ani z białkiem S1 oddzielnie, ale wiąże się z kompleksem polimerazy RNA i białka S1 (Sukhodolets i Garges, 2003). Jednak rola biologiczna takiego kompleksu nie została dotąd poznana. Możliwe, że jest zaangażowany w regulację sRNA lub pozwala na umiejscowienie Hfq w pobliżu miejsca uwalniania transkryptu z polimerazy RNA, co umożliwia wydajne wiązanie substratów.

Jako białko opiekuńcze, Hfq wpływa na odpowiednie fałdowanie mRNA, co skutkuje wydajniejszą translacją lub zmniejszeniem zjawiska zatrzymywania transkrypcji (Ryc. 9 B), (Le Derout i wsp., 2010). Co więcej, remodelowanie RNA może być związane z aktywnością ATPazową Hfq (Sukhodolets i Garges, 2003, Arluison i wsp., 2007b). Sugeruje to rolę Hfq w łączeniu procesów transkrypcji i translacji (Ryc. 9 D).

Główną biologiczną funkcją białka Hfq jest specyficzne oddziaływanie z sRNA oraz mRNA, jednak wykazano, że wiąże ono także inne kwasy nukleinowe np. tRNA (Lee i Feig, 2008, Holmqvist i wsp., 2016, Melamed i wsp., 2016), inne niekodujące i antysensowne RNA (Melamed i wsp., 2016), a także DNA (Takada i wsp., 1997, Updegrove i wsp., 2010, Geinguenaud i wsp., 2011). Hfq zostało zidentyfikowane jako jedno z 12 najpowszechniej występujących białek w nukleoidzie bakterii, reprezentując około 24% wszystkich białek związanych z genomowym DNA w logarytmicznej fazie wzrostu. Hfq oddziałuje z DNA głównie w regionach o wysokim stopniu helikalności (Updegrove i wsp., 2010). Co więcej, Hfq z *E. coli* wiąże się z białkiem HU (Ryc. 9 C), (Butland i wsp., 2005), które jest bakteryjnym odpowiednikiem eukariotycznych białek histonowych zaangażowanym w organizację strukturalną nukleoidu oraz aktywność transkrypcyjną (Pontiggia i wsp., 1993, Kar i wsp., 2005). Rolą oddziaływania białka HU z Hfq najprawdopodobniej jest kierowanie Hfq do nukleoidu i wymuszanie jego wiązania do specyficznych sekwencji DNA (Tolstorukov i wsp., 2005).

Hfq reguluje translację mRNA nie tylko przy udziale sRNA, ale także bezpośrednio przez wiązanie do transkryptu. Przykładem jest oddziaływanie Hfq *E. coli* z miejscem wiązania rybosomu w mRNA transpozazy Tn10, co powoduje represję transpozazy IS10 (Ellis i wsp., 2015). Co więcej, Hfq jest także zdolne do hamowania translacji mRNA *mutS*, nawet wtedy, gdy strona proksymalna Hfq jest zmutowana, co uniemożliwia jego oddziaływanie z sRNA (Chen i Gottesman, 2017). Dokładny mechanizm regulacji mRNA przez udziale samego Hfq nie został jednoznacznie wyjaśniony. Możliwe, że w procesy te jest zaangażowane dodatkowe białko lub RNA. U bakterii *Pseudomonas* w regulacji transkrypcji zależnej od źródła węgla nie pośredniczą cykliczne AMP oraz CRP jak u *E. coli*, ale białko Crc (Sonnleitner i wsp., 2009). Crc nie wiąże się bezpośrednio do RNA, więc

Hfq stanowi niejako platformę dla tego oddziaływania wiążąc RNA w motywach CA oraz białko Crc (Sonnleitner i Blasi, 2014). Oddziaływanie Crc z Hfq jest hamowane przez wychwytywanie Hfq przez sRNA CrcZ, którego ekspresja ulega regulacji w zależności od dostępności źródła węgla (Sonnleitner i Blasi, 2014, Sonnleitner i wsp., 2017).



**Rycina 9** Udział globalnego białka regulatorowego Hfq w kontroli ekspresji genów za pomocą różnych mechanizmów na różnych poziomach przepływu informacji genetycznej. **(A)** Hfq oddziałuje z degradosomem powodując degradację kompleksu sRNA-mRNA i wyciszenie ekspresji mRNA. **(B)** Jako białko opiekuńcze, Hfq wpływa na lokalne fałdowanie mRNA i hamowanie zatrzymywania transkrypcji. Rozpoznawanie substratowego RNA przez Hfq może zachodzić bezpośrednio w miejscu transkrypcji przez oddziaływanie Hfq z polimerazą RNA (RNAP). **(C)** Hfq wiąże DNA, a także oddziałuje z białkami HU, co sugeruje rolę w rearanżacji DNA i kontroli na poziomie transkrypcji. **(D)** Kontrola translacji zależna od Hfq oraz sRNA powoduje oddzielenie procesów transkrypcji i translacji oraz może powodować zależną od Rho terminację transkrypcji. **(E)** Przy braku kontroli na poziomie translacji, Hfq wpływa na hamowanie terminacji transkrypcji przez bezpośrednie oddziaływanie z białkiem Rho. Opracowano na podstawie Sobrero i Valverde, 2012.

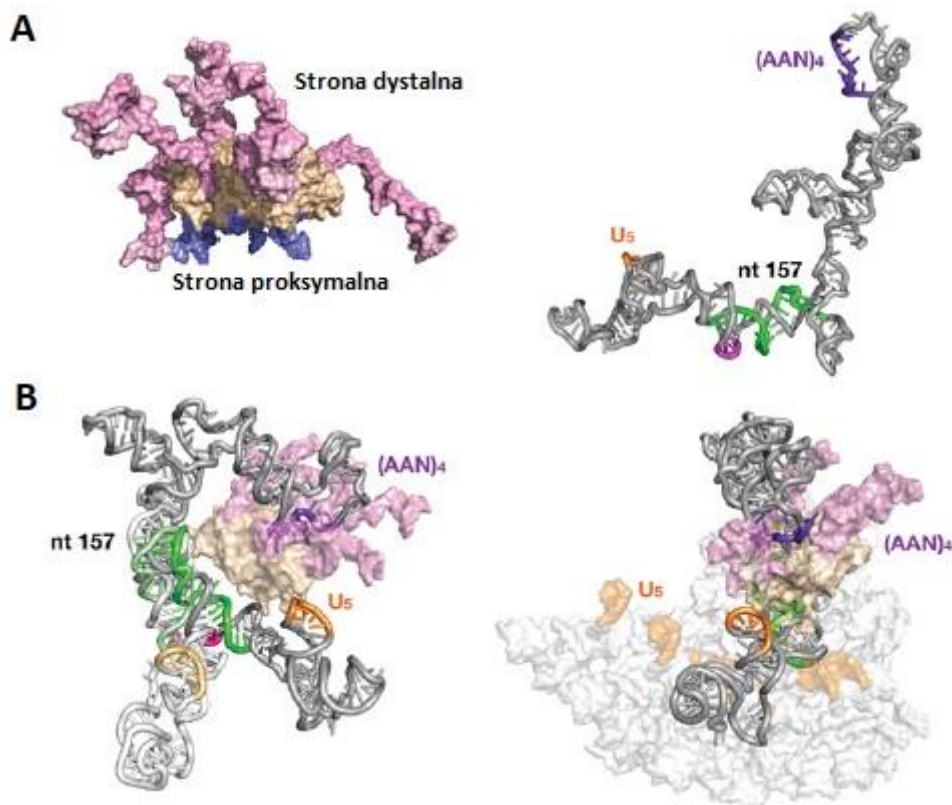
Białko Hfq jest także zdolne do oddziaływania z dwoma innymi białkami zaangażowanymi w metabolizm RNA – polimerazą poli(A) oraz egzorybonukleazą - fosforylazą polinukleotydową (Mohanty i wsp., 2004). Enzymy te są zaangażowane w procesy związane z przemianami mRNA (Santos i wsp., 2006, Viegas i wsp., 2007). Oddziaływanie Hfq z 3' końcem RNA powoduje jego poliadenylację z udziałem polimerazy I poli(A), co prowadzi do degradacji tego RNA (Folichon i wsp., 2005). Innym białkowym partnerem Hfq jest białko Rho (Ryc. 9 E). Kompleks ten był początkowo zidentyfikowany *in vivo* (Butland i wsp.,

2005), a następnie jego obecność u *E. coli* potwierdzono zarówno *in vivo* jak i *in vitro* (Rabhi i wsp., 2011). Hfq tworzy stabilny kompleks z Rho, co prowadzi do hamowania transkrypcji, ponieważ Hfq blokuje aktywność ATPazową oraz helikazową białka Rho (Rabhi i wsp., 2011). Zdolność Hfq do oddziaływania zarówno z polimerazą RNA jak i z białkiem Rho powoduje, że jest ono kluczowym regulatorem komórkowej aktywności transkrypcyjnej.

#### **4.2.3 Mechanizm działania białka Hfq w oddziaływaniach pomiędzy sRNA a mRNA**

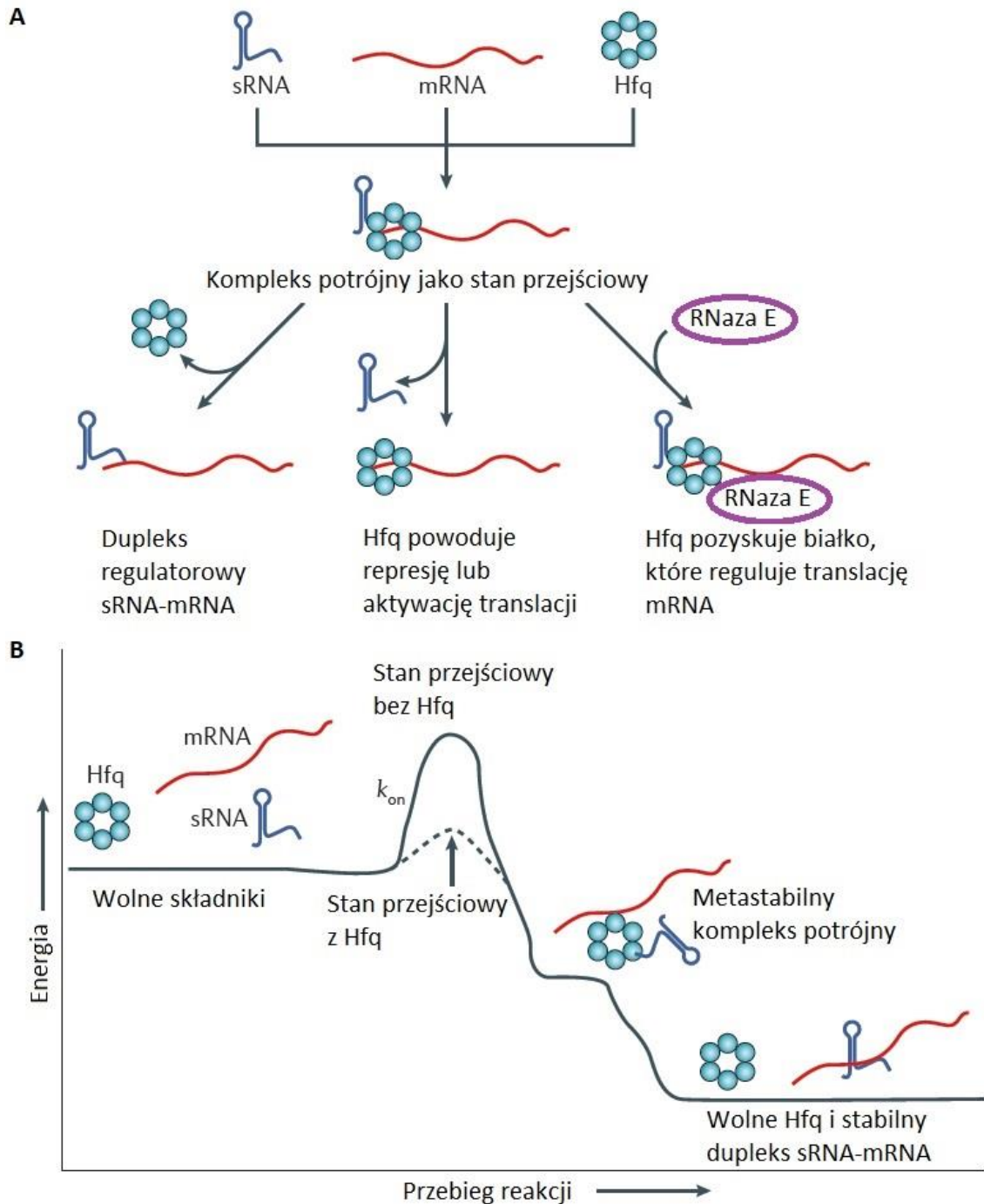
Białko Hfq pomaga w tworzeniu kompleksu pomiędzy sRNA bakterii a regulowanymi przez nie mRNA (Moller i wsp., 2002, Kawamoto i wsp., 2006, Soper i Woodson, 2008). W niektórych przypadkach dochodzi do oddziaływania sRNA z mRNA nawet przy nieobecności Hfq, jednak obecność białka znacznie przyspiesza asocjację RNA (Kawamoto i wsp., 2006, Soper i wsp., 2010). Aby wyjaśnić rolę Hfq w promowaniu tworzenia kompleksu sRNA-mRNA zaproponowano dwa alternatywne mechanizmy. Pierwszy z nich jest związany z aktywnością chaperonową Hfq w remodelowaniu struktury oddziałujących RNA (Schuppli i wsp., 1997, Moll i wsp., 2003, Sobrero i Valverde, 2012). Eksperyment typu „footprint”, mający na celu analizę struktury RNA po związaniu białka Hfq, wykazał, że oddziaływanie Hfq z mRNA *sodB* powoduje zmianę struktury mRNA w regionie komplementarnym do jego regulatorowego RNA RyhB. Jednakże Hfq nie wpływało na zmianę struktury sRNA (Geissmann i Touati, 2004). W tym przypadku Hfq powoduje wyeksponowanie sekwencji komplementarnej do sRNA w mRNA, co prowadzi do powstania kompleksu trójskładnikowego *sodB*-RyhB-Hfq. RNA ulega uwolnieniu z takiego kompleksu w wyniku stymulacji z udziałem kompetytorowych ligandów (Afonyushkin i wsp., 2005). Analizy biochemiczne oddziaływania sRNA DsrA z mRNA *rpoS* z użyciem zmutowanych substratów wykazały, że dla tworzenia kompleksu trójskładnikowego niezbędna jest komplementarność wiązanych RNA, a pośrednictwo Hfq w oddziaływaniu DsrA z *rpoS* jest możliwe dzięki remodelowaniu struktury drugorzędowej mRNA (Soper i wsp., 2011). Analizy z wykorzystaniem technik SAXS (ang. *small-angle X-ray scattering*) oraz SANS (ang. *small-angle neutron scattering*) w połączeniu z dichroizmem kołowym Hfq związanego z sRNA RprA oraz OxyS wskazują, że Hfq *E.*

*E. coli* oddziałuje z sRNA w stosunku stechiometrycznym 1:1, co powoduje zmianę struktury sRNA przy niezmienionej strukturze Hfq (Henderson i wsp., 2013). Co więcej, analizy z użyciem technik SAXS oraz SHAPE (ang. *selective 2'-hydroxyl acylation and primer extension*) wykazały, że strona boczna Hfq *E. coli* wiąże motyw U<sub>5</sub>, a strona dystalna motyw (A-A-N)<sub>n</sub> w mRNA *rpoS*. Skutkuje to zmianą konformacji trzeciorzędowej mRNA do bardziej kompaktowej, w której region komplementarny do sRNA jest pozycjonowany w pobliżu strony proksymalnej, do której wiąże się sRNA (Peng i wsp., 2014), (Ryc. 10). Co więcej, zaobserwowano, że mutacja aminokwasów znajdujących się po stronie bocznej Hfq, a także usunięcie końca karboksylowego Hfq *E. coli* zahamowały tworzenie się kompleksu trójskładnikowego Hfq-RydC-*cfa*. Wyniki te potwierdzają model, w którym rolą Hfq jest pozycjonowanie RNA w taki sposób, aby sprzyjać tworzeniu się komplementarnego parowania (Dimastrogiovanni i wsp., 2014).



**Rycina 10 Model kompleksu regulatorowego *rpoS*-Hfq.** Model atomowy (A) pełnej długości Hfq (po lewej), i mRNA *rpoS* (po prawej), (B) kompleksu *rpoS*-Hfq w zamkniętej (po lewej) i otwartej (po prawej) konformacji. Rdzeń Sm białka Hfq zaznaczono kolorem sławkowym, N-koniec ciemnoszarym, C-koniec różowym, wstęgę *rpoS* szarym, motyw (AAN)<sub>4</sub> purpurowym, motyw U<sub>5</sub> pomarańczowym, miejsce wiązania sRNA zielonym, sekwencję Shine-Dalgarno fioletowym. Opracowano na podstawie Peng i wsp., 2014.

Alternatywny mechanizm funkcjonowania białka Hfq zakłada jednoczesne oddziaływanie sRNA i regulowanego mRNA z Hfq, co powoduje powstawanie kompleksów trójskładnikowych i pasywne wymuszenie tworzenia kompleksu RNA-RNA (Mikulecky i wsp., 2004) (Ryc. 11 A). Oddziaływanie sRNA DsrA z mRNA *rpoS in vitro* potwierdza ten model (Soper i Woodson, 2008). Innym przykładem jest jednoczesne oddziaływanie sRNA OxyS z mRNA *fhfA* i Hfq (Salim i Feig, 2010). Jednakże oddysocjowanie długiej sekwencji liderowej mRNA *fhfA* było możliwe jedynie przez dodanie kompetytorowego sRNA oddziałującego ze stroną proksymalną (DsrA) i dystalną (A<sub>18</sub>) białka Hfq. Co więcej, analiza kinetyki asocjacji sugeruje, że Hfq związane z *fhfA* tworzy kompleks trójskładnikowy z sRNA tylko wtedy, gdy jest ono komplementarne do mRNA (Salim i Feig, 2010). Inne badania sugerują, że strona boczna Hfq odgrywa główną rolę w pozycjonowaniu dwóch RNA w taki sposób, aby umożliwić ich oddziaływanie, pełniąc w ten sposób funkcje katalityczne (Panja i wsp., 2013, Panja i wsp., 2015a). Analiza wiązania sRNA do mRNA z użyciem spektroskopii zatrzymanego przepływu i sond RNA wykazała, że Hfq z *E. coli* przyspiesza szybkość asocjacji komplementarnych RNA nawet 100-krotnie przez zmniejszanie barier związanych z entropią i ładunkiem elektrostatycznym (Ryc. 11 B). Ponadto mutacja aminokwasów znajdujących się po stronie bocznej Hfq zniósła efekt przyspieszenia oddziaływania (Panja i wsp., 2013). Inne badania z użyciem sond molekularnych (ang. *molecular beacon*) wskazują, że Hfq bezpośrednio zmniejsza początkową barierę w zawiązywaniu helisy RNA, a także promuje wydłużanie kompleksu sRNA-mRNA (Panja i wsp., 2015a). Możliwe, że nie istnieje jeden uniwersalny mechanizm działania Hfq w tworzeniu kompleksu sRNA-mRNA, a zależy on od właściwości danej pary sRNA-mRNA (Arluison i wsp., 2007a).



**Rycina 11 Rola kompleksu trójskładnikowego sRNA-mRNA-Hfq w regulacji przy udziale sRNA.** (A) Różne warianty procesów zachodzących po rozpadzie kompleksu trójskładnikowego. Finalnym produktem takiej reakcji jest kompleks sRNA-mRNA (po lewej) lub kompleks mRNA-Hfq (na środku), kompleks trójskładnikowy może także oddziaływać z innymi białkami np. RNazą E (po prawej). (B) Model katalitycznego działania białka Hfq. Hfq przyspiesza szybkość asocjacji, co zostało przedstawione przez zmniejszenie bariery aktywacyjnej dla formowania kompleksu. Ponadto Hfq stabilizuje równowagową strukturę sRNA-mRNA prawdopodobnie przez wymuszanie tworzenia metastabilnych struktur o najniższej lokalnej energii. Opracowano na podstawie Vogel i Luisi, 2011.

## 5. CELE PRACY

Celem pracy było poznanie znaczenia sekwencji i struktury mRNA oraz anty-sRNA w ich oddziaływaniach z niekodującymi RNA bakterii. W pracy podjęto dwa aspekty tego zagadnienia. Celem pierwszej części pracy było wyjaśnienie, czy sekwencja mRNA sąsiadująca z miejscem wiązania sRNA może wpływać na to oddziaływanie. W tym celu zbadano oddziaływania sRNA RybB z *S. enterica* z komplementarnymi mRNA posiadającymi różne reszty nukleotydowe w pozycji 3' względem miejsca wiązania RybB. Dla tej części wyróżniono następujące cele szczegółowe:

- Wyznaczenie parametrów termodynamicznych krótkich dupleksów RNA odpowiadających miejscu oddziaływania sRNA RybB z regulowanymi mRNA.
- Analiza stabilności termodynamicznej i kinetyki asocjacji pełnej długości sRNA RybB z fragmentami mRNA posiadającymi mutacje reszty nukleotydowej w pozycji 3'.
- Określenie udziału białka Hfq w tworzeniu kompleksu sRNA RybB z naturalnymi i zmutowanymi mRNA.
- Sprawdzenie, w jaki sposób represja przez RybB translacji *in vitro* naturalnego fragmentu mRNA *ompC* w fuzji z mRNA białka GFP zależy od mutacji w pozycji 3'.

Celem drugiej części pracy było poznanie roli białka Hfq w oddziaływaniach sRNA z regulatorowymi anty-sRNA oraz porównania jej do roli tego białka w oddziaływaniach cząsteczek sRNA z regulowanymi przez nie mRNA. Analizy wykonano, porównując oddziaływania sRNA z *E. coli*: ChiX z anty-sRNA *chbBC*-IGR oraz mRNA *chiP*, a także RybB z komplementarnym anty-sRNA 3'ETS<sup>leuZ</sup> oraz mRNA *tsx*. Ponadto sprawdzono, w jaki sposób białko Hfq bierze udział w asocjacji sRNA GcvB z regulatorowym anty-sRNA AgvB z *E. coli*. Realizacja tej części projektu obejmowała następujące cele:

- Wyznaczenie struktur cząsteczek *chbBC*-IGR, 3'ETS<sup>leuZ</sup> i AgvB oraz sRNA GcvB, którego struktura nie była znana, w celu określenia dostępności regionów odpowiedzialnych za wiązanie komplementarnych RNA.

- Porównanie roli Hfq w tworzeniu kompleksów pomiędzy cząsteczkami sRNA a anty-sRNA oraz sRNA z mRNA.

## 6. MATERIAŁY

### 6.1 Aparatura

#### 6.1.1 Urządzenia

Nazwa	Producent/ model
Aparat do elektroforezy poziomej	Bio-Rad/ Mini-Sub® Cell GT Cell
Aparat do elektroforezy SDS-PAGE	Bio-Rad/ Mini-PROTEAN®
Blok grzejny	Grant/ QBD1
Blok grzejny z wytrząsaniem	Eppendorf/ Comfort
Ekran fosforowy	Fuji/ 3543
Kaseta do naświetlań	Fuji/ HYPERCASSETTE
Lampa UV	UVP/ UVLS-28
Licznik Geigera	Sper Scientific/ 840026
Mieszadło magnetyczne	IKA/ RH basic 2
pH-metr	HANNA instruments/ HI2212
Skaner laserowy	Fujifilm/ FLA-5100 z oprogramowaniem
Sonikator	Bandelin/ Sonopuls HD2070
Spektrofotometr	NanoDrop/ ND-1000 z oprogramowaniem ND-1000 V3.2.1
Spektrofotometr z kontrolerem temperatury	Beckman/ DU 640
Suszarka do żeli	Bio-Rad/ 583
Syntetyzer DNA/RNA	MerMade 12 (BioAutomatization)
System do chromatografii cieczowej	ÄKTA explorer 100
System dokumentacji i analizy żeli	G:BOX/ Syngene
Termocykler	Peqlab/ primus 25
Waga	Kern/ EG

Wirówki	Eppendorf/ 5430 R, Beckman/ Coulter Avanti J-30I, rotor JA-30.50, Beckman/ Coulter Avanti J-26XPI, rotor JLA-10.500, Hetovac/ z pompą próżniową KNFLAB Laboport
Worteks	Peqlab/Peqtwist
Zasilacz do elektroforezy wysokonapięciowej	Consort/ EV245

### 6.1.2 Drobny sprzęt laboratoryjny

Nazwa	Producent/ model
Kolumny do oczyszczania RNA	Bio-Rad/ Micro Bio-Spin P-6
Kolumny do odsalania chemicznie syntetyzowanych RNA o długości powyżej 15 nt	GE Healthcare/ NAP-25
Kolumny do odsalania RNA po syntezie chemicznej	Waters/ Sep-pak C-18 cartridge
Membrana do dializy białek	Spectrum Laboratories, Inc./ Spectra Por 6-8000 MWCO
Płytki do chromatografii cienkowarstwowej	Baker/ Si500F
Płytki do pomiaru fluorescencji	Sigma/ CLS3993-25EA
Płytki z powierzchnią niewiążącą	Greiner/ 651901
Probówki z membraną do zagęszczania białek	Millipore/ Amicon Ultra 50 ml 10000 MWCO
Probówki z powierzchnią niewiążącą	Eppendorf/ Z666505-100EA
Pipety automatyczne	HTL/ Discovery comfort

### 6.1.3 Kolumny chromatograficzne do izolacji białek

Kolumny wykorzystywane do oczyszczania rekombinowanej polimerazy RNA z faga T7:

- His Trap FF Crude 5 ml – producent GE Healthcare, stosowana do wstępnego etapu izolacji białka bezpośrednio z lizatu bakteryjnego na podstawie chromatografii metalopowinowactwa łańcucha polihistydynowego białka do jonów  $Ni^{2+}$  usieciowanych w złożu kolumny.
- Superdex 200 16/60 - producent GE Healthcare, stosowana do drugiego etapu oczyszczania białka na podstawie rozdziału substancji według masy cząsteczkowej podczas sączenia molekularnego.

Do obsługi kolumn chromatograficznych zastosowano system ÄKTA explorer 100 z oprogramowaniem Unicorn.

### 6.2 Odczynniki chemiczne i zestawy dostępne komercyjnie

Odczynnik chemiczny/zestaw dostępny komercyjnie	Producent
1-butanol (99,9%)	POCH
2-merkaptoetanol	Sigma
2-propanol (99,7 %)	POCH
5-bromo-4-chloro-3-indolylo-beta-D-galaktopiranozyd (X-gal)	BioShop
Acetonitryl (99,5 %)	POCH
Adenozyno-5'-trifosforan (ATP)	Sigma
Agaroza	Prona
Akrylamid:bis-akrylamid mieszanina 29:1 w proszku	BioShop
Amoniak (32%)	POCH
Ampicylina, sól sodowa	Sigma
Chloramfenikol	Sigma
Chlorek amonu	Sigma
Chlorek sodu	Sigma
Chlorek wapnia	Sigma
Chlorowodorek L-cysteiny	Sigma
Chlorowodorek L-histydyny	Sigma
Chlorowodorek L-lizyny	Sigma
Chlorowodorek L-argininy	Sigma
Comassie Brilliant Blue R250	Sigma
Cykliczny adenozyno-3',5'-monofosforan (cAMP)	Roche
Cytydino-5'-trifosforan (CTP)	Sigma
Dimetyloformamid (DMF)	Sigma
Ditiotreitol (DTT)	Sigma
Etanol (96%)	POCH

Fenol/Chloroform/Alkohol izoamylowy (25:24:1)	BioShop
Fosforan kreatyny (CP)	Roche
Glicerol (99%)	BioShop
Glicyna	Sigma
Glikol polietylenowy 8000 (PEG 8000)	Sigma
Glutaminian potasu	Sigma
Guanozyno-5'-trifosforan (GTP)	Sigma
Imidazol	Sigma
Inhibitory proteaz w tabletkach, wolne od EDTA	Roche
Kakodylan sodu	Sigma
Kwas borowy	BioShop
Kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA)	Sigma
Kwas fluorowodorowy (HF)	Sigma
Kwas folinowy	Sigma
Kwas L-asparaginowy	Sigma
Kwas L-glutaminowy	Sigma
Kwas octowy (99,9%)	POCH
Kwas solny (37%)	POCH
L-alanina	Sigma
L-asparagina	Sigma
LB Broth	Sigma
LB Broth z agarem	Sigma
L-feniloalanina	Sigma
L-glutamina	Sigma
L-izoleucyna	Sigma
L-leucyna	Sigma
L-prolina	Sigma
L-seryna	Sigma
L-treonina	Sigma
L-tryptofan	Sigma
L-tyrozyna	Sigma
L-walina	Sigma
Metanol (99,9%)	POCH
Metionina	Sigma
Midori Green	NIPPON Genetics
Mieszanina dNTP	Thermo Scientific
Mieszanina ksylencjanol: błękit bromofenolowy	Sigma
Mieszanina tRNA	Roche
Mocznik	BioShop
N-(2-hydroksyetyl)piperazyna-N'-2-kwas 2- etanosulfonowy (HEPES)	BioShop
N,N,N',N'-Tetrametyloetylenodiamina (TEMED)	BioShop
Nadsiarczan amonu (APS)	BioShop
Octan amonu	Sigma
Octan magnezu	Sigma
Octan sodu	Sigma
Laurylosiarczan sodu (SDS)	Sigma
Spermidyna	Sigma

Tris(hydroksymetylo)aminometan (Tris)	BioShop
Urydyno-5'-trifosforan (UTP)	Sigma
Wodorotlenek sodu	Sigma
Zestaw do ekstrakcji DNA z żelu agarozowego „GeneJET gel extraction and DNA cleanup Micro kit”	Thermo Scientific
Zestaw do izolacji plazmidowego „DNA genelute hp plasmid miniprep”	Sigma
Zestaw do oczyszczania RNA po reakcjach enzymatycznych „RNeasy MinElute Cleanup Kit”	Qiagen
$\beta$ -D-tiogalaktopiranozyd IPTG	Sigma
$\gamma$ - <sup>32</sup> P-ATP (222TBq (6000Ci)/mmol 370MBq (10mCi)/ml)	Hartmann Analytic

## 6.2 Enzymy i markery wielkości

Enzym	Producent
DpnI	Thermo Scientific
DNaza I	Thermo Scientific
Kinaza keratynowa (CK)	Roche
Kinaza polinukleotydowa (PNK)	Thermo Scientific
Ligaza DNA faga T4	Thermo Scientific
Polimeraza DNA DreamTaq	Thermo Scientific
Polimeraza Pfu Turbo Cx Hotstart	Agilent Genomics
Rybonukleaza T1	Thermo Scientific
Rybonukleaza T2	MoBiTec
Nukleaza S1	Thermo Scientific
Marker wielkości	Producent
Gene Ruler 100 bp	Thermo Scientific
Gene Ruler 1kB Plus	Thermo Scientific
PAGE Ruler (barwiony)	Thermo Scientific
RiboRuler™ RNA, High Range	Thermo Scientific

## 6.3 Oczyszczone białka/ekstrakty bakteryjne

Białko/ekstrakt	Oczyszczone przez
Hfq <i>Salmonella</i> subsp. enterica serovar Typhimurium	Dr Zuzanna Wróblewska Zakład Biochemii UAM
Hfq <i>Escherichia coli</i> K12	Dr Joanna Stróżecka Zakład Biochemii UAM
Ekstrakt bakteryjny S30	Mgr Marcin Osuch Zakład Biochemii UAM

## 6.4 Syntetyczne oligonukleotydy

### 6.4.1 Syntetyczne oligonukleotydy DNA

<b>Oligonukleotydy wykorzystywane do reakcji wydłużania starterów</b>	
<b>Nazwa</b>	<b>Sekwencja 5' - 3'</b>
<i>AgyB</i> F	TAATACGACTCACTATAggCGATAACACAACAATATCAGTATCTCATG
<i>AgyB</i> R	AAAAATGCCGAATGGGTTCGGGCAATAGCATGAGATACTGATATTGTTG
<i>chbBC</i> -IGR F	TAATACGACTCACTATAggTTTATTTTAAATTTTCCCGTCAAAGAGTTATTTCAATAAT CAATACC
<i>chbBC</i> -IGR F mut	TAATACGACTCACTATAggTTTATTTTAAATTTTCCCGTCAAAGAGTTATTTCAATAAT CAATACC
<i>chbBC</i> -IGR R	AGAAAAATACCTTAAAAACCGCAATTTAAATATTGCGGTATTGATTTATGAAATAAC
<i>chiP</i> F	TAATACGACTCACTATAGGTAGTCAGCGAGACTTTTCTCAACGCTACTTTTTTAATTTT TATTTTTTCGCTGTTCA
<i>chiP</i> R	GCCACTAAACGTACGCATGGGTAAATCCTCTTTGACGTATAAATTGCTGCACCAAAGGT GAACAGCGAAAAATA
<i>ChiX</i> F	TAATACGACTCACTATAGGACACCGTCGCTTAAAGTGACGGCATAAATAAAAAAATG
<i>ChiX</i> R	AAAAAAATGGCCAATATCGCTATTGGCCCGTCAAAGAGGAATTTTCATTTTTTTATTATT ATGCCG
<i>ChiX</i> R mut	AAAAAAATGGCCAATATCGCTATTGGCCCGTCAAAGAGGAATTTTCATTTTTTTATTATT ATGCCG
<i>ompC</i> R	AGCTGGTACCAGGAGGGACAGTACTTTAACTTTCATGTTATTAACCTCTGTTATATGC CTTTATTGCTTTTTT
<i>ompC(A)</i> F	TAATACGACTCACTATAGGTGCCGACTGGTTAATGAGGGTTAACCAGTAAGCAGTGGCA TAAAAAAGCAATAAAGGCATA
<i>ompC(C)</i> F	TAATACGACTCACTATAGGTGCCGACTGGTTAATGAGGGTTAACCAGTAAGCAGTGGCC TAAAAAAGCAATAAAGGCATA
<i>ompC(G)</i> F	TAATACGACTCACTATAGGTGCCGACTGGTTAATGAGGGTTAACCAGTAAGCAGTGGCG TAAAAAAGCAATAAAGGCATA
<i>ompC(U)</i> F	TAATACGACTCACTATAGGTGCCGACTGGTTAATGAGGGTTAACCAGTAAGCAGTGGCT TAAAAAAGCAATAAAGGCATA
<i>ompS</i> F	TAATACGACTCACTATAGGTATCAATTTGTAGTTTTGTGAAGTGGCTACATATTCATA TAAATTATTAT
<i>ompS(A)</i> R	CGCCGGGACAAGCAGTGCCAGAACTTTTCTGTTTCATTATGTATTCCTTATGATAATAA TTTATATGAATATG
<i>ompS(C)</i> R	CGCCGGGACAAGCAGGGCCAGAACTTTTCTGTTTCATTATGTATTCCTTATGATAATAA TTTATATGAATATG
<i>ompS(G)</i> R	CGCCGGGACAAGCAGCGCCAGAACTTTTCTGTTTCATTATGTATTCCTTATGATAATAA TTTATATGAATATG
<i>ompS(U)</i> R	CGCCGGGACAAGCAGAGCCAGAACTTTTCTGTTTCATTATGTATTCCTTATGATAATAA TTTATATGAATATG
<i>ompW</i> F	TAATACGACTCACTATAGCTTTTATAACCATAACGATGGAGCGGGTATGAAAAAATTTA C
<i>ompW(A)</i> R	TGTTAACGCCAGTGCTGCCACTGTAAATTTTTTCATACCC
<i>ompW(C)</i> R	TGTTAACGCCAGTGCGGCCACTGTAAATTTTTTCATACCC
<i>ompW(G)</i> R	TGTTAACGCCAGTGCCGCCACTGTAAATTTTTTCATACCC
<i>ompW(U)</i> R	TGTTAACGCCAGTGCGGCCACTGTAAATTTTTTCATACCC
<i>RybB</i> EC F	TAATACGACTCACTATAGGCCACTGCTTTTCTTTGATGTCCCATTTTTGTGGAGCCC
<i>RybB</i> EC F mut	TAATACGACTCACTATAGGCCACTCGTTTTGTTTGTATGTCCCATTTTTGTGGAGCCC
<i>RybB</i> EC R	AAAAAACCACATCAACCTTGAACCGAAATGGCGGGGTTGATGGGCTCCACAAAATGGGG
<i>RybB</i> Sth F	TAATACGACTCACTATAGGCCACTGCTTTTCTTTGATGTCCCATTTTTGTGGAGCCCATC
<i>RybB</i> Sth R	AAAAAACCACCAACCTTGAACCGAAATGGCGGGGTTGATGGGCTCCACAAAATGGG
<i>tsx</i> EC F	TAATACGACTCACTATAGCTCTGTATACGAAATATTTAGAAACGCAATTTGCGCCTTTT TCACTCCCGCAAGGGAT

<i>tsx</i> EC R	GCCAGTACCGCACCGGCTGCCAGTAATGTTTTTTTCATATGTATGCCACTGTTTGAAAA TCCCTTGCGGGAGTGAAAA
<i>tsx</i> Sth F	TAATACGACTCACTATAGGCGCAGAAACACGAAATATTTAGAAACGCAAATTGCGTTCT TTTCACTCCCGAAGGGATTTCAAA
<i>tsx(A)</i> Sth R	CCAGCGCTGCGCTGACTGCGAGTAAAGTTTTTTTCATATGTATGCCACTGTTTGAAATC CCTTGCGGGAGTG
<i>tsx(C)</i> Sth R	CCAGCGCTGCGCTGACTGCGAGTAAAGTTTTTTTCATATGTAGGCCACTGTTTGAAATC CCTTGCGGGAGTG
<i>tsx(G)</i> Sth R	CCAGCGCTGCGCTGACTGCGAGTAAAGTTTTTTTCATATGTACGCCACTGTTTGAAATC CCTTGCGGGAG
<i>tsx(U)</i> Sth R	CCAGCGCTGCGCTGACTGCGAGTAAAGTTTTTTTCATATGTAAGCCACTGTTTGAAATC CCTTGCGGGAGTG
AgvB F mut	TAATACGACTCACTATAggCGATAACACTTGTATATCAGTATCTCATG

<b>Oligonukleotydy wykorzystywane do amplifikacji fragmentu DNA</b>	
<b>Nazwa</b>	<b>Sekwencja 5' - 3'</b>
3'ETS <sup>leuZ</sup> F	TAATACGACTCACTATAgCCCCGATGGTGGAATCGGT
3'ETS <sup>leuZ</sup> R	AAAAAAACCACCCGAAGGTGGTTTCAGG
GcvB F	TAATACGACTCACTATAgACTTCTGAGCCGGAACG
GcvB R	AAAAAAAGCACCGCAATTAGGCGGTGCTACATTAATC
<i>ompA</i> F T7	TAATACGACTCACTATAGGCCAGGGGTGCTCAGCATAAGC
<i>ompA(A)</i> R	TAGCGAAACCAGCCAGTGCCACTGC
<i>ompA(C)</i> R	TAGCGAAACCAGCCAGGGCCACTGC
<i>ompA(G)</i> R	TAGCGAAACCAGCCAGCGCCACTGC
<i>ompA(U)</i> R	TAGCGAAACCAGCCAGAGCCACTGC
<i>ompC</i> T7 F	GTTTTTAATACGACTCACTATAGCCGACTGGTTAATGAGG
<i>ompC::GFP</i> R	CGGCGGATTTGTCTACT

<b>Oligonukleotydy wykorzystywane do mutagenyzy punktowej DNA</b>	
<b>Nazwa</b>	<b>Sekwencja 5' - 3'</b>
3'ETS <sup>leuZ</sup> F mut	GAATAAAATCAAACGAATAACGAGTGTCGTGAAACC
3'ETS <sup>leuZ</sup> R mut	GGTTTCACGACACTCGTTATTGTTTTGATTTTATTC
GcvB F mut	GGTTGTGATGTTGTGTACAAGTGTGCAATTG
GcvB R mut	CAATTGCAAACTTGTACACAACATCACAACC
Hfq K56A F	CAGCCAGATGGTTTACGCGCACGCGATTTCTACT
Hfq K56A R	AGTAGAAATCGCGTGCGCGTAAACCATCTGGCTG
Hfq R16A F	TTCTGAACGCATTGGCTCGGGAACGTGTTCCAG
Hfq R16A R	CTGGAACACGTTCCCGAGCCAATGCGTTCAGGAA
Hfq Y25D F	CCAGTTTCTATTGATTTGGTGAATGGTATT
Hfq Y25D R	AATACCATTACCAAATCAATAGAAACTGG
<i>ompC::GFP</i> mut A>C F	CCAGTAAGCAGTGGCCTAAAAAAGCAATAAAGGC
<i>ompC::GFP</i> mut A>C R	GCCTTTATTGCTTTTTTAGGCCACTGCTTACTGG
<i>ompC::GFP</i> mut A>G F	CCAGTAAGCAGTGGCGTAAAAAAGCAATAAAGGC
<i>ompC::GFP</i> mut A>G R	GCCTTTATTGCTTTTTTACGCCACTGCTTACTGG
<i>ompC::GFP</i> mut A>U F	CCAGTAAGCAGTGGCTTAAAAAAGCAATAAAGGC
<i>ompC::GFP</i> mut A>U R	GCCTTTATTGCTTTTTTAAGGCCACTGCTTACTGG

<b>Oligonukleotydy wykorzystywane do sekwencjonowania DNA</b>	
<b>Nazwa</b>	<b>Sekwencja 5' - 3'</b>
pXG10seq	GTCTCATTTCGCCAGATATC
SP6	TATTTAGGTGACACTATAG

### 6.4.2 Syntetyczne oligorybonukleotydy

<b>Nazwa</b>	<b>Sekwencja 5' - 3'</b>
<i>ompC(A)</i> -15	AAGCAGUGGCAUAAA
<i>ompC(C)</i> -15	AAGCAGUGGCCUAAA
<i>ompC(G)</i> -15	AAGCAGUGGCGUAAA
<i>ompC(U)</i> -15	AAGCAGUGGCUUAAA
<i>ompD(A)</i> -14	GGCAGUGGCAGUGA
<i>ompD(C)</i> -14	GGCAGUGGCCGUGA
<i>ompD(G)</i> -14	GGCAGUGGCGGUGA
<i>ompD(U)</i> -14	GGCAGUGGCUGUGA
<i>ompW(A)</i> -12	CAGUGGCAGGAC
<i>ompW(C)</i> -12	CAGUGGCCGGAC
<i>ompW(G)</i> -12	CAGUGGCGGGAC
<i>ompW(U)</i> -12	CAGUGGCUGGAC
RybB-10	GCCACUGCUU
RybB-7	GCCACUG
RybB-9	GCCACUGCU
<i>tsx(A)</i> -12	CAGUGGCAUACA
<i>tsx(C)</i> -12	CAGUGGCCUACA
<i>tsx(G)</i> -12	CAGUGGCGUACA
<i>tsx(U)</i> -12	CAGUGGCUUACA

## 6.5 Szczepy i plazmidy bakteryjne

### 6.5.1 Szczepy bakteryjne

<b>Nazwa</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Zastosowanie</b>	<b>Producent</b>
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	<i>supE44</i> $\Delta$ <i>lacU169</i> ( $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15) <i>hsdR17 recA1</i> <i>endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Do namnażania wektorów bakteryjnych	Invitrogen (Thermo Scientific)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>ompT gal dcm lon</i> <i>hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>)</i> $\lambda$ (DE3 [ <i>lacI</i> <i>lacUV5-T7 gene 1</i> <i>ind1 sam7 nin5</i> ])	Do nadekspresji rekombinowanej polimerazy faga T7 oraz Hfq z <i>E. coli</i>	Invitrogen (Thermo Scientific)

### 6.5.2 Plazmidy bakteryjne

Nazwa	Fragment ulegający ekspresji	Miejsce startu replikacji/Marker oporności	Referencja
pVP16-1	<i>ompC:GFP</i>	pSC101/Cm <sup>R</sup>	(Papenfort i wsp., 2010) otrzymany dzięki uprzejmości Prof. J. Vogla
pGEM: <i>ompA(A)</i>	<i>ompA(A)</i>	f1/Amp <sup>R</sup>	Ta praca
pGEM: <i>ompA(C)</i>	<i>ompA(C)</i>	f1/Amp <sup>R</sup>	Ta praca
pGEM: <i>ompA(G)</i>	<i>ompA(G)</i>	f1/Amp <sup>R</sup>	Ta praca
pGEM: <i>ompA(U)</i>	<i>ompA(U)</i>	f1/Amp <sup>R</sup>	Ta praca
pGEM:GcvB	GcvB	f1/Amp <sup>R</sup>	Ta praca
pGEM:3'ETS <sup>leuZ</sup>	3'ETS <sup>leuZ</sup>	f1/Amp <sup>R</sup>	Ta praca
pET15b:HfqWT	Hfq WT	f1/Amp <sup>R</sup>	Uzyskany przez dr J. Stróżecką w Zakładzie Biochemii UAM
pET15b:HfqR16A	Hfq R16A	f1/Amp <sup>R</sup>	Ta praca
pET15b:HfqK56A	Hfq K56A	f1/Amp <sup>R</sup>	Ta praca
pET15b:HfqY25D	Hfq Y25D	f1/Amp <sup>R</sup>	Ta praca

### 6.6 Podłoża i pożywki

Pożywka stała Luria-Bertani

5 g ekstrakt drożdżowy  
 10 g trypton  
 10 g NaCl  
 15 g agar  
 na 1000 ml wody destylowanej

Pożywka płynna Luria-Bertani

5 g ekstrakt drożdżowy  
 10 g trypton  
 10 g NaCl  
 na 1000 ml wody destylowanej



Roztwór agarozy	0,5-2% agarozą (w/v) 1x TBE
Roztwór żelu poliakrylamidowego natywnego	8-20% roztworu akrylamid:bisakrylamid 29:1(v/v) 1x TBE
Roztwór żelu poliakrylamidowego denaturującego do oczyszczania DNA/RNA	10-20% roztworu akrylamid:bisakrylamid 29:1 (v/v) 8M mocznik 1x TBE
Roztwór żelu poliakrylamidowego denaturującego do analizy produktów hydrolizy enzymatycznej	10-20% roztworu akrylamid:bisakrylamid 19:1 (v/v) 8M mocznik 1x TBE

### 6.8.2 Bufory i roztwory wykorzystywane do elektroforezy białek

Bufor „dolny” 4x stężony	1,5 M Tris-HCl pH 8,8 0,4 % SDS (w/v)
Bufor „górny” 4x stężony	1,5 M Tris-HCl pH 6,8 0,4 % SDS (w/v)
Bufor elektrodowy do elektroforezy SDS-PAGE	25 mM Tris 250 mM glicyna 0,1% SDS (w/v)
Bufor Laemmli do prób 2x stężony	4% SDS (w/v) 20% glicerol (v/v) 10% 2-merkaptoetanol (v/v) 0.004% błękit bromofenolowy (w/v) 0,125 M Tris HCl, pH 6,8

Odbarwiacz do białkowych żeli poliakrylamidowych:	30% metanol (v/v) 10% kwas octowy (v/v)
Roztwór do barwienia białkowych żeli poliakrylamidowych	0,1 % Comassie Brilliant Blue R250 (w/v) 50% metanol (v/v) 10% kwas octowy lodowaty (v/v)
Roztwór żelu rozdzielającego	10-15% roztwór akrylamid:bisakrylamid 29:1 (v/v) 1x bufor „dolny”
Roztwór żelu zagęszczającego	4,5% roztwór akrylamid:bisakrylamid 29:1 (v/v) 1x bufor „górny”

### 6.8.3 Bufory wykorzystywane do izolacji i analizy oddziaływań z RNA

Bufor do elucji RNA z żelu poliakrylamidowego	0,3 M NaOAc pH 5,4 1 mM EDTA
Bufor do topień	100 mM NaCl 20 mM kakodylan sodu, 0,5 mM Na <sub>2</sub> EDTA pH 7
Bufor do transkrypcji 10x stężony	800 mM Tris pH 8,0 200 mM MgCl <sub>2</sub> 20 mM spermidyna 100 mM NaCl
Bufor do wiązania 5x stężony	120 mM Tris pH 7,5 250 mM NaCl 250 mM KCl 250 mM NH <sub>4</sub> Cl

	2,5 mM EDTA
	25% glicerol (v/v)
Bufor do testów kompetycyjnych 4x stężony	200 mM HEPES pH 7,5 200 mM NaCl 200 mM KCl 0,4 mM EDTA 10 mM MgCl <sub>2</sub>

#### **6.8.4 Bufory wykorzystywane do hydrolizy enzymatycznej RNA**

Bufor do przechowywania RNazy T1	50 mM Tris-HCl pH 7,4 50% glicerol (v/v)
Bufor do przechowywania RNazy T2	15 mM octan sodu pH 4,5 100 mM NaCl 50% glicerol (v/v)
Bufor do przechowywania nukleazy S1	20 mM Tris-HCl 50 mM NaCl 0,1 mM ZnCl <sub>2</sub> 50% glicerol (v/v)
Bufor do hydrolizy RNazą T1 w warunkach denaturujących	50 mM cytrynian sodu pH 4,3 7 M mocznik
Bufor do hydrolizy RNazą T1 w warunkach natywnych	12 mM Tris-HCl pH 7,2 48 mM NaCl 1,2 mM MgCl <sub>2</sub>
Bufor do hydrolizy nukleazą S1	25 mM NaOAc pH 4,5 50 mM KCl 1 mM ZnCl <sub>2</sub>

Bufor STOP  
20 mM EDTA  
8 M mocznik

### 6.8.5 Roztwory wykorzystywane do translacji *in vitro*

Koktajl S30  
184 mM HEPES-KOH pH 7,5  
5,7 mM DTT  
4 mM ATP  
2,7 mM CTP  
2,7 mM GTP  
2,7 mM UTP  
267 mM CP  
0,8 mg/ml CK  
13% PEG (w/v)  
2 mM cAMP  
0,2 mM kwas folinowy  
580 µg/ml mieszanina tRNA  
700 mM glutaminian potasu  
90 mM octan amonu  
7,2 mM octan magnezu

Mieszanina aminokwasów pH 7,5  
10 mM L-feniloalanina  
10 mM L-glutamina\*  
10 mM L-izoleucyna  
10 mM L-leucyna\*  
10 mM L-prolina  
10 mM L-seryna  
10 mM L-treonina  
10 mM L-tryptofan\*  
10 mM L-tyrozyna\*  
10 mM L-walina  
10 mM chlorowodorek L-cysteiny  
10 mM chlorowodorek L-histydyny  
10 mM chlorowodorek L-lizyny

10 mM chlowodorek L-argininy\*

10 mM kwas L-asparaginowy

10 mM kwas L-glutaminowy\*

10 mM L-alanina

10 mM L-asparagina\*

\* początkowo rozpuszczone w małej  
objętości 1M HCl

### 6.8.6 Bufory wykorzystywane do oczyszczania polimerazy z faga T7

Bufor PA 2x stężony

100 mM Tris pH 8

1500 mM NaCl

10 mM 2-merkaptoetanol

10% glicerol (v/v)

Bufor PB

1x bufor A

1M imidazol pH 8,0

Bufor do dializy 1

50 mM Tris pH 8

500 mM NaCl

10 % glicerol (v/v)

Bufor do dializy 2

50 mM Tris pH 8

250 mM NaCl

20 % glicerol (v/v)

Bufor do dializy 3

50 mM Tris pH 8

250 mM NaCl

30 % glicerol (v/v)

Bufor do dializy 4

50 mM Tris pH 8

250 mM NaCl

40 % glicerol (v/v)

Bufor do dializy 5  
50 mM Tris pH 8  
250 mM NaCl  
50 % glicerol (v/v)

Bufor P do sączenia  
50 mM Tris pH 8  
750 mM NaCl  
5% glicerol (v/v)

### **6.8.7 Bufory wykorzystywane do oczyszczania wariantów białka Hfq z mutacjami**

Bufor do zawieszania komórek  
50 mM HEPES pH 7,5  
500 mM NH<sub>4</sub>Cl  
5% glicerol (v/v)

Bufor HA  
35 mM imidazol pH 7,5  
50 mM HEPES pH 7,5  
500 mM NH<sub>4</sub>Cl  
5% glicerol (v/v)

Bufor HB  
600 mM imidazol pH 7,5  
50 mM HEPES pH 7,5  
500 mM NH<sub>4</sub>Cl  
5% glicerol (v/v)

Bufor H do sączenia  
50 mM HEPES pH 7,5  
250 mM NH<sub>4</sub>Cl  
10% glicerol (v/v)  
1 mM EDTA

## 7. METODY

### 7.1 Metody mikrobiologiczne

#### 7.1.1 Standardowe warunki wzrostu

Hodowlę bakterii *E. coli* prowadzono w 37°C na pożywce stałej LB z agarem lub na pożywce płynnej LB z wytrząsaniem 180 rpm. Hodowle były inokulowane z pojedynczej kolonii lub z hodowli nocnej rozcieńczonej w stosunku 1:100 świeżą pożywką. W zależności od potrzeb pożywki były suplementowane według opisu znajdującego się w podrozdziale 6.7.

W przypadku prowadzenia hodowli na dużą skalę do nadekspresji rekombinowanej polimerazy RNA faga T7 lub białka Hfq przygotowano sześć kolb zawierających po 500 ml pożywki LB i inokulowano hodowlą nocną. Po uzyskaniu wartości  $OD_{600} \sim 0,5-0,6$  indukowano nadprodukcję białka przez dodanie IPTG (stężenie końcowe w pożywce 1 mM), po czym prowadzono hodowlę przez trzy godziny w 30°C. Po zakończeniu hodowli zwirowano pożywkę zawierającą bakterie przez 8 min w 4°C 5000 rpm (rotor JLA10.500 wirówka Beckman Coulter Avanti J-26XP). Uzyskany osad zawierający bakterie zawieszono w buforze PA (polimeraza RNA z faga T7) lub w buforze do zawieszania komórek (Hfq) i poddano lizie lub zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -80°C do czasu lizy.

#### 7.1.2 Otrzymywanie komórek kompetentnych

Hodowlę nocną komórek kompetentnych *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS lub *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  zainokulowano komórkami z poprzedniej izolacji. Hodowlę prowadzono w 10-15 ml LB w 37°C. Kolejnego dnia zaszczepiono 100 ml świeżej pożywki LB hodowlą nocną, rozcieńczając ją 100-krotnie. Kolejno prowadzono hodowlę w 37°C do uzyskania wartości  $OD_{600} \sim 0,3-0,4$ . Następnie hodowlę poddano wirowaniu (5000 rpm przez 10 minut w 4°C) i zawieszono osad w 25 ml schłodzonego 100 mM MgCl<sub>2</sub>, po czym pozostawiono na lodzie na 3 do 5 minut. Kolejno komórki poddano wirowaniu (4000 rpm przez 10 min w 4°C) i zawieszono osad w 50 ml schłodzonego 100 mM CaCl<sub>2</sub> i pozostawiono na lodzie na 20 minut. Po tym czasie komórki poddano kolejnemu wirowaniu (4000 rpm przez 10 min w 4°C) i zawieszono osad w schłodzonym 85 mM CaCl<sub>2</sub> z dodatkiem 15%

glicerolu. Tak przygotowane komórki kompetentne porpcjowano po 100  $\mu$ l i przechowywano w  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 7.1.3 Transformacja komórek kompetentnych

Do probówek typu Eppendorf pobrano sterylnie po 100  $\mu$ l komórek kompetentnych *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  lub *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS. Następnie do komórek dodano sterylnie roztwór plazmidów (ilość podana w tabeli). Następnie komórki inkubowano przez 30 minut na lodzie. Po tym czasie przeprowadzono szok cieplny przez umieszczenie komórek na 1,5 minuty w  $42^{\circ}\text{C}$ , a następnie inkubację przez 2 min na lodzie. Po tym czasie do komórek dodano 900  $\mu$ l podgrzanej do  $37^{\circ}\text{C}$  pożywki LB i umieszczono w cieplarni z wytrząsaniem o temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$  na godzinę. Następnie wysiano komórki na szalki Petriego z pożywką stałą LA zawierającą odpowiednie antybiotyki i suplementy (podane w tabeli) umożliwiające selekcję transformantów.

Rodzaj plazmidu	Ilość plazmidu	Szczep	Antybiotyki dodane do pożywki stałej	Suplementy dodane do pożywki stałej
pGEM po reakcji ligacji	10 $\mu$ l	DH5 $\alpha$	ampicylina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Dodane bezpośrednio na płytkę z pożywką: 10 $\mu$ l 1M IPTG 20 $\mu$ l 50 mg/ml X-Gal
pVP16-1 po mutagenezie	5 $\mu$ l	DH5 $\alpha$	chloramfenikol (60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	
Plazmid do nadprodukcji polimerazy RNA z faga T7/ pET15b:Hfq po mutagenezie	1 $\mu$ l	BL21(DE3) pLysS	ampicylina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) chloramfenikol (60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	

## 7.2 Metody biologii molekularnej

### 7.2.1 Precypitacja kwasów nukleinowych

W celu zagęszczenia preparatów kwasów nukleinowych stosowano precypitację etanolem. Do roztworu kwasu nukleinowego dodawano 0,1 objętości 3M NaOAc pH 5,4 (etap był pomijany podczas precypitacji kwasu nukleinowego po elucji z żelu) oraz 3 objętości 96% etanolu. Następnie próby precypitowano przez godzinę w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$  lub przez noc w  $-20^{\circ}\text{C}$ , po czym poddano wirowaniu (14000 rpm przez 40 min w  $4^{\circ}\text{C}$ ), usunięto supernatant i osuszono osad zawierający kwasy nukleinowe w wirówce z pompą próżniową. Kolejno osad rozpuszczono w 50  $\mu\text{l}$  wody demineralizowanej i zmierzono stężenie za pomocą spektrofotometru NanoDrop.

### 7.2.2 Oczyszczanie oligonukleotydów

Syntetyzowane chemicznie oligonukleotydy DNA (Sigma) przeznaczone do reakcji wydłużania starterów oczyszczano na żelu denaturującym w celu usunięcia produktów ubocznych syntezy. Oligonukleotydy rozpuszczono w wodzie miliQ do uzyskania stężenia 500  $\mu\text{M}$ . Następnie do 8  $\mu\text{l}$  rozpuszczonych oligonukleotydów dodano 8  $\mu\text{l}$  8 M mocznika. Cząsteczki oczyszczano na 10% denaturującym żelu poliakrylamidowym po uprzedniej denaturacji przez 2 minuty w  $90^{\circ}\text{C}$ . Elektroforezę prowadzono przy mocy 15 W. Po rozdzielu żel analizowano na płytce TLC zawierającej złożę krzemionkowe przez monitorowanie pochłaniania światła UV przy długości fali 260 nm przez DNA (ang. *UV shadowing*) i wycinano fragmenty żelu zawierające oligonukleotydy o odpowiedniej długości. Następnie DNA eluowano poprzez umieszczenie fragmentów żelu w 500  $\mu\text{l}$  0,3 M NaOAc pH 5,4 przez noc w temperaturze  $4^{\circ}\text{C}$  z wytrząsaniem (300 rpm). Po elucji próby krótko wirowano i przenoszono supernatant do świeżych probówek typu Eppendorf i precypitowano DNA zgodnie z metodą opisaną w podrozdziale 7.2.1.

### 7.2.3 Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR)

Technikę PCR stosowano do uzyskania matrycy do transkrypcji *in vitro* przez reakcję wydłużania starterów, a także do amplifikacji fragmentu DNA na matrycy genomowego DNA *S. enterica* lub *E. coli* oraz do mutagenyzy punktowej sekwencji

DNA znajdującej się w wektorze. Warunki reakcji były różne w zależności od zastosowania.

Skład mieszaniny reakcyjnej i warunki reakcji:

a) Reakcja wydłużania starterów:

Składnik	Stężenie końcowe
Bufor	1x
Mieszanina dNTP	0,2 mM
Starter F	1,5 $\mu$ M
Starter R	1,5 $\mu$ M
Polimeraza DreamTaq	0,05 U/ $\mu$ l
Woda	Do 200 $\mu$ l

Etap	Temperatura/ Czas	Liczba cykli
Denaturacja wstępna	94 °C/ 5 min	1
Denaturacja	94°C/ 1 min 15 s	7
Przyłączanie starterów	55°C/ 1 min 15 s	7
Elongacja	72°C/ 2 min	7
Końcowa elongacja	72°C/ 10 min	1

Po zakończonej reakcji mieszanina reakcyjna była oczyszczana z białek przez ekstrakcję układem fenol/chloroform/alkohol izoamylowy, następnie faza wodna zawierająca DNA została przeniesiona do nowej probówki i poddana precypitacji według procedury opisanej w podrozdziale 7.2.1.

b) Amplifikacja fragmentu DNA na matrycy plazmidu lub genomowego DNA:

Składnik	Stężenie końcowe
Matryca DNA	2-20 ng/ $\mu$ l
Bufor	1x
Mieszanina dNTP	0,2 mM
Starter F	0,4 $\mu$ M
Starter R	0,4 $\mu$ M
Polimeraza DreamTaq	0,05 U/ $\mu$ l
Woda	Do 50 $\mu$ l

Etap	Temperatura/ Czas	Liczba cykli
Denaturacja wstępna	95 °C/ 2 min	1
Denaturacja	95°C/ 30 s	30
Przyłączanie starterów	58°C/ 30 s	30
Elongacja	72°C/ 30 s	30
Końcowa elongacja	72°C/ 10 min	1

Po zakończeniu reakcji w przypadku amplifikacji fragmentu na matrycy genomowego DNA mieszaninę reakcyjną poddano rozdzielaniu w żelu agarozowym według metody opisanej w podrozdziale 7.2.4. Następnie fragment żelu zawierający DNA o właściwej długości poddano izolacji zestawem do ekstrakcji DNA z żelu agarozowego. Oczyszczony fragment DNA posłużył jako insert do klonowania do wektora pGEM zgodnie z metodą opisaną w podrozdziale 7.2.5. W przypadku amplifikacji fragmentu DNA na matrycy plazmidu mieszanina reakcyjna posłużyła jako matryca do transkrypcji *in vitro* według metody opisanej w podrozdziale 7.3.1.

c) Mutageneza punktowa sekwencji DNA znajdującej się w wektorze

Składnik	Stężenie końcowe	Etap	Temperatura/ Czas	Liczba cykli
Matryca DNA	2 ng/μl	Denaturacja wstępna	95°C/ 3 min	1
Bufor	1x	Denaturacja	95°C/ 30 s	18
Mieszanina dNTP	0,2 mM	Przyłączanie starterów	58°C/ 1 min	18
Starter F	0,2 μM	Elongacja	72°C/ 12 min	18
Starter R	0,2 μM	Końcowa elongacja	72°C/ 10 min	1
Polimeraza Pfu Turbo Cx	0,05 U/μl			
Woda	Do 50 μl			

Po zakończeniu reakcji przeprowadzono trawienie restrykcyjne matrycowego, metylowanego DNA za pomocą enzymu DpnI (inkubacja przez godzinę w 37°C, inaktywacja przez 20 min w 80°C). Mieszanina reakcyjna po trawieniu restrykcyjnym posłużyła do transformacji komórek kompetentnych DH5α zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 7.1.3.

#### 7.2.4 Elektroforeza w żelu agarozowym

W celu przeprowadzenia elektroforezy DNA w żelu agarozowym, przygotowano roztwór 0,5-2% agarozy (w/v) w buforze 1xTBE, do którego po schłodzeniu do temperatury około 45°C dodano 2 μl barwnika Midori Green, który umożliwił późniejszą wizualizację DNA w żelu. Do prób nanoszonych na żel dodano 6x stężony bufor obciążający, co pozwoliło na monitorowanie migracji

DNA podczas elektroforezy. Elektroforezę prowadzono przy stałym napięciu 100V przez około 30 min, a następnie żel poddano wizualizacji pod lampą UV lub za pomocą urządzenia G:BOX.

### 7.2.5 Klonowanie do wektora pGEM

Fragmety DNA amplifikowane za pomocą polimerazy Taq zostały poddane oczyszczeniu na żelu agarozowym i ekstrakcji przy użyciu gotowego zestawu do ekstrakcji DNA z żeli agarozowych (GeneJET gel extraction and DNA cleanup Micro kit). Oczyszczone fragmenty DNA posłużyły jako insert do reakcji ligacji. Przygotowano 10 µl mieszaniny ligacyjnej zawierającej 50 ng plazmidu pGEM, 1 U ligazy DNA faga T4, bufor 1x do ligazy oraz 1 µl insertu. Reakcję ligacji prowadzono przez noc w 4°C, a następnie ligazę poddano inaktywacji w 65°C przez 5 min. Uzyskany wektor poddano transformacji do komórek kompetentnych DH5α zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 7.1.3. Warunki hodowli umożliwiły selekcję wektorów posiadających insert.

## 7.3 Metody pracy z RNA

### 7.3.1 Transkrypcja *in vitro*

W celu przeprowadzania reakcji transkrypcji *in vitro* przygotowano mieszaninę reakcyjną o objętości 100 µl zawierającą:

Składnik	Stężenie końcowe
Bufor do transkrypcji 10x stężony	1x
ATP	4 mM
CTP	4 mM
GTP	4 mM
UTP	4 mM
DTT	25 mM
MgCl <sub>2</sub>	18 mM
Guanozyna	2 mM
Polimeraza RNA z faga T7	4,5 µg
Woda	Do 100 µl

Matrycowe DNA (5 µl) poddano denaturacji przez 5 min w temperaturze 90°C, następnie pozostawiono w temperaturze pokojowej na 10 min. Kolejno dodano pozostałe składniki reakcji (90 µl) i inkubowano przez 3 godziny w temperaturze 37°C z wytrząsaniem (300 rpm). Następnie do mieszaniny

reakcyjnej dodano 33,3  $\mu$ l 100 mM EDTA, 13  $\mu$ l 3 M NaOAc pH 5,4 oraz 300  $\mu$ l 96% etanolu i precypitowano przez godzinę w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ . Kolejno poddano wirowaniu (14000 rpm przez 40 min w  $4^{\circ}\text{C}$ ), usunięto supernatant i wysuszono osad w wirówce z pompą próżniową.

### 7.3.2 Oczyszczanie RNA na żelu denaturującym

Osad zawierający RNA rozpuszczono w 30  $\mu$ l 8 M mocznika (dla RNA uzyskanych w skutek transkrypcji *in vitro*) lub w 100  $\mu$ l 8 M mocznika (dla RNA uzyskanych w wyniku syntezy chemicznej). Następnie RNA poddano denaturacji przez 2 min w  $90^{\circ}\text{C}$  i oczyszczono przez rozdział w 10% denaturującym żelu poliakrylamidowym przy mocy 15 W. Po zakończeniu elektroforezy, żel analizowano przez monitorowanie absorpcji światła UV przy długości fali 260 nm przez RNA (ang. *UV shadowing*) i wycięto fragmenty żelu odpowiadające RNA o określonej długości. Następnie RNA poddano elucji w buforze do elucji RNA przez noc w temperaturze  $4^{\circ}\text{C}$  z wytrząsaniem (300 rpm). Kolejno próby po elucji krótko wirowano i przeniesiono supernatant do świeżych probówek typu Eppendorf, następnie poddano precypitacji według procedury opisanej w podrozdziale 7.2.1.

### 7.3.3 Synteza chemiczna oligorybonukleotydów

Krótkie oligorybonukleotydy odpowiadające miejscom oddziaływania sRNA z mRNA zostały zsyntetyzowane w Zakładzie Chemii i Biologii Strukturalnej Kwasów Nukleinowych Instytutu Chemii Bioorganicznej w Poznaniu dzięki uprzejmości prof. Ryszarda Kierzka. Synteza chemiczna oligorybonukleotydów została wykonana przy użyciu automatycznego syntetyzera DNA/RNA MerMade 12 (BioAutomatization) przy zastosowaniu standardowej metody fosforamidowej (Kierzek i wsp., 1986). Oligonukleotydy RNA zostały usunięte z nośnika stałego CPG i odblokowane przez traktowanie mieszaniną 32% amoniak/etanol w stosunku objętościowym 3:1 v/v w  $55^{\circ}\text{C}$  przez noc (Stawinski i wsp., 1988). Nośnik stały (CPG) został następnie odsączony, RNA poddano elucji wodą, po czym próby wysuszono przy użyciu wirówki z pompą próżniową. Następnie do osadów zawierających RNA dodano 30  $\mu$ l dimetyloformamidu (DMF) oraz 270  $\mu$ l trihydrofluorku trietyloaminy ( $\text{Et}_3\text{N}\cdot 3\text{HF}$ ) i inkubowano w  $55^{\circ}\text{C}$  przez 3 godziny. Kolejno do mieszaniny reakcyjnej dodano 4 ml n-butanolu w celu precypitacji i wysuszono. Następnie próby poddano odsalaniu z użyciem kolumnienek z

odwróconą fazą „Sep-pak” C-18 (Waters). Kolumnienki uprzednio przygotowano przez przemycie kolejno 10 ml metanolu, 10 ml acetonitrylu i 10 ml 10 mM roztworu octanu amonu. Na tak przygotowaną kolumnienkę naniesiono oligorybonukleotyd rozpuszczony w 10 ml 10 mM octanu amonu. Małocząsteczkowe zanieczyszczenia wymywano z kolumnienki, przemywając ją 10 ml 10 mM octanu amonu. Elucję oligorybonukleotydów prowadzono za pomocą 5 ml roztworu acetonitryl:woda 3:7 v/v. Zebraną frakcję odparowano do sucha w wirówce z pompą próżniową. Oligorybonukleotydy o długości powyżej 20 nukleotydów zostały oczyszczone na 10% żelu denaturującym według metody opisanej w podrozdziale 7.3.2, z tą różnicą, że osad zawierający oligorybonukleotydy został rozpuszczony w 100  $\mu$ l mocznika. Następnie próby po elucji, precypitacji i wysuszeniu zostały ponownie poddane odsalaniu z użyciem kolumnienek z odwróconą fazą „Sep-pak” C-18 (Waters). Oligorybonukleotydy o długości poniżej 20 nukleotydów zostały rozpuszczone w wodzie i oczyszczone za pomocą chromatografii cienkowarstwowej przez naniesienie na płytki Si500F (Baker) i rozdział przy użyciu mieszaniny n-propanol:amoniak:woda w stosunku 55:35:10 v/v jako eluentu (Chou i wsp., 1989). Najmniej mobilny produkt został poddany wizualizacji pod światłem ultrafioletowym, wycięty i eluowany za pomocą wody. Następnie próby zostały ponownie poddane odsalaniu z użyciem kolumnienek z odwróconą fazą „Sep-pak” C-18 (Waters).

#### **7.3.4 Znakowanie radioaktywne RNA na 5' końcu**

W celu wyznakowania cząsteczek RNA na 5' końcu przygotowano mieszaninę reakcyjną o objętości 20  $\mu$ l zawierającą RNA (końcowe stężenie 1000 nM), 1x stężony bufor A do kinazy polinukleotydowej faga T4 (PNK) (Thermoscientific), 1 U PNK oraz 25  $\mu$ Ci  $^{32}$ P- $\gamma$ -ATP. Reakcję prowadzono przez godzinę w temperaturze 37°C, następnie do reakcji dodano 30  $\mu$ l wody i prowadzono ekstrakcję układem fenol/chloroform/alkohol izoamylowy. Następnie faza wodna zawierająca  $^{32}$ P-RNA została przeniesiona do nowej probówki, do której dodano 20  $\mu$ l 8 M mocznika i  $^{32}$ P-RNA zostały poddane oczyszczaniu według procedury opisanej w rozdziale 7.3.2.

### 7.3.5 Wyznaczanie parametrów termodynamicznych krótkich dupleksów RNA

Stężenia poszczególnych oligorybonukleotydów obliczono na podstawie absorbancji mierzonej w temperaturze 80°C przy długości fali 260 nm oraz współczynników ekstynkcji. Pojedyncze nici RNA zostały poddane asocjacji w stosunku molowym 1:1. Eksperymenty topnienia zostały wykonane przy długości fali 26 nm za pomocą spektrofotometru Beckman DU 640 wyposażonego w kontroler temperatury o wysokiej wydajności. Zmiany w absorbancji dla oligorybonukleotydów w buforze do topnień ze 100 mM NaCl (rozdział 6.8.3) były rejestrowane, jako funkcja temperatury w zakresie od 4 do 85°C stosując szybkość wzrostu temperatury wynoszącą 1°C/min. Eksperyment został powtórzony dla 9 różnych stężeń dupleksu RNA, aby uzyskać 50-krotny zakres stężeń dla każdej badanej próby. Do analizy krzywych topnienia oraz wyznaczenia parametrów termodynamicznych zastosowano program MeltWin 3.5 zakładając model dwustanowy (McDowell i Turner, 1996). Parametry termodynamiczne dupleksów RNA zostały uzyskane przez analizę wykresu zależności odwrotności temperatury topnienia od logarytmu  $C_t/4$ , która pozwoliła na wyznaczenie zmian entalpii oraz entropii (Borer i wsp., 1974).  $T^{-1}_M = (2,3 R/\Delta H^\circ) \log C_t/4 + (\Delta S^\circ/\Delta H^\circ)$ .  $C_t$  to całkowite stężenie oligorybonukleotydu. Zmiana energii swobodnej Gibbsa w 37°C została obliczona, jako:  $\Delta G^\circ_{37} = \Delta H^\circ - (310,15 \text{ K})\Delta S^\circ$ .

### 7.3.6 Wyznaczanie stałej równowagi reakcji dysocjacji kompleksów RNA

W celu wyznaczenia stałej równowagi reakcji dysocjacji kompleksów RNA zastosowano metodę różnicowej migracji kompleksów w polu elektrycznym. Reakcje prowadzono w 1x buforze do wiązania, którego skład znajduje się w podrozdziale 6.8.3 (Lease i Woodson, 2004) w temperaturze pokojowej. Cząsteczki RNA przed dodaniem do reakcji zostały poddane renaturacji poprzez podgrzanie do 90°C przez 2 min, a następnie schładzanie przez 10 min w temperaturze pokojowej. 0,1 nM  $^{32}\text{P}$ -RNA były inkubowane przez noc z rozcieńczeniami nieznakowanego RNA (stężenia oznaczone na poszczególnych rycinach) w objętości 30  $\mu\text{l}$  w temperaturze pokojowej. Następnie z każdej reakcji nakładano po 5  $\mu\text{l}$  na 8% natywny żel poliakrylamidowy (29:1) przygotowany z roztworu

opisanego w podrozdziale 6.8.1. Elektroforezę prowadzono w 4°C przez godzinę przy mocy 4W w buforze 0,5x TBE. Następnie żele wysuszono i poddano ekspozycji z ekranem fosforowym przez noc. Kolejno ekrany fosforowe poddano analizie przy użyciu skanera FLA-5100 (Fujifilm). Frakcja związana dla poszczególnych kompleksów była obliczona za pomocą oprogramowania MultiGauge, jako proporcja intensywności znakowanego RNA w danym kompleksie do sumy intensywności wszystkich kompleksów i niezwiązanego znakowanego RNA w danej ścieżce. Następnie przy użyciu programu GraphPad Prism wygenerowano wykresy zależności frakcji związanej od stężenia nieznakowanego RNA i dopasowano punkty równaniem Michaelisa-Menten. Pozwoliło to na wyznaczenie wartości stałej równowagi reakcji dysocjacji ( $K_d$ ), na podstawie danych uzyskanych z minimum trzech niezależnych powtórzeń danego eksperymentu.

### 7.3.7 Wyznaczanie wartości $IC_{50}$ z reakcji kompetycji w równowadze

$^{32}P$ -RNA w stężeniu 0,1 nM znajdujące się w buforze do testów kompetycyjnych (podrozdział 6.8.3) bez chlorku magnezu poddano denaturacji przez 2 min w 90°C, a następnie pozostawiono na 10 min w temperaturze pokojowej. Po tym czasie dodano chlorek magnezu do końcowego stężenia 2,5 mM. Kolejno przygotowano szereg jedenastu rozcieńczeń kompetytorów, które przeniesiono w objętości po 10  $\mu$ l na dołek na płytce. Następnie do każdego dołka z kompetytorem dodano po 10  $\mu$ l  $^{32}P$ -RNA, a na końcu 10  $\mu$ l białka Hfq. Ostatecznie stężenia składników w reakcji wynosiły: 0,04 nM  $^{32}P$ -RNA, 4 nM Hfq i zakres stężeń kompetytorów (według opisu na poszczególnych wykresach). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 35 min. Następnie 25  $\mu$ l reakcji filtrowano i przemywano 100  $\mu$ l buforu do testów kompetycyjnych. Membrany wysuszono, a następnie eksponowano przez noc z ekranem fosforowym. Ekran skanowano, a frakcję związanego i wolnego RNA kwantyfikowano z wykorzystaniem programu MultiGauge (Fuji). W programie GraphPad Prism generowano wykresy zależności logarytmu stężenia kompetytora do frakcji związanej  $^{32}P$ -RNA do Hfq. Punkty dopasowywano według równania zakładającego jedno miejsce wiązania - sigmoidalny przebieg krzywej z wartością współczynnika Hilla=1

$$F_B = B + \frac{A - B}{1 + 10^{X - \log IC_{50}}}$$

A - plateau minimalne w jednostkach osi Y

B - plateau maksymalne w jednostkach osi Y

Średnią wartość  $IC_{50}$  obliczono z co najmniej trzech niezależnych eksperymentów.

### 7.3.8 Wyznaczanie obserwowanej szybkości asocjacji i stałej szybkości asocjacji kompleksów

Aby wyznaczyć wartość obserwowanej szybkości asocjacji dla kompleksów RNA lub dla kompleksów sRNA z mRNA i białkiem Hfq, zastosowano metodę różnicowej migracji kompleksów w polu elektrycznym. Reakcje prowadzono w 1x buforze do wiązania, którego skład znajduje się w podrozdziale 6.8.3 (Lease i Woodson, 2004) w 25°C. Cząsteczki RNA przed dodaniem do reakcji zostały poddane denaturacji w 90°C przez 2 min, a następnie fałdowaniu przez 10 min w temperaturze pokojowej. Reakcje prowadzono w objętości końcowej 120  $\mu$ l i zapoczątkowano je przez jednoczesne dodanie do  $^{32}$ P-RNA nieznakowanego RNA lub nieznakowanego RNA i białka Hfq. Końcowe stężenia składników reakcji są oznaczone na rycinach odnoszących się do poszczególnych eksperymentów. Przez cały czas trwania eksperymentu oraz godzinę po zakończeniu reakcji prowadzono elektroforezę w 4°C przy mocy 4 W w buforze TBE. W poszczególnych punktach czasowych nakładano po 5  $\mu$ l reakcji na natywny żel poliakrylamidowy. Reakcje kontrolne przygotowano w objętości 40  $\mu$ l na 30 min przed rozpoczęciem właściwej reakcji i nakładano na żel bezpośrednio przed rozpoczęciem właściwej reakcji oraz po jej zakończeniu. Po zakończeniu elektroforezy żele poddano suszeniu i ekspozycji przez noc w kasecie z ekranem fosforowym. Następnie ekrany analizowano przy użyciu skanera FLA-5100 (Fujifilm). Frakcja związana dla poszczególnych kompleksów była obliczona za pomocą oprogramowania MultiGauge, jako proporcja sumy intensywności znakowanego RNA w kompleksie z nieznakowanym RNA oraz w kompleksie sRNA z mRNA i Hfq do sumy intensywności wszystkich kompleksów i wolnego znakowanego RNA w danej ścieżce. Następnie przy użyciu programu GraphPad Prism wygenerowano wykresy zależności frakcji związanej od czasu i dopasowano punkty według równania wykładniczego jednofazowego. Pozwoliło to na wyznaczenie obserwowanej szybkości asocjacji ( $k_{obs}$ ), na podstawie danych uzyskanych z minimum trzech

niezależnych powtórzeń danego eksperymentu. Wartości stałej szybkości asocjacji ( $k_{on}$ ) kompleksów RNA-RNA wyznaczono przez pomiar wartości  $k_{obs}$  w co najmniej 4 stężeniach nieznakowanego RNA. Następnie wygenerowano wykres zależności wartości  $k_{obs}$  od stężenia nieznakowanego RNA, dane dopasowano do modelu regresji liniowej a wartości  $k_{on}$  obliczono z nachylenia krzywej regresji. Wartość stałej szybkości dysocjacji ( $k_{off}$ ) obliczono ze wzoru ( $k_{off} = k_{on} \times K_d$ ).

### 7.3.9 Wyznaczanie struktury RNA – hydroliza enzymatyczna

Wszystkie opisane poniżej reakcje hydrolizy enzymatycznej zawierały 5'-<sup>32</sup>P-RNA. Przed dodaniem do reakcji, cząsteczki RNA zostały poddane denaturacji w wodzie przez minutę w 90°C a następnie inkubacji przez 10 min w temperaturze pokojowej. Do każdej reakcji hydrolizy lub reakcji kontrolnej dodano na końcu 10 µl buforu STOP i schłodzono w temperaturze -20°C przed nałożeniem na żel. Produkty hydrolizy rozdzielano w denaturującym żelu poliakrylamidowym (skład opisano w podrozdziale 6.8.1. Następnie żel mrożono w temperaturze -20°C by zapobiec dyfuzji RNA w żelu i eksponowano na ekran fosforowy przez noc. Ekran skanowano przy użyciu skanera (Fuji), a intensywność prążków analizowano programem MultiGauge (Fuji).

#### Przygotowanie kontroli w wodzie

Kontrolę zawierającą 1 µl 200 nM <sup>32</sup>P-RNA w 9 µl wody poddano denaturacji w 90°C przez minutę, a następnie inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut.

#### Przygotowanie „drabinki” alkalicznej

2 µl 200 nM <sup>32</sup>P-RNA inkubowano w 10 µl formamidu w 100°C przez 60 min.

#### Hydroliza rybonukleazą T1

Warunki denaturujące: 1 µl <sup>32</sup>P-RNA 200 nM inkubowano z dodatkiem 8 µl buforu do trawienia RNazą T1 w warunkach denaturujących i 1 µl enzymu w 55°C przez 10 min.

Warunki natywne: 1 µl <sup>32</sup>P-RNA 200 nM inkubowano z 1 µl enzymu przez 10 min w temperaturze pokojowej w buforze do trawienia RNazą T1 w warunkach natywnych.

**Hydroliza rybonukleazą T2**

1  $\mu\text{l}$   $^{32}\text{P}$ -RNA 200 nM inkubowano z 0,1  $\mu\text{g}$  RNA drożdżowego i 1  $\mu\text{l}$  enzymu przez 15 min w temperaturze pokojowej w buforze do trawienia RNazą T2.

**Hydroliza nukleazą S1**

1  $\mu\text{l}$   $^{32}\text{P}$ -RNA 200 nM inkubowano z 1  $\mu\text{l}$  enzymu przez 10 min w temperaturze pokojowej w buforze do trawienia nukleazą S1.

**Analiza dostępności mRNA dla oddziaływania z sRNA – „RNA footprinting”**

W celu sprawdzenia zmian w dostępności mRNA *ompC* dla trawienia enzymatycznego rybonukleazą T1 w obecności sRNA RybB przygotowano reakcje zawierające  $^{32}\text{P}$ -RNA *ompC* lub  $^{32}\text{P}$ -RNA *ompC* z RybB (stężenia RybB dla poszczególnych eksperymentów zostały oznaczone na wykresie i rycinie). Reakcje inkubowano w buforze do trawienia RNazą T1 w warunkach natywnych przez 30 min w temperaturze pokojowej, po czym przeprowadzono hydrolizę enzymatyczną RNazą T1 w objętości końcowej 10  $\mu\text{l}$  w warunkach natywnych według metody opisanej w tym podrozdziale. Ponadto, zgodnie z wcześniej opisanymi procedurami przygotowano reakcje kontrolne zawierające:  $^{32}\text{P}$ -RNA *ompC* po hydrolizie RNazą T1 w warunkach denaturujących, drabinkę alkaliczną oraz kontrolę w wodzie.

**7.3.10 Translacja *in vitro***

RNA stosowane do reakcji przygotowano przez transkrypcję *in vitro* według procedury opisanej w podrozdziale 7.3.1, a następnie mRNA w fuzji z mRNA białka GFP poddano ekstrakcji układem fenol/chloroform/alkohol izoamylowy. Fazę wodną oczyszczono na kolumnkach P-6, w których uprzednio wymieniono fazę ruchomą na wodę miliQ, według protokołu producenta. Następnie RNA poddano precypitacji według metody opisanej w podrozdziale 7.2.1. sRNA używane do represji translacji były po transkrypcji *in vitro* oczyszczane na żelu denaturującym według procedury opisanej w podrozdziale 7.3.2.

Reakcje translacji *in vitro* były prowadzone w ekstrakcie S30 przygotowanym z hodowli komórek BL21 posiadających delecję genu *hfq* według protokołu (Zaher i Green, 2014) przez mgr Marcina Osucha. Reakcje translacji mRNA w fuzji z mRNA białka GFP w obecności sRNA lub Hfq lub sRNA I Hfq prowadzono w objętości 50  $\mu\text{l}$ . Ostateczne stężenia w reakcji wynosiły: 500 nM

mRNA *ompC:gfp*, 500 nM sRNA RybB i 200 nM białka Hfq. RNA były poddane renaturacji przed dodaniem do reakcji poprzez denaturację w 90°C przez 30 s, a następnie inkubację w temperaturze pokojowej przez 10 min. Następnie na czarnej płytce do fluorescencji przygotowano reakcje zawierające mRNA, mRNA i Hfq, mRNA i sRNA lub mRNA, sRNA i Hfq, do których dodano ekstrakt S30, koktajl S30 oraz mieszaninę aminokwasów (skład roztworów opisano w podrozdziale 6.8.5). Następnie płytkę inkubowano w 30°C w czytniku mikroplatek TECAN z oprogramowaniem i-control przez 2 godziny, przy czym czytnik wykonywał pomiar fluorescencji co 5 min. Wartość fluorescencji została znormalizowana przez założenie, że wartość fluorescencji dla pomiaru reakcji kontrolnej nie zawierającej mRNA, sRNA i Hfq odpowiada relatywnej wartości 0,0, a wartość fluorescencji dla reakcji kontrolnej zawierającej tylko mRNA odpowiada wartości relatywnej 1,0. Wydajność represji obliczono ze stosunku relatywnej wartości fluorescencji w ostatnim punkcie czasowym dla reakcji zawierającej tylko mRNA do relatywnej wartości fluorescencji w ostatnim punkcie czasowym dla danej reakcji zawierającej mRNA i sRNA lub mRNA, sRNA i Hfq.

## **7.4 Metody pracy z białkami**

### **7.4.1 Liza komórek**

Osad zawierający komórki bakteryjne uzyskane w wyniku hodowli na dużą skalę według procedury opisanej w podrozdziale 7.1.1, zawieszono w buforze PA (polimeraza RNA z faga T7) lub w buforze do zawieszania (Hfq) z dodatkiem inhibitorów proteaz (rozpuszczonych uprzednio w danym buforze). Następnie komórki poddano lizie przy użyciu sonikatora 6-krotnie po 30 sekund przy mocy 70%. Pomędzy każdym cyklem sonikacji lizat mieszano i schładzano na lodzie przez minutę. Kolejno lizat przeniesiono do naczyń wirówkowych i wirowano przy 26000 rpm przez 30 min w 4°C (rotor Ja30-50, wirówka Beckman Coulter Avanti J-30I). Następnie oddzielono supernatant (ekstrakt bakteryjny) od osadu, zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C. Zarówno ekstrakt jak i osad po lizie analizowano na żelu SDS-PAGE.

### **7.4.2 Elektroforeza SDS-PAGE**

Roztwory żelu zagęszczającego i rozdzielającego oraz inne bufony stosowane w technice SDS-PAGE zostały przygotowane według protokołu opisanego w podrozdziale 6.8.2. Żel rozdzielający znajdował się w dolnej warstwie, a zagęszczający w górnej. Po polimerazacji żelu, do prób zawierających analizowane białka dodano bufor Laemmli do prób 2x stężony, a następnie poddano denaturacji przez 5 min w 100°C. Następnie po krótkim wirowaniu na żel nałożono próby oraz marker wielkości i prowadzono elektroforezę w buforze elektrodowym przy początkowym napięciu 100 V, które później zwiększono do 120 V. Po zakończonej elektroforezie żel umieszczono w roztworze do barwienia na około 30 min. Następnie żel przeniesiono do odbarwiacza i inkubowano do czasu uwidocznienia prążków odpowiadających białkom znajdującym się w żelu.

### **7.4.3 Izolacja białek z zastosowaniem chromatografii metalopowinowactwa**

Po potwierdzeniu obecności białka poddawanego nadekspresji w ekstrakcie po lizie komórek (rozdział 7.4.1), do ekstraktu dodano bufor PB do uzyskania końcowego stężenia 10 mM imidazolu (dla polimerazy RNA z faga T7) lub bufor HB do uzyskania końcowego stężenia 35 mM imidazolu (dla Hfq). Następnie kolumnę His-TRAP crude FF 5 ml (GE Healthcare) przygotowaną według protokołu producenta zrównoważono buforem PA z dodatkiem buforu PB do uzyskania końcowego stężenia 10 mM imidazolu (dla polimerazy RNA z faga T7) lub zrównoważono buforem HA (dla Hfq). Kolejno ekstrakt po lizie nałożono ręcznie na kolumnę His-TRAP i podłączono ją do systemu do chromatografii ÄKTA Explorer lub ÄKTA Pure z oprogramowaniem Unicorn na przepływie 0,2 ml/min buforu, który służył do równoważenia kolumny. Następnie kolumnę płukano 10 objętościami buforu, przy przepływie 1 ml/min i zbierano frakcje o objętości 2 ml. Kolejno prowadzono elucję białek związanych do kolumny przez zastosowanie 20 objętości kolumny gradientu liniowego z buforu PA do PB (dla polimerazy RNA z faga T7) lub z HA do HB (dla Hfq) przy przepływie 1 ml/min. Zbierano frakcje o objętości 1 ml i analizowano obecność oczyszczanego białka przez SDS-PAGE (podrozdział 7.4.2).

W przypadku oczyszczania białka Hfq po trawieniu nukleazami próby zawierające docelowe białko rozcieńczono buforem HA do uzyskania 35 mM końcowego stężenia imidazolu. Kolejno białko nałożono na kolumnę His-TRAP crude FF 1 ml (GE Healthcare) i prowadzono płukanie i elucję w ten sam sposób jak dla kolumny o objętości 5 ml.

#### **7.4.4 Izolacja białek z zastosowaniem filtracji żelowej**

Przed filtracją żelową białko poddano zagęszczaniu stosując probówki wirówkowe z filtrem Amicon o punkcie odcięcia 60000 MW (dla polimerazy RNA z faga T7) lub 10000 MW (dla Hfq). Następnie kolumnę Superdex 200 przepłukano 1,5 objętości wody oraz zrównoważono 1,5 objętości buforu P do sączenia (dla polimerazy) lub buforu H do sączenia (dla Hfq) przy przepływie 1 ml/min. Kolejno na kolumnę naniesiono zagęszczone białko z zastosowaniem pętli (ang. *superloop*) przy przepływie buforu do sączenia 0,2 ml/min, po czym zwiększono przepływ na 0,5 ml/min i prowadzono elucję przez 1,2 objętości kolumny. Po wypłynięciu objętości rozpuszczalnika zalegającego między ziarnami żelu ( $V_0$ ) rozpoczęto zbieranie frakcji o objętości 0,5 ml. Następnie analizowano obecność białka w poszczególnych frakcjach przy pomocy metody SDS-PAGE (podrozdział 7.4.2).

#### **7.4.5 Trawienie nukleazami**

Po wstępnym oczyszczeniu białka Hfq na kolumnie His-TRAP crude FF 5 ml, zagęszczono frakcje zawierające białko, stosując probówki wirówkowe z filtrem Amicon o punkcie odcięcia 10000 MW. Następnie dodano do roztworu inhibitory proteaz oraz RNazę E (30  $\mu\text{g/ml}$  białka) i DNazę I (5U/ml białka), po czym inkubowano przez godzinę w 37°C z wytrząsaniem przy 300 rpm. Kolejno białko rozcieńczono buforem HA do uzyskania 35 mM końcowego stężenia imidazolu i oczyszczano na kolumnie His-TRAP crude FF 1 ml według procedury opisanej w podrozdziale 7.4.3.

#### **7.4.6 Dializa**

Po izolacji polimerazy RNA z faga T7 przez sączenie molekularne, frakcje zawierające oczyszczone białko zostały połączone i przeniesione do membrany do dializy białek Spectra Por 6-8000 MWCO (Spectrum Laboratories, Inc). Następnie membrana zawierająca białko została umieszczona w cylindrze zawierającym 500

ml buforu do dializy 1 na mieszadle magnetycznym w chłodni (4°C) na 40 min. Po tym czasie membranę z białkiem przeniesiono na 40 min do 500 ml buforu do dializy 2, następnie do buforu do dializy 3, itd. Ostatni bufor do dializy 5 był użyty w objętości 600 ml i dializa była prowadzona przez 1,5 godz. Stosowanie skokowego gradientu podczas dializy pozwala na bardziej wydajną wymianę buforu i zapobiega precypitacji białka przez nagłą zmianę ciśnienia osmotycznego. Po zakończeniu dializy, czystość białka została ponownie zanalizowana za pomocą metody SDS-PAGE (podrozdział 7.4.2), po czym sprawdzono stężenie białka według metody opisanej w podrozdziale 7.4.7

#### **7.4.7 Oznaczanie stężenia białek**

Pomiar absorbancji przy długości fali 280 nM wykonano w kuwecie kwarcowej. Na podstawie sekwencji białka obliczono też współczynnik ekstynkcji. Następnie z równania Lamberta Beera obliczono stężenie białka:

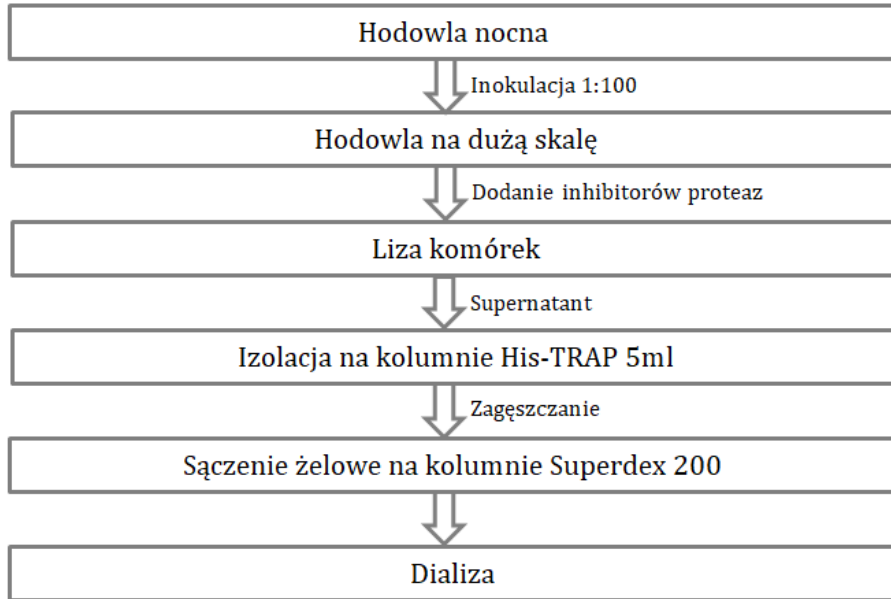
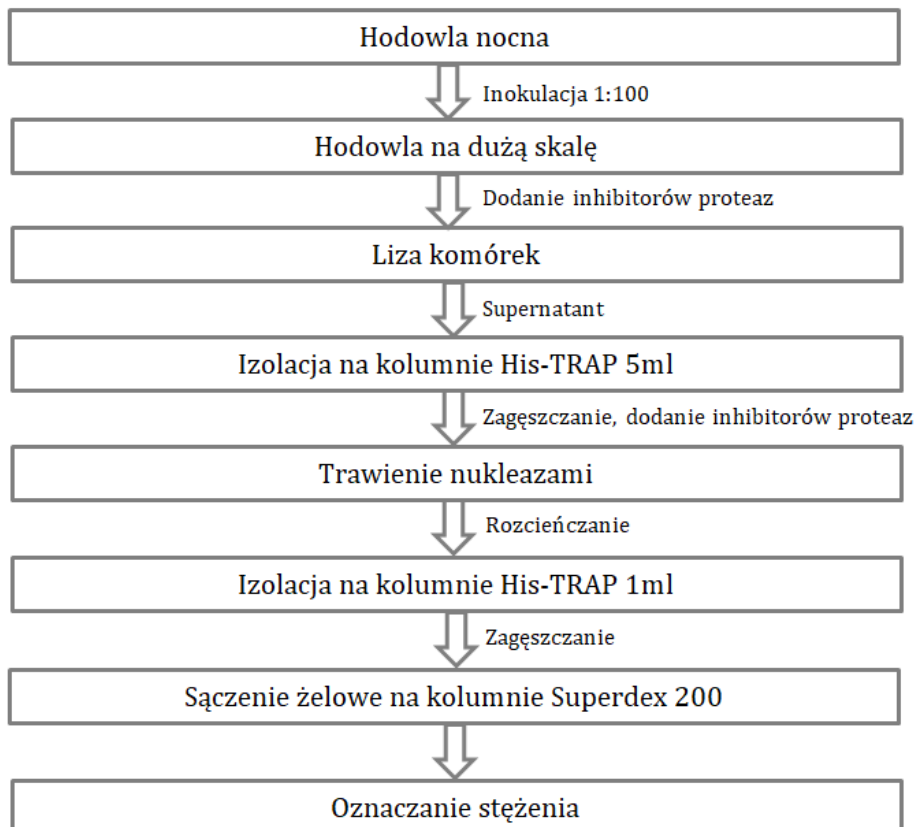
$$A = k \times c \times l,$$

gdzie: A – absorbancja przy długości fali 280 nM, k – współczynnik ekstynkcji, c – stężenie substancji, l – grubość warstwy absorbującej.

Uzyskany wynik przeliczono na masę molarną.

#### **7.4.8 Skrócona procedura izolacji polimerazy RNA z faga T7/białka Hfq**

Skrócony opis procedur oczyszczania polimerazy RNA z faga T7 oraz zmutowanych wariantów białka Hfq przedstawiono na poniższych schematach blokowych. Szczegółowe opisy każdej z zastosowanych metod znajdują się powyżej.

**Procedura oczyszczania zmutowanych wariantów białka Hfq:****Procedura oczyszczania polimerazy RNA z faga T7:**

## 8. WYNIKI

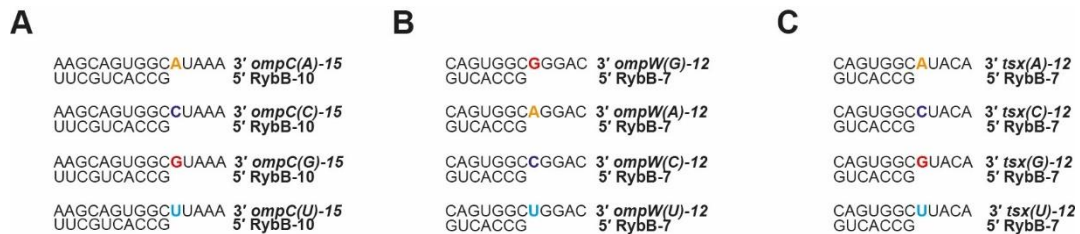
### 8.1 Znaczenie sekwencji mRNA sąsiadującej z miejscem wiązania regulatorowego sRNA RybB dla ich oddziaływania oraz represji translacji *in vitro*

#### 8.1.1 Badane cząsteczki RNA

sRNA regulują translację mRNA przez tworzenie w pełni lub częściowo komplementarnych kompleksów RNA-RNA, w czym uczestniczy białko Hfq. Obecny stan wiedzy nie pozwala jednoznacznie określić, czy bardziej istotna dla regulacji translacji mRNA przez komplementarne sRNA jest stabilność termodynamiczna powstałego kompleksu sRNA-mRNA, czy też kinetyka asocjacji sRNA do mRNA. Procesy oddziaływania sRNA z mRNA w komórce zachodzą szybko, efekt nadekspresji sRNA na translację mRNA jest widoczny po około 1-2 minutach, podczas gdy czas potrzebny do uzyskania równowagi termodynamicznej jest znacznie dłuższy. Dlatego w ramach niniejszego projektu zdecydowano się zbadać zależność pomiędzy stabilnością termodynamiczną oraz kinetyką powstawania kompleksu sRNA-mRNA, a regulacją translacji mRNA, stosując, jako model oddziaływanie sRNA RybB z *S. enterica* z pięcioma fragmentami mRNA. Wybór ten został uzasadniony faktem, iż mRNA, których ekspresja jest kontrolowana przez RybB posiadają konserwatywną purynę w pozycji 3' od sekwencji tworzącej komplementarny kompleks z sRNA RybB zakończony parą zasad C-G (Papenfort i wsp., 2010).

Badania stabilności termodynamicznej modelowych, krótkich dupleksów RNA wskazują, że niesparowane reszty purynowe znajdujące się w pozycji 3' za parą zasad C-G stabilizują dupleks bardziej niż reszty pirymidynowe (Freier i wsp., 1986). Aby sprawdzić, czy podobna relacja dotyczy oddziaływań cząsteczki regulatorowego sRNA RybB z cząsteczką mRNA, przygotowano naturalne i zmutowane wersje mRNA posiadające różne reszty nukleotydowe w pozycji 3' względem miejsca wiązania RybB. sRNA RybB ulega ekspresji przy udziale czynnika  $\sigma^E$  podczas stresu związanego z błoną, opisanego w podrozdziale 4.1.2, i oddziałuje z regulowanymi mRNA za pomocą ewolucyjnie zachowanej domeny na końcu 5'. mRNA wybrane jako model na potrzeby niniejszego projektu kodują

poryny błonowe u *S. enterica* i posiadają w pozycji 3' względem miejsca wiązania RybB konserwatywną adenozyne (mRNA *ompA*, *ompC*, *ompS* i *tsx*) lub guanozyne (mRNA *ompW*). Regulowane mRNA różnią się długością i strukturą cząsteczki oraz długością i lokalizacją regionu odpowiedzialnego za komplementarne parowanie z sRNA RybB.



**Rycina 12 Oligorybonukleotydy odpowiadające miejscom oddziaływania sRNA z mRNA.** Badane dupлексы zawierają sekwencję komplementarną wraz z 5 niesparowanymi nukleotydami mRNA w pozycji 3' do regionu komplementarnego do RybB. Oddziaływanie **(A)** RybB-10 z *ompC*-15, **(B)** RybB-7 z *ompW*-12, **(C)** RybB-7 z *tsx*-12. Długość oligonukleotydów określono na podstawie przewidzianych miejsc oddziaływania (Papenfort i wsp., 2010). Kolorem zaznaczono resztę nukleotydową w pozycji 3' do regionu komplementarnego do RybB.

W celu analizy stabilności termodynamicznej krótkich dupлексов RNA odpowiadających miejscu oddziaływania sRNA z mRNA, we współpracy z prof. Ryszardem Kierzkim przygotowano chemicznie syntetyzowane pary oligonukleotydów RNA: RybB-10 z *ompC*-15, RybB-7 z *ompW*-12, RybB-7 z *tsx*-12 (Ryc. 12). Z kolei do określenia stabilności termodynamicznej i szybkości asocjacji kompleksów sRNA-mRNA wykorzystano fragmenty mRNA *S. enterica*, które były wcześniej używane w fuzji z mRNA białka GFP do analizy oddziaływań z RybB *in vivo* (Papenfort i wsp., 2010): 181-nt *ompA*, 115-nt *ompC*, 65-nt *ompW*, 104-nt *ompS* i 114-nt *tsx* (Ryc. 13). Do zbadania efektu wprowadzenia mutacji w pozycji 3' na dostępność struktury mRNA dla oddziaływania z RybB zastosowano również 115-nt fragment mRNA *ompC* oraz jego zmutowane warianty. Te same fragmenty w fuzji z mRNA białka GFP posłużyły do analizy wydajności represji translacji *in vitro* przez sRNA RybB.



**Rycina 13** Przewidywane oddziaływanie fragmentów mRNA z pełnej długości cząsteczkami sRNA RybB. Oddziaływanie (A) RybB z *ompC*-115, (B) RybB z *ompW*-65, (C) RybB z *tsx*-114, (D) RybB z *ompS*-104, (E) RybB z *ompA*-181. Kolorem zaznaczono resztę nukleotydu w pozycji 3' względem regionu komplementarnego do RybB. Struktury przewidziano przy użyciu programu RNAstructure.

### **8.1.2 Obecność reszty purynowej w pozycji 3' względem miejsca wiązania sRNA RybB w różnych cząsteczkach mRNA zwiększa stabilność termodynamiczną ich oddziaływań**

Sekwencje mRNA zawierają ewolucyjnie zachowaną resztę purynową w pozycji 3' względem miejsca wiązania 5' końca sRNA (Ryc. 13). Dotychczas nie określono roli ewolucyjnej selekcji reszty purynowej w tej pozycji względem innych reszt nukleotydowych. Możliwe, że puryny w pozycji 3' zwiększają stabilność termodynamiczną kompleksu sRNA-mRNA, gdyż badania modelowych dupleksów RNA zakończonych parą C-G i posiadających niesparowaną resztę nukleotydową od strony 3' wskazują, że puryny w tej pozycji stabilizują dupleks bardziej niż pirymidyny (Freier i wsp., 1986). W związku z powyższym, celem pierwszego etapu badań w projekcie było porównanie, czy reszta nukleotydowa znajdująca się w pozycji 3' względem miejsca wiązania sRNA w mRNA wpływa na stabilność termodynamiczną krótkich dupleksów RNA odpowiadających regionowi oddziaływania sRNA z mRNA, tak jak w przypadku modelowych dupleksów.

W celu zbadania efektu reszty nukleotydowej w pozycji 3' na parametry termodynamiczne krótkich dupleksów RNA zastosowano metodę topnienia w świetle UV (Freier i wsp., 1986). Wybrano tę technikę, ponieważ analiza krzywych topnienia jest wykonywana w założeniu o model dwustanowy, który stosuje się także w przewidywaniach stabilności termodynamicznej dupleksów RNA *in silico* (Mathews i wsp., 2010). Co więcej, metoda ta pozwala na analizę oddziaływań dwóch RNA w stosunku stężeń 1:1. Topnienia UV wykonano dla trzech dupleksów RNA opisanych w poprzednim podrozdziale: RybB-10 - *ompC*-15, RybB-7 - *ompW*-12 oraz RybB-7 - *tsx*-12 (Ryc. 12). Oligonukleotydy odpowiadające sekwencji mRNA poza regionem komplementarnym zawierały 5 niesparowanych reszt nukleotydowych od strony 3' miejsca wiązania RybB. Pierwsza z tych niesparowanych reszt nukleotydowych, tuż za miejscem oddziaływania z RybB była miejscem wprowadzania mutacji, aby sprawdzić, czy stabilizacja dupleksu zależy od rodzaju reszty nukleotydowej w tej pozycji. Topnienia wykonano w dziewięciu stężeniach oligonukleotydów w zakresie od 2,8  $\mu\text{M}$  do 170  $\mu\text{M}$  (aby uzyskać 50-krotny zakres stężeń dla każdej badanej próby), a powstałe krzywe topnienia analizowano dwoma metodami przy użyciu programu MeltWin w celu

określenia parametrów termodynamicznych. Obie metody bazowały na modelu dwustanowym, jednak pierwsza opierała się na zależności temperatury topnienia od stężenia oligomerów, a druga na dopasowaniu krzywych topnienia (Tab. 1).

**Tabela 1** Parametry termodynamiczne krótkich dupleksów oligonukleotydów RNA odpowiadających miejscu oddziaływania RybB z mRNA wraz z 5-nt regionem niesparowanym w sekwencji mRNA od strony 3' miejsca wiązania RybB.

mRNA	Reszta nukleotydomowa w pozycji 3'	Zależność $T_M^{-1}$ od $\log C_T$				Średnie dopasowanie krzywych			
		$\Delta H^\circ$ (kcal/mol)	$\Delta S^\circ$ (cal/K $\times$ mol)	$\Delta G^\circ_{37}$ (kcal/mol)	$T_M$ ( $^\circ$ C)	$\Delta H^\circ$ (kcal/mol)	$\Delta S^\circ$ (cal/K $\times$ mol)	$\Delta G^\circ_{37}$ (kcal/mol)	$T_M$ ( $^\circ$ C)
<i>ompC</i>	A	-137,8 (3,7)	-380,6 (10,9)	-18,5 (1,12)	70,0	-106,9 (8,3)	-289,7 (24,7)	-17,1 (0,63)	71,0
	C	-112,9 (2,1)	-309,2 (6,4)	-17,0 (0,17)	68,7	-115,6 (24,6)	-316,8 (72,3)	-17,3 (2,2)	69,0
	G	-103,3 (3,7)	-279,1 (11,0)	-16,7 (0,32)	71,0	-103,7 (4,2)	-280,4 (12,3)	-16,8 (0,39)	71,0
	U	-116,6 (10,2)	-319,8 (29,9)	-17,4 (0,91)	69,2	-109,5 (13,3)	-298,9 (39,6)	-16,8 (1,0)	69,2
<i>ompW</i>	A	-73,9 (3,6)	-200,8 (10,9)	-11,6 (0,21)	59,7	-79,2 (6,4)	-216,9 (18,9)	-11,9 (0,55)	59,6
	C	-89,7 (3,6)	-247,7 (10,9)	-12,9 (0,22)	60,6	-82,18 (3,8)	-225,0 (11,4)	-12,4 (0,28)	60,8
	G	-81,5 (5,5)	-224,6 (16,7)	-11,8 (0,31)	58,6	-79,6 (7,5)	-218,7 (22,4)	-11,8 (0,55)	58,8
	U	-70,9 (2,7)	-194,3 (8,2)	-10,7 (0,13)	56,1	-76,2 (3,8)	-210,3 (11,5)	-10,9 (0,26)	56,0
<i>tsx</i>	A	-76,3 (2,6)	-208,7 (8,0)	-11,6 (0,15)	59,1	-74,5 (3,7)	-203,1 (11,4)	-11,5 (0,2)	59,1
	C	-78,9 (2,3)	-219,0 (7,2)	-11,0 (0,11)	55,7	-74,4 (12,2)	-205,1 (37,2)	-10,8 (0,71)	55,8
	G	-74,5 (3,2)	-219,7 (32,3)	-11,3 (0,18)	58,2	-77,2 (4,3)	-211,9 (13,2)	-11,4 (0,21)	58,0
	U	-83,5 (5,0)	-232,4 (15,5)	-11,4 (0,26)	56,2	-79,4 (10,5)	-219,7 (32,3)	-11,2 (0,55)	56,5

Wartości błędu uzyskane przez analizę danych programem MeltWin podano w nawiasach.

Wyniki topnień dupleksów RNA w świetle UV wskazują, że reszta nukleotydomowa w pozycji 3' względem miejsca wiązania sRNA zmienia stabilność krótkiego dupleksu RNA. Wartości temperatury topnienia ( $T_M$ ) były wyższe dla dupleksów RNA posiadających purynę w pozycji 3' niż dla tych, które zawierały w tym miejscu pirymidynę. Wyjątkiem jest *ompW(C)*, który tworzy dimer w natywnych żelach poliakrylamidowych, co może wpływać na wyniki topnień UV. Analiza wartości zmiany energii swobodnej Gibbsa ( $\Delta G$ ) wskazała, że dla dupleksu zawierającego fragment mRNA *ompC*, reszta adenozyiny w pozycji 3' ma

największy wpływ na stabilizację dupleksu (dla danych analizowanych pierwszą metodą). Z kolei dla *ompW* duplekisy z puryną w pozycji 3' są stabilniejsze niż w przypadku, gdy w tej pozycji znajdowała się pirymidyna (z porównania wykluczono *ompW(C)*). Stabilność dupleksu tworzonego z fragmentem mRNA *tsx* była najwyższa dla wariantów mRNA z puryną w pozycji 3', gdy wartości termodynamiczne były określone pierwszą metodą. Z kolei wyniki uzyskane drugą metodą wskazują, że adenozyzna znajdująca się od strony 3' za miejscem wiązania sRNA stabilizowała dupleks RybB-*tsx* bardziej niż inne reszty nukleotydowe.

Uzyskane wyniki wskazują, że niesparowane puryny zlokalizowane w pozycji 3' komplementarnego dupleksu RNA odpowiadającego regionowi oddziaływania sRNA z mRNA zwiększają stabilność termodynamiczną dupleksu RNA bardziej niż pirymidyny w tej pozycji.

**Tabela 2** Stała dysocjacji ( $K_d$ ) oraz obserwowana szybkość asocjacji ( $k_{obs}$ ) pełnej długości sRNA RybB z fragmentami mRNA zawierającymi różne reszty nukleotydowe w pozycji 3' względem miejsca wiązania sRNA przy nieobecności oraz w obecności Hfq.

mRNA	Reszta nukleotydowa w pozycji 3'	$K_d$ (nM)	$k_{obs}$ (min <sup>-1</sup> ) 200 nM RybB bez Hfq	$k_{obs}$ (min <sup>-1</sup> ) 5 nM RybB 1 nM Hfq
<i>ompC-115</i>	A	0,71±0,28	0,32±0,01	8,9±1,1
	C	9,54±2,25	0,08±0,029	5,8±1,7
	G	0,14±0,04	0,72±0,06	12±1,7
	U	2,2±0,61	0,1±0,039	6,9±2,3
<i>ompW-65</i>	A	1,2±0,38	0,12±0,011	5,8±1,7
	C	43±8,1	0,048±0,019	1,4±0,28
	G	0,53±0,2	0,22±0,043	7,7±2,1
	U	2,4±0,49	0,10±0,027	5,7±0,80
<i>tsx-114</i>	A	0,22±0,038	0,92±0,11	13±0,98
	C	3,4±0,43	0,043±0,0078	7,9±2,7
	G	2,55±0,72	0,068±0,0099	8,3±1,9
	U	0,33±0,055	0,28±0,019	11±2,9
<i>ompA-181</i>	A	0,47±0,18	0,81±0,19	11±2,4
	C	4,8±0,73	0,65±0,00064	14±4,9
	G	3,4±1,6	0,46±0,075	9,4±1,5
	U	2,0±0,80	0,35±0,13	7,6±1,4
<i>ompS-104</i>	A	1,6±0,45	0,22±0,027	6,5±1,9
	C	0,46±0,21	0,15±0,026	5,4±1,9
	G	0,44±0,12	0,28±0,025	5,9±0,65
	U	3,5±0,92	0,048±0,011	4,4±0,85

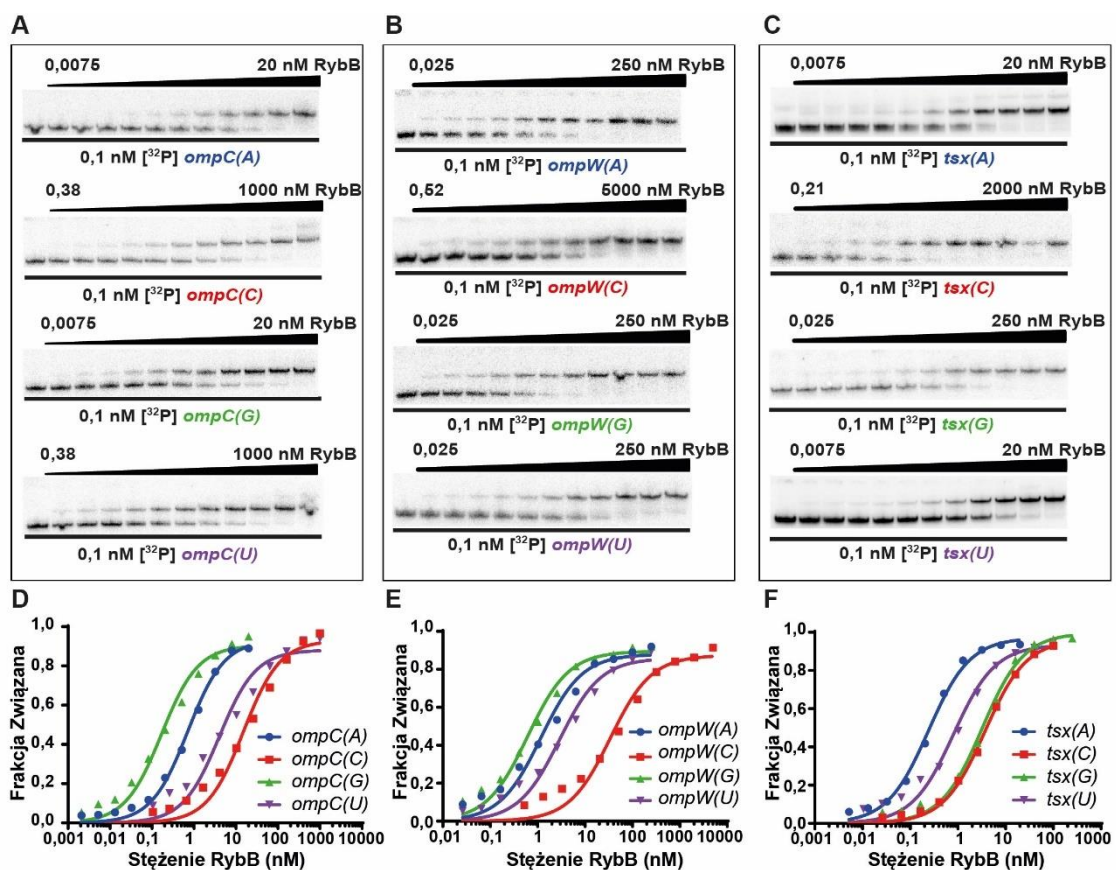
Poprzednie eksperymenty wykazały, że w przypadku krótkich dupleksów odpowiadających miejscu oddziaływania sRNA z mRNA, niesparowane puryny w

pozycji 3' od regionu komplementarnego w mRNA zwiększają stabilność termodynamiczną dupleksu RNA (Tab. 2). Jednak naturalne cząsteczki sRNA i mRNA są znacznie dłuższe od badanych poprzednio krótkich dupleksów RNA i tworzą złożone struktury drugorzędowe, co może zmieniać efekt reszty nukleotydowej w pozycji 3' na stabilność termodynamiczną kompleksu RNA-RNA. Dlatego celem kolejnego etapu badań było uwzględnienie roli struktury sRNA i mRNA w analizie zmiany stabilności termodynamicznej kompleksu sRNA-mRNA wywołanej przez resztę nukleotydową w pozycji 3'. Aby to osiągnąć, określono stabilność termodynamiczną kompleksów tworzonych przez sRNA RybB pełnej długości wraz z dłuższymi, ustrukturyzowanymi fragmentami mRNA i ich wariantami z naturalną lub zmutowaną resztą nukleotydową w pozycji 3' względem miejsca wiązania sRNA.

Do analiz wybrano następujące fragmenty mRNA oddziałujące z RybB: 115-nt *ompC*, 65-nt *ompW*, 114-nt *tsx*, 104-nt *ompS* oraz 181-nt *ompA* (Ryc. 13). Były one wcześniej używane w fuzji z mRNA białka GFP w badaniach dotyczących negatywnej regulacji translacji mRNA wiązanych przez sRNA RybB (Papenfert i wsp., 2010). Stabilność termodynamiczną kompleksów RNA mierzono jako wartość stałej dysocjacji ( $K_d$ ) metodą różnicowej migracji w żelu poliakrylamidowym (EMSA – ang. *Electrophoretic Mobility Shift Assay*). Następnie policzono intensywność kompleksów odpowiadających niezwiązanemu znakowanemu mRNA oraz kompleksowi znakowanego mRNA z sRNA RybB (Ryc. 14). Przedstawienie zależności frakcji związanej mRNA-RybB od stężenia sRNA RybB i dopasowanie danych do hiperboli Michaelis-Menten pozwoliło na obliczenie wartości  $K_d$  (Tab. 2).

Analiza oddziaływań sRNA RybB z fragmentami mRNA ujawniła, że rodzaj reszty nukleotydowej w pozycji 3' względem miejsca wiązania RybB wpływa także na stabilność termodynamiczną kompleksu RybB z mRNA (Ryc. 14, Tab. 2). Wyniki wskazują, że guanozyna i adenozyne w pozycji 3' wykazują największy efekt stabilizacji dla mRNA *ompC* z wartościami  $K_d$  odpowiednio 0,14 nM oraz 0,71. Oddziaływanie RybB z wariantami *ompC* posiadającymi pirymidynę w pozycji 3' było 100-krotnie słabsze. Dla mRNA *ompW*, guanozyna występująca naturalnie w pozycji 3' stabilizowała kompleks najefektywniej, z wartością  $K_d$  0,53 nM. Wartość stałej dysocjacji była 2- i 4-krotnie wyższa dla *ompW* z adenozyną i urydyną oraz

80-krotnie wyższa dla *ompW* z cytydyną. Z kolei adenozyna w pozycji 3' mRNA *tsx* najbardziej ze wszystkich reszt nukleotydowych stabilizowała kompleks tworzony z RybB z 4,5 nM  $K_d$ , 2 i 4-krotnie mniejszy efekt wykazywała urydyna i guanozyna, podczas gdy kompleks z *tsx* posiadającym cytydynę w tej pozycji był 18-krotnie mniej stabilny. Dla mRNA *ompA* również adenozyna najefektywniej stabilizuje kompleks RybB-mRNA z  $K_d$  0,47 nM, podczas gdy urydyna, guanozyna i cytydyna w pozycji 3' wykazują kolejno 4, 7 i 10-krotnie wyższe wartości stałej dysocjacji. Kompleks sRNA RybB z mRNA *ompS* jest najskuteczniej stabilizowany przez guanozynę oraz cytydynę w pozycji 3' z wartościami stałej dysocjacji: 0,44 nM dla guanozyny i 0,46 dla cytydyny. Co ciekawe, w porównaniu do najstabilniejszego kompleksu z guanozyną, kompleks z naturalnym mRNA *ompS* zawierającym adenozynę sąsiadującą z miejscem wiązania RybB był 4-krotnie mniej stabilny, a kompleks z urydyną 8-krotnie mniej stabilny (Tab. 2).



**Rycina 14** Analiza stałej dysocjacji dla oddziaływań sRNA RybB ze znakowanymi cząsteczkami mRNA. Autoradiogramy przedstawiają rozdział w żelu reakcji wiązania w równowadze dla kompleksów: **(A)** RybB - *ompC*-115, **(B)** RybB - *ompW*-65 oraz **(C)** RybB - *tsx*-114. Dopasowanie wykresów przedstawiających zależność frakcji związanej od stężenia RybB dla: **(D)** RybB - *ompC*-115, **(E)** RybB - *ompW*-65 oraz **(F)** RybB - *tsx*-114 do modelu Michaelis-Menten pozwoliło na określenie wartości stałej dysocjacji ( $K_d$ ) podanych w Tab. 2.

Podsumowując, w większości przypadków puryna znajdująca się po stronie 3' względem miejsca wiązania sRNA w mRNA powodowała zwiększoną stabilizację kompleksu RybB z mRNA. W przypadku cząsteczki *tsx*, dla której urydyna wykazywała lepszy lub podobny efekt stabilizacji do puryny, mogłoby to wynikać ze zmiany konformacji struktury mRNA wywołanej zmianą reszty nukleotydowej w pozycji 3'. Efekt rodzaju reszty nukleotydowej w pozycji 3' na stabilność kompleksu RNA był bardziej wyraźny dla długich niż dla krótkich kompleksów RNA.

### **8.1.3 Szybkość wiązania sRNA RybB do różnych cząsteczek mRNA zależy od rodzaju reszty nukleotydowej w pozycji 3'**

Oddziaływanie sRNA z mRNA w komórce bakteryjnej musi odbywać się bardzo szybko, ponieważ efekt nadekspresji danego sRNA na translację regulowanego mRNA jest widoczny po około 1-2 minutach. W związku z tym, wydaje się, że to kinetyka asocjacji sRNA do mRNA, a nie stabilność termodynamiczna kompleksu RNA powinna odgrywać ważniejszą rolę w kontroli translacji mRNA. Dlatego kolejnym celem niniejszego projektu było sprawdzenie, czy zachowane ewolucyjnie puryny w pozycji 3' względem miejsca wiązania sRNA w mRNA powodują zwiększoną szybkość asocjacji takich mRNA z sRNA RybB, niż gdy w pozycji 3' znajduje się pirymidyna.

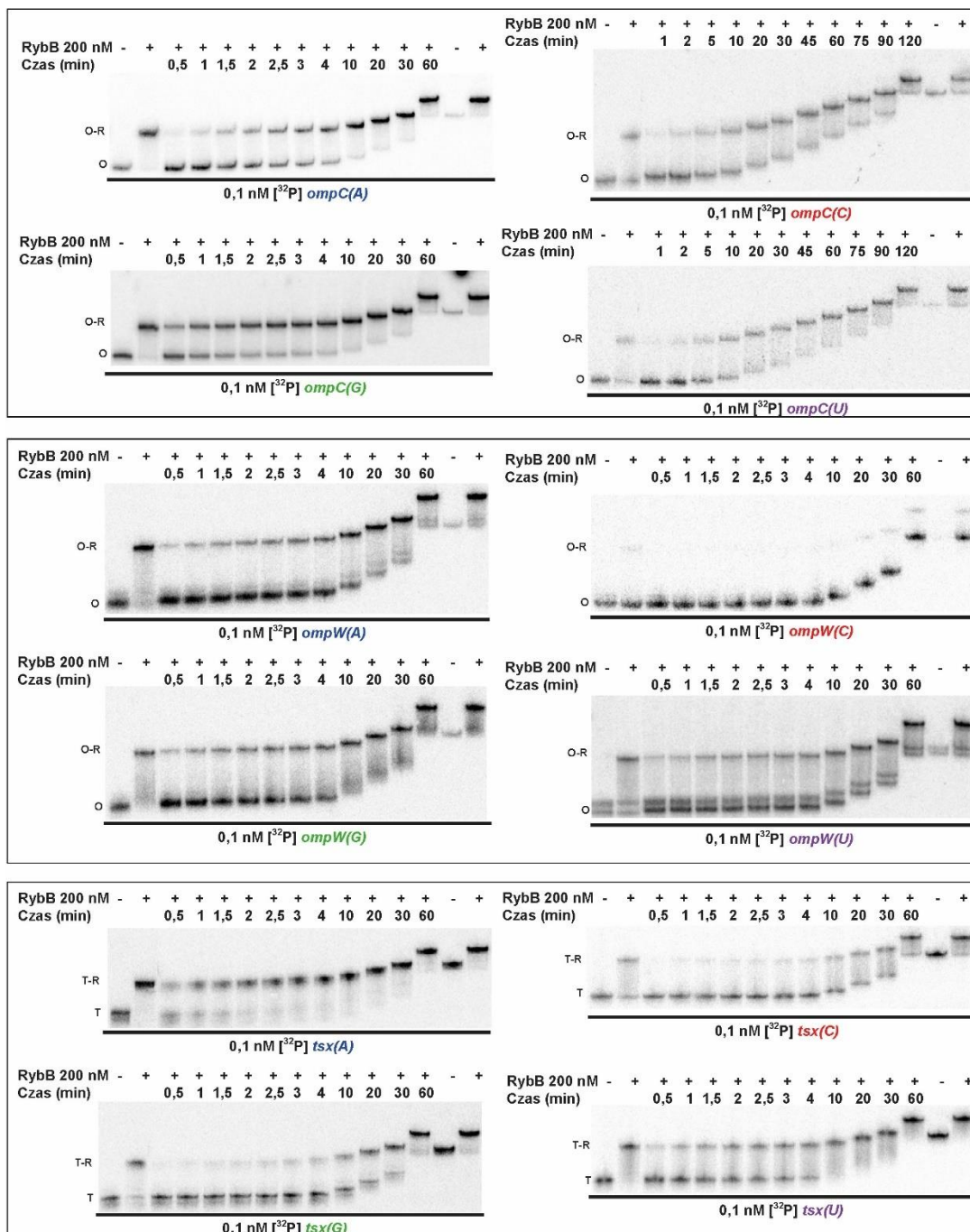
Pomiar szybkości asocjacji sRNA z mRNA wykonano techniką różnicowej migracji w żelu poliakrylamidowym, przy użyciu pełnej długości sRNA RybB wraz z fragmentami mRNA stosowanymi w poprzednim etapie badań. Monitorowano powstawanie kompleksu pomiędzy 200 nM RybB a 0,1 nM znakowanym mRNA oraz jego zmutowanymi wariantami w czasie (Ryc. 15). W eksperymentach używano 200 nM stężenia RybB, ponieważ przy stężeniu 5 nM (stosowanym podczas analizy kinetyki asocjacji w obecności Hfq opisanej w kolejnym podrozdziale) reakcja przebiegała zbyt wolno, aby zaobserwować różnice w asocjacji pomiędzy poszczególnymi wariantami mRNA. Dane uzyskane podczas obliczenia intensywności wolnego znakowanego RNA oraz znajdującego się w kompleksach migrujących na żelu w czasie (Ryc. 15), zostały dopasowane do równania wykładniczego jednofazowego (Ryc. 16), co pozwoliło określić wartość obserwowanej szybkości asocjacji ( $k_{obs}$ ) (Tab. 2).

Wyniki uzyskane podczas analizy kinetyki asocjacji wskazują, że zamiana reszty nukleotydowej w pozycji 3' względem miejsca wiązania sRNA w mRNA wywołuje zmiany w obserwowanej szybkości powstawania kompleksu sRNA-mRNA. Dla mRNA *ompC* z guanozyną wartość  $k_{obs}$  była najwyższa, co sugeruje najszybsze powstawanie kompleksu sRNA-mRNA. Adenozyna w tej pozycji powodowała 2-krotnie, a cytydyna i urydyna około 8-krotnie wolniejszą asocjację. W przypadku mRNA *ompW* naturalnie występująca guanozyna w pozycji 3' powodowała 2-krotnie szybsze powstawanie kompleksu niż adenozyna i urydyna, podczas gdy kompleks z cytydyną tworzył się prawie 5-krotnie wolniej od naturalnego. Dla mRNA *tsx* kompleks z adenozyną powstawał najszybciej, podczas gdy kompleks z urydyną, guanozyną i cytydyną odpowiednio 3, 14 i 22-krotnie wolniej. Powstawanie kompleksu RybB-*ompA* cechowało się największą szybkością, gdy naturalnie występująca adenozyna znajdowała się w pozycji 3'. Zastąpienie jej cytydyną, guanozyną lub urydyną skutkowało odpowiednio 1,5-, 2- i 3-krotnie wolniejszą asocjacją. Z kolei szybkość tworzenia kompleksu RybB-*ompS* była największa, gdy puryna znajdowała się w pozycji 3'. Nieco wolniejsze wiązanie wykazywały kompleksy z cytydyną, a urydyna w pozycji 3' powodowała 5-krotne spowolnienie reakcji.

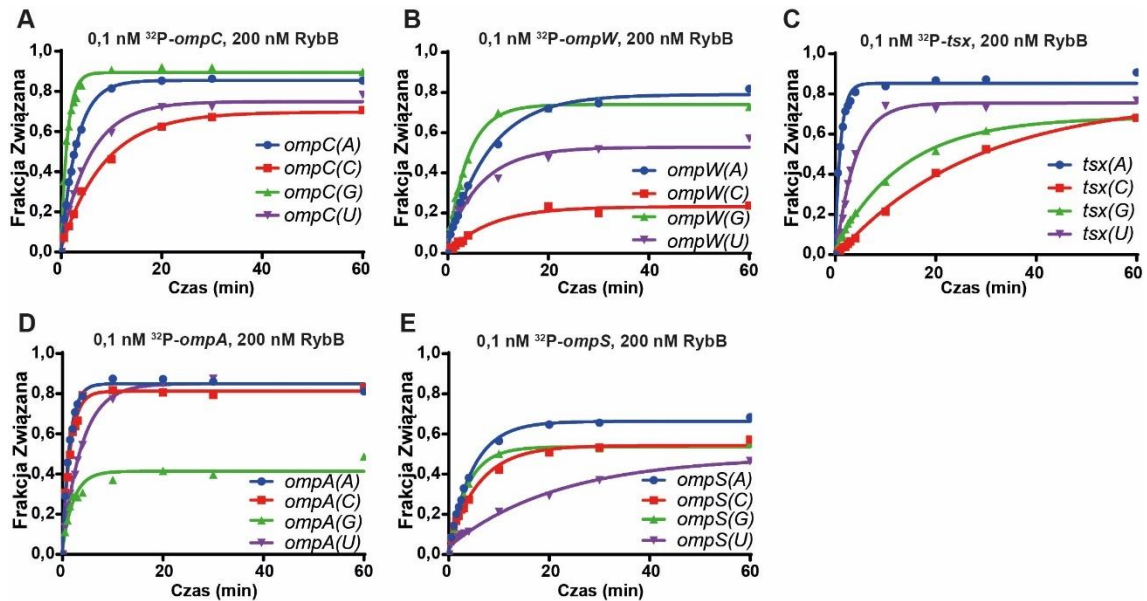
Podsumowując, dla większości oddziaływań RybB z mRNA, puryna w pozycji 3' powodowała zwiększenie obserwowanej szybkości asocjacji kompleksu sRNA-mRNA. Co więcej, pary RybB-mRNA, które cechowały się największą stabilnością wykazywały również najszybszą asocjację.

Aby sprawdzić zależność między kinetyką asocjacji kompleksów RNA a ich stabilnością termodynamiczną, wyznaczono stałą szybkość asocjacji ( $k_{on}$ ) dla oddziaływania sRNA RybB z mRNA *ompC*-115. W tym celu zmierzono obserwowaną szybkość asocjacji ( $k_{obs}$ )  $^{32}\text{P}$ -*ompC* w zakresie stężeń sRNA RybB (Ryc. 17 A, B). Wartości stałej szybkości asocjacji (Ryc. 17 C) wskazują, że puryny w pozycji 3' względem miejsca wiązania RybB w mRNA przyspieszają powstawanie kompleksów *ompC*-RybB. Ponadto wartości stałej szybkości dysocjacji ( $k_{off}$ ) (Ryc. 17 E) obliczone z iloczynu wyznaczonych eksperymentalnie wartości  $k_{on}$  (Ryc. 17 C) i  $K_d$  (Ryc. 17 D) dla wariantów mRNA *ompC* z różnymi resztami nukleotydowymi w pozycji 3' są bardzo zbliżone. Wyniki te sugerują, że

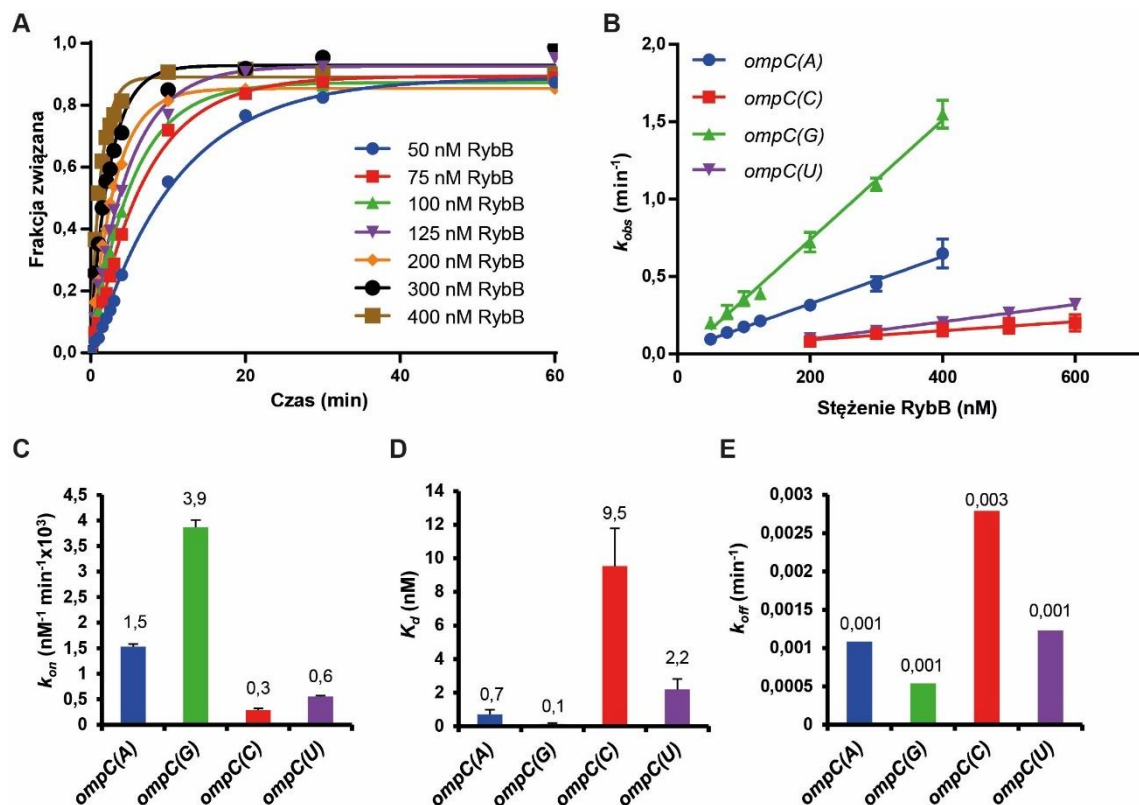
różnice w stałej dysocjacji ( $K_d$ ) po wprowadzeniu mutacji w pozycji 3' mRNA *ompC* wynikają z różnic w stałej szybkości asocjacji  $k_{on}$ , a nie dysocjacji  $k_{off}$ .



**Rycina 15** Kinytyka asocjacji  $^{32}\text{P}$ -mRNA z sRNA RybB monitorowana w czasie. Eksperymenty wykonano używając  $0,1 \text{ nM } ^{32}\text{P}$ -mRNA oraz  $200 \text{ nM}$  RybB. Wolne RNA oraz jego kompleksy oznaczono, jako: O -  $^{32}\text{P}$ -*ompC*/ $^{32}\text{P}$ -*ompW*, T -  $^{32}\text{P}$ -*tsx*, natomiast kompleksy  $^{32}\text{P}$ -*ompC*-RybB/ $^{32}\text{P}$ -*ompW*-RybB oznaczono, jako O-R, a  $^{32}\text{P}$ -*tsx*-RybB jako T-R.



**Rycina 16** Reszta nukleotydowa w pozycji 3' względem miejsca wiązania RybB w mRNA wpływa na kinetykę asocjacji kompleksu RybB-mRNA. Przedstawienie zależności frakcji związanej od czasu umożliwiło wyznaczenie wartości obserwowanych szybkości asocjacji ( $k_{obs}$ ) umieszczonych w Tabeli 2. Eksperyment wykonano dla par: **(A)**  $^{32}P$ -ompC-RybB, **(B)**  $^{32}P$ -ompW-RybB, **(C)**  $^{32}P$ -tsx-RybB, **(D)**  $^{32}P$ -ompA-RybB, **(E)**  $^{32}P$ -ompS-RybB.



**Rycina 17** Różnice w stabilności termodynamicznej kompleksów RybB-ompC z różnymi resztami nukleotydowymi w pozycji 3' wynikają z kinetyki asocjacji, a nie dysocjacji. **(A)** W celu wyznaczenia stałej szybkości asocjacji ( $k_{on}$ ) zmierzono obserwowaną szybkość asocjacji RybB-ompC w różnych stężeniach RybB **(B)** Na wykresie przedstawiono zależność wartości obserwowanej szybkości asocjacji ( $k_{obs}$ ) od stężenia RybB. Z nachylenia krzywej określono wartości

$k_{on}$  dla poszczególnych kompleksów **(C)**. Z wartości  $k_{on}$  i  $K_d$  **(D)** obliczono stałą szybkość dysocjacji ( $k_{off}$ ).

Podsumowując, zachowane ewolucyjnie puryny w pozycji 3' względem miejsca wiązania sRNA w mRNA oprócz stabilności termodynamicznej zwiększają szybkość asocjacji sRNA do regulowanych mRNA, co jest ważne dla regulacji odpowiedzi na zmieniające się warunki środowiska.

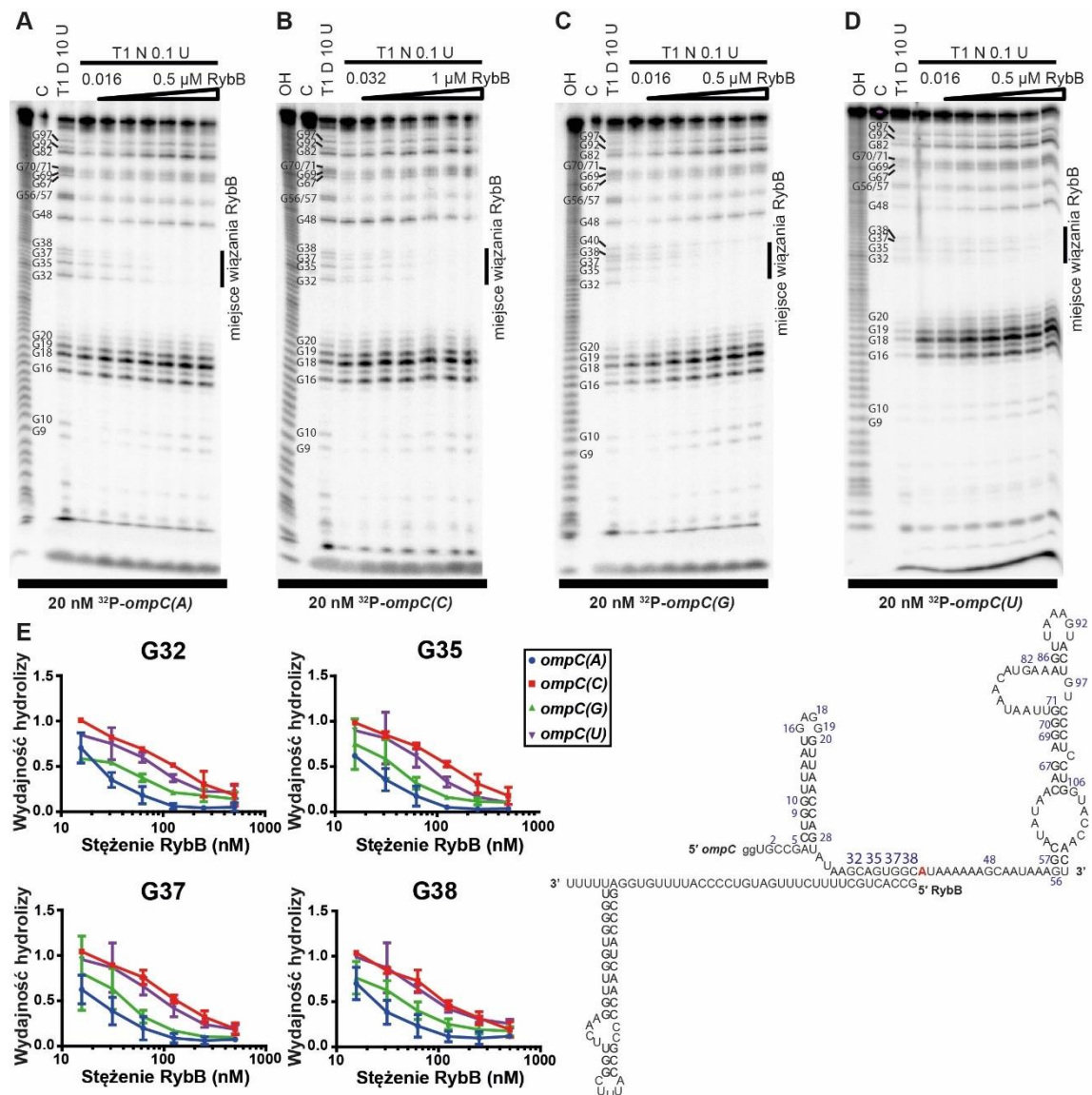
#### **8.1.4 Analiza strukturalna cząsteczek mRNA potwierdza silniejsze oddziaływanie RybB z cząsteczkami posiadającymi resztę purynową w pozycji 3'**

Wyniki poprzednich eksperymentów sugerują, że rodzaj reszty nukleotydowej w pozycji 3' względem miejsca wiązania sRNA w mRNA wpływa na stabilność termodynamiczną oraz szybkość ich oddziaływania (Tab. 2). Aby potwierdzić znaczenie sąsiadującej reszty nukleotydowej dla stabilizacji kompleksu, sprawdzono, jak zmienia się konformacja naturalnego mRNA *ompC* i jego zmutowanych wariantów w obecności sRNA RybB.

W celu zbadania wpływu mutacji reszty nukleotydowej w pozycji 3' względem miejsca wiązania sRNA w mRNA na ich oddziaływanie, wykonano analizę struktury mRNA *ompC* i jego mutantów związanych z sRNA RybB przy użyciu hydrolizy enzymatycznej. Znakowane radioaktywnie mRNA *ompC* z różnymi resztami nukleotydowymi w pozycji 3' inkubowano z RybB, a następnie trawiono RNazą T1 w warunkach natywnych. RNaza T1 w tych warunkach hydrolizuje jedynie jednoniciowe RNA, więc po dodaniu RybB w rosnących stężeniach obserwowano zmniejszenie wydajności przecinania znakowanego mRNA *ompC* w regionie jego oddziaływania z RybB (Ryc. 18 A-D).

W kolejnym etapie analizowano względną wydajność trawienia mRNA *ompC* RNazą T1 po resztach guanozyny w pozycjach 32, 35, 37 i 38 występujących w regionie komplementarnym do sRNA RybB, po związaniu tego sRNA w rosnących stężeniach (Ryc. 18 E). Oddziaływanie tych RNA ze sobą powodowało spadek wydajności hydrolizy znakowanego RNA RNazą T1 w regionie powstawania komplementarnego kompleksu. Uzyskane wyniki potwierdzają wcześniej określony region oddziaływania sRNA RybB z mRNA *ompC* (Balbontin i wsp., 2010), (Ryc. 18 A). Dane wskazują, że wydajność hydrolizy mRNA *ompC* po

dodaniu sRNA RybB ulega większemu obniżeniu dla mRNA z 3' puryną, niż z pirymidyną w tej pozycji. Sugeruje to, że silne oddziaływanie sRNA RybB z fragmentami mRNA *ompC* posiadającymi puryny w pozycji 3' względem miejsca wiązania sRNA RybB jest obserwowane w niższych stężeniach, niż z *ompC* zawierającym pirymidyny w tej pozycji.



**Rycina 18** Cząsteczki mRNA *ompC* posiadające purynę w pozycji 3' silniej oddziałują z RybB. Autoradiogramy żeli sekwencyjnych po trawieniu RNazą T1 mRNA <sup>32</sup>P-*ompC* z 3' adenozyzną (A), cytydyną (B), guanozyną (C) lub urydyną (D) w kompleksie z sRNA RybB. T1 D oznacza reakcję kontrolną trawienia w warunkach denaturujących, a T1 reakcję w warunkach natywnych. Numery po lewej odpowiadają guanozynom w sekwencji mRNA *ompC*. C oznacza reakcję kontrolną, a OH-produkty degradacji pod wpływem formamidu. (E) Średnia relatywna wydajność hydrolizy mRNA <sup>32</sup>P-*ompC* przez RNazę T1 po resztach guanozyny znajdujących się w regionie komplementarnym do RybB w mRNA *ompC* z eksperymentów A-D wykonanych w trzech powtórzeniach. Reszty nukleotydowe, których wydajność hydrolizy analizowano oznaczono na przewidzianej strukturze mRNA pogrubioną fioletową czcionką.

Podsumowując, analiza przecinania mRNA *ompC* RNazą T1 w obecności sRNA RybB potwierdza, że puryna w pozycji 3' względem miejsca wiązania RybB w mRNA stabilizuje kompleks z RybB.

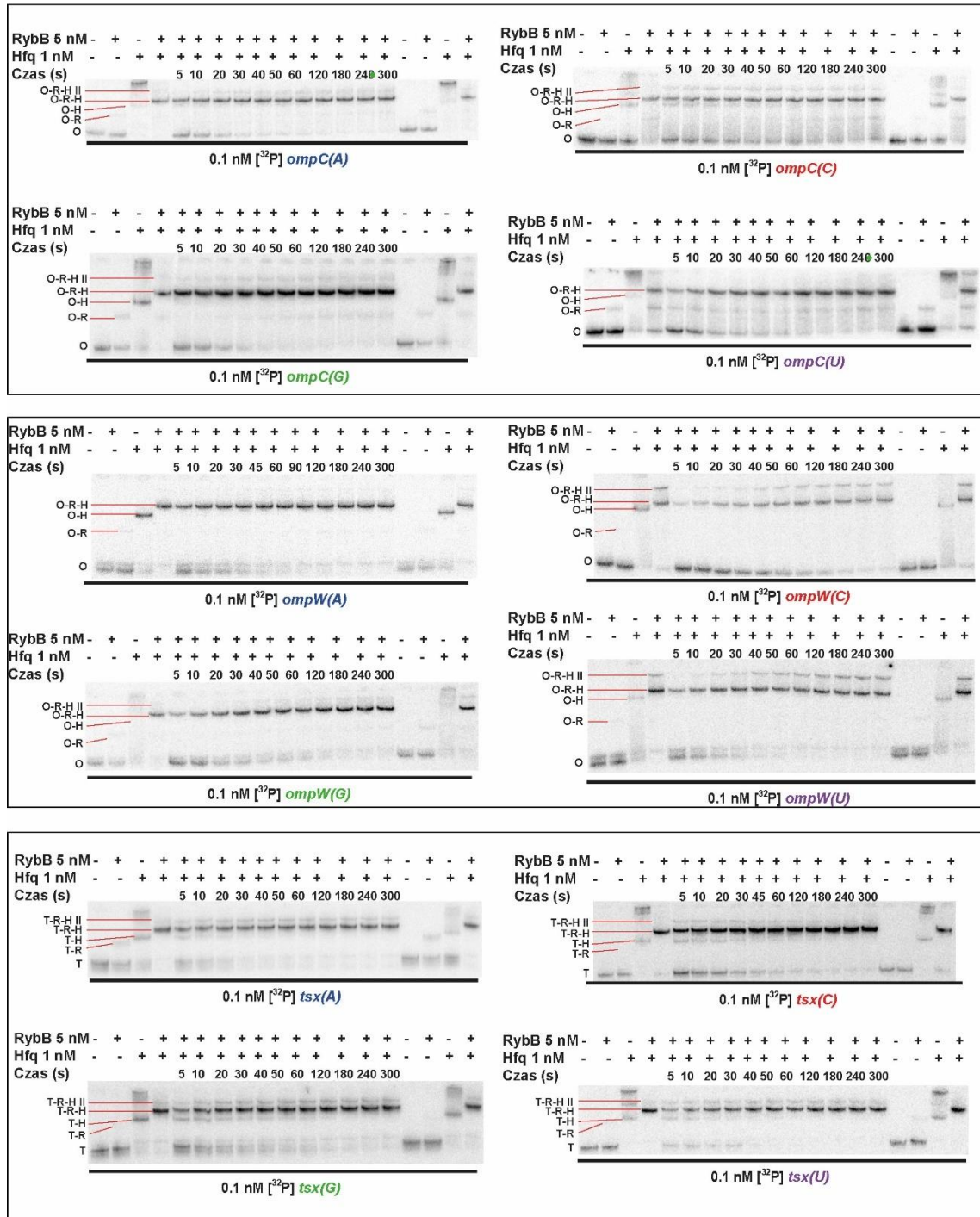
### **8.1.5 W obecności białka opiekuńczego Hfq szybkość asocjacji sRNA RybB do różnych cząsteczek mRNA jest podobna**

Badania pozytywnej regulacji translacji mRNA *rpoS* przez sRNA DsrA, RprA i ArcZ wykazały, że obecność białka opiekuńczego Hfq powoduje wyrównanie różnic w stabilności termodynamicznej kompleksów sRNA-mRNA (Soper i wsp., 2010). Co więcej, dowiedziono, że Hfq może wpływać na rearanżację struktury mRNA *sodB*, co umożliwia wiązanie z sRNA RybB (Geissmann i Touati, 2004). Dlatego na dalszym etapie badań sprawdzono jak białko Hfq zmienia kinetykę oddziaływań RybB z naturalnymi i zmutowanymi fragmentami mRNA.

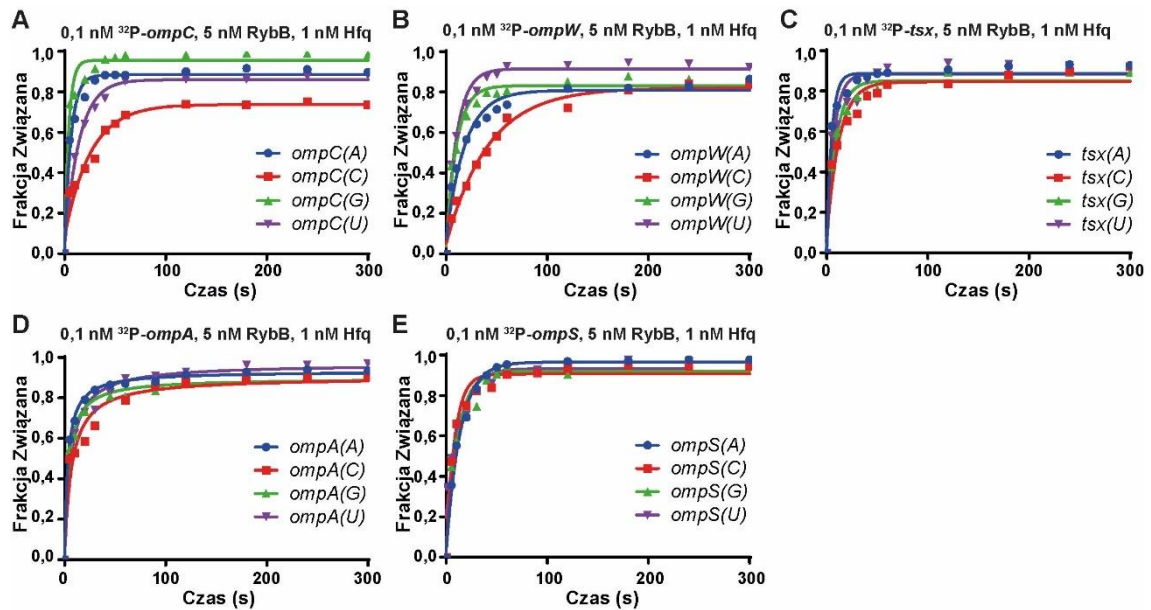
W celu określenia roli białka Hfq w asocjacji sRNA z naturalnymi i zmutowanymi mRNA, zmierzono obserwowane szybkości asocjacji badanych wcześniej kompleksów RybB-mRNA z różnymi wariantami reszt nukleotydowych w pozycji 3' za pomocą techniki różnicowej migracji w żelu poliakrylamidowym (Ryc. 19, Tab. 2). Eksperymenty wykonano dla 0,1 nM <sup>32</sup>P-mRNA, 5 nM RybB oraz 1 nM Hfq (Ryc. 20). Dla określenia czy Hfq przyspiesza asocjację sRNA-mRNA w tym samym stężeniu RybB przeprowadzono także reakcje w takich samych warunkach, ale bez białka Hfq (Ryc. 21).

Wyniki wskazują, że w badanych warunkach Hfq przyspiesza asocjację sRNA RybB z regulowanymi mRNA około 1000-krotnie (Ryc. 21). Ponadto obecność Hfq zmniejsza różnice w szybkości asocjacji kompleksów sRNA-mRNA z różnymi wariantami reszty nukleotydowej w pozycji 3' względem miejsca oddziaływania z sRNA w mRNA (Ryc. 20, Ryc. 21). Dla mRNA *ompC* guanozyna oraz adenozyne powodowały najszybszą asocjację kompleksu RybB-*ompC*, jednak jego powstawanie dla wariantów mRNA z cytydyną i urydyną było tylko 2-krotnie wolniejsze w porównaniu do guanozyny. Dla *ompW* różnica między szybkością asocjacji naturalnego mRNA z guanozyną w pozycji 3' a mutanta z cytydyną jest 5-krotna. Dla mRNA *tsx* oddziaływanie naturalnej cząsteczki z adenozyną z sRNA RybB cechuje się tylko 1,5-krotnie szybszą kinetyką niż najwolniej powstający kompleks zawierający cytydynę. Co więcej, w obecności Hfq szybkość asocjacji

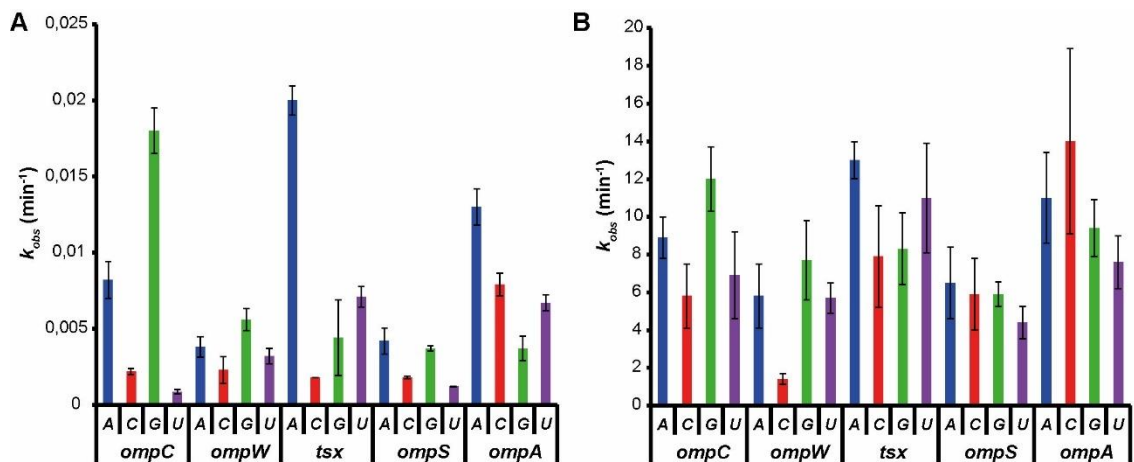
mRNA *ompS* oraz *ompA* z RybB nie wykazuje istotnych różnic w zależności od reszty nukleotydowej znajdującej się w pozycji 3' względem miejsca wiązania RybB w mRNA.



**Rycina 19** Kinetyka asocjacji  $^{32}\text{P}$ -mRNA z sRNA RybB w obecności białka Hfq monitorowana w czasie. Eksperymenty wykonano w stężeniach: 0,1 nM  $^{32}\text{P}$ -mRNA, 5 nM RybB, 1 nM Hfq. Wolne RNA oraz jego kompleksy oznaczono jako: O -  $^{32}\text{P}$ -*ompC*/ $^{32}\text{P}$ -*ompW*, T -  $^{32}\text{P}$ -*tsx*, O-R -  $^{32}\text{P}$ -*ompC*-RybB/ $^{32}\text{P}$ -*ompW*-RybB, T-R -  $^{32}\text{P}$ -*tsx*-RybB, O-H -  $^{32}\text{P}$ -*ompC*-Hfq/ $^{32}\text{P}$ -*ompW*-Hfq, T-H -  $^{32}\text{P}$ -*tsx*-Hfq, O-R-H -  $^{32}\text{P}$ -*ompC*-RybB-Hfq/ $^{32}\text{P}$ -*ompW*-RybB-Hfq, T-R-H -  $^{32}\text{P}$ -*tsx*-RybB-Hfq.



**Rycina 20 Hfq zmniejsza wpływ mutacji reszty nukleotydowej w pozycji 3' względem miejsca wiązania RybB w mRNA na kinetykę asocjacji kompleksu RybB z mRNA.** Przedstawienie zależności frakcji związanej od czasu umożliwiło wyznaczenie wartości obserwowanych szybkości asocjacji ( $k_{obs}$ ) umieszczonych w Tabeli 2. Eksperyment wykonano dla par oddziaływań: **(A)** <sup>32</sup>P-ompC-RybB, **(B)** <sup>32</sup>P-ompW-RybB, **(C)** <sup>32</sup>P-tsx-RybB, **(D)** <sup>32</sup>P-ompA-RybB, **(E)** <sup>32</sup>P-ompS-RybB.



**Rycina 21 Hfq przyspiesza asocjację sRNA-mRNA oraz zmniejsza różnice w szybkości asocjacji wywołane mutacją reszty nukleotydowej w pozycji 3' względem miejsca wiązania sRNA w mRNA.** Wykresy słupkowe przedstawiają obserwowaną szybkość asocjacji różnych wariantów oddziaływań RybB-mRNA przy 5 nM stężeniu sRNA RybB dla reakcji bez Hfq **(A)** oraz z 1 nM Hfq **(B)**.

Uzyskane wyniki sugerują, że obecność Hfq przyspiesza oddziaływanie sRNA z mRNA, gdyż wiążąc mRNA i sRNA białko umożliwia ich odpowiednie ułożenie względem siebie i powstawanie komplementarnego kompleksu. Jednak w stosowanych warunkach eksperymentalnych w obecności białka Hfq nie obserwowano dużych różnic pomiędzy mRNA z różnymi resztami

nukleotydowymi w pozycji 3' względem miejsca wiązania RybB. Jednak należy się spodziewać, że przy niższych stężeniach białka Hfq efekt selekcji byłby bardziej widoczny. Ponadto przewidywane stężenie Hfq w komórce jest ograniczające dla regulacji (Hussein i Lim, 2011), więc jest możliwe, że w przypadku zmniejszonej dostępności białka Hfq efekt sekwencji mRNA miałyby większe znaczenie dla kontroli ekspresji tego mRNA, co może tłumaczyć zachowanie reszty adenozyiny w pozycji 3' w ewolucji.

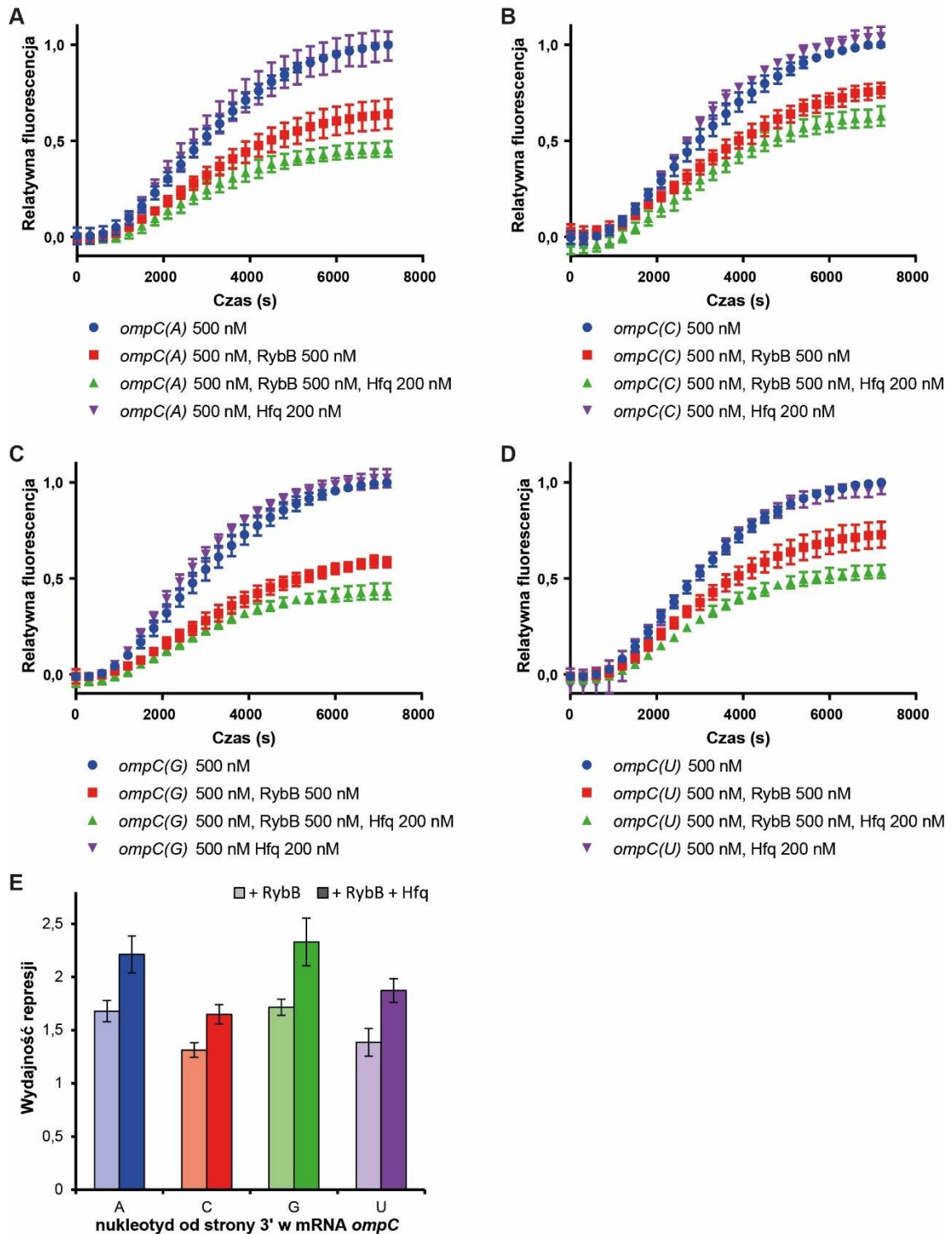
### **8.1.6 Wydajność represji translacji mRNA *ompC* *in vitro* jest zależna od sekwencji mRNA sąsiadującej z miejscem wiązania sRNA RybB**

Wyniki poprzednich eksperymentów pokazały, że reszty purynowe w pozycji 3' względem miejsca wiązania RybB w mRNA *ompC* stabilizują kompleks sRNA-mRNA oraz przyspieszają kinetykę jego powstawania w porównaniu z *ompC* zawierającym w tej pozycji reszty pirymidynowe. Jednak efekt ten jest mniejszy w obecności białka Hfq. W kolejnym etapie badań postanowiono sprawdzić, czy wyżej wymienione właściwości kompleksów RybB-*ompC* wpływają na negatywną regulację translacji *in vitro* mRNA *ompC* przez RybB.

W celu określenia zależności między stabilnością termodynamiczną i szybkością asocjacji kompleksu RybB-*ompC* oraz regulacją jego translacji przy udziale sRNA RybB, monitorowano represję translacji *in vitro* mRNA *ompC* w fuzji z mRNA białka GFP z różnymi resztami nukleotydowymi w pozycji 3' względem miejsca wiązania RybB. Reakcje prowadzono w obecności sRNA RybB, białka Hfq lub RybB i Hfq w ekstrakcie S30 wyizolowanym ze szczepu *E. coli* BL21 z delecją Hfq (Ryc. 22 A-D). Następnie ze stosunku relatywnej fluorescencji dla reakcji z samym mRNA do reakcji z RybB lub RybB i Hfq obliczono wydajność represji dla każdego z testowanych wariantów mRNA *ompC* (Ryc. 22 E).

Wyniki wskazują, że relatywna fluorescencja białka zsyntetyzowanego podczas translacji mRNA *in vitro* ulega zmianie w obecności RybB oraz RybB i białka Hfq. Represja translacji *in vitro* jest bardziej wydajna dla mRNA *ompC* zawierającego resztę purynową od strony 3' miejsca wiązania RybB niż dla mRNA z pirymidyną w tej pozycji. Ponadto białko Hfq zwiększa efektywność represji translacji mRNA *ompC* w obecności sRNA RybB, ale nie wpływa na translację w nieobecności RybB (Ryc. 22 E). Uzyskane dane sugerują, że do represji translacji

mRNA *ompC* może dochodzić także przy braku białka Hfq, jednak jej wydajność jest obniżona. Ponadto samo białko Hfq nie wywiera wpływu na translację *in vitro* testowanych mRNA w badanych stężeniach.



**Rycina 22 Zależność między sekwencją mRNA *ompC*, a wydajnością represji translacji tego mRNA przez sRNA RybB *in vitro*.** Wykresy przedstawiają zależność znormalizowanej (relatywnej) fluorescencji w czasie dla mRNA *ompC* w fuzji z mRNA białka GFP z różnymi resztami nukleotydowymi w pozycji 3' względem miejsca wiązania RybB w *ompC*: **(A)** adenozyną, **(B)**

cytydina, **(C)** guanozyną lub **(D)** urydyną. Reakcje wykonano dla 500 nM matrycowego mRNA, z dodatkiem 500 nM RybB, 200 nM Hfq lub 500 nM RybB i 200 nM Hfq w ekstrakcie S30 przygotowanym ze szczepu *E. coli* BL21  $\Delta hfq$ . (E) Poziom represji został obliczony na podstawie relatywnych wartości fluorescencji po 2 godzinach reakcji z dodatkiem 500 nM sRNA RybB dla każdego wariantu mRNA *ompC* dla reakcji bez Hfq (oznaczone jaśniejszym kolorem) oraz z 200 nM Hfq (oznaczone ciemniejszym kolorem słupków).

Podsumowując, wyniki te sugerują, że represja translacji przez sRNA RybB w ekstrakcie komórkowym z *E. coli* jest najbardziej wydajna dla cząsteczek mRNA *ompC* z mutacjami powodującymi podwyższoną stabilność termodynamiczną oraz kinetykę asocjacji sRNA z mRNA. Wyniki te potwierdzają znaczenie zachowania ewolucyjnego sekwencji mRNA sąsiadującej z miejscem wiązania RybB dla regulacji translacji.

## 8.2 Porównanie roli białka Hfq w oddziaływaniach cząsteczek sRNA z cząsteczkami anty-sRNA oraz mRNA

### 8.2.1 Wprowadzenie

Aby wyjaśnić rolę sekwencji mRNA oraz anty-sRNA dla oddziaływań z cząsteczkami sRNA postanowiono także porównać, w jaki sposób białko Hfq uczestniczy w oddziaływaniu sRNA z mRNA, a w jaki z cząsteczkami hamującymi regulację, zwanymi anty-sRNA lub ceRNA. Anty-sRNA należą do niedawno zidentyfikowanych, niekodujących cząsteczek RNA, których rolą jest hamowanie działania cząsteczek sRNA przez wiązanie do komplementarnych sekwencji. W ten sposób uniemożliwiają one wiązanie się sRNA do mRNA i blokują regulację. Jednym z przykładów jest regulacja sRNA ChiX u *E. coli* i *S. enterica* (Overgaard i wsp., 2009) przez anty-sRNA *chbBC*-IGR powstałe z regionu międzygenowego operonu *chbBCARFG* (Ryc. 23 A). Mechanizm ten odpowiada za kontrolę poziomu chitocukrów, który został dokładnie opisany w rozdziale 4.1.5. Kolejnym przykładem takiego typu regulacji jest wychwytywanie sRNA RybB, gdy jego poziom ekspresji jest niski, przez anty-sRNA 3'ETS<sup>leuZ</sup>, co ma na celu całkowite wyłączenie działania tego sRNA. 3'ETS<sup>leuZ</sup> jest generowany w wyniku hydrolizy RNazą E dłuższego transkryptu powstającego z operonu *glyW-cysT-leuZ* kodującego trzy geny tRNA (Lalaouna i wsp., 2015a) (Ryc. 23 B). Mechanizm ten został opisany w rozdziale 4.1.5. Innym przykładem wiązania sRNA przez anty-sRNA jest wychwytywanie sRNA GcvB przez AgvB (Ryc. 23 C). Anty-sRNA AgvB jest kodowane w genomie dwóch patogennych szczepów *E. coli* (Chao i wsp., 2012) i oddziałuje z regionem GcvB odpowiedzialnym za komplementarne parowanie zasad z regulowanymi mRNA, co powoduje kompetycję pomiędzy AgvB i mRNA o oddziaływanie z GcvB. Dzięki temu mechanizmowi nadekspresja AgvB wywołuje derepresję regulowanego przez GcvB u *E. coli* i *S. enterica* mRNA *dppA* kodującego element peryplazmatyczny dipeptydu transportera ABC, co opisano w podrozdziale 4.1.5.



Jak dotąd nie porównywano mechanizmu tworzenia kompleksu sRNA z anty-sRNA i białkiem Hfq, do tego jak Hfq wiąże sRNA i komplementarne mRNA. Badania oddziaływań sRNA z białkiem Hfq wykazały, że sRNA mogą wykorzystywać specyficzne sekwencje do wiązania różnych stron Hfq, co opisano w podrozdziale 4.2.1. Zaangażowanie poszczególnych powierzchni Hfq w powstawanie kompleksu trójskładnikowego z sRNA i mRNA jest zależne nie tylko od danego sRNA, ale także od tego, do których stron białka wiąże się regulowane przez nie mRNA. Jednak jak dotąd nie określono, które powierzchnie Hfq są zaangażowane w wiązanie anty-sRNA. Wiadomo, że Hfq może bezpośrednio wpływać na oddziaływania anty-sRNA z sRNA (podrozdział 4.1.5). Wykazano, że anty-sRNA AgvB, które kontroluje poziom sRNA GcvB konkuruje o stronę dystalną białka Hfq z komplementarnym do GcvB mRNA *dppA* (Tree i wsp., 2014). Z kolei inne anty-sRNA zostały zidentyfikowane techniką głębokiego sekwencjonowania nowej generacji, w eksperymentach mających na celu wykrycie RNA wiążących się do Hfq. Należą do nich anty-sRNA *chbBC*-IGR (Sittka i wsp., 2008) oraz anty-sRNA 3'ETS<sup>leuZ</sup> (Lalaouna i wsp., 2015a).

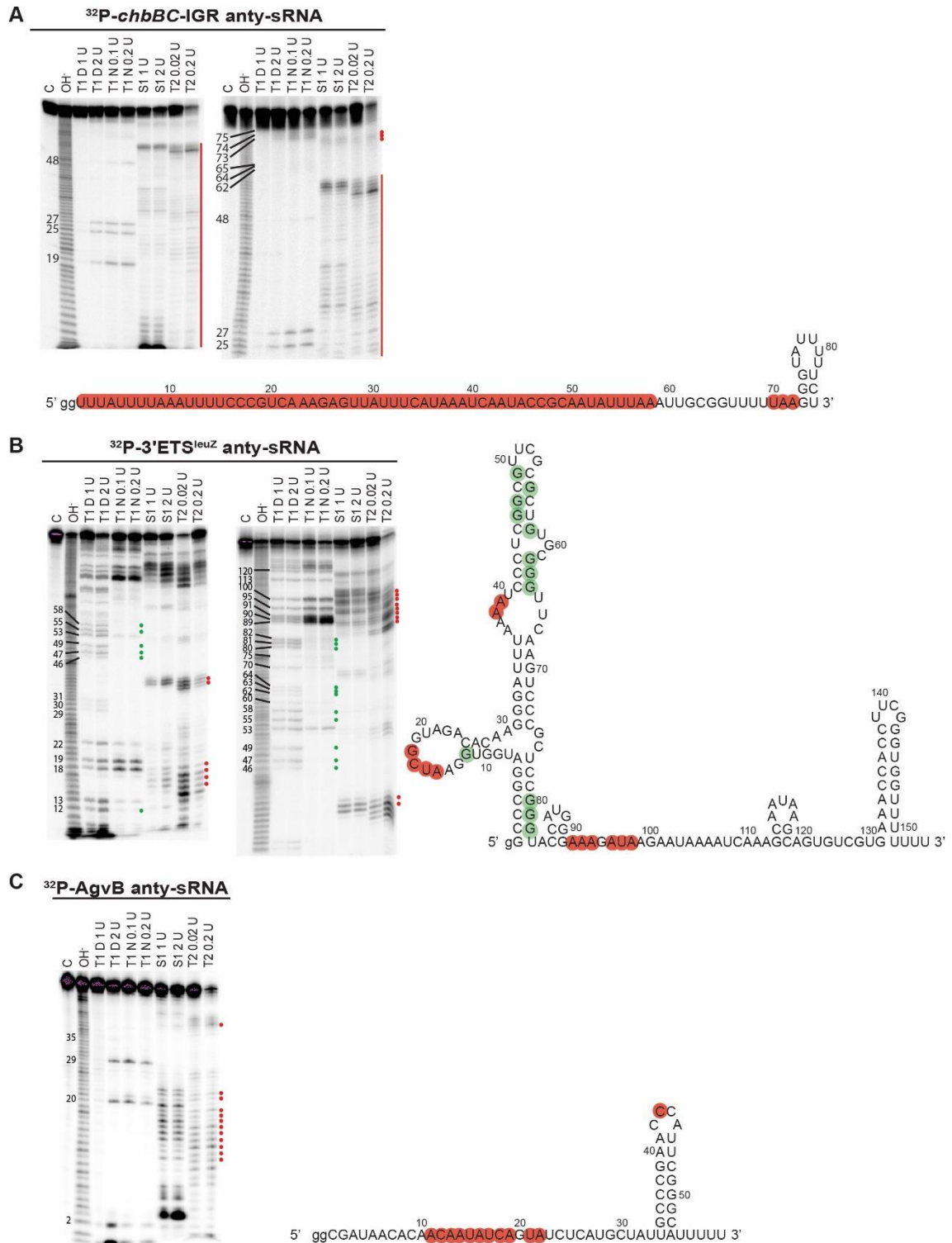
Celem niniejszej części było porównanie sposobu wiązania białka Hfq w oddziaływaniach sRNA z anty-sRNA oraz z mRNA. Aby to określić, wybrano sRNA, dla których znany był mechanizm działania w wiązaniu mRNA. Należą do nich sRNA z klasy I: RybB i GcvB, które oddziałują z powierzchnią boczną i proksymalną Hfq (Malecka i wsp., 2015, Małecka-Grajek, 2017) oraz sRNA z klasy II ChiX wiążące się do strony dystalnej i proksymalnej (Malecka i wsp., 2015). W ramach projektu analizowano pełnej długości sRNA RybB, ChiX i GcvB z *E. coli* (Ryc. 23 A, B, C), a także pełnej długości anty-sRNA 3'ETS<sup>leuZ</sup> oraz 86-nukleotydowy fragment międzygenowy transkryptu powstałego z operonu *chbBCARFG* *E. coli* i pełnej długości AgvB z patogenego szczepu *E. coli*. (Ryc. 23 A, B, C). Pierwszym celem postawionym w tej części było porównanie oddziaływania sRNA z klasy I, na przykładzie sRNA RybB z *E. coli*, w kompleksie z białkiem Hfq i anty-sRNA 3'ETS<sup>leuZ</sup> oraz z regulowanym przez RybB mRNA *tsx*. Postanowiono także sprawdzić, czy mechanizm wiązania białka Hfq przez sRNA klasy II – ChiX jest zbliżony dla oddziaływania z anty-sRNA *chbBC*-IGR i z mRNA *chiP*. Następnie określono sposób interakcji białka Hfq z anty-sRNA AgvB i sRNA z klasy I – GcvB.

### 8.2.2 Analiza struktury drugorzędowej cząsteczek: sRNA GcvB oraz anty-sRNA *chbBC-IGR*, 3'ETS<sup>leuZ</sup> i AgvB

W pierwszym etapie analizy oddziaływań anty-sRNA z sRNA przy udziale białka Hfq zdecydowano się na wyznaczenie struktur drugorzędowych cząsteczek anty-sRNA *chbBC-IGR*, 3'ETS<sup>leuZ</sup>, AgvB, a także sRNA GcvB, którego struktura dla sRNA z *E. coli* nie była do tej pory określona eksperymentalnie. Celem tych badań było porównanie struktur anty-sRNA ze strukturami sRNA oraz ustalenie kontekstu strukturalnego miejsc oddziaływania pomiędzy sRNA a anty-sRNA.

W celu wyznaczenia struktur drugorzędowych RNA zastosowano metodę hydrolizy nukleazami specyficznymi dla danej struktury. Aby określić regiony o strukturze jednoniciowej porównano degradację RNA przez RNazę T2 oraz nukleazę S1, podczas gdy regiony dwuniciowe określono na podstawie różnic w regionach trawionych RNazą T1 w warunkach natywnych i denaturujących. Następnie aby wyznaczyć struktury drugorzędowe badanych RNA, wprowadzono do programu RNAstructure więzy strukturalne określone przez wzór trawień (Reuter i Mathews, 2010).

Analiza struktury drugorzędowej anty-sRNA *chbBC-IGR*, które jest regulatorem sRNA ChiX, wykazała, że RNA to jest w większości jednoniciowe oraz posiada niewielką spinkę od strony 3' (Fig. 25 A). Niski poziom parowania zasad w obrębie sekwencji anty-sRNA wynika z niewielkiej ilości reszt cytydyn i guanozyn, które tworzą najbardziej stabilne wiązania z komplementarnymi resztami nukleotydowymi. Anty-sRNA *chbBC-IGR* powstaje z regionu międzygenowego operonu *chbBCARFG*, który nie zawiera sekwencji kodującej, dlatego jest mało ustrukturyzowany, a w sekwencji dominują reszty nukleotydowe adenozyń i urydyn. Region zawierający reszty adenozyń i urydyn po stronie 5' cząsteczki RNA jest więc dostępny dla potencjalnego oddziaływania z Hfq. Co więcej, w mRNA *chiP*, które ulega regulacji przy udziale sRNA ChiX, również znajdują się sekwencje reszt nukleotydowych adenozyń i urydyn (Ryc. 32 A), (Schu i wsp., 2015). Może to świadczyć o podobnym mechanizmie oddziaływania w kompleksie z Hfq sRNA ChiX z anty-sRNA oraz z mRNA.



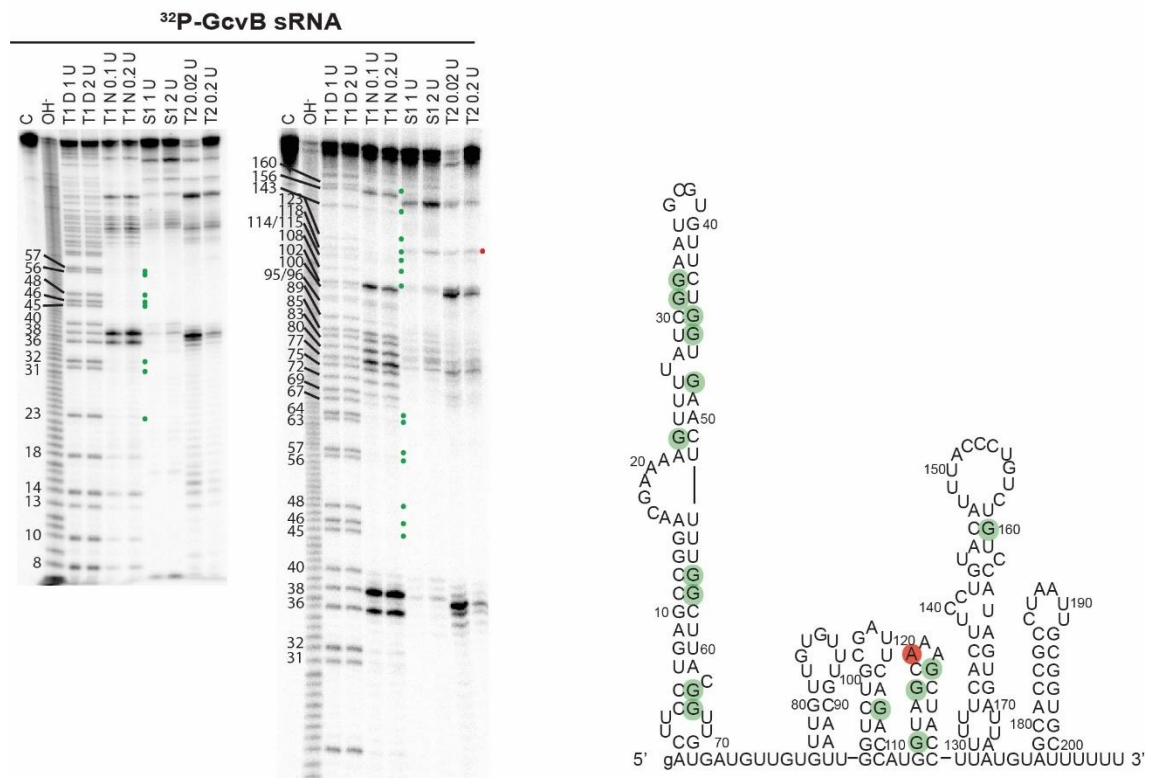
**Rycina 24 Struktury drugorzędowe anty-sRNA.** Hydroliza enzymatyczna **(A)** anty-sRNA <sup>32</sup>P-*chbBC*-IGR, **(B)** <sup>32</sup>P-3'ETS<sup>leuZ</sup>, **(C)** <sup>32</sup>P-AgvB. Numery po lewej odpowiadają pozycjom guanozyn w sekwencji RNA, C oznacza reakcję kontrolną, a OH- produkty degradacji pod wpływem formamidu. Nad autoradiogramem znajdują się oznaczenia nukleaz i ich stężeń zastosowanych do hydrolizy. T1 D oznacza reakcję kontrolną trawienia w warunkach denaturujących, a T1 N reakcje w warunkach natywnych. Pozycje chronione przed trawieniem RNazą T1 w warunkach natywnych posłużyły jako więzy strukturalne do wyznaczenia reszt nukleotydydowych znajdujących się w regionach dwuniciowych (oznaczone zielonymi kółkami), podczas gdy regiony trawione zarówno RNazą T2 jak i nukleazą S1 stanowiły więzy strukturalne dla sekwencji jednoniciowych (czerwone kółka).

Wyniki uzyskane przez hydrolizę enzymatyczną anty-sRNA 3'ETS<sup>leuZ</sup>, które jest regulatorem RybB, wskazują, że badane RNA tworzy dwie stabilne struktury spinki na 5' końcu (Ryc. 24 B). Pierwsza spinka jest długa, obejmuje prawie 70 nukleotydów, podczas gdy druga zawiera jedynie dwie pary zasad. Z kolei środkowy region 3'ETS<sup>leuZ</sup> jest mało ustrukturyzowany. Z powodu niskiej rozdzielczości najdłuższych produktów degradacji, struktura dla ostatnich 35 reszt nukleotydowych znajdujących się od strony 3' została określona na podstawie przewidywania przy użyciu programu RNAstructure. Przewidywanie wskazuje na powstawanie spinki na końcu 3' zakończonej jednoniciową sekwencją oligo(U), co przypomina struktury występujące na końcu 3' sRNA, odpowiedzialne za wiązanie strony proksymalnej białka Hfq. Ponadto sekwencje zlokalizowane w obrębie motywu (ARN)<sub>5</sub> (Ryc. 23 B) stanowiącego potencjalne miejsce oddziaływania ze stroną dystalną Hfq są jednoniciowe, co świadczy o dostępności tych regionów dla białka. Co więcej, sekwencja obejmująca reszty nukleotydowe od 107 do 127, która jest komplementarna do sRNA RybB znajduje się w obrębie mało stabilnej spinki, zawierającej jedynie dwie pary G-C, co sugeruje, że region ten jest dostępny dla oddziaływania z sRNA. Porównanie sekwencji anty-sRNA 3'ETS<sup>leuZ</sup> do mRNA *tsx* regulowanego przez sRNA RybB wykazało, że *tsx* również zawiera sekwencje bogate w adenozyiny znajdujące się w obrębie struktur jednoniciowych (Ryc. 32 B, Groszewska A, nieopublikowane dane). Może to świadczyć o podobnym mechanizmie oddziaływania w kompleksie z Hfq sRNA RybB z anty-sRNA 3'ETS<sup>leuZ</sup> oraz z mRNA *tsx*.

Analiza struktury anty-sRNA AgvB, które jest regulatorem sRNA GcvB, wskazuje, że zarówno 5' koniec cząsteczki jak i jej region centralny są jednoniciowe (Ryc. 24 C). Sekwencja pomiędzy 6 a 23 resztą nukleotydową jest komplementarna do GcvB. Ponadto na 3' końcu AgvB znajduje się struktura spinki terminatorowej z oligo(U) po 3' stronie, która może być miejscem rozpoznawania Hfq (Sauer i Weichenrieder, 2011).

Hydroliza enzymatyczna sRNA GcvB pozwoliła ustalić, że na końcu 5' tego sRNA tworzy się stabilna struktura spinki (Ryc. 25). Środkowa część cząsteczki jest również mocno ustrukturyzowana i zawiera cztery spinki. Pierwsza z nich charakteryzuje się niską stabilnością, ponieważ posiada tylko jedną parę zasad G-C w pięcionukleotydowym regionie dwuniciowym. Spinka ta częściowo nakłada się

na miejsce komplementarnego oddziaływania z anty-sRNA AgvB. Ponadto, w centralnej części GcvB znajdują się liczne sekwencje zawierające reszty urydyn, które mogłyby być miejscami wiązania białka Hfq, gdyż w większości ulokowane są w sekwencjach jednoniciowych. Z powodu niskiej rozdzielczości najkrótszych produktów degradacji, niemożliwa była analiza układu trawień dla ostatnich 46 reszt nukleotydowych z 3' końca cząsteczki GcvB, jednak według przewidywania z zastosowaniem programu RNAstructure, tworzy się tam spinka terminatorowa z oligo(U) od strony 3', która jest znanym miejscem wiązania białka Hfq (Sauer i Weichenrieder, 2011).



**Rycina 25 Struktura drugorzędowa sRNA GcvB.** Hydroliza enzymatyczna sRNA <sup>32</sup>P-GcvB. Numery po lewej odpowiadają pozycjom guanozyn w sekwencji RNA, C oznacza reakcję kontrolną, a OH<sup>-</sup> produkty degradacji pod wpływem formamidu. Nad autoradiogramem znajdują się oznaczenia nukleaz i ich stężeń zastosowanych do hydrolizy. T1 D oznacza reakcję kontrolną trawienia w warunkach denaturujących, a T1 N reakcje w warunkach natywnych. Pozycje chronione przed trawieniem RNazą T1 w warunkach natywnych posłużyły jako więzy strukturalne do wyznaczenia reszt nukleotydowych znajdujących się w regionach dwuniciowych (oznaczone zielonymi kółkami), podczas gdy regiony trawione zarówno RNazą T2 jak i nukleazą S1 stanowiły więzy strukturalne dla sekwencji jednoniciowych (czerwone kółka).

Podsumowując, w cząsteczkach anty-sRNA *chbBC*-IGR, 3'ETS<sup>leuZ</sup> i AgvB sekwencje komplementarne do sRNA znajdują się w regionach o niestabilnej strukturze, potencjalnie dostępnej do wiązania. Ponadto, *chbBC*-IGR podobnie jak

*chiP* posiada region zawierający adenozyne i urydyny, a 3'ETS<sup>leuZ</sup> porównywalnie do *tsx* region bogaty w adenozyne. Sugeruje to, że mogą one oddziaływać z Hfq w sposób typowy, odpowiedni dla klasy II i I.

### **8.2.3 Cząsteczki anty-sRNA inaczej oddziałują z miejscami wiązania RNA na powierzchni Hfq niż cząsteczki sRNA**

Celem kolejnego etapu badań w projekcie było określenie sposobu oddziaływania anty-sRNA z białkiem Hfq, aby porównać je z mechanizmem wiązania Hfq do sRNA i mRNA. Analizowane cząsteczki RNA posiadają sekwencje charakterystyczne dla miejsc wiązania Hfq (Ryc. 23 A-C), a eksperymentalnie wyznaczone struktury drugorzędowe RNA wskazują, że regiony te znajdują się w sekwencjach nietworzących struktur drugorzędowych (Ryc. 24 A-C, Ryc. 25).

Aby określić udział poszczególnych miejsc wiązania RNA na powierzchni białka Hfq w wiązaniu analizowanych anty-sRNA, wykonano reakcję kompetycji wobec oligorybonukleotydów wiążących się specyficznie do strony proksymalnej (U<sub>18</sub>) i dystalnej (A<sub>27</sub>), co pozwoliło na wyznaczenie wartości  $IC_{50}$ . Wartość ta odpowiada stężeniu kompetytorowego RNA dla którego połowa RNA pozostaje związana z białkiem. Reakcja kompetycji w równowadze polegała na związaniu do Hfq znakowanego oligorybonukleotydu A<sub>27</sub> specyficznie oddziałującego ze stroną dystalną Hfq lub U<sub>18</sub>, który wiąże się do powierzchni proksymalnej Hfq. Następnie do Hfq związanego z danym oligorybonukleotydem dodawano badane sRNA lub anty-sRNA w rosnących stężeniach i obserwowano jego zdolność do wymuszania dysocjacji znakowanego RNA od białka Hfq.

Analiza zdolności kompetycji anty-sRNA *chbBC*-IGR o wiązanie do białka Hfq ze znakowanymi radioaktywnie oligorybonukleotydami A<sub>27</sub> i U<sub>18</sub> wykazała, że *chbBC*-IGR nie konkuruje z oligorybonukleotydem U<sub>18</sub> o stronę proksymalną białka Hfq (Tab. 3). Anty-sRNA posiada jedynie niewielką zdolność konkurencji z A<sub>27</sub> o wiązanie do strony dystalnej Hfq, jednak wartość  $IC_{50}$  jest dużo wyższa, niż dla sRNA ChiX zależnego od strony dystalnej (Malecka i wsp., 2015), (Tab. 3). Jest to spójne ze znajdującą się w *chbBC*-IGR sekwencją zawierającą reszty adenozyne (Ryc. 23 A), która jest znanym miejscem rozpoznawania białka Hfq (Updegrave i wsp., 2008, Zhang i wsp., 2013, Ellis i wsp., 2015, Malecka i wsp., 2015, Schu i wsp., 2015, Wang i wsp., 2015). Dane sugerują, że *chbBC*-IGR oddziałuje z trzecią, boczną

stroną Hfq, gdyż posiada sekwencję zawierającą reszty adenozyń i urydyn, które służą do rozpoznawania tej powierzchni białka (Ishikawa i wsp., 2012, Murina i wsp., 2013, Panja i wsp., 2013, Dimastrogiovanni i wsp., 2014, Malecka i wsp., 2015, Schu i wsp., 2015). mRNA *chiP*, które ulega regulacji przy udziale sRNA ChiX, również zawiera sekwencje bogate w reszty nukleotydowe adenozyń i urydyn (Schu i wsp., 2015). Może to świadczyć o podobnym mechanizmie oddziaływania w kompleksie z Hfq sRNA ChiX z anty-sRNA oraz z mRNA.

Z kolei eksperyment  $IC_{50}$  wykonany dla 3'ETS<sup>leuZ</sup> wykazał, że anty-sRNA efektywnie konkuruje ze znakowanym radioaktywnie oligorybonukleotydem A<sub>27</sub> o wiązanie do strony dystalnej białka Hfq z wartością  $IC_{50}$  2,7 nM (Tab. 3). Jest to spójne z posiadaną przez 3'ETS<sup>leuZ</sup> sekwencją zawierającą motywy ARN (Ryc. 23 B), która jest znanym miejscem wiązania strony dystalnej Hfq (Robinson i wsp., 2014). 3'ETS<sup>leuZ</sup> w mniejszym stopniu wypierało także znakowany radioaktywnie oligorybonukleotyd U<sub>18</sub> ze strony proksymalnej Hfq z  $IC_{50}$  40 nM (Tab. 3), co sugeruje niewielkie powinowactwo do tej powierzchni Hfq. Wyniki wskazują, że głównym miejscem wiązania 3'ETS<sup>leuZ</sup> jest strona dystalna, co przypomina wiązanie mRNA regulowanych przez sRNA z klasy I.

**Tabela 3 Średnie wartości  $IC_{50}$  dla kompetycji analizowanych RNA o dostęp do białka Hfq z <sup>32</sup>P-A<sub>27</sub> i <sup>32</sup>P-U<sub>18</sub>.**

	$IC_{50}$ (nM)	
	<sup>32</sup> P-A <sub>27</sub>	<sup>32</sup> P-U <sub>18</sub>
<b><i>chbBC</i>-IGR</b>	44 ± 7,2	>3000
<b>ChiX</b>	1,8 ± 0,22 <sup>a</sup>	3,2 ± 1,2 <sup>a</sup>
<b>3'ETS<sup>leuZ</sup></b>	2,7 ± 0,48	40 ± 9
<b>RybB</b>	>1000 <sup>a</sup>	1,6 ± 0,29 <sup>a</sup>
<b>AgvB</b>	3,2 ± 1,5 <sup>b</sup>	9,9 ± 2,8 <sup>b</sup>
<b>GcvB</b>	>100 <sup>b</sup>	26 ± 3,5 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> wyniki z (Malecka i wsp., 2015), <sup>b</sup> wyniki z (Małeczka-Grajek, 2017)

Analiza zdolności kompetycji anty-sRNA AgvB o wiązanie do białka Hfq ze znakowanymi radioaktywnie oligorybonukleotydami A<sub>27</sub> i U<sub>18</sub> wykazała, że AgvB wydajnie konkuruje ze znakowanym oligorybonukleotydem A<sub>27</sub> o wiązanie do powierzchni dystalnej z  $IC_{50}$  3,2 nM. Jest to spójne z faktem, że w obrębie AgvB znajduje się sekwencja bogata w reszty adenozyń, która jest dobrze

scharakteryzowanym miejscem rozpoznawania strony dystalnej Hfq (Updegrave i wsp., 2008, Zhang i wsp., 2013, Ellis i wsp., 2015, Malecka i wsp., 2015, Schu i wsp., 2015, Wang i wsp., 2015). Co więcej, AgvB również wydajnie wypierało znakowany radioaktywnie oligorybonukleotyd U<sub>18</sub> ze strony proksymalnej Hfq z  $IC_{50}$  9,9 nM (Tab. 3). Może to być związane z występowaniem na 3' końcu AgvB sekwencji oligo(U) (Ryc. 23 C), która jest rozpoznawana przez stronę proksymalną białka Hfq (Sauer i Weichenrieder, 2011). Oddziaływanie AgvB ze stronami dystalną i proksymalną białka Hfq jest podobne do wiązania sRNA z klasy II przez Hfq (Schu i wsp., 2015).

Eksperyment  $IC_{50}$  wykonany dla sRNA GcvB wykazał, że GcvB nie konkuruje z A<sub>27</sub> o stronę dystalną Hfq oraz wykazuje niewielką zdolność wypierania U<sub>18</sub> ze strony proksymalnej z  $IC_{50}$  26 nM (Tab. 3). Wiązanie strony proksymalnej jest możliwe, przez sekwencję oligo(U) znajdującą się na końcu 3' GcvB. Uzyskane wyniki sugerują udział trzeciej, bocznej powierzchni Hfq w oddziaływaniu z GcvB. Jest to spójne z faktem występowania licznych reszt urydyn w obrębie sekwencji tego sRNA, które są znanym miejscem oddziaływania ze stroną boczną Hfq (Ishikawa i wsp., 2012, Murina i wsp., 2013, Panja i wsp., 2013, Dimastrogiovanni i wsp., 2014, Malecka i wsp., 2015, Schu i wsp., 2015). Podsumowując, oddziaływanie GcvB z Hfq jest podobne do wiązania Hfq przez sRNA z klasy I, jednak powinowactwo do strony proksymalnej jest niższe, niż dla typowych sRNA z tej klasy. Sugeruje to, że GcvB może też zachowywać się jak mRNA oddziałujące z sRNA z klasy II, wiążąc powierzchnię boczną Hfq (Schu i wsp., 2015).

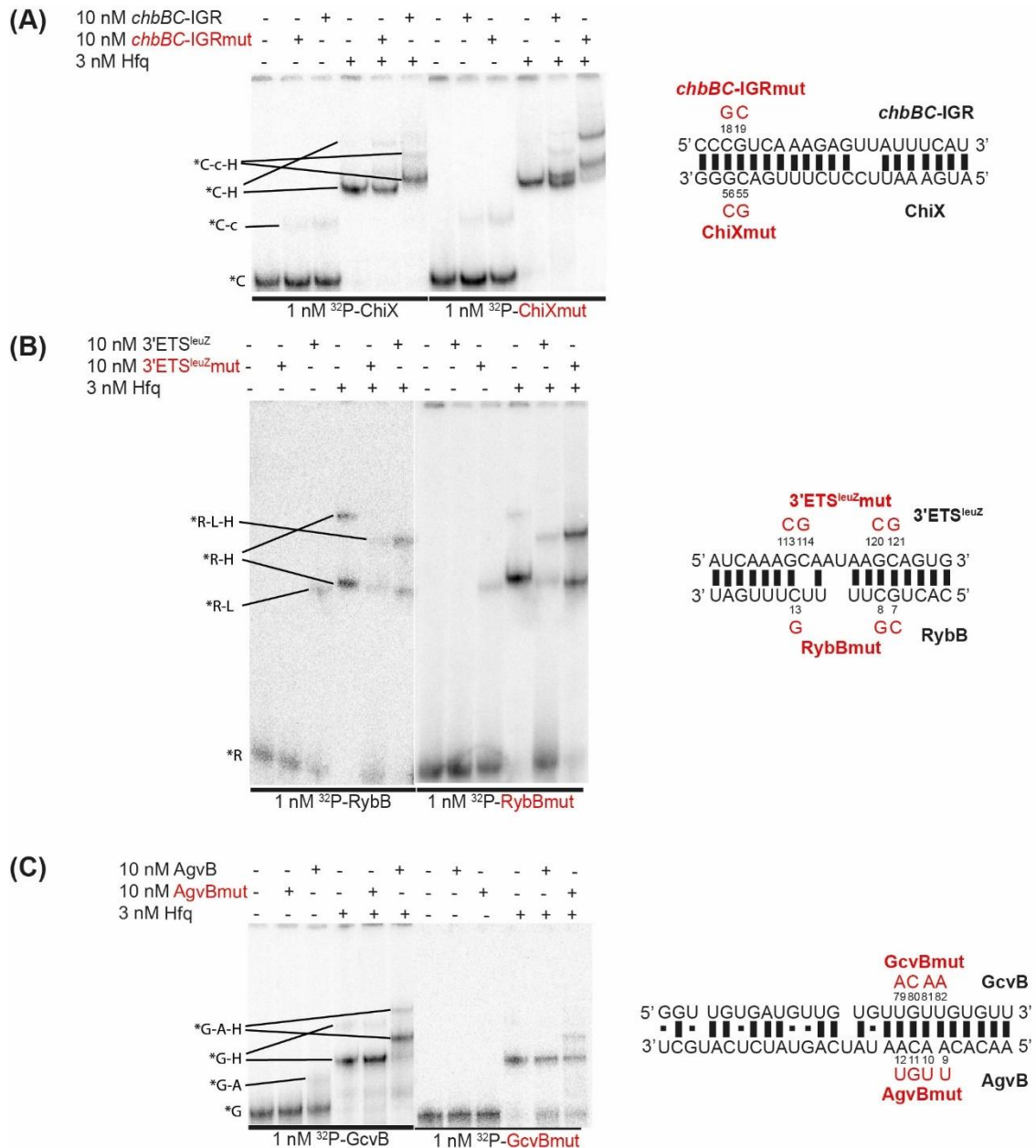
Podsumowując, uzyskane wyniki sugerują, że sposób wiązania anty-sRNA przez Hfq przypomina oddziaływanie Hfq z mRNA i sRNA. Wiązanie *chbBC*-IGR do strony bocznej Hfq jest podobne do oddziaływania z cząsteczkami mRNA regulowanymi przez sRNA z klasy II. Z kolei wiązanie 3'ETS<sup>leuZ</sup> do strony dystalnej białka Hfq, przypomina mechanizm oddziaływania z Hfq mRNA regulowanych przez sRNA z klasy I. 3'ETS<sup>leuZ</sup> wiąże się także ze stroną proksymalną Hfq, jednak z mniejszym powinowactwem niż ze stroną dystalną. Analiza oddziaływania AgvB i GcvB z białkiem Hfq wskazuje, że anty-sRNA AgvB wykazuje wysokie powinowactwo do powierzchni dystalnej i proksymalnej, podobnie jak sRNA z klasy II. Z kolei sRNA GcvB zachowuje się w sposób zbliżony do sRNA z klasy I oddziałując ze stroną boczną oraz proksymalną białka Hfq. Jednak wiązanie strony

proksymalnej jest mniej wydajne niż dla typowych sRNA z klasy I, przez co oddziaływanie GcvB z Hfq może być podobne do wiązania przez Hfq mRNA regulowanych przez sRNA z klasy II.

#### **8.2.4 Białko opiekuńcze Hfq uczestniczy w oddziaływaniach sRNA z cząsteczkami anty-sRNA w sposób podobny jak w oddziaływaniach sRNA klasy I i klasy II z regulowanymi przez nie cząsteczkami mRNA**

Kolejny etap badań wykonanych na potrzeby niniejszej pracy miał na celu określenie w jaki sposób białko Hfq uczestniczy w oddziaływaniu anty-sRNA z sRNA oraz porównanie go do mechanizmu działania Hfq w asocjacji sRNA do regulowanych mRNA. W poprzedniej części projektu określono zaangażowanie poszczególnych stron białka Hfq w oddziaływania z badanymi RNA, jednak nie jest jasne, która z powierzchni Hfq jest niezbędna dla asocjacji anty-sRNA z sRNA oraz czy mechanizm ten jest zbliżony do tworzenia kompleksu sRNA-mRNA w obecności Hfq.

Początkowo zdecydowano się sprawdzić znaczenie sekwencji komplementarnej pomiędzy anty-sRNA a sRNA w powstawaniu kompleksu trójskładnikowego z białkiem Hfq. Aby potwierdzić, czy w kompleksie trójskładnikowym anty-sRNA jest bezpośrednio związane z sRNA, a nie tylko za pośrednictwem białka Hfq, wykonano wiązanie 1 nM znakowanych radioaktywnie cząsteczek sRNA z 10 nM anty-sRNA w obecności 3 nM białka Hfq. Ponadto przeprowadzono reakcje kontrolne pozwalające na określenie wzoru migracji poszczególnych kompleksów na żelu poliakrylamidowym. Użyto RNA o naturalnej sekwencji, których wiązanie do Hfq oraz strukturę analizowano w poprzednich podrozdziałach (Tab. 3, Ryc. 24 A, B, C, Ryc. 25) oraz ich wersje zmutowane, których efekt na regulację *in vivo* był badany we wcześniejszych pracach (Overgaard i wsp., 2009, Tree i wsp., 2014, Lalaouna i wsp., 2015a). Następnie kompleksy analizowano z użyciem techniki analizy różnicowej migracji w żelu poliakrylamidowym (Ryc. 26).



**Rycina 26 Powstawanie kompleksu trójskładnikowego anty-sRNA z sRNA i Hfq zależy od komplementarności pomiędzy sRNA a anty-sRNA.** Mutacje punktowe wprowadzone w miejscu oddziaływania anty-sRNA z sRNA zostały wybrane na podstawie wcześniejszych badań *in vivo* dla **(A)** *chbBC*-IGR-ChiX (Overgaard i wsp., 2009), **(B)** 3'ETS<sup>leuZ</sup>-RybB (Lalaouna i wsp., 2015a) oraz **(C)** AgvB-GcvB (Tree i wsp., 2014). Wolne <sup>32</sup>P-ChiX oznaczono jako \*C, *chbBC*-IGR jako c, <sup>32</sup>P-RybB jako \*R, 3'ETS<sup>leuZ</sup> jako L, <sup>32</sup>P-GcvB jako \*G, AgvB jako A oraz Hfq jako H. Kombinacje tych liter odnoszą się do kompleksów tworzonych przez RNA oraz Hfq.

Wyniki eksperymentu wskazują, że w przypadku oddziaływania *chbBC*-IGR z ChiX i Hfq wprowadzenie mutacji do jednej z cząsteczek skutkowało zmniejszeniem wydajności tworzenia kompleksu anty-sRNA z sRNA w nieobecności białka Hfq. Natomiast kompleks trójskładnikowy zawierający oba RNA i Hfq powstawał jedynie wtedy, gdy oddziałujące cząsteczki były

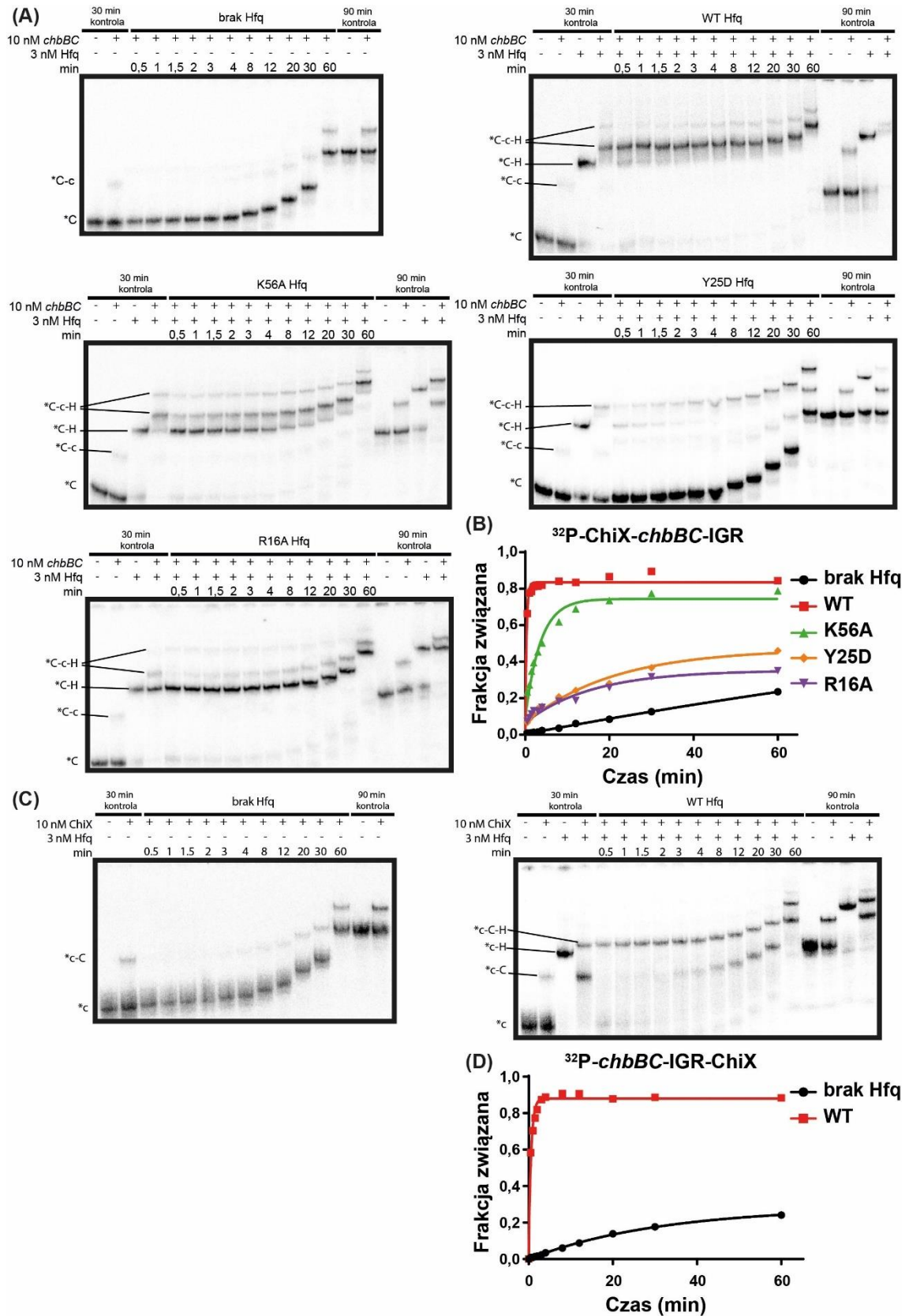
komplementarne (Ryc. 26 A). Z kolei kompleks 3'ETS<sup>leuZ</sup> z RybB, powstaje tylko gdy zachowana jest komplementarność w miejscu oddziaływania. Jednakże kompleks trójskładnikowy zawierający oba RNA i Hfq tworzył się także w sytuacji, kiedy jedno z RNA posiadało mutacje zaburzające komplementarność, ale frakcja związana była niższa, niż w przypadku komplementarnej sekwencji (Ryc. 26 B). Analiza oddziaływania dla pary anty-sRNA AgvB z sRNA GcvB wykazała, że w nieobecności Hfq kompleks AgvB z GcvB powstawał jedynie w przypadku zachowania naturalnych sekwencji obu RNA. Z kolei kompleks trójskładnikowy AgvB-GcvB-Hfq tworzył się, gdy komplementarność obu RNA była zachowana, przy czym proces ten był wydajniejszy (wyższa frakcja związana) dla naturalnych RNA niż dla ich zmutowanych wersji (Ryc. 26 C).

**Tabela 4 Porównanie obserwowanej szybkości asocjacji dla tworzenia kompleksów sRNA z mRNA lub anty-sRNA w obecności 3 nM Hfq oraz jego mutantów.**

	<i>k<sub>obs</sub></i> (min <sup>-1</sup> )				
	Brak Hfq	Hfq WT	Hfq K56A	Hfq Y25D	Hfq R16A
<sup>32</sup> P-ChiX/ <i>chbBC</i> -IGR	0,00042 ± 0,0003	2,7 ± 0,62	0,25 ± 0,026	0,05 ± 0,012	0,01 ± 0,001*
<sup>32</sup> P- <i>chbBC</i> -IGR/ ChiX	0,025 ± 0,0084	1,8 ± 0,062	n. m.	n. m.	n. m.
<sup>32</sup> P-ChiX/ <i>chiP</i>	0,089 ± 0,0016*	0,57 ± 0,059	0,43 ± 0,091	0,043 ± 0,0085	0,022 ± 0,0066
<sup>32</sup> P- <i>chiP</i> /ChiX	0,011 ± 0,00079*	4,9 ± 1,2	n. m.	n. m.	n. m.
<sup>32</sup> P-RybB/ 3'ETS <sup>leuZ</sup>	0,028 ± 0,01	2,7 ± 0,73	0,25 ± 0,05	0,095 ± 0,033	0,17 ± 0,0047
<sup>32</sup> P-3'ETS <sup>leuZ</sup> / RybB	0,0019 ± 0,00067	4,8 ± 1,6	n. m.	n. m.	n. m.
<sup>32</sup> P-RybB/ <i>tsx</i>	~ 0	0,25 ± 0,081	0,00099 ± 0,00049	0,0025 ± 0,001	0,12 ± 0,014
<sup>32</sup> P- <i>tsx</i> /RybB	~ 0	1,1 ± 0,11	n. m.	n. m.	n. m.
<sup>32</sup> P-GcvB/AgvB	0,01 ± 0,0031*	2,2 ± 0,24	0,16 ± 0,044	0,39 ± 0,064	0,028 ± 0,0055
<sup>32</sup> P-AgvB/GcvB	0,02 ± 0,0027*	0,95 ± 0,35	n. m.	n. m.	n. m.

\* dane były dopasowywane do równania wykładniczego jednofazowego zakładając wartość końcową frakcji związanej równą 0,7

n. m. – nie mierzono



**Rycina 27** Miejsca wiązania RNA na stronach bocznej i dystalnej białka Hfq uczestniczą w oddziaływaniu ChiX z *chbBC*-IGR. **(A)** Autoradiogramy przedstawiające żele natywne użyte do monitorowania asocjacji 1 nM  $^{32}\text{P}$ -ChiX z 10 nM *chbBC*-IGR w nieobecności Hfq lub w obecności naturalnego Hfq oraz jego mutantów. Wolne  $^{32}\text{P}$ -ChiX oznaczono jako \*C, *chbBC*-IGR jako c oraz Hfq jako H. Kombinacje tych liter odnoszą się do kompleksów tworzonych przez RNA oraz Hfq.

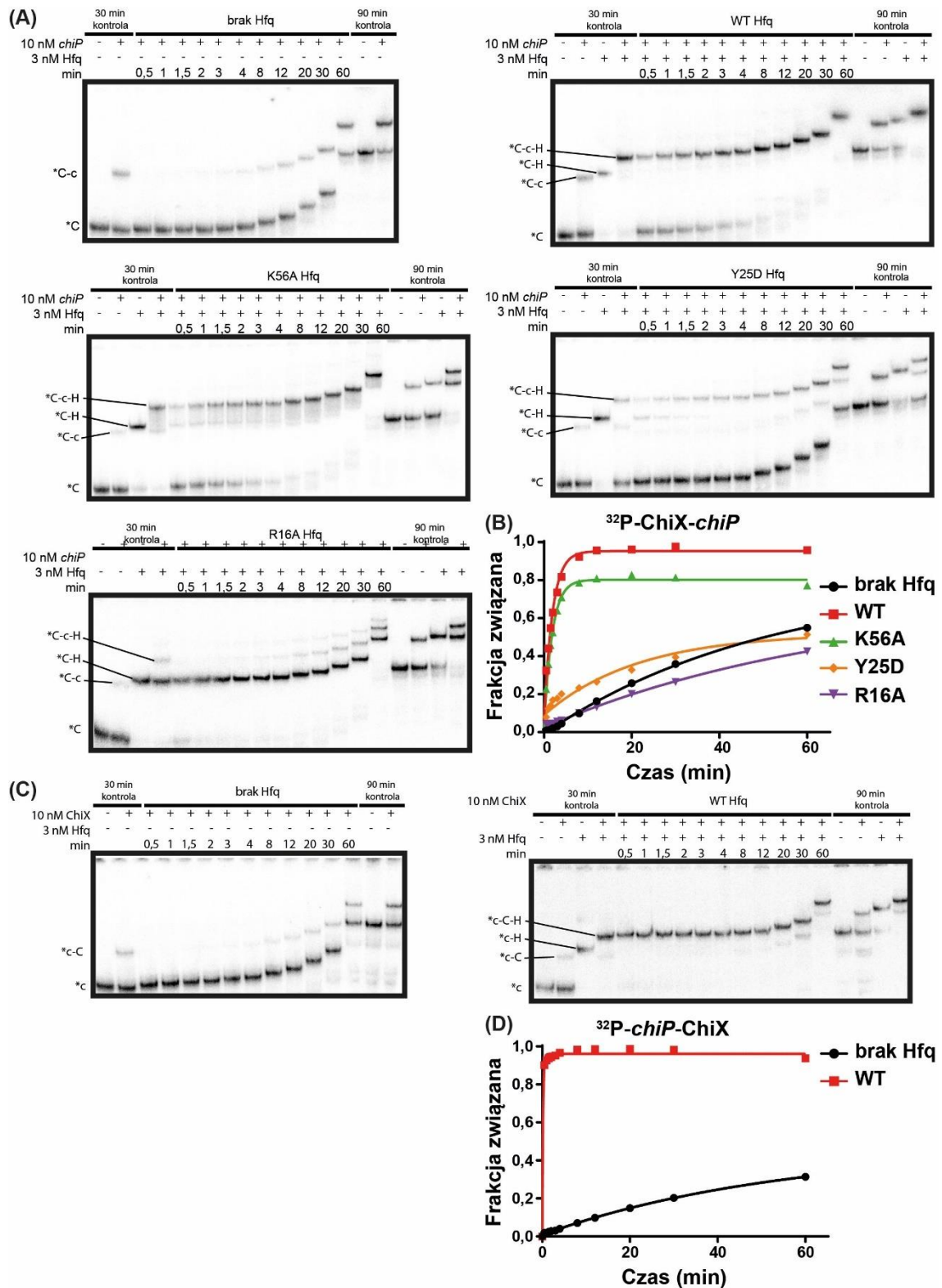
**(B)** Oddziaływanie  $^{32}\text{P}$ - ChiX z *chbBC*-IGR było najbardziej osłabione dla wariantów białka Hfq z mutacjami R16A i Y25D znajdującymi się odpowiednio na powierzchni bocznej oraz dystalnej. **(C)** Autoradiogramy przedstawiające żele natywne zastosowane do monitorowania asocjacji 1 nM  $^{32}\text{P}$ -*chbBC*-IGR z 10 nM ChiX przy nieobecności Hfq lub w obecności naturalnego Hfq.  $^{32}\text{P}$ -*chbBC*-IGR oznaczono jako \*, ChiX jako C oraz Hfq jako H. Kombinacje tych liter odnoszą się do kompleksów tworzonych przez RNA oraz Hfq. **(D)** Hfq przyspiesza asocjację  $^{32}\text{P}$ -*chbBC*-IGR z ChiX.

Kolejnym celem projektu było porównanie mechanizmu oddziaływania z RNA białka Hfq podczas asocjacji sRNA z anty-sRNA oraz z mRNA. Aby określić rolę poszczególnych powierzchni białka Hfq w wiązaniu sRNA z anty-sRNA oraz z mRNA wykonano pomiar kinetyki asocjacji bez Hfq, w obecności naturalnego Hfq oraz jego wariantów z mutacjami w miejscach wiązania RNA techniką różnicowej migracji w żelu poliakrylamidowym. Mutacje aminokwasów białka Hfq zostały wybrane na podstawie pracy, w której analizowano ich wpływ na stabilność i regulację translacji przez sRNA (Zhang i wsp., 2013). Wariant Hfq uniemożliwiający oddziaływanie ze stroną proksymalną posiadał mutację K56A, ze stroną boczną R16A, a z powierzchnią dystalną Y25D. Do pomiaru kinetyki asocjacji wykorzystano 1 nM znakowane sRNA, 10 nM anty-sRNA lub mRNA oraz 3 nM Hfq. Dodatkowo wykonano eksperymenty kontrolne, aby sprawdzić, czy proces zachodzi tak samo, gdy druga z cząsteczek RNA (anty-sRNA lub mRNA) jest wyznakowana. W tym celu zmierzono obserwowaną szybkość asocjacji dwóch RNA bez Hfq oraz w obecności 3 nM Hfq.

Najpierw analizowano oddziaływania sRNA ChiX z anty-sRNA *chbBC*-IGR oraz z mRNA *chiP*. mRNA *chiP* posiada sekwencje zawierające reszty adenozyń i urydyn, które potencjalnie mogą być wiązane przez stronę boczną białka Hfq. Znajdują się one w regionach jednoniciowych badanego fragmentu mRNA (Groszewska A, nieopublikowane dane). W obecności 3 nM naturalnego Hfq szybkość asocjacji znakowanego sRNA ChiX z anty-sRNA *chbBC*-IGR wykazywała ponad 6000-krotne przyspieszenie, z kolei dla eksperymentu ze znakowanym *chbBC*-IGR była zwiększona 72-razy (Tab. 4, Ryc. 27 A, B). W przypadku oddziaływania sRNA ChiX z regulowanym przez niego mRNA *chiP*, szybkość asocjacji dla znakowanego ChiX uległa 6-krotnemu przyspieszeniu z udziałem białka Hfq oraz ponad 400-krotnemu przyspieszeniu, gdy znakowane było mRNA *chiP* (Tab. 4, Ryc. 28 A, B). Różnice w efekcie białka Hfq na asocjację badanych RNA w zależności od znakowanego RNA mogą wynikać z powinowactwa poszczególnych znakowanych cząsteczek RNA do Hfq. ChiX wiąże się do Hfq z

wartością  $K_d$  0,2 nM (Malecka i wsp., 2015), podczas gdy *chbBC*-IGR słabiej oddziałuje z Hfq z  $K_d$  0,92 nM (Małecka-Grajek, 2017). Sugeruje to, że w obecności 3 nM naturalnego Hfq szybkość asocjacji znakowanego sRNA ChiX z anty-sRNA *chbBC*-IGR wykazywała większe przyspieszenie niż dla znakowanego *chbBC*-IGR, gdyż ChiX wydajniej oddziałuje z białkiem Hfq niż *chbBC*-IGR. Prawdopodobnie analogiczna sytuacja dotyczy asocjacji ChiX do mRNA *chiP*, jednak aby to potwierdzić należałoby dokonać pomiaru wartości  $K_d$  dla wiązania *chiP* przez Hfq.

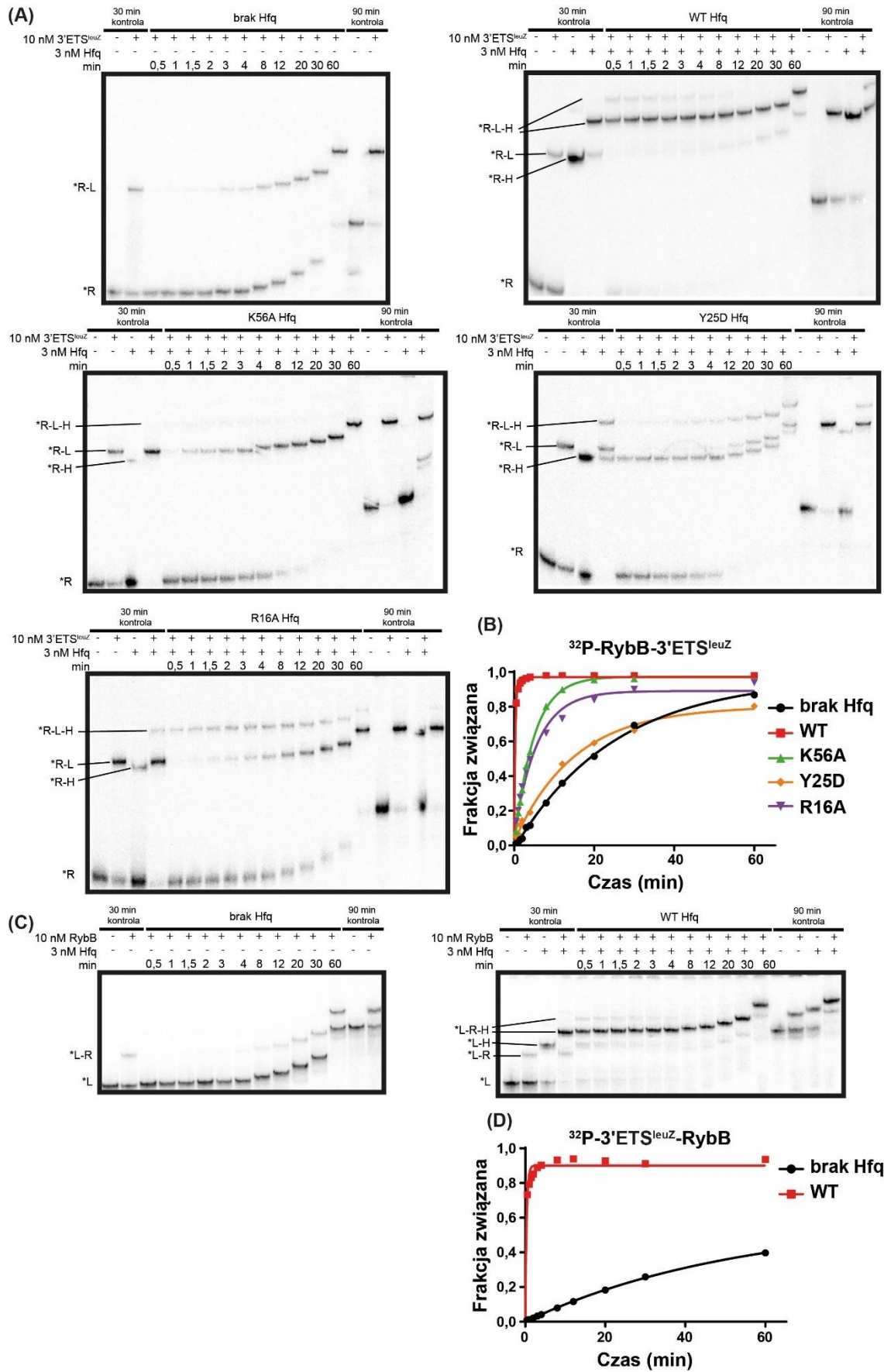
Kolejno porównywano udział miejsc wiązania RNA na powierzchni białka Hfq w asocjacji znakowanego sRNA ChiX z anty-sRNA *chbBC*-IGR oraz mRNA *chiP*. Wykazano, że dla oddziaływania ChiX z anty-sRNA największy wpływ na zdolność asocjacji miały mutacje dwóch stron: bocznej oraz dystalnej. Wartość obserwowanej szybkości asocjacji z wariantem Hfq R16A była ponad 250-krotnie niższa wobec  $k_{obs}$  w obecności naturalnego Hfq, a dla Hfq Y25D ponad 50-krotnie niższa (Tab. 4, Ryc. 27 A). Najmniejszy efekt na asocjację ChiX z *chbBC*-IGR wykazywała mutacja strony proksymalnej Hfq z 10-krotnie niższą wartością  $k_{obs}$  w porównaniu do reakcji w obecności naturalnego Hfq. Analiza szybkości asocjacji sRNA ChiX z mRNA *chiP* wykazała podobny mechanizm oddziaływania z białkiem Hfq, co w przypadku wiązania anty-sRNA przez ChiX. Również mutacje stron bocznej i dystalnej powodowały największy efekt na spowolnienie asocjacji sRNA z mRNA. Wartość obserwowanej szybkości asocjacji z wariantem Hfq R16A była ponad 25-krotnie niższa od  $k_{obs}$  w obecności naturalnego Hfq, a dla Hfq Y25D ponad 13-krotnie niższa (Tab. 4, Ryc. 28 A). Najmniejszy wpływ na szybkość asocjacji ChiX z *chiP* wykazywała mutacja strony proksymalnej Hfq z 1,3-krotnie niższą wartością  $k_{obs}$  w porównaniu do  $k_{obs}$  w obecności naturalnego Hfq. Podsumowując, mechanizm oddziaływania sRNA ChiX z anty-sRNA *chbBC*-IGR jest podobny do używanego podczas asocjacji z mRNA *chiP*.



**Rycina 28** Miejsca wiązania RNA na stronach bocznej i dystalnej białka Hfq uczestniczą w oddziaływaniu ChiX z mRNA *chiP*. **(A)** Autoradiogramy przedstawiające żele natywne użyte do monitorowania asocjacji 1 nM <sup>32</sup>P- ChiX z 10 nM *chiP* przy nieobecności Hfq lub w obecności naturalnego Hfq oraz jego mutantów. Wolne <sup>32</sup>P-ChiX oznaczono jako \*C, *chiP* jako c oraz Hfq jako H. Kombinacje tych liter odnoszą się do kompleksów tworzonych przez RNA oraz Hfq. **(B)** Oddziaływanie <sup>32</sup>P- ChiX z *chiP* było najbardziej osłabione dla wariantów białka Hfq z mutacjami R16A i Y25D znajdującymi się odpowiednio na powierzchni bocznej oraz dystalnej. **(C)** Autoradiogramy przedstawiające żele natywne zastosowane do monitorowania asocjacji 1 nM

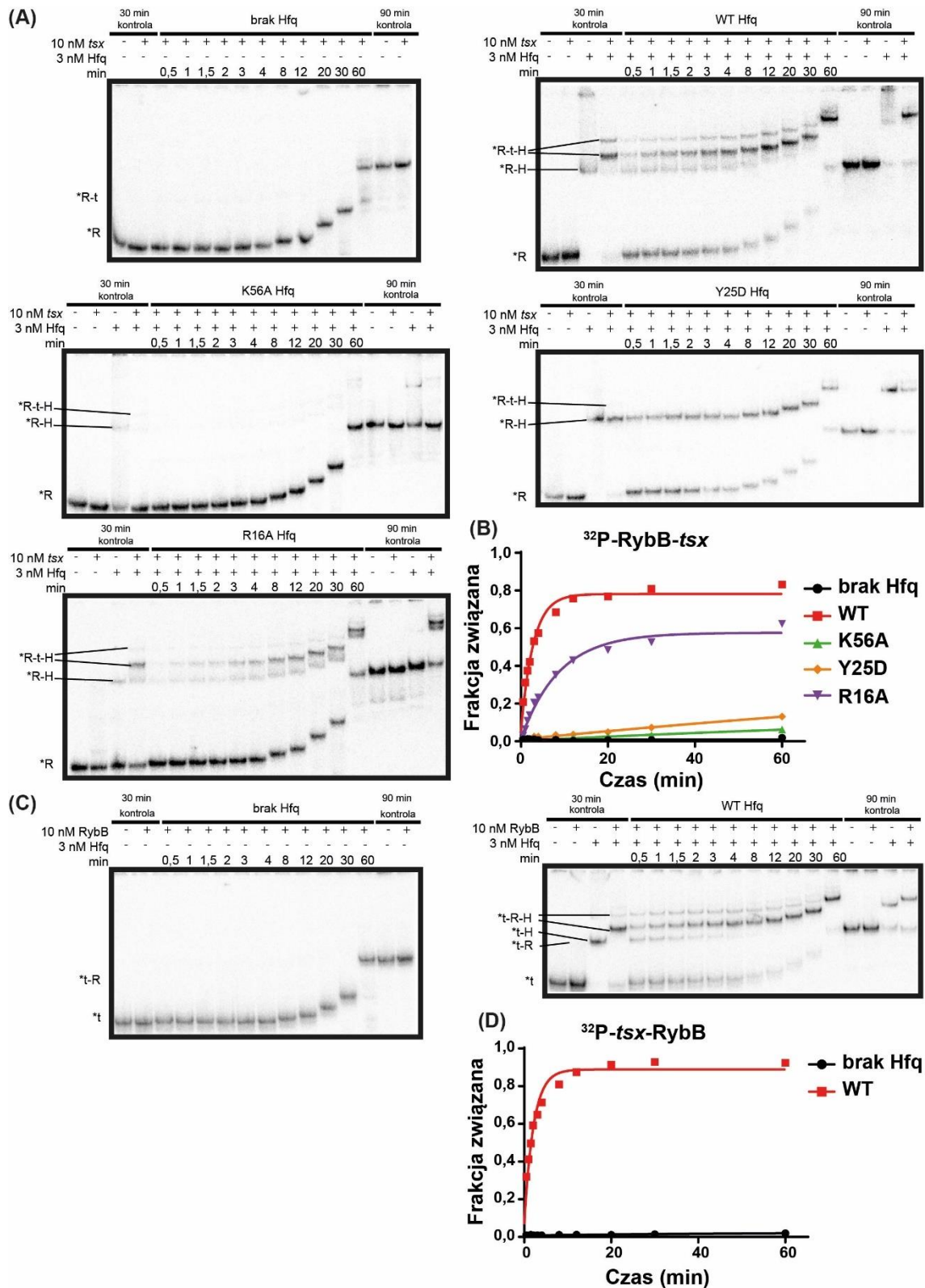
<sup>32</sup>P- *chiP* z 10 nM ChiX przy nieobecności Hfq lub w obecności naturalnego Hfq. <sup>32</sup>P- *chiP* oznaczono jako \*c, ChiX jako C oraz Hfq jako H. Kombinacje tych liter odnoszą się do kompleksów tworzonych przez RNA oraz Hfq. **(D)** Hfq przyspiesza asocjację <sup>32</sup>P- *chiP* z ChiX.

Następnie porównano sposób wiązania RNA przez białko Hfq w oddziaływaniach sRNA RybB z anty-sRNA 3'ETS<sup>leuZ</sup> oraz z mRNA *tsx*. mRNA *tsx* posiada sekwencje zawierające liczne reszty adenzyn, które potencjalnie mogą oddziaływać ze stroną dystalną białka Hfq. Znajdują się one w regionach jednoniciowych badanego fragmentu mRNA (Groszewska A, nieopublikowane dane). Początkowo sprawdzono udział białka Hfq w asocjacji RybB zarówno z anty-sRNA jak i z mRNA, w sytuacji, gdy jedno lub drugie RNA było znakowane radioaktywnie. Pomiar obserwowanej szybkości asocjacji znakowanego RybB z 3'ETS<sup>leuZ</sup> wykazał, że 3 nM Hfq zwiększa wartość  $k_{obs}$  prawie 100-krotnie, podczas gdy asocjacja dla znakowanego 3'ETS<sup>leuZ</sup> jest przyspieszona ponad 2500-krotnie (Tab. 4, Ryc. 29 A, B). Różnice w efekcie wpływu białka Hfq na asocjację badanych RNA w zależności od znakowanego RNA mogą wynikać z odmiennej zdolności wiązania Hfq przez badane cząsteczki RNA. RybB oddziałuje z Hfq z wartością  $K_d$  0,34 nM (Malecka i wsp., 2015), podczas gdy  $K_d$  dla 3'ETS<sup>leuZ</sup> wynosi 0,24 nM (Małecka-Grajek, 2017). Sugeruje to, że w obecności 3 nM naturalnego Hfq szybkość asocjacji znakowanego anty-sRNA 3'ETS<sup>leuZ</sup> z sRNA RybB wykazywała większe przyspieszenie niż dla znakowanego RybB, gdyż 3'ETS<sup>leuZ</sup> silniej oddziałuje z białkiem Hfq niż RybB. Z kolei w przypadku oddziaływania RybB z *tsx* nieobecność Hfq uniemożliwia asocjację obu RNA. Natomiast wartość  $k_{obs}$  w obecności 3 nM Hfq wynosiła 0,25 min<sup>-1</sup> dla znakowanego RybB i 1,1 min<sup>-1</sup> dla znakowanego *tsx* (Tab. 4, Ryc. 30 A, B). Różnice w szybkości asocjacji w zależności od znakowanego RNA mogą również wynikać z różnic w wiązaniu badanych RNA przez Hfq, jednak aby to potwierdzić należałoby sprawdzić powinowactwo mRNA *tsx* do Hfq.



**Rycina 29 Miejsce wiązania RNA na stronie dystalnej białka Hfq uczestniczy w oddziaływaniu sRNA RybB z anty-sRNA 3'ETS<sup>leuZ</sup>.** (A) Autoradiogramy przedstawiające żele natywne użyte do monitorowania asocjacji 1 nM <sup>32</sup>P-RybB z 10 nM 3'ETS<sup>leuZ</sup> przy nieobecności Hfq lub w obecności naturalnego Hfq oraz jego mutantów. Wolne <sup>32</sup>P- RybB oznaczono jako \*R, 3'ETS<sup>leuZ</sup> jako L oraz Hfq jako H. Kombinacje tych liter odnoszą się do kompleksów tworzonych przez RNA oraz Hfq. (B) Oddziaływanie <sup>32</sup>P-RybB z 3'ETS<sup>leuZ</sup> było najbardziej osłabione dla Hfq z mutacją Y25D znajdującą się na powierzchni dystalnej. (C) Autoradiogramy przedstawiające żele natywne zastosowane do monitorowania asocjacji 1 nM <sup>32</sup>P-3'ETS<sup>leuZ</sup> z 10 nM RybB przy nieobecności Hfq lub w obecności naturalnego Hfq. <sup>32</sup>P-3'ETS<sup>leuZ</sup> oznaczono jako \*L, RybB jako R oraz Hfq jako H. Kombinacje tych liter odnoszą się do kompleksów tworzonych przez RNA oraz Hfq. (D) Hfq przyspiesza asocjację <sup>32</sup>P-3'ETS<sup>leuZ</sup> z RybB.

W kolejnym etapie badano udział poszczególnych stron białka Hfq w asocjacji znakowanego sRNA RybB z anty-sRNA 3'ETS<sup>leuZ</sup> oraz z mRNA *tsx*. Wykazano, że dla powstawania kompleksu RybB z anty-sRNA największy wpływ miała mutacja powierzchni dystalnej. Wartość obserwowanej szybkości asocjacji z wariantem białka Hfq z mutacją strony dystalnej była prawie 30-krotnie niższa od  $k_{obs}$  w obecności naturalnego Hfq. Mniejszy efekt na oddziaływanie RybB z anty-sRNA wykazywały mutacje stron: bocznej i proksymalnej z odpowiednio 16- i 11-krotnie niższą wartością  $k_{obs}$  w porównaniu do asocjacji w obecności naturalnego białka Hfq (Tab. 4, Ryc. 29 A). Analiza szybkości asocjacji sRNA RybB z mRNA *tsx* wskazuje na zbliżony mechanizm oddziaływania z białkiem Hfq, do obserwowanego w przypadku powstawania kompleksu z anty-sRNA. Oprócz strony dystalnej, która była niezbędna dla wydajnego oddziaływania RybB z anty-sRNA, także strona proksymalna miała znaczenie dla wiązania z mRNA *tsx*. Wartości  $k_{obs}$  dla asocjacji w obecności wariantów białka z mutacją powierzchni dystalnej i proksymalnej były odpowiednio 100- i 250-krotnie niższe w porównaniu z  $k_{obs}$  zmierzoną dla oddziaływania z naturalnym Hfq. Z kolei mutacja strony bocznej Hfq obniżyła wartość  $k_{obs}$  2-krotnie w porównaniu do naturalnego Hfq (Tab. 4, Ryc. 29 A). Reasumując, mechanizm działania białka Hfq w tworzeniu kompleksu z sRNA RybB i anty-sRNA 3'ETS<sup>leuZ</sup> jest zbliżony do używanego podczas asocjacji z mRNA *tsx*.

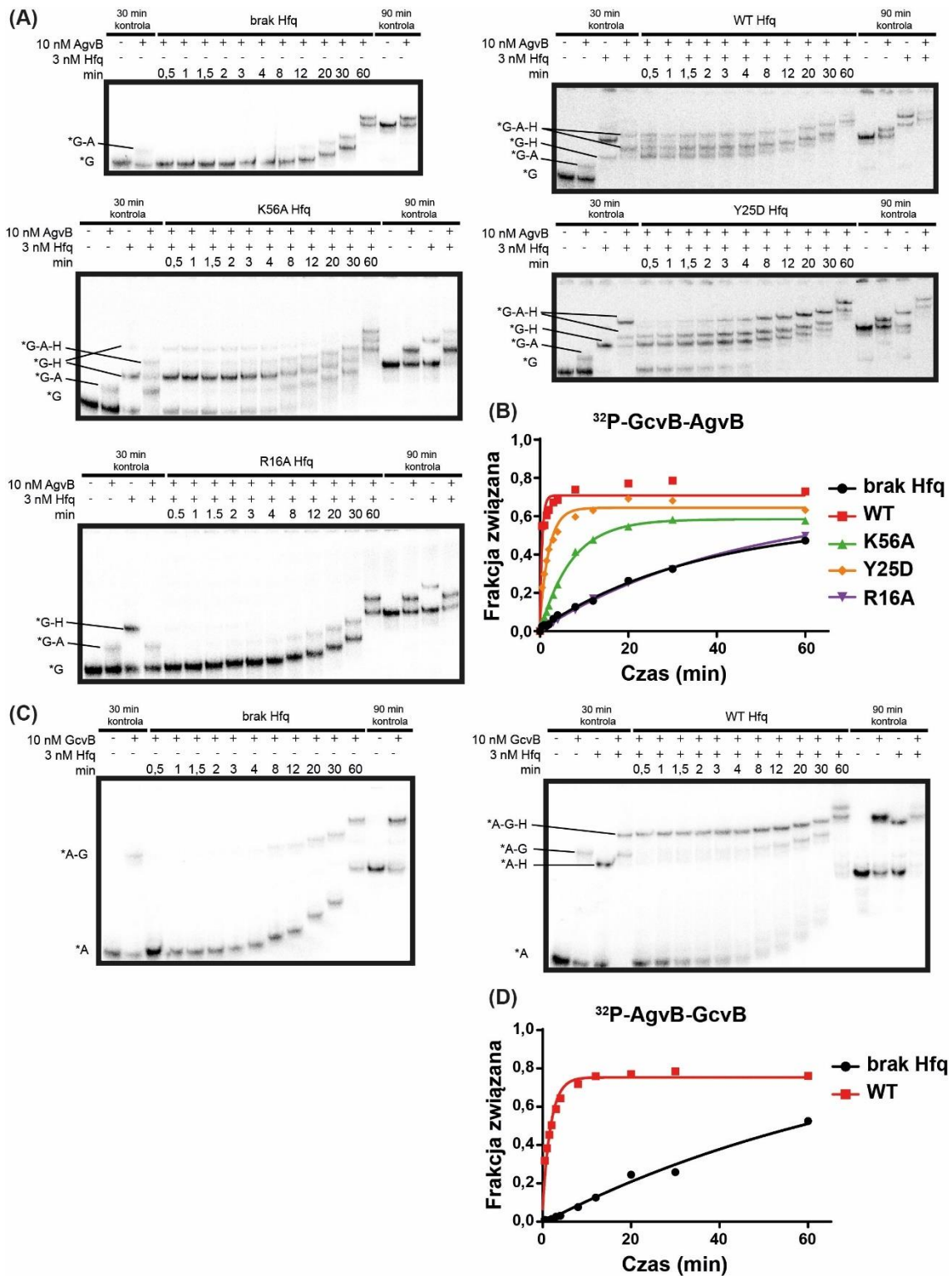


**Rycina 30** Miejsce wiązania RNA na stronach dystalnej i proksymalnej białka Hfq uczestniczą w oddziaływaniu sRNA RybB z mRNA *tsx*. **(A)** Autoradiogramy przedstawiające żele natywne użyte do monitorowania asocjacji 1 nM  $^{32}\text{P}$ -RybB z 10 nM *tsx* przy nieobecności Hfq lub w obecności naturalnego Hfq oraz jego mutantów. Wolne  $^{32}\text{P}$ -RybB oznaczono jako \*R, *tsx* jako t oraz Hfq jako H. Kombinacje tych liter odnoszą się do kompleksów tworzonych przez RNA oraz Hfq. **(B)** Oddziaływanie  $^{32}\text{P}$ -RybB z *tsx* było najbardziej osłabione dla wariantów białka Hfq z mutacjami powierzchni dystalnej (Y25D) i proksymalnej (K56A). **(C)** Autoradiogramy przedstawiające żele natywne zastosowane do monitorowania asocjacji 1 nM  $^{32}\text{P}$ -*tsx* z 10 nM RybB przy nieobecności

Hfq lub w obecności naturalnego Hfq.  $^{32}\text{P}$ -*tsx* oznaczono jako \*t, RybB jako R oraz Hfq jako H. Kombinacje tych liter odnoszą się do kompleksów tworzonych przez RNA oraz Hfq. **(D)** Hfq przyspiesza asocjację  $^{32}\text{P}$ -*tsx* z RybB.

Następnym celem w projekcie było określenie roli białka Hfq w oddziaływaniu anty-sRNA AgvB z sRNA GcvB. Najpierw sprawdzono jak obecność Hfq wpływa na szybkość asocjacji AgvB z GcvB. Wykazano, że 3 nM Hfq zwiększa wartość  $k_{obs}$  dla asocjacji znakowanego radioaktywnie GcvB z AgvB ponad 200-krotnie, podczas gdy wartość  $k_{obs}$  dla wiązania znakowanego AgvB z GcvB wzrosła prawie 50-krotnie w obecności Hfq (Tab. 4, Ryc. 31 A, B). Różnice w efekcie wpływu białka Hfq na asocjację badanych RNA w zależności od znakowanego RNA mogą wynikać z odmiennej zdolności wiązania Hfq przez badane cząsteczki RNA. GcvB oddziałuje z Hfq z wartością  $K_d$  0,31 nM, podczas gdy  $K_d$  dla AgvB wynosi 0,44 nM (Małecka-Grajek, 2017). Sugeruje to, że w obecności 3 nM naturalnego Hfq szybkość asocjacji znakowanego sRNA GcvB z anty-sRNA AgvB wykazywała większe przyspieszenie niż dla znakowanego AgvB, gdyż GcvB silniej oddziałuje z białkiem Hfq niż AgvB.

Zmiany szybkości asocjacji znakowanego GcvB z AgvB w obecności zmutowanych wariantów białka Hfq sugerują, że mutacja strony bocznej ma największy wpływ na spowolnienie oddziaływania sRNA z anty-sRNA, z wartością  $k_{obs}$  prawie 80-krotnie niższą niż w obecności naturalnego Hfq. Mniejszy efekt obserwowano dla stron proksymalnej i dystalnej z odpowiednio 14- i 6-krotnie niższą wartością  $k_{obs}$  (Tab. 4, Ryc. 31 B). Podsumowując, dla oddziaływania AgvB z GcvB największe znaczenie dla wydajnej asocjacji wykazała powierzchnia boczna białka Hfq, która posiada powinowactwo zarówno do anty-sRNA AgvB jak i sRNA GcvB. Jak wykazały eksperymenty z udziałem sRNA ChiX, strona boczna Hfq jest niezbędna dla oddziaływania tego sRNA z klasy II zarówno z mRNA, jak i z anty-sRNA. Sugeruje to, że oddziaływanie AgvB z GcvB jest bardziej zbliżone do wiązania sRNA z klasy II (AgvB) z regulowanym mRNA, którego rolę odgrywa w tym przypadku sRNA GcvB.



**Rycina 31** Miejsce wiązania RNA na stronie bocznej białka Hfq uczestniczy w oddziaływaniu sRNA GcvB z anti-sRNA AgvB. **(A)** Autoradiogramy przedstawiające żele natywne użyte do monitorowania asocjacji 1 nM  $^{32}\text{P}$ -GcvB z 10 nM AgvB przy nieobecności Hfq lub w obecności naturalnego Hfq oraz jego mutantów. Wolne  $^{32}\text{P}$ -GcvB oznaczono jako \*G, AgvB jako A oraz Hfq jako H. Kombinacje tych liter odnoszą się do kompleksów tworzonych przez RNA oraz Hfq. **(B)** Oddziaływanie  $^{32}\text{P}$ -GcvB z AgvB było najbardziej osłabione dla wariantu białka Hfq z mutacją R16A znajdującą się na powierzchni bocznej. **(C)** Autoradiogramy przedstawiające żele natywne zastosowane do monitorowania asocjacji 1 nM  $^{32}\text{P}$ -AgvB z 10 nM GcvB przy nieobecności Hfq lub w obecności naturalnego Hfq. Wolne  $^{32}\text{P}$ -AgvB oznaczono jako \*A, GcvB jako G oraz Hfq jako H.

Kombinacje tych liter odnoszą się do kompleksów tworzonych przez RNA oraz Hfq. **(D)** Hfq przyspiesza asocjację <sup>32</sup>P-AgvB z GcvB.

Podsumowując, w oddziaływaniu sRNA ChiX z anty-sRNA *chbBC*-IGR białko Hfq wiąże oba RNA w podobny sposób, jak podczas asocjacji ChiX z mRNA *chiP*, gdyż w obu przypadkach strony boczna i proksymalna wykazywały największy wpływ na oddziaływania. Podobieństwo *chbBC*-IGR do mRNA *chiP* w sposobie wiązania z Hfq i ChiX może wynikać z tego, że oba RNA posiadają sekwencje bogate w reszty adenozyń i urydyn (Ryc. 32 A), które służą do rozpoznawania bocznej powierzchni białka Hfq. Z kolei mechanizm oddziaływania Hfq z sRNA RybB i anty-sRNA 3'ETS<sup>leuZ</sup> jest zbliżony do stosowanego podczas asocjacji RybB z mRNA *tsx*. Może to wynikać z podobieństwa sekwencji 3'ETS<sup>leuZ</sup> i *tsx*, gdyż posiadają one regiony bogate w reszty adenozyń, zgodne z sekwencją motywu ARN, które służą do oddziaływania z miejscem wiązania RNA na powierzchni dystalnej białka Hfq (Ryc. 32 B). Dla wiązania anty-sRNA AgvB z sRNA GcvB największe znaczenie wykazała strona boczna Hfq, stąd sposób oddziaływania Hfq z AgvB i GcvB jest podobny do mechanizmu działania Hfq w wiązaniu sRNA z klasy II do komplementarnych mRNA. AgvB posiada sekwencje bogate w reszty adenozyń, które oddziałują ze stroną dystalną Hfq tak jak sRNA z klasy II, z kolei GcvB zawiera znajdujące się wewnątrz cząsteczki sekwencje bogate w urydyny, które są rozpoznawane przez stronę boczną Hfq, tak jak sekwencje znajdujące się w mRNA regulowanych przez sRNA z klasy II.

## 9. DYSKUSJA

### 9.1 Znaczenie sekwencji mRNA w oddziaływaniach z sRNA

#### 9.1.1 Rola sekwencji mRNA w stabilizowaniu kompleksu sRNA-mRNA

Analiza efektu wywołanego zmianą reszty nukleotydowej w pozycji 3' względem miejsca wiązania sRNA w sekwencji mRNA na stabilność termodynamiczną krótkich dupleksów RNA wykazała, że dla większości badanych oddziaływań reszta nukleotydowa występująca naturalnie w tej pozycji najbardziej stabilizowała dupleks (Tab. 1). W przypadku dupleksów RybB-*ompC* oraz RybB-*tsx* była to adenozyzna, a dla RybB-*ompW* guanozyzna (w analizach pominięto *ompW(C)*, ponieważ tworzy ono dimer, co uniemożliwia poprawną interpretację danych). Jednak różnice w stabilności poszczególnych krótkich dupleksów odpowiadających miejscu oddziaływania RybB z regulowanymi mRNA były niewielkie, często w zakresie błędu. Prawdopodobnie jest to związane z tym, że dodanie 5 niesparowanych nukleotydów od strony 3' dupleksu osłabiło efekt niesparowanej reszty nukleotydowej występującej zaraz po regionie komplementarnym. Wcześniejsze badania modelowych dupleksów RNA, które wykazały że niesparowana puryna w pozycji 3' stabilizuje dupleks RNA-RNA, były wykonane dla dupleksów z tylko jedną niesparowaną resztą nukleotydową (Freier i wsp., 1986). Wyniki tych analiz wskazują, że reszty adenozy i guanozy w pozycji 3' powodują zwiększoną wartość  $\Delta G_{37}^{\circ}$  dupleksu o -1,7 kcal/mol, podczas gdy reszty urydyn o -1,2 kcal/mol, a cytydyn o -0,8 kcal/mol. Analizy kinetyki wiązania krótkich dupleksów RNA badanych w tej pracy wskazują, że różnią się one wartością obserwowanej szybkości asocjacji i różnice w tej wartości są skorelowane z odmienną stabilnością termodynamiczną dupleksów (nieopublikowane dane). Dlatego, aby wyeliminować efekt pozostałych niesparowanych reszt nukleotydowych na powstawanie komplementarnego dupleksu należałoby przetestować krótkie oligonukleotydy RNA odpowiadające fragmentom mRNA posiadającym wyłącznie jedną niesparowaną resztę nukleotydową od strony 3'.

Stabilność termodynamiczna kompleksów tworzonych przez naturalną cząsteczkę sRNA RybB z fragmentami mRNA nie mogła być analizowana techniką topnienia w świetle UV, ponieważ zawierają one zróżnicowane struktury

drugorzędowe o różnych temperaturach topnienia, co powoduje, że wykres zależności  $T_M$  od absorbancji nie jest dwufazowy jak w przypadku krótkich RNA i utrudnia interpretację wyników. Aby sprawdzić poprawność stosowania metody różnicowej migracji w żelu poliakrylamidowym do badań stabilności termodynamicznej, wykonano eksperyment  $K_d$  dla krótkich dupleksów RNA w stężeniu soli oraz temperaturze używanej w technice topnienia UV (nieopublikowane dane). Wartości  $\Delta G_{37}^{\circ}$  uzyskane po przeliczeniu z  $K_d$  były zbliżone do uzyskanych metodą topnienia UV. Dlatego do badań stabilności termodynamicznej długich kompleksów RNA-RNA stosowano technikę EMSA. Analiza oddziaływań fragmentów mRNA z naturalnym sRNA RybB *Salmonelli* wykazała, że w większości przypadków reszty purynowe w pozycji 3' względem miejsca wiązania sRNA w sekwencji mRNA powodują większą stabilizację badanych kompleksów niż reszty pirymidynowe w tej pozycji (Tab. 2, Ryc. 14). W pracy dotyczącej badania oddziaływań sRNA Spot42 z naturalnymi oraz syntetycznymi komplementarnymi mRNA wykazano, że 9 na 12 mRNA regulowanych przez Spot42 posiadało resztę adenozyiny w pozycji 3' względem miejsca wiązania Spot42 w mRNA (Beisel i wsp., 2012). Co więcej, ewolucyjnie konserwatywna reszta adenozyiny występuje także od strony 3' kompleksu mikroRNA z mRNA, co wskazuje na rolę tej reszty nukleotydydowej w stabilizacji oddziaływań RNA-RNA u eukariontów (Lewis i wsp., 2005)

Dla niektórych długich fragmentów mRNA efekt mutacji reszty nukleotydydowej w pozycji 3' na stabilność termodynamiczną był odmienny od spodziewanego, np. kompleks RybB z *tsx* posiadającym resztę urydyny był bardziej stabilny niż z resztą guanozyiny. Może to być związane z rearanżacją struktury mRNA po wprowadzeniu mutacji. Miejsca wiązania sRNA w mRNA znajdują się zazwyczaj w regionach jednoniciowych, dostępnych dla oddziaływania z sRNA (Peer i Margalit, 2011, Richter i Backofen, 2012), przez co wprowadzenie mutacji w pozycji 3' względem miejsca wiązania sRNA w mRNA może powodować zmiany struktury tych regionów. Eksperyment typu „footprint” dla oddziaływania RybB z mRNA *ompC* wykazał, że obecność puryn w pozycji 3' mRNA *ompC* powodowała silniejsze wiązanie takiego kompleksu (Ryc. 21).

Analiza translacji mRNA *ompC:gfp in vitro* w ekstrakcie S30 wykazała, że warianty mRNA, które tworzyły bardziej stabilny kompleks z RybB,

charakteryzowały się także wydajniejszą represją translacji w obecności tego sRNA. Wcześniejsze badania oddziaływań sRNA z mRNA sugerują, że stabilność termodynamiczna kompleksu sRNA-mRNA jest skorelowana z wydajnością represji translacji. Jednym z przykładów jest negatywna regulacja poziomu mRNA *sodB* przez sRNA RyhB (Geissmann i Touati, 2004). Analiza właściwości kompleksów RNA-RNA posiadających komplementarne mutacje w miejscu oddziaływania wykazała, że charakteryzują się one różną stabilnością termodynamiczną, która jest liniowo skorelowana z wydajnością represji translacji (Hao i wsp., 2011). Z kolei badanie regulacji pozytywnej mRNA *rpoS* przez sRNA DsrA, ArcZ i RprA wskazuje, że energia wiązania dla kompleksu sRNA-*rpoS* przy nieobecności Hfq może służyć do przewidywania wpływu danego sRNA na regulację translacji mRNA (Soper i wsp., 2010). Wyniki innych eksperymentów sugerują, że dla wydajnej regulacji translacji niezbędne jest uzyskanie minimalnej energii oddziaływania sRNA z mRNA. Takie wnioski wysnuto na podstawie analizy biblioteki mutantów antysensownego, zależnego od RNA systemu kontroli translacji (RNA-IN/OUT), w którym sRNA jest kodowane *cis*. W eksperymentach tych wykazano, że dla wydajnej regulacji translacji niezbędna jest energia tworzenia kompleksu RNA-RNA o wartości niższej od -46 kcal/mol. (Mutalik i wsp., 2012). Co więcej, analiza biblioteki sztucznych sRNA, które zostały zaprojektowane tak, aby oddziaływać z mRNA trzech białek fluorescencyjnych wykazała, że minimalna energia wiązania sRNA z mRNA wynosząca -30 do -40 kcal/mol prowadzi do wydajnej represji translacji (Hoynes-O'Connor i Moon, 2016). Do podobnych wniosków doszła grupa dr Lee, która testowała zależność między wydajnością hamowania translacji mRNA białka fluoryzującego DSRed2 (Na i wsp., 2013). Z kolei analiza oddziaływań sRNA Spot42 z *E. coli* z regulowanymi przez niego mRNA wykazała, że nie ma bezpośredniej zależności pomiędzy stabilnością termodynamiczną tworzonego kompleksu RNA-RNA a wydajnością regulacji translacji. Jedynie wydłużenie regionu oddziaływania sRNA z mRNA lub dodanie dodatkowych miejsc wiązania Hfq skutkowało zwiększeniem efektu sRNA na regulowane mRNA (Beisel i wsp., 2012). Ciekawym przykładem jest oddziaływanie sRNA SgrS z mRNA *sopD*. Kompleks RNA-RNA tworzony pomiędzy nimi różni się jednym wiązaniem wodorowym od kompleksu SgrS z mRNA *sopD2*, które nie ulega regulacji pod wpływem SgrS. Zmutowane miejsca

oddziaływania o zwiększonej stabilności termodynamicznej nie wykazywały zwiększonej wydajności regulacji. Jedynie lokalizacja pary zasad G-U w określonym miejscu kompleksu sRNA-mRNA powodowała, że dane mRNA ulegało represji zależnej od SgrS (Papenfort i wsp., 2012).

Podsumowując, dane literaturowe wskazują, że nie jest do końca jasne, w jaki sposób stabilność termodynamiczna kompleksu sRNA-mRNA wpływa na regulację translacji mRNA. Dane uzyskane w ramach niniejszej pracy pozwalają określić, że dla oddziaływań sRNA RybB z regulowanymi przez niego mRNA, stabilność termodynamiczna kompleksu sRNA-mRNA wynika z kinetyki jego asocjacji. Analiza wydajności represji translacji mRNA *ompC* przy udziale sRNA RybB wskazuje, że najbardziej stabilne kompleksy RybB-*ompC* posiadające purynę w pozycji 3' od miejsca wiązania RybB cechowały się efektywniejszą represją translacji.

### **9.1.2 Znaczenie sekwencji mRNA w przyspieszaniu asocjacji sRNA do mRNA**

Analiza obserwowanej szybkości asocjacji RybB z mRNA z różnymi resztami nukleotydowymi w pozycji 3' wykazała, że kompleksy RybB-mRNA odznaczające się większą stabilnością termodynamiczną charakteryzowały się także przyspieszoną asocjacją (Tab. 2, Ryc. 16). Aby ustalić zależność między termodynamiką a kinetyką oddziaływań sRNA z mRNA, wyznaczono stałą szybkość asocjacji ( $k_{on}$ ) kompleksu RybB-*ompC* (Ryc. 17). W badaniach zastosowano naturalnie występujący fragment mRNA *ompC* oraz jego warianty z mutacją reszty nukleotydowej w pozycji 3' względem miejsca wiązania RybB. Wyznaczona wartość  $k_{on}$  była najwyższa dla *ompC* z resztami guanozyny oraz adenozy, które w eksperymencie  $K_d$  charakteryzowały się najwyższą stabilnością. Na podstawie wartości  $k_{on}$  i  $K_d$  obliczono wartość stałej szybkości dysocjacji ( $k_{off}$ ), która była zbliżona dla wszystkich wariantów *ompC*. Wyniki te sugerują, że różnice w stabilności termodynamicznej kompleksów RybB-mRNA wynikają z różnic w kinetyce ich asocjacji, a nie dysocjacji. Podsumowując, zachowane ewolucyjnie reszty purynowe w pozycji 3' względem miejsca wiązania sRNA w mRNA powodują zwiększoną szybkość asocjacji z regulowanymi mRNA w porównaniu do reszt pirymidynowych w tej pozycji. Jest to szczególnie ważne dla

komórki bakteryjnej, w której powstawanie kompleksu sRNA z mRNA umożliwia niemalże natychmiastową regulację poziomu mRNA w odpowiedzi na gwałtownie zmieniające się warunki środowiska.

Istnieją przykłady badań, w których sprawdzano wpływ szybkości asocjacji sRNA z mRNA na regulację translacji. Analiza pozytywnej regulacji translacji mRNA *rpoS* przez sRNA *in vitro* (Soper i wsp., 2010) wykazała, że szybkość asocjacji kompleksów sRNA-*rpoS* podczas nieobecności Hfq była zbliżona, podczas gdy oddziaływanie DsrA-*rpoS* charakteryzowało się wyższą stabilnością termodynamiczną od pozostałych. Jednak analiza interakcji sRNA-*rpoS* nie może być bezpośrednio porównywana do wyników uzyskanych w niniejszej pracy, ponieważ mechanizm oddziaływania sRNA z *rpoS* jest odmienny – powodują one rearanżację struktury mRNA, co prowadzi do regulacji pozytywnej. Poza tym badano oddziaływanie naturalnych sRNA i mRNA, a niniejsza praca dotyczy analizy wpływu mutacji w sekwencji mRNA na oddziaływanie z sRNA. Innym przykładem jest analiza biblioteki mutantów antysensownego, zależnego od RNA systemu kontroli translacji (RNA-IN/OUT), w którym sRNA jest kodowane *cis*. Wykazała ona, że wydajność represji translacji zależy od zainicjowania oddziaływania w 5-nukleotydowym regionie komplementarnym, co prowadzi do parowania pozostałych zasad kompleksu RNA-RNA (Mutalik i wsp., 2012). Z kolei badania *in vivo* dotyczące interakcji sRNA SgrS z regulowanymi mRNA wykazały, że oddziaływania o różnym znaczeniu dla komórki charakteryzują się odmienną szybkością asocjacji. Zespół dr Ha udowodnił, że sRNA SgrS oddziałuje z mRNA *ptsG* szybciej i z większą stabilnością termodynamiczną, niż z mRNA *manXYZ* (Fei i wsp., 2015). Wyniki te są zgodne z obserwacją, że oddziaływanie SgrS z *ptsG* ma dla komórki większy priorytet niż z *manXYZ*, ponieważ regulacja poziomu *ptsG* jest absolutnie niezbędna w większości warunków stresowych dla niezahamowanego wzrostu bakterii (Sun i Vanderpool, 2013). Przykład oddziaływania SgrS z mRNA potwierdza, że różnice w stabilności poszczególnych kompleksów sRNA-mRNA są skorelowane z ich szybkością asocjacji.

### 9.1.3 Udział białka Hfq w tworzeniu kompleksu sRNA z mRNA

Wyznaczenie obserwowanych szybkości asocjacji sRNA RybB z badanymi cząsteczkami mRNA w obecności Hfq pozwoliło określić, że białko Hfq przyspiesza

asocjację RybB z regulowanymi mRNA oraz powoduje zmniejszenie różnic w wartościach  $k_{obs}$  dla poszczególnych par oddziaływań w porównaniu do sytuacji w nieobecności Hfq (Tab. 3, Ryc. 19-21). Jednak znaczenie białka Hfq w zmniejszaniu różnic w wydajności represji translacji naturalnego i zmutowanych wariantów mRNA *ompC:gfp in vitro* nie było aż tak istotne, co może wynikać z faktu zastosowania innych stężeń cząsteczek RNA w obu metodach. Translacja wymaga użycia 5000-krotnie wyższego stężenia cząsteczek mRNA w porównaniu do eksperymentów ze znakowanym mRNA, co wynika z różnicy w sposobie detekcji. Ponadto dla eksperymentów translacji *in vitro* niemożliwe było zastosowanie takiego samego stosunku stężeniowego RybB do *ompC* jak w analizach ze znakowanym mRNA, ponieważ powodowałyby to całkowite zahamowanie translacji, przez co nie można by było określić wydajności represji.

Wcześniejsze badania dowodzą, że Hfq przyspiesza powstawanie kompleksów sRNA-mRNA (Wroblewska i Olejniczak, 2016), co jest spójne z wynikami uzyskanymi w niniejszej pracy. W badanych warunkach Hfq powodowało zwiększenie wartości  $k_{obs}$  nawet 1000-krotnie. Co więcej, różnice w szybkości asocjacji sRNA RybB do cząsteczek mRNA z różnymi resztami nukleotydowymi w pozycji 3' względem miejsca wiązania sRNA były zmniejszone w obecności Hfq. Może to być związane z rearanżacją struktury mRNA przez Hfq, przez co jest ona dostępna dla oddziaływania z sRNA. Jak wykazano dla mRNA *ompD*, Hfq oddziałując z mRNA zmienia jego strukturę w sposób, który umożliwia wydajną asocjację sRNA RybB z sekwencją kodującą w mRNA *ompD* (Wroblewska i Olejniczak, 2016). Do podobnej sytuacji dochodzi w przypadku negatywnej regulacji mRNA *sodB* przez sRNA RyhB (Geissmann i Touati, 2004). Hfq oddziałując z *sodB* powoduje otwarcie struktury spinki, w której znajduje się region odpowiedzialny za komplementarne parowanie z RyhB, co umożliwia regulację translacji. Inne badania wskazują, że Hfq może powodować zwiększenie stabilności termodynamicznej kompleksów sRNA-*rpoS* (Soper i wsp., 2010). To z kolei prowadzi do wyrównania poziomu aktywacji translacji przez sRNA o niższej stabilności kompleksu sRNA-*rpoS* w obecności białka Hfq. Mechanizm tego oddziaływania jest najprawdopodobniej także związany ze zmianą struktury mRNA przez białko Hfq. Analizy z użyciem technik SAXS oraz SHAPE wykazały, że strona boczna Hfq *E. coli* wiąże motyw U<sub>5</sub>, a strona dystalna motyw (A-A-N)<sub>n</sub> w

mRNA *rpoS*. Skutkuje to zmianą konformacji trzeciorzędowej mRNA do bardziej kompaktowej, w której region komplementarny do sRNA jest pozycjonowany w pobliżu strony proksymalnej, do której wiąże się sRNA (Peng i wsp., 2014). Co więcej, analiza struktury krystalicznej sRNA RydC w kompleksie z białkiem Hfq wykazała, że strona boczna białka Hfq jest zaangażowana w powstawanie kompleksu RydC z regulowanym przez niego mRNA *cfa* (Dimastrogiovanni i wsp., 2014). Wyniki te potwierdzają model, w którym rolą Hfq jest umiejscowienie cząsteczek RNA względem siebie w taki sposób, aby sprzyjać tworzeniu się komplementarnego oddziaływania.

Podsumowując, wyniki uzyskane w niniejszej pracy sugerują, że białko Hfq może powodować stabilizację struktury cząsteczek mRNA co zmniejsza różnice w kinetyce ich asocjacji do sRNA RybB. Z kolei eksperymenty w nieobecności Hfq wykazały rolę reszty nukleotydowej w pozycji 3' względem miejsca wiązania sRNA w mRNA dla stabilizacji oddziaływań sRNA RybB z regulowanymi mRNA oraz w zwiększaniu szybkości asocjacji RybB do cząsteczek mRNA. Co więcej, obecność reszt purynowych w pozycji 3' mRNA *ompC* w fuzji z mRNA *gfp* powodowała wydajniejszą represję translacji tych mRNA w obecności RybB. Uzyskane dane mogą sugerować, że zachowana konserwatywnie adenozyzna w sąsiedztwie miejsca wiązania RybB w sekwencji mRNA wspomaga oddziaływanie RybB z cząsteczkami mRNA podczas braku dostępności białka Hfq w komórce bakteryjnej. Pozwala to na szybkie przystosowywanie metabolizmu komórki w odpowiedzi na gwałtownie zmieniające się warunki środowiska.

## 9.2 Występowanie podobnych motywów sekwencji w cząsteczkach anty-sRNA i mRNA jest ważne dla zależnych od Hfq oddziaływań z regulatorowymi sRNA

### 9.2.1 Znaczenie struktury anty-sRNA i sRNA dla ich oddziaływań

Struktura sRNA kodowanych *trans* jest bardzo różnorodna, ale posiada wspólne cechy (Ryc. 4). sRNA tworzą zazwyczaj kilka spinek rozdzielonych regionami jednoniciowymi. W sRNA klasy I regiony te często zawierają sekwencje bogate w reszty adenozyń i urydyn, które są zaangażowane w oddziaływanie ze stroną boczną białka Hfq (Zhang i wsp., 2002). Z kolei sRNA z klasy II posiadają wewnątrz cząsteczek sekwencje bogate w reszty adenozyń służące do rozpoznawania strony dystalnej Hfq (Updegrave i wsp., 2008, Zhang i wsp., 2013, Ellis i wsp., 2015, Malecka i wsp., 2015, Schu i wsp., 2015, Wang i wsp., 2015). Na końcu 3' znajduje się charakterystyczna, niezależna od Rho spinka terminatorowa oraz jednoniciowy region bogaty w reszty urydyn od strony 3', który oddziałuje ze stroną proksymalną Hfq (Otaka i wsp., 2011, Ishikawa i wsp., 2012, Holmqvist i wsp., 2016). Większość sRNA posiada region konserwatywny, odpowiedzialny za komplementarne parowanie z regulowanymi mRNA (Balbontin i wsp., 2010, Papenfort i wsp., 2010). sRNA różnią się długością oraz sekwencją regionów jednoniciowych, a także ilością spinek.

Struktury dwóch sRNA, których oddziaływania z anty-sRNA były badane w niniejszej pracy zostały wcześniej określone eksperymentalnie. sRNA RybB posiada długi region jednoniciowy zawierający sekwencję komplementarną do regulowanych mRNA na końcu 5' oraz spinkę terminową na końcu 3', po której następuje sekwencja oligo(U) odpowiedzialna za oddziaływanie z Hfq (Balbontin i wsp., 2010). Miejsce wiązania anty-sRNA 3'ETS<sup>leuZ</sup> znajduje się w obrębie dostępnej dla wiązania sekwencji jednoniciowej służącej również do rozpoznawania komplementarnych mRNA przez RybB (Lalaouna i wsp., 2015a). Z kolei sRNA ChiX tworzy dwie struktury spinki, jedna znajduje się w regionie od strony 5', a druga na końcu 3' (Rasmussen i wsp., 2009). Za drugą spinką ulokowana jest jednoniciowa sekwencja oligo(U) odpowiedzialna za oddziaływanie z Hfq. Region komplementarny do anty-sRNA *chbBC*-IGR znajduje się w dostępnej dla wiązania sekwencji jednoniciowej, która służy także do

oddziaływania z mRNA *chiP*. Struktura drugorzędowa sRNA GcvB została wyznaczona w niniejszej pracy (Ryc. 25). GcvB tworzy 5 spinek, z których znajdująca się na końcu 3' przypomina niezależne od Rho spinki terminatorowe występujące w strukturach innych sRNA. Za spinką następuje sekwencja bogata w reszty urydyn na końcu 3', która jest najprawdopodobniej odpowiedzialna za oddziaływanie ze strona proksymalną Hfq. Sekwencja komplementarna do anty-sRNA AgvB jest ulokowana częściowo w regionie jednoniciowym, a także obejmuje drugą spinkę, która wykazuje niską stabilność termodynamiczną, ponieważ zawiera tylko jedną parę zasad G-C, co sugeruje, że może ona ulegać rozpleceniu przez oddziaływanie z anty-sRNA. AgvB oddziałuje z sekwencją sRNA GcvB, która służy do komplementarnego wiązania mRNA regulowanych przez to sRNA.

W niniejszej pracy analizowano także struktury drugorzędowe anty-sRNA. Wykazano, że zarówno 3'ETS<sup>leuZ</sup> jak i AgvB tworzą struktury charakterystyczne dla sRNA. Struktura drugorzędowa 3'ETS<sup>leuZ</sup> zawiera dwie spinki: jedną w regionie znajdującym się od strony 5', a drugą na końcu 3', po której następuje sekwencja oligo(U). Jednak sekwencja bogata w reszty urydyn częściowo jest ulokowana w trzonie spinki, przez co prawdopodobnie nie jest dostępna dla oddziaływania z Hfq. Region komplementarny do RybB znajduje się w większości w sekwencji jednoniciowej, co prawdopodobnie umożliwia wydajne oddziaływanie z regulowanym sRNA. Z kolei anty-sRNA AgvB posiada długi region jednoniciowy od strony 5' oraz spinkę terminatorową na końcu 3' zakończoną jednoniciową sekwencją oligo(U), przez co przypomina swoją strukturą inne sRNA np. ChiX. Ponadto region odpowiedzialny za komplementarne oddziaływanie z GcvB znajduje się w sekwencji jednoniciowej, co pozwala na wydajne powstawanie kompleksu AgvB z GcvB. Podobieństwo struktur anty-sRNA AgvB oraz 3'ETS<sup>leuZ</sup> do sRNA prawdopodobnie jest związane z biogenezą tych RNA, która jest zbliżona do mechanizmów powstawania sRNA. 3'ETS<sup>leuZ</sup> powstaje w wyniku hydrolizy dłuższego transkryptu prekursora tRNA RNazą E (Lalaouna i wsp., 2015a). Mechanizm ten przypomina powstawanie sRNA z regionu 3'UTR np. sRNA CpxQ, który jest generowany przez trawienie RNazą E sekwencji 3'UTR mRNA *cpxP* (Chao i Vogel, 2016). Z kolei AgvB ulega ekspresji z niezależnego genu *agvb* kodowanego w patogennym szczepie *E. coli*. Większość *trans*-kodowanych sRNA także powstaje z niezależnych genów, których transkrypcja jest ściśle

kontrolowana. Analiza struktury anty-sRNA *chbBC-IGR* wykazała, że cząsteczka ta nie tworzy stabilnych struktur drugorzędowych z powodu niskiej zawartości reszt guanozyn i cytydyn. Wynika to z pochodzenia sekwencji tego anty-sRNA, ponieważ znajduje się ona w regionie międzygenowym operonu *chbBCARFG* i nie występuje jako niezależny fragment RNA w komórce. Na końcu 3' *chbBC-IGR* tworzy niewielką strukturę spinki o niskiej stabilności, która nie przypomina spinki terminatorowej i nie jest zakończona sekwencją bogatą w reszty urydyn. Region komplementarnego oddziaływania z sRNA ChiX znajduje się w centralnej części cząsteczki, co umożliwi wydajne powstawanie kompleksu z ChiX.

Podsumowując, sekwencje odpowiedzialne za oddziaływanie anty-sRNA z sRNA znajdują się w tych cząsteczkach w regionach jednoniciowych, dostępnych dla wiązania. Co więcej, badane anty-sRNA wiążą się z sekwencjami w sRNA wykorzystywanymi do oddziaływania z regulowanymi mRNA, przez co cząsteczki anty-sRNA i mRNA konkurują o wiązanie z sRNA. Może to wskazywać na podobny mechanizm oddziaływania sRNA z anty-sRNA i z mRNA.

### 9.2.2 Podobne motywy w sekwencjach anty-sRNA i mRNA

Białko opiekuńcze Hfq posiada trzy powierzchnie specyficznie wiążące określone sekwencje RNA, co opisano w podrozdziale 4.2.1. Co więcej wykazano, że miejsca wiązania RNA na różnych stronach białka Hfq mogą brać udział w wiązaniu poszczególnych par sRNA-mRNA, co stanowi podstawę do podziału sRNA na dwie klasy (Schu i wsp., 2015), co zostało opisane w podrozdziale 4.2.1.

W niniejszej pracy opisano podobieństwo zależnego od białka Hfq oddziaływania sRNA klasy II ChiX z *chbBC-IGR* oraz z mRNA *chiP*. Podobieństwo to może wynikać z występowania zarówno w anty-sRNA, jak i w mRNA sekwencji bogatych w reszty adenozyń i urydyn (Ryc. 32 A), które służą do rozpoznawania powierzchni bocznej białka Hfq (Ishikawa i wsp., 2012, Murina i wsp., 2013, Panja i wsp., 2013, Dimastrogiovanni i wsp., 2014, Malecka i wsp., 2015, Schu i wsp., 2015). Sekwencje zawierające regiony bogate w adenozyń i urydyny występują także w cząsteczkach mRNA *eptB* i *ygdQ* regulowanych przez sRNA z klasy II MgrR. Wprowadzenie mutacji do tych sekwencji w cząsteczkach mRNA powodowało pogorszenie asocjacji z sRNA MgrR (Mazur J., nieopublikowane dane), co podkreśla ich znaczenie dla oddziaływania. Co więcej, sekwencje służące do



Ellis i wsp., 2015, Malecka i wsp., 2015, Schu i wsp., 2015, Wang i wsp., 2015). Badane w niniejszej pracy mRNA regulowane przez sRNA RybB u *Salmonelli* również zawierają sekwencje bogate w reszty adenozyń służące potencjalnie do oddziaływania ze miejscem wiązania RNA na powierzchni dystalnej Hfq (Ryc. 13). Co więcej, wykazano, że mRNA *ompD* regulowane przez sRNA RybB u *Salmonelli* także posiadają regiony bogate w reszty adenozyń. Wprowadzenie mutacji w tych sekwencjach powodowało osłabienie oddziaływania RybB z *ompD* w obecności białka Hfq (Wroblewska i Olejniczak, 2016). Ponadto sekwencje służące do oddziaływania sRNA RybB z regulowanym mRNA *tsx* są rozpoznawane przez anty-sRNA 3'ETS<sup>leuZ</sup>, co podkreśla podobieństwo w sposobie oddziaływania sRNA RybB z anty-sRNA oraz z mRNA.

### 9.2.3 Rola białka Hfq w oddziaływaniu sRNA z anty-sRNA oraz z mRNA

Wcześniejsze badania wykazały, że miejsca wiązania RNA na różnych powierzchniach białka Hfq mogą brać udział w wiązaniu poszczególnych par sRNA-mRNA, co stanowi podstawę do podziału sRNA na dwie klasy (Schu i wsp., 2015) i zostało opisane w podrozdziale 4.2.1. ChiX zostało przyporządkowane do niekanonicznej klasy II sRNA, gdyż oddziałuje z powierzchnią proksymalną i dystalną białka Hfq. W niniejszej pracy analizowano zdolność anty-sRNA *chbBC-IGR* do kompetycji o wiązanie do miejsc oddziaływania z RNA na powierzchni Hfq z oligorybonukleotydami. Dane wskazują, że *chbBC-IGR* ma niewielką zdolność do wypierania A<sub>27</sub> ze strony dystalnej Hfq i nie konkuruje z U<sub>18</sub> o oddziaływanie z powierzchnią proksymalną (Tab. 3). Jest to spójne z analizą powinowactwa *chbBC-IGR* do białka Hfq ze zmutowanym aminokwasem po stronie bocznej, które charakteryzowało się wyższą wartością  $K_d$ , niż w przypadku naturalnego białka. Z kolei wydłużenie sekwencji oligo(U) *chbBC-IGR* na końcu 3', umożliwiło oddziaływanie ze stroną proksymalną i zniwelowało negatywny efekt mutacji strony bocznej na wiązanie anty-sRNA przez Hfq (Małecka-Grajek, 2017). *chbBC-IGR* zachowuje się więc jak mRNA regulowane przez sRNA z klasy II, gdyż wykazuje oddziaływanie z miejscem wiązania RNA na stronie bocznej Hfq. Analiza wiązania anty-sRNA *chbBC-IGR* z sRNA ChiX wykazała, że do asocjacji tych RNA przy udziale Hfq niezbędne są powierzchnie boczna i proksymalna białka (Tab. 4, Ryc. 27 A). Mechanizm oddziaływania Hfq z ChiX i anty-sRNA jest więc podobny do

wiązania mRNA *chiP* przez ChiX, gdyż dla asocjacji tych RNA również strony boczna i proksymalna wykazywały największy wpływ na oddziaływanie (Tab. 4, Ryc. 28 A). Dla innego sRNA z klasy II – MgrR asocjacja z regulowanymi mRNA *in vitro* była także najbardziej zaburzona dla wariantu Hfq z mutacją strony bocznej (Mazur J., nieopublikowane dane). Podsumowując, wiązanie *chbBC*-IGR do ChiX jest klasycznym przykładem oddziaływania sRNA klasy II z komplementarnym RNA.

sRNA RybB należy do klasy I (Schu i wsp., 2015), gdyż oddziałuje ze stroną proksymalną i boczną Hfq (Sauer i Weichenrieder, 2011). Z kolei mRNA regulowane przez takie sRNA wiążą się do strony dystalnej za pomocą motywów bogatych w adenozyne. Analiza zdolności do kompetycji anty-sRNA 3'ETS<sup>leuZ</sup> regulującego RybB wobec oligorybonukleotydów specyficznie wiążących się z Hfq wykazała, że 3'ETS<sup>leuZ</sup> silnie oddziałuje z miejscem wiązania RNA na stronie dystalnej Hfq oraz w mniejszym stopniu na stronie proksymalnej. Jest to spójne z analizą stałej dysocjacji dla 3'ETS<sup>leuZ</sup> ze zmutowanymi wariantami białka Hfq, która dla naturalnie występującej cząsteczki nie wykazała osłabienia oddziaływania w przypadku żadnej z mutacji aminokwasów na powierzchni Hfq. Może być to związane z rekompensowaniem niedostępności jednej ze stron Hfq oddziaływaniem z drugą powierzchnią. Powinowactwo do strony proksymalnej Hfq, zostało potwierdzone przez analizę wiązania zmutowanego 3'ETS<sup>leuZ</sup> z usuniętą sekwencją oligo(U). Takie RNA charakteryzowało się słabszym wiązaniem do wersji Hfq z mutacją strony dystalnej, co podkreśla oddziaływanie tej powierzchni białka z 3'ETS<sup>leuZ</sup> (Małecka-Grajek, 2017). Analiza wiązania RybB z 3'ETS<sup>leuZ</sup> w obecności zmutowanych wariantów białka Hfq wykazała, że mutacja strony dystalnej Hfq najbardziej pogarszała asocjację anty-sRNA z sRNA (Tab. 4). Natomiast badanie oddziaływania sRNA RybB z mRNA *tsx* wskazało, że nie tylko strona dystalna, ale także proksymalna były niezbędne dla asocjacji RybB z *tsx*. Uzyskane wyniki sugerują, że mechanizm oddziaływania z Hfq sRNA klasy I RybB z anty-sRNA 3'ETS<sup>leuZ</sup> oraz z mRNA *tsx* jest zbliżony. Analiza efektów mutacji białka Hfq na asocjację RybB z *Salmonelli* z fragmentem mRNA *ompD* *in vitro* również wykazała, że szybkość wiązania komplementarnych RNA była zaburzona w obecności Hfq z mutacją powierzchni dystalnej (Wroblewska i Olejniczak, 2016). Co więcej, także strona proksymalna białka Hfq była niezbędna dla wydajnej

asocjacji RybB z *ompD*, tak jak w przypadku oddziaływania RybB z *E. coli* z mRNA *tsx* badanego w niniejszej pracy. Z kolei analizy *in vivo* kontroli translacji przy udziale sRNA z klasy I RyhB wskazały, że regulacja mRNA *sodB* była zaburzona dla szczepu z mutacją powierzchni bocznej białka Hfq (Schu i wsp., 2015). Podsumowując, oddziaływanie RybB z 3'ETS<sup>leuZ</sup> w obecności białka Hfq jest zbliżone do sposobu asocjacji sRNA z klasy I, do których należy RybB z komplementarnymi mRNA, ponieważ jest silnie zależne od miejsca wiązania RNA na powierzchni dystalnej Hfq.

Anty-sRNA AgvB zachowuje się jak sRNA z klasy II, ponieważ oddziałuje z powierzchnią dystalną i proksymalną białka Hfq, co zostało wykazane podczas analizy zdolności AgvB do kompetycji z oligorybonukleotydam A<sub>27</sub> i U<sub>18</sub> o wiązanie do Hfq (Tab. 3). Potwierdza to także fakt, że AgvB konkuruje o stronę dystalną białka Hfq z mRNA *dppA*, którego poziom jest regulowany przez GcvB (Tree i wsp., 2014). Z kolei sRNA GcvB wiąże się z Hfq w podobny sposób, co sRNA z klasy I, czyli ze stroną boczną i proksymalną białka. Jednak zdolność do kompetycji z oligorybonukleotydem specyficznym dla strony proksymalnej jest mniejsza niż dla typowego sRNA z klasy I RybB (Tab. 3). Oddziaływanie GcvB ze stroną boczną Hfq jest spójne z wynikami stałej dysocjacji GcvB dla wiązania ze zmutowanymi wariantami białka Hfq. sRNA GcvB wykazywał 30-krotnie mniejsze powinowactwo do Hfq z mutacją powierzchni bocznej niż do naturalnego białka. (Małecka-Grajek, 2017). Analiza szybkości asocjacji AgvB z GcvB wskazała, że dostępność strony bocznej Hfq ma największe znaczenie dla powstawania kompleksu anty-sRNA z sRNA. Sytuacja ta jest więc zbliżona do sposobu działania białka Hfq w asocjacji sRNA z klasy II z regulowanymi przez nie mRNA. W tym przypadku rolę sRNA z klasy II pełni AgvB, a rolę mRNA pełni sRNA GcvB.

Podsumowując, zależne od Hfq oddziaływania cząsteczek sRNA z klasy I i II z anty-sRNA są zbliżone do ich wiązania z regulowanymi mRNA. Wynika to z podobieństwa sekwencji anty-sRNA do mRNA, gdyż oddziałują one z tymi samymi regionami w cząsteczkach sRNA. Co więcej, anty-sRNA i mRNA wiążące się do danej cząsteczki sRNA wykorzystują te same miejsca wiązania RNA na powierzchni białka Hfq. Co ciekawe, porównanie szybkości asocjacji anty-sRNA z sRNA do oddziaływania sRNA z mRNA wskazuje, że anty-sRNA wiążą się w obecności

naturalnego białka Hfq do sRNA szybciej niż sRNA do mRNA. Najprawdopodobniej wynika to z roli anty-sRNA w hamowaniu aktywności sRNA.

## 10. WNIOSKI

### Rola sekwencji mRNA w oddziaływaniach z sRNA RybB

- Dowiedziono, że obecność reszty purynowej w pozycji 3' względem miejsca wiązania sRNA w mRNA stabilizuje zarówno krótkie duplekisy RNA odpowiadające miejscom oddziaływania sRNA RybB z mRNA *ompC*, *tsx* i *ompW*, jak i kompleksy tworzone przez naturalną cząsteczkę sRNA RybB z fragmentami mRNA *ompC*, *tsx*, *ompW*, *ompS* i *ompA*. Zostało to potwierdzone przez analizę struktury mRNA *ompC* związanego z RybB.
- Ustalono, że rodzaj reszty nukleotydowej w pozycji 3' względem miejsca wiązania sRNA w mRNA wpływa na szybkość asocjacji sRNA RybB do mRNA.
- Określono, że obecność białka Hfq zmniejsza znaczenie sekwencji mRNA sąsiadującej z miejscem wiązania sRNA dla ich oddziaływań.
- Wskazano, że warianty mRNA *ompC* posiadające resztę purynową w pozycji 3' względem miejsca wiązania sRNA RybB ulegają bardziej wydajnej represji translacji zależnej od RybB.

Wyniki niniejszej pracy stanowią wkład w poznanie powiązań między sekwencją i strukturą mRNA, a sposobem oddziaływania sRNA bakterii z regulowanymi mRNA. Zaproponowano, że ewolucyjna preferencja reszt purynowych w sekwencji mRNA w miejscu oddziaływania z sRNA umożliwia wydajną interakcję obu RNA, co prowadzi do efektywnej represji translacji mRNA.

### Udział białka opiekuńczego Hfq w oddziaływaniach pomiędzy regulatorowymi sRNA a cząsteczkami anti-sRNA oraz cząsteczkami mRNA

- Ustalono, że struktury anti-sRNA AgvB oraz 3'ETS<sup>leuZ</sup> przypominają te tworzone przez sRNA, ponieważ zawierają spinę terminatorową na końcu 3', za którą następuje sekwencja oligo(U), podczas gdy struktura anti-sRNA *chbBC*-IGR nie zawiera stabilnych struktur drugorzędowych.
- Wskazano, że sekwencje odpowiedzialne za oddziaływanie z komplementarnymi RNA w strukturach anti-sRNA AgvB, 3'ETS<sup>leuZ</sup> i *chbBC*-IGR oraz sRNA GcvB są zlokalizowane w dostępnych dla wiązania regionach jednoniciowych.

- Wykazano, że sekwencje odpowiedzialne za wiązanie Hfq w cząsteczkach anty-sRNA i mRNA komplementarnych do tej samej cząsteczki sRNA zawierają podobne motywy, co może wyjaśniać podobieństwo w ich oddziaływaniach z Hfq.
- Dowiedziono, że zarówno oddziaływania sRNA klasy II ChiX z anty-sRNA *chbBC*-IGR, jak i z mRNA *chiP* wymagają dostępności stron bocznej i dystalnej Hfq, co wskazuje na podobny mechanizm udziału Hfq w tworzeniu kompleksu ChiX z anty-sRNA i z mRNA.
- Ustalono, że oddziaływanie sRNA klasy I RybB z anty-sRNA 3'ETS<sup>leuZ</sup> w podobny sposób zależą od interakcji z białkiem Hfq jak oddziaływanie tego sRNA z mRNA *tsx*, ponieważ w obu przypadkach niezbędna jest dostępność strony dystalnej Hfq.
- Wskazano, że sposób oddziaływania anty-sRNA AgvB z sRNA GcvB w kompleksie z Hfq jest podobny do wiązania sRNA klasy II z regulowanym mRNA, w którym rolę sRNA pełni AgvB, a GcvB zachowuje się jak mRNA.
- Anty-sRNA 3'ETS<sup>leuZ</sup> oraz *chbBC*-IGR szybciej wiążą się z sRNA niż sRNA z mRNA w obecności białka Hfq, co jest spójne z ich rolą biologiczną w zmniejszaniu poziomu sRNA.

Uzyskane wyniki pozwoliły na scharakteryzowanie sposobu oddziaływania anty-sRNA z regulowanymi sRNA w kompleksie z białkiem Hfq. Ustalono, że anty-sRNA wiążąc się z cząsteczkami sRNA i białkiem opiekuńczym Hfq imituje oddziaływania pomiędzy cząsteczkami mRNA a sRNA.

## 11. REFERENCJE

- Afonyushkin, T., B. Vecerek, I. Moll, U. Blasi i V. R. Kaberdin (2005). "Both RNase E and RNase III control the stability of sodB mRNA upon translational inhibition by the small regulatory RNA RyhB." *Nucleic Acids Res* **33**(5): 1678-1689.
- Aiba, H. (2007). "Mechanism of RNA silencing by Hfq-binding small RNAs." *Curr Opin Microbiol* **10**(2): 134-139.
- Argaman, L. i S. Altuvia (2000). "fhfA repression by OxyS RNA: kissing complex formation at two sites results in a stable antisense-target RNA complex." *J Mol Biol* **300**(5): 1101-1112.
- Arluison, V., S. Hohng, R. Roy, O. Pellegrini, P. Regnier i T. Ha (2007a). "Spectroscopic observation of RNA chaperone activities of Hfq in post-transcriptional regulation by a small non-coding RNA." *Nucleic Acids Res* **35**(3): 999-1006.
- Arluison, V., S. K. Mutyam, C. Mura, S. Marco i M. V. Sukhodolets (2007b). "Sm-like protein Hfq: location of the ATP-binding site and the effect of ATP on Hfq-- RNA complexes." *Protein Sci* **16**(9): 1830-1841.
- Baker, J. L., N. Sudarsan, Z. Weinberg, A. Roth, R. B. Stockbridge i R. R. Breaker (2012). "Widespread genetic switches and toxicity resistance proteins for fluoride." *Science* **335**(6065): 233-235.
- Balbontin, R., F. Fiorini, N. Figueroa-Bossi, J. Casadesus i L. Bossi (2010). "Recognition of heptameric seed sequence underlies multi-target regulation by RybB small RNA in Salmonella enterica." *Mol Microbiol* **78**(2): 380-394.
- Balbontin, R., N. Villagra, M. Pardos de la Gandara, G. Mora, N. Figueroa-Bossi i L. Bossi (2016). "Expression of Iron, the salmochelin siderophore receptor, requires mRNA activation by RyhB small RNA homologues." *Mol Microbiol* **100**(1): 139-155.
- Barquist, L. i J. Vogel (2015). "Accelerating Discovery and Functional Analysis of Small RNAs with New Technologies." *Annu Rev Genet* **49**: 367-394.
- Barrick, J. E. i R. R. Breaker (2007). "The distributions, mechanisms, and structures of metabolite-binding riboswitches." *Genome Biol* **8**(11): R239.
- Beisel, C. L., T. B. Updegrove, B. J. Janson i G. Storz (2012). "Multiple factors dictate target selection by Hfq-binding small RNAs." *EMBO J* **31**(8): 1961-1974.
- Bilusic, I., N. Popitsch, P. Rescheneder, R. Schroeder i M. Lybecker (2014). "Revisiting the coding potential of the E. coli genome through Hfq co-immunoprecipitation." *RNA Biol* **11**(5): 641-654.
- Borer, P. N., B. Dengler, I. Tinoco, Jr. i O. C. Uhlenbeck (1974). "Stability of ribonucleic acid double-stranded helices." *J Mol Biol* **86**(4): 843-853.
- Bossi, L. i N. Figueroa-Bossi (2016). "Competing endogenous RNAs: a target-centric view of small RNA regulation in bacteria." *Nat Rev Microbiol* **14**(12): 775-784.
- Bouvier, M., C. M. Sharma, F. Mika, K. H. Nierhaus i J. Vogel (2008). "Small RNA binding to 5' mRNA coding region inhibits translational initiation." *Mol Cell* **32**(6): 827-837.

- Brantl, S. (2007). "Regulatory mechanisms employed by cis-encoded antisense RNAs." *Curr Opin Microbiol* **10**(2): 102-109.
- Brennan, R. G. i T. M. Link (2007). "Hfq structure, function and ligand binding." *Curr Opin Microbiol* **10**(2): 125-133.
- Brownlee, G. G. (1971). "Sequence of 6S RNA of E. coli." *Nat New Biol* **229**(5): 147-149.
- Busch, A., A. S. Richter i R. Backofen (2008). "IntaRNA: efficient prediction of bacterial sRNA targets incorporating target site accessibility and seed regions." *Bioinformatics* **24**(24): 2849-2856.
- Butland, G., J. M. Peregrin-Alvarez, J. Li, W. Yang, X. Yang, V. Canadien, A. Starostine, D. Richards, B. Beattie, N. Krogan, M. Davey, J. Parkinson, J. Greenblatt i A. Emili (2005). "Interaction network containing conserved and essential protein complexes in Escherichia coli." *Nature* **433**(7025): 531-537.
- Caillet, J., C. Gracia, F. Fontaine i E. Hajnsdorf (2014). "Clostridium difficile Hfq can replace Escherichia coli Hfq for most of its function." *RNA* **20**(10): 1567-1578.
- Carpousis, A. J., B. F. Luisi i K. J. McDowall (2009). "Endonucleolytic initiation of mRNA decay in Escherichia coli." *Prog Mol Biol Transl Sci* **85**: 91-135.
- Chao, Y., L. Li, D. Girodat, K. U. Forstner, N. Said, C. Corcoran, M. Smiga, K. Papenfort, R. Reinhardt, H. J. Wieden, B. F. Luisi i J. Vogel (2017). "In Vivo Cleavage Map Illuminates the Central Role of RNase E in Coding and Non-coding RNA Pathways." *Mol Cell* **65**(1): 39-51.
- Chao, Y., K. Papenfort, R. Reinhardt, C. M. Sharma i J. Vogel (2012). "An atlas of Hfq-bound transcripts reveals 3' UTRs as a genomic reservoir of regulatory small RNAs." *EMBO J* **31**(20): 4005-4019.
- Chao, Y. i J. Vogel (2016). "A 3' UTR-Derived Small RNA Provides the Regulatory Noncoding Arm of the Inner Membrane Stress Response." *Mol Cell* **61**(3): 352-363.
- Chen, J. i S. Gottesman (2017). "Hfq links translation repression to stress-induced mutagenesis in E. coli." *Genes Dev.*
- Chen, J., K. M. Wassarman, S. Feng, K. Leon, A. Feklistov, J. T. Winkelman, Z. Li, T. Walz, E. A. Campbell i S. A. Darst (2017). "6S RNA Mimics B-Form DNA to Regulate Escherichia coli RNA Polymerase." *Mol Cell* **68**(2): 388-397 e386.
- Chevalier, C., S. Boisset, C. Romilly, B. Masquida, P. Fechter, T. Geissmann, F. Vandenesch i P. Romby (2010). "Staphylococcus aureus RNAlII binds to two distant regions of coa mRNA to arrest translation and promote mRNA degradation." *PLoS Pathog* **6**(3): e1000809.
- Chou, S. H., P. Flynn i B. Reid (1989). "Solid-phase synthesis and high-resolution NMR studies of two synthetic double-helical RNA dodecamers: r(CGCGAAUUCGCG) and r(CGCGUAUACGCG)." *Biochemistry* **28**(6): 2422-2435.
- Cromie, M. J., Y. Shi, T. Latifi i E. A. Groisman (2006). "An RNA sensor for intracellular Mg(2+)." *Cell* **125**(1): 71-84.
- Dambach, M., M. Sandoval, T. B. Updegrove, V. Anantharaman, L. Aravind, L. S. Waters i G. Storz (2015). "The ubiquitous yybP-ykoY riboswitch is a manganese-responsive regulatory element." *Mol Cell* **57**(6): 1099-1109.

- Dambach, M. D. i W. C. Winkler (2009). "Expanding roles for metabolite-sensing regulatory RNAs." Curr Opin Microbiol **12**(2): 161-169.
- Dann, C. E., 3rd, C. A. Wakeman, C. L. Sieling, S. C. Baker, I. Irnov i W. C. Winkler (2007). "Structure and mechanism of a metal-sensing regulatory RNA." Cell **130**(5): 878-892.
- De Lay, N., D. J. Schu i S. Gottesman (2013). "Bacterial small RNA-based negative regulation: Hfq and its accomplices." J Biol Chem **288**(12): 7996-8003.
- de Smit, M. H. i J. van Duin (1994). "Control of translation by mRNA secondary structure in Escherichia coli. A quantitative analysis of literature data." J Mol Biol **244**(2): 144-150.
- de Smit, M. H. i J. van Duin (2003). "Translational standby sites: how ribosomes may deal with the rapid folding kinetics of mRNA." J Mol Biol **331**(4): 737-743.
- Dimastrogiovanni, D., K. S. Frohlich, K. J. Bandyra, H. A. Bruce, S. Hohensee, J. Vogel i B. F. Luisi (2014). "Recognition of the small regulatory RNA RydC by the bacterial Hfq protein." Elife **3**.
- Ebert, M. S., J. R. Neilson i P. A. Sharp (2007). "MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells." Nat Methods **4**(9): 721-726.
- Ebert, M. S. i P. A. Sharp (2010). "Emerging roles for natural microRNA sponges." Curr Biol **20**(19): R858-861.
- Eggenhofer, F., H. Tafer, P. F. Stadler i I. L. Hofacker (2011). "RNApredator: fast accessibility-based prediction of sRNA targets." Nucleic Acids Res **39**(Web Server issue): W149-154.
- Ellis, M. J., R. S. Trussler i D. B. Haniford (2015). "Hfq binds directly to the ribosome-binding site of IS10 transposase mRNA to inhibit translation." Mol Microbiol **96**(3): 633-650.
- Fei, J., D. Singh, Q. Zhang, S. Park, D. Balasubramanian, I. Golding, C. K. Vanderpool i T. Ha (2015). "RNA biochemistry. Determination of in vivo target search kinetics of regulatory noncoding RNA." Science **347**(6228): 1371-1374.
- Figueroa-Bossi, N., M. Valentini, L. Malleret, F. Fiorini i L. Bossi (2009). "Caught at its own game: regulatory small RNA inactivated by an inducible transcript mimicking its target." Genes Dev **23**(17): 2004-2015.
- Folichon, M., F. Allemand, P. Regnier i E. Hajnsdorf (2005). "Stimulation of poly(A) synthesis by Escherichia coli poly(A) polymerase I is correlated with Hfq binding to poly(A) tails." FEBS J **272**(2): 454-463.
- Fozo, E. M., M. Kawano, F. Fontaine, Y. Kaya, K. S. Mendieta, K. L. Jones, A. Ocampo, K. E. Rudd i G. Storz (2008). "Repression of small toxic protein synthesis by the Sib and OhsC small RNAs." Mol Microbiol **70**(5): 1076-1093.
- Franco-Zorrilla, J. M., A. Valli, M. Todesco, I. Mateos, M. I. Puga, I. Rubio-Somoza, A. Leyva, D. Weigel, J. A. Garcia i J. Paz-Ares (2007). "Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity." Nat Genet **39**(8): 1033-1037.
- Franze de Fernandez, M. T., L. Eoyang i J. T. August (1968). "Factor fraction required for the synthesis of bacteriophage Qbeta-RNA." Nature **219**(5154): 588-590.

- Freier, S. M., R. Kierzek, J. A. Jaeger, N. Sugimoto, M. H. Caruthers, T. Neilson i D. H. Turner (1986). "Improved free-energy parameters for predictions of RNA duplex stability." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(24): 9373-9377.
- Frohlich, K. S., K. Papenfort, A. Fekete i J. Vogel (2013). "A small RNA activates CFA synthase by isoform-specific mRNA stabilization." *EMBO J* **32**(22): 2963-2979.
- Furukawa, K., A. Ramesh, Z. Zhou, Z. Weinberg, T. Vallery, W. C. Winkler i R. R. Breaker (2015). "Bacterial riboswitches cooperatively bind Ni(2+) or Co(2+) ions and control expression of heavy metal transporters." *Mol Cell* **57**(6): 1088-1098.
- Garrey, S. M., M. Blech, J. L. Riffell, J. S. Hankins, L. M. Stickney, M. Diver, Y. H. Hsu, V. Kunanithy i G. A. Mackie (2009). "Substrate binding and active site residues in RNases E and G: role of the 5'-sensor." *J Biol Chem* **284**(46): 31843-31850.
- Garst, A. D. i R. T. Batey (2009). "A switch in time: detailing the life of a riboswitch." *Biochim Biophys Acta* **1789**(9-10): 584-591.
- Geinguenaud, F., V. Calandrini, J. Teixeira, C. Mayer, J. Liquier, C. Lavelle i V. Arluison (2011). "Conformational transition of DNA bound to Hfq probed by infrared spectroscopy." *Phys Chem Chem Phys* **13**(3): 1222-1229.
- Geissmann, T. A. i D. Touati (2004). "Hfq, a new chaperoning role: binding to messenger RNA determines access for small RNA regulator." *EMBO J* **23**(2): 396-405.
- Gimpel, M., N. Heidrich, U. Mader, H. Krugel i S. Brantl (2010). "A dual-function sRNA from *B. subtilis*: SR1 acts as a peptide encoding mRNA on the gapA operon." *Mol Microbiol* **76**(4): 990-1009.
- Gogol, E. B., V. A. Rhodius, K. Papenfort, J. Vogel i C. A. Gross (2011). "Small RNAs endow a transcriptional activator with essential repressor functions for single-tier control of a global stress regulon." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(31): 12875-12880.
- Gopel, Y., M. A. Khan i B. Gorke (2014). "Menage a trois: post-transcriptional control of the key enzyme for cell envelope synthesis by a base-pairing small RNA, an RNase adaptor protein, and a small RNA mimic." *RNA Biol* **11**(5): 433-442.
- Gopel, Y., K. Papenfort, B. Reichenbach, J. Vogel i B. Gorke (2013). "Targeted decay of a regulatory small RNA by an adaptor protein for RNase E and counteraction by an anti-adaptor RNA." *Genes Dev* **27**(5): 552-564.
- Gottesman, S. (2005). "Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria." *Trends Genet* **21**(7): 399-404.
- Grabowicz, M., D. Koren i T. J. Silhavy (2016). "The CpxQ sRNA Negatively Regulates Skp To Prevent Mistargeting of beta-Barrel Outer Membrane Proteins into the Cytoplasmic Membrane." *MBio* **7**(2): e00312-00316.
- Guo, M. S., T. B. Updegrove, E. B. Gogol, S. A. Shabalina, C. A. Gross i G. Storz (2014). "MicL, a new sigmaE-dependent sRNA, combats envelope stress by repressing synthesis of Lpp, the major outer membrane lipoprotein." *Genes Dev* **28**(14): 1620-1634.
- Han, K., B. Tjaden i S. Lory (2016). "GRIL-seq provides a method for identifying direct targets of bacterial small regulatory RNA by in vivo proximity ligation." *Nat Microbiol* **2**: 16239.

- Hao, Y., Z. J. Zhang, D. W. Erickson, M. Huang, Y. Huang, J. Li, T. Hwa i H. Shi (2011). "Quantifying the sequence-function relation in gene silencing by bacterial small RNAs." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(30): 12473-12478.
- Hauryliuk, V. i M. Ehrenberg (2006). "Two-step selection of mRNAs in initiation of protein synthesis." *Mol Cell* **22**(2): 155-156.
- Heidrich, N., I. Moll i S. Brantl (2007). "In vitro analysis of the interaction between the small RNA SR1 and its primary target ahrC mRNA." *Nucleic Acids Res* **35**(13): 4331-4346.
- Henderson, C. A., H. A. Vincent, A. Casamento, C. M. Stone, J. O. Phillips, P. D. Cary, F. Sobott, D. M. Gowers, J. E. Taylor i A. J. Callaghan (2013). "Hfq binding changes the structure of Escherichia coli small noncoding RNAs OxyS and RprA, which are involved in the riboregulation of rpoS." *RNA* **19**(8): 1089-1104.
- Holmqvist, E., P. R. Wright, L. Li, T. Bischler, L. Barquist, R. Reinhardt, R. Backofen i J. Vogel (2016). "Global RNA recognition patterns of post-transcriptional regulators Hfq and CsrA revealed by UV crosslinking in vivo." *EMBO J* **35**(9): 991-1011.
- Horstmann, N., J. Orans, P. Valentin-Hansen, S. A. Shelburne, 3rd i R. G. Brennan (2012). "Structural mechanism of Staphylococcus aureus Hfq binding to an RNA Atract." *Nucleic Acids Res* **40**(21): 11023-11035.
- Hoynes-O'Connor, A. i T. S. Moon (2016). "Development of Design Rules for Reliable Antisense RNA Behavior in E. coli." *ACS Synth Biol* **5**(12): 1441-1454.
- Hunke, S., R. Keller i V. S. Muller (2012). "Signal integration by the Cpx-envelope stress system." *FEMS Microbiol Lett* **326**(1): 12-22.
- Hussein, R. i H. N. Lim (2011). "Disruption of small RNA signaling caused by competition for Hfq." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(3): 1110-1115.
- Huttenhofer, A. i H. F. Noller (1994). "Footprinting mRNA-ribosome complexes with chemical probes." *EMBO J* **13**(16): 3892-3901.
- Ikemura, T. i J. E. Dahlberg (1973a). "Small ribonucleic acids of Escherichia coli. I. Characterization by polyacrylamide gel electrophoresis and fingerprint analysis." *J Biol Chem* **248**(14): 5024-5032.
- Ikemura, T. i J. E. Dahlberg (1973b). "Small ribonucleic acids of Escherichia coli. II. Noncoordinate accumulation during stringent control." *J Biol Chem* **248**(14): 5033-5041.
- Isaac, D. D., J. S. Pinkner, S. J. Hultgren i T. J. Silhavy (2005). "The extracytoplasmic adaptor protein CpxP is degraded with substrate by DegP." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(49): 17775-17779.
- Ishikawa, H., H. Otaka, K. Maki, T. Morita i H. Aiba (2012). "The functional Hfq-binding module of bacterial sRNAs consists of a double or single hairpin preceded by a U-rich sequence and followed by a 3' poly(U) tail." *RNA* **18**(5): 1062-1074.
- Jacques, J. F., S. Jang, K. Prevost, G. Desnoyers, M. Desmarais, J. Imlay i E. Masse (2006). "RyhB small RNA modulates the free intracellular iron pool and is essential for normal growth during iron limitation in Escherichia coli." *Mol Microbiol* **62**(4): 1181-1190.

- Jost, D., A. Nowojewski i E. Levine (2011). "Small RNA biology is systems biology." BMB Rep **44**(1): 11-21.
- Kadner, R. J., G. P. Murphy i C. M. Stephens (1992). "Two mechanisms for growth inhibition by elevated transport of sugar phosphates in *Escherichia coli*." J Gen Microbiol **138**(10): 2007-2014.
- Kajitani, M., A. Kato, A. Wada, Y. Inokuchi i A. Ishihama (1994). "Regulation of the *Escherichia coli* hfq gene encoding the host factor for phage Q beta." J Bacteriol **176**(2): 531-534.
- Kalamorz, F., B. Reichenbach, W. Marz, B. Rak i B. Gorke (2007). "Feedback control of glucosamine-6-phosphate synthase GlmS expression depends on the small RNA GlmZ and involves the novel protein YhbJ in *Escherichia coli*." Mol Microbiol **65**(6): 1518-1533.
- Kar, S., R. Edgar i S. Adhya (2005). "Nucleoid remodeling by an altered HU protein: reorganization of the transcription program." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(45): 16397-16402.
- Kawamoto, H., Y. Koide, T. Morita i H. Aiba (2006). "Base-pairing requirement for RNA silencing by a bacterial small RNA and acceleration of duplex formation by Hfq." Mol Microbiol **61**(4): 1013-1022.
- Kawano, M., L. Aravind i G. Storz (2007). "An antisense RNA controls synthesis of an SOS-induced toxin evolved from an antitoxin." Mol Microbiol **64**(3): 738-754.
- Kierzek, R., M. H. Caruthers, C. E. Longfellow, D. Swinton, D. H. Turner i S. M. Freier (1986). "Polymer-supported RNA synthesis and its application to test the nearest-neighbor model for duplex stability." Biochemistry **25**(24): 7840-7846.
- Kovach, A. R., K. E. Hoff, J. T. Canty, J. Orans i R. G. Brennan (2014). "Recognition of U-rich RNA by Hfq from the Gram-positive pathogen *Listeria monocytogenes*." RNA **20**(10): 1548-1559.
- Lalaouna, D., M. C. Carrier, S. Semsey, J. S. Brouard, J. Wang, J. T. Wade i E. Masse (2015a). "A 3' external transcribed spacer in a tRNA transcript acts as a sponge for small RNAs to prevent transcriptional noise." Mol Cell **58**(3): 393-405.
- Lalaouna, D., A. Morissette, M. C. Carrier i E. Masse (2015b). "DsrA regulatory RNA represses both hns and rbsD mRNAs through distinct mechanisms in *Escherichia coli*." Mol Microbiol **98**(2): 357-369.
- Le Derout, J., I. V. Boni, P. Regnier i E. Hajsndorf (2010). "Hfq affects mRNA levels independently of degradation." BMC Mol Biol **11**: 17.
- Lease, R. A. i S. A. Woodson (2004). "Cycling of the Sm-like protein Hfq on the DsrA small regulatory RNA." J Mol Biol **344**(5): 1211-1223.
- Lee, T. i A. L. Feig (2008). "The RNA binding protein Hfq interacts specifically with tRNAs." RNA **14**(3): 514-523.
- Levine, E., Z. Zhang, T. Kuhlman i T. Hwa (2007). "Quantitative characteristics of gene regulation by small RNA." PLoS Biol **5**(9): e229.
- Lewis, B. P., C. B. Burge i D. P. Bartel (2005). "Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets." Cell **120**(1): 15-20.

- Link, T. M., P. Valentin-Hansen i R. G. Brennan (2009). "Structure of Escherichia coli Hfq bound to polyriboadenylate RNA." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(46): 19292-19297.
- Livny, J. i M. K. Waldor (2007). "Identification of small RNAs in diverse bacterial species." Curr Opin Microbiol **10**(2): 96-101.
- Lloyd, C. R., S. Park, J. Fei i C. K. Vanderpool (2017). "The Small Protein SgrT Controls Transport Activity of the Glucose-Specific Phosphotransferase System." J Bacteriol **199**(11).
- Majdalani, N., C. Cunning, D. Sledjeski, T. Elliott i S. Gottesman (1998). "DsrA RNA regulates translation of RpoS message by an anti-antisense mechanism, independent of its action as an antisilencer of transcription." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(21): 12462-12467.
- Majdalani, N., D. Hernandez i S. Gottesman (2002). "Regulation and mode of action of the second small RNA activator of RpoS translation, RprA." Mol Microbiol **46**(3): 813-826.
- Makarova, K. S., Y. I. Wolf, O. S. Alkhnbashi, F. Costa, S. A. Shah, S. J. Saunders, R. Barrangou, S. J. Brouns, E. Charpentier, D. H. Haft, P. Horvath, S. Moineau, F. J. Mojica, R. M. Terns, M. P. Terns, M. F. White, A. F. Yakunin, R. A. Garrett, J. van der Oost, R. Backofen i E. V. Koonin (2015). "An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems." Nat Rev Microbiol **13**(11): 722-736.
- Malecka, E. M., J. Strozecka, D. Sobanska i M. Olejniczak (2015). "Structure of bacterial regulatory RNAs determines their performance in competition for the chaperone protein Hfq." Biochemistry **54**(5): 1157-1170.
- Małecka-Grajek, E. M. (2017). "Specyficzność rozpoznawania małych regulatorowych RNA przez białko opiekuńcze Hfq." Nieopublikowana rozprawa doktorska(Poznań: Uniwersytet im. A Mickiewicza w Poznaniu).
- Mandin, P. i S. Gottesman (2010). "Integrating anaerobic/aerobic sensing and the general stress response through the ArcZ small RNA." EMBO J **29**(18): 3094-3107.
- Marraffini, L. A. (2015). "CRISPR-Cas immunity in prokaryotes." Nature **526**(7571): 55-61.
- Masse, E., F. E. Escorcía i S. Gottesman (2003). "Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in Escherichia coli." Genes Dev **17**(19): 2374-2383.
- Masse, E., C. K. Vanderpool i S. Gottesman (2005). "Effect of RyhB small RNA on global iron use in Escherichia coli." J Bacteriol **187**(20): 6962-6971.
- Mathews, D. H., W. N. Moss i D. H. Turner (2010). "Folding and finding RNA secondary structure." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(12): a003665.
- McDowell, J. A. i D. H. Turner (1996). "Investigation of the structural basis for thermodynamic stabilities of tandem GU mismatches: solution structure of (rGAGGUCUC)<sub>2</sub> by two-dimensional NMR and simulated annealing." Biochemistry **35**(45): 14077-14089.

- Melamed, S., A. Peer, R. Faigenbaum-Romm, Y. E. Gatt, N. Reiss, A. Bar, Y. Altuvia, L. Argaman i H. Margalit (2016). "Global Mapping of Small RNA-Target Interactions in Bacteria." *Mol Cell* **63**(5): 884-897.
- Mikulecky, P. J., M. K. Kaw, C. C. Brescia, J. C. Takach, D. D. Sledjeski i A. L. Feig (2004). "Escherichia coli Hfq has distinct interaction surfaces for DsrA, rpoS and poly(A) RNAs." *Nat Struct Mol Biol* **11**(12): 1206-1214.
- Miyakoshi, M., Y. Chao i J. Vogel (2015a). "Cross talk between ABC transporter mRNAs via a target mRNA-derived sponge of the GcvB small RNA." *EMBO J* **34**(11): 1478-1492.
- Miyakoshi, M., Y. Chao i J. Vogel (2015b). "Regulatory small RNAs from the 3' regions of bacterial mRNAs." *Curr Opin Microbiol* **24**: 132-139.
- Mizuno, T., M. Y. Chou i M. Inouye (1984). "A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA)." *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(7): 1966-1970.
- Mohanty, B. K., V. F. Maples i S. R. Kushner (2004). "The Sm-like protein Hfq regulates polyadenylation dependent mRNA decay in Escherichia coli." *Mol Microbiol* **54**(4): 905-920.
- Moll, I., D. Leitsch, T. Steinhauser i U. Blasi (2003). "RNA chaperone activity of the Sm-like Hfq protein." *EMBO Rep* **4**(3): 284-289.
- Moller, T., T. Franch, P. Hojrup, D. R. Keene, H. P. Bachinger, R. G. Brennan i P. Valentin-Hansen (2002). "Hfq: a bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA interaction." *Mol Cell* **9**(1): 23-30.
- Moon, K. i S. Gottesman (2011). "Competition among Hfq-binding small RNAs in Escherichia coli." *Mol Microbiol* **82**(6): 1545-1562.
- Morfeldt, E., D. Taylor, A. von Gabain i S. Arvidson (1995). "Activation of alpha-toxin translation in Staphylococcus aureus by the trans-encoded antisense RNA, RNAIII." *EMBO J* **14**(18): 4569-4577.
- Morita, T., K. Maki i H. Aiba (2005). "RNase E-based ribonucleoprotein complexes: mechanical basis of mRNA destabilization mediated by bacterial noncoding RNAs." *Genes Dev* **19**(18): 2176-2186.
- Morita, T., Y. Mochizuki i H. Aiba (2006). "Translational repression is sufficient for gene silencing by bacterial small noncoding RNAs in the absence of mRNA destruction." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(13): 4858-4863.
- Mulley, G., J. P. White, R. Karunakaran, J. Prell, A. Bourdes, S. Bunnewell, L. Hill i P. S. Poole (2011). "Mutation of GOGAT prevents pea bacteroid formation and N<sub>2</sub> fixation by globally downregulating transport of organic nitrogen sources." *Mol Microbiol* **80**(1): 149-167.
- Mura, C., P. S. Randolph, J. Patterson i A. E. Cozen (2013). "Archaeal and eukaryotic homologs of Hfq: A structural and evolutionary perspective on Sm function." *RNA Biol* **10**(4): 636-651.
- Murina, V., N. Lekontseva i A. Nikulin (2013). "Hfq binds ribonucleotides in three different RNA-binding sites." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **69**(Pt 8): 1504-1513.

- Mutalik, V. K., L. Qi, J. C. Guimaraes, J. B. Lucks i A. P. Arkin (2012). "Rationally designed families of orthogonal RNA regulators of translation." Nat Chem Biol **8**(5): 447-454.
- Na, D., S. M. Yoo, H. Chung, H. Park, J. H. Park i S. Y. Lee (2013). "Metabolic engineering of Escherichia coli using synthetic small regulatory RNAs." Nat Biotechnol **31**(2): 170-174.
- Nevesinjac, A. Z. i T. L. Raivio (2005). "The Cpx envelope stress response affects expression of the type IV bundle-forming pili of enteropathogenic Escherichia coli." J Bacteriol **187**(2): 672-686.
- Nitzan, M., R. Rehani i H. Margalit (2017). "Integration of Bacterial Small RNAs in Regulatory Networks." Annu Rev Biophys **46**: 131-148.
- Opdyke, J. A., J. G. Kang i G. Storz (2004). "GadY, a small-RNA regulator of acid response genes in Escherichia coli." J Bacteriol **186**(20): 6698-6705.
- Otaka, H., H. Ishikawa, T. Morita i H. Aiba (2011). "PolyU tail of rho-independent terminator of bacterial small RNAs is essential for Hfq action." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(32): 13059-13064.
- Overgaard, M., J. Johansen, J. Moller-Jensen i P. Valentin-Hansen (2009). "Switching off small RNA regulation with trap-mRNA." Mol Microbiol **73**(5): 790-800.
- Padalon-Brauch, G., R. Hershberg, M. Elgrably-Weiss, K. Baruch, I. Rosenshine, H. Margalit i S. Altuvia (2008). "Small RNAs encoded within genetic islands of Salmonella typhimurium show host-induced expression and role in virulence." Nucleic Acids Res **36**(6): 1913-1927.
- Panja, S., R. Paul, M. M. Greenberg i S. A. Woodson (2015a). "Light-Triggered RNA Annealing by an RNA Chaperone." Angew Chem Int Ed Engl **54**(25): 7281-7284.
- Panja, S., A. Santiago-Frangos, D. J. Schu, S. Gottesman i S. A. Woodson (2015b). "Acidic Residues in the Hfq Chaperone Increase the Selectivity of sRNA Binding and Annealing." J Mol Biol **427**(22): 3491-3500.
- Panja, S., D. J. Schu i S. A. Woodson (2013). "Conserved arginines on the rim of Hfq catalyze base pair formation and exchange." Nucleic Acids Res **41**(15): 7536-7546.
- Panja, S. i S. A. Woodson (2012). "Hfq proximity and orientation controls RNA annealing." Nucleic Acids Res **40**(17): 8690-8697.
- Papenfort, K., M. Bouvier, F. Mika, C. M. Sharma i J. Vogel (2010). "Evidence for an autonomous 5' target recognition domain in an Hfq-associated small RNA." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(47): 20435-20440.
- Papenfort, K., V. Pfeiffer, F. Mika, S. Lucchini, J. C. Hinton i J. Vogel (2006). "SigmaE-dependent small RNAs of Salmonella respond to membrane stress by accelerating global omp mRNA decay." Mol Microbiol **62**(6): 1674-1688.
- Papenfort, K., D. Podkaminski, J. C. Hinton i J. Vogel (2012). "The ancestral SgrS RNA discriminates horizontally acquired Salmonella mRNAs through a single G-U wobble pair." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(13): E757-764.
- Papenfort, K., N. Said, T. Welsink, S. Lucchini, J. C. Hinton i J. Vogel (2009). "Specific and pleiotropic patterns of mRNA regulation by ArcZ, a conserved, Hfq-dependent small RNA." Mol Microbiol **74**(1): 139-158.

- Papenfort, K., Y. Sun, M. Miyakoshi, C. K. Vanderpool i J. Vogel (2013). "Small RNA-mediated activation of sugar phosphatase mRNA regulates glucose homeostasis." Cell **153**(2): 426-437.
- Peer, A. i H. Margalit (2011). "Accessibility and evolutionary conservation mark bacterial small-rna target-binding regions." J Bacteriol **193**(7): 1690-1701.
- Peng, Y., J. E. Curtis, X. Fang i S. A. Woodson (2014). "Structural model of an mRNA in complex with the bacterial chaperone Hfq." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(48): 17134-17139.
- Pfeiffer, V., K. Papenfort, S. Lucchini, J. C. Hinton i J. Vogel (2009). "Coding sequence targeting by MicC RNA reveals bacterial mRNA silencing downstream of translational initiation." Nat Struct Mol Biol **16**(8): 840-846.
- Plumbridge, J., L. Bossi, J. Oberto, J. T. Wade i N. Figueroa-Bossi (2014). "Interplay of transcriptional and small RNA-dependent control mechanisms regulates chitosugar uptake in Escherichia coli and Salmonella." Mol Microbiol **92**(4): 648-658.
- Plumbridge, J. i O. Pellegrini (2004). "Expression of the chitobiose operon of Escherichia coli is regulated by three transcription factors: NagC, ChbR and CAP." Mol Microbiol **52**(2): 437-449.
- Pontiggia, A., A. Negri, M. Beltrame i M. E. Bianchi (1993). "Protein HU binds specifically to kinked DNA." Mol Microbiol **7**(3): 343-350.
- Prevost, K., H. Salvail, G. Desnoyers, J. F. Jacques, E. Phaneuf i E. Masse (2007). "The small RNA RyhB activates the translation of shiA mRNA encoding a permease of shikimate, a compound involved in siderophore synthesis." Mol Microbiol **64**(5): 1260-1273.
- Price, I. R., A. Gaballa, F. Ding, J. D. Helmann i A. Ke (2015). "Mn(2+)-sensing mechanisms of yybP-ykoY orphan riboswitches." Mol Cell **57**(6): 1110-1123.
- Rabhi, M., O. Espeli, A. Schwartz, B. Cayrol, A. R. Rahmouni, V. Arluison i M. Boudvillain (2011). "The Sm-like RNA chaperone Hfq mediates transcription antitermination at Rho-dependent terminators." EMBO J **30**(14): 2805-2816.
- Raivio, T. L., D. L. Popkin i T. J. Silhavy (1999). "The Cpx envelope stress response is controlled by amplification and feedback inhibition." J Bacteriol **181**(17): 5263-5272.
- Rasmussen, A. A., J. Johansen, J. S. Nielsen, M. Overgaard, B. Kallipolitis i P. Valentin-Hansen (2009). "A conserved small RNA promotes silencing of the outer membrane protein YbfM." Mol Microbiol **72**(3): 566-577.
- Reuter, J. S. i D. H. Mathews (2010). "RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis." BMC Bioinformatics **11**: 129.
- Rhodijs, V. A., W. C. Suh, G. Nonaka, J. West i C. A. Gross (2006). "Conserved and variable functions of the sigmaE stress response in related genomes." PLoS Biol **4**(1): e2.
- Rice, J. B., D. Balasubramanian i C. K. Vanderpool (2012). "Small RNA binding-site multiplicity involved in translational regulation of a polycistronic mRNA." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(40): E2691-2698.

- Richards, G. R. i C. K. Vanderpool (2011). "Molecular call and response: the physiology of bacterial small RNAs." Biochim Biophys Acta **1809**(10): 525-531.
- Richter, A. S. i R. Backofen (2012). "Accessibility and conservation: general features of bacterial small RNA-mRNA interactions?" RNA Biol **9**(7): 954-965.
- Rieder, U., C. Kreutz i R. Micura (2010). "Folding of a transcriptionally acting preQ1 riboswitch." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(24): 10804-10809.
- Robinson, K. E., J. Orans, A. R. Kovach, T. M. Link i R. G. Brennan (2014). "Mapping Hfq-RNA interaction surfaces using tryptophan fluorescence quenching." Nucleic Acids Res **42**(4): 2736-2749.
- Romeo, T., C. A. Vakulskas i P. Babitzke (2013). "Post-transcriptional regulation on a global scale: form and function of Csr/Rsm systems." Environ Microbiol **15**(2): 313-324.
- Romilly, C., C. Chevalier, S. Marzi, B. Masquida, T. Geissmann, F. Vandenesch, E. Westhof i P. Romby (2012). "Loop-loop interactions involved in antisense regulation are processed by the endoribonuclease III in *Staphylococcus aureus*." RNA Biol **9**(12): 1461-1472.
- Roth, A., W. C. Winkler, E. E. Regulski, B. W. Lee, J. Lim, I. Jona, J. E. Barrick, A. Ritwik, J. N. Kim, R. Welz, D. Iwata-Reuyl i R. R. Breaker (2007). "A riboswitch selective for the queuosine precursor preQ1 contains an unusually small aptamer domain." Nat Struct Mol Biol **14**(4): 308-317.
- Rutherford, S. T., J. S. Valastyan, T. Taillefumier, N. S. Wingreen i B. L. Bassler (2015). "Comprehensive analysis reveals how single nucleotides contribute to noncoding RNA function in bacterial quorum sensing." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(44): E6038-6047.
- Salim, N. N. i A. L. Feig (2010). "An upstream Hfq binding site in the *fhlA* mRNA leader region facilitates the OxyS-*fhlA* interaction." PLoS One **5**(9).
- Santiago-Frangos, A., J. R. Jeliaskov, J. J. Gray i S. A. Woodson (2017). "Acidic C-terminal domains autoregulate the RNA chaperone Hfq." Elife **6**.
- Santos, J. M., P. Freire, F. S. Mesquita, F. Mika, R. Hengge i C. M. Arraiano (2006). "Poly(A)-polymerase I links transcription with mRNA degradation via sigmaS proteolysis." Mol Microbiol **60**(1): 177-188.
- Sauer, E. (2013). "Structure and RNA-binding properties of the bacterial LSm protein Hfq." RNA Biol **10**(4): 610-618.
- Sauer, E., S. Schmidt i O. Weichenrieder (2012). "Small RNA binding to the lateral surface of Hfq hexamers and structural rearrangements upon mRNA target recognition." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(24): 9396-9401.
- Sauer, E. i O. Weichenrieder (2011). "Structural basis for RNA 3'-end recognition by Hfq." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(32): 13065-13070.
- Schu, D. J., A. Zhang, S. Gottesman i G. Storz (2015). "Alternative Hfq-sRNA interaction modes dictate alternative mRNA recognition." EMBO J **34**(20): 2557-2573.

- Schumacher, M. A., R. F. Pearson, T. Moller, P. Valentin-Hansen i R. G. Brennan (2002). "Structures of the pleiotropic translational regulator Hfq and an Hfq-RNA complex: a bacterial Sm-like protein." *EMBO J* **21**(13): 3546-3556.
- Schuppli, D., G. Miranda, H. C. Tsui, M. E. Winkler, J. M. Sogo i H. Weber (1997). "Altered 3'-terminal RNA structure in phage Qbeta adapted to host factor-less *Escherichia coli*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(19): 10239-10242.
- Serganov, A. i E. Nudler (2013). "A decade of riboswitches." *Cell* **152**(1-2): 17-24.
- Sharma, C. M., F. Darfeuille, T. H. Plantinga i J. Vogel (2007). "A small RNA regulates multiple ABC transporter mRNAs by targeting C/A-rich elements inside and upstream of ribosome-binding sites." *Genes Dev* **21**(21): 2804-2817.
- Sharma, C. M., K. Papenfort, S. R. Pernitzsch, H. J. Mollenkopf, J. C. Hinton i J. Vogel (2011). "Pervasive post-transcriptional control of genes involved in amino acid metabolism by the Hfq-dependent GcvB small RNA." *Mol Microbiol* **81**(5): 1144-1165.
- Simons, R. W. i N. Kleckner (1983). "Translational control of IS10 transposition." *Cell* **34**(2): 683-691.
- Sittka, A., S. Lucchini, K. Papenfort, C. M. Sharma, K. Rolle, T. T. Binnewies, J. C. Hinton i J. Vogel (2008). "Deep sequencing analysis of small noncoding RNA and mRNA targets of the global post-transcriptional regulator, Hfq." *PLoS Genet* **4**(8): e1000163.
- Smirnov, A., K. U. Forstner, E. Holmqvist, A. Otto, R. Gunster, D. Becher, R. Reinhardt i J. Vogel (2016). "Grad-seq guides the discovery of ProQ as a major small RNA-binding protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**(41): 11591-11596.
- Smith, A. M., R. T. Fuchs, F. J. Grundy i T. M. Henkin (2010). "Riboswitch RNAs: regulation of gene expression by direct monitoring of a physiological signal." *RNA Biol* **7**(1): 104-110.
- Snyder, W. B., L. J. Davis, P. N. Danese, C. L. Cosma i T. J. Silhavy (1995). "Overproduction of NlpE, a new outer membrane lipoprotein, suppresses the toxicity of periplasmic LacZ by activation of the Cpx signal transduction pathway." *J Bacteriol* **177**(15): 4216-4223.
- Sobrero, P. i C. Valverde (2011). "Evidences of autoregulation of hfq expression in *Sinorhizobium meliloti* strain 2011." *Arch Microbiol* **193**(9): 629-639.
- Sobrero, P. i C. Valverde (2012). "The bacterial protein Hfq: much more than a mere RNA-binding factor." *Crit Rev Microbiol* **38**(4): 276-299.
- Someya, T., S. Baba, M. Fujimoto, G. Kawai, T. Kumasaka i K. Nakamura (2012). "Crystal structure of Hfq from *Bacillus subtilis* in complex with SELEX-derived RNA aptamer: insight into RNA-binding properties of bacterial Hfq." *Nucleic Acids Res* **40**(4): 1856-1867.
- Sonnleitner, E., L. Abdou i D. Haas (2009). "Small RNA as global regulator of carbon catabolite repression in *Pseudomonas aeruginosa*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(51): 21866-21871.

- Sonnleitner, E. i U. Blasi (2014). "Regulation of Hfq by the RNA CrcZ in *Pseudomonas aeruginosa* carbon catabolite repression." *PLoS Genet* **10**(6): e1004440.
- Sonnleitner, E., K. Prindl i U. Blasi (2017). "The *Pseudomonas aeruginosa* CrcZ RNA interferes with Hfq-mediated riboregulation." *PLoS One* **12**(7): e0180887.
- Soper, T., P. Mandin, N. Majdalani, S. Gottesman i S. A. Woodson (2010). "Positive regulation by small RNAs and the role of Hfq." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(21): 9602-9607.
- Soper, T. J., K. Doxzen i S. A. Woodson (2011). "Major role for mRNA binding and restructuring in sRNA recruitment by Hfq." *RNA* **17**(8): 1544-1550.
- Soper, T. J. i S. A. Woodson (2008). "The *rpoS* mRNA leader recruits Hfq to facilitate annealing with DsrA sRNA." *RNA* **14**(9): 1907-1917.
- Stawinski, J., R. Stromberg, M. Thelin i E. Westman (1988). "Studies on the t-butyltrimethylsilyl group as 2'-O-protection in oligoribonucleotide synthesis via the H-phosphonate approach." *Nucleic Acids Res* **16**(19): 9285-9298.
- Steuten, B., S. Schneider i R. Wagner (2014). "6S RNA: recent answers--future questions." *Mol Microbiol* **91**(4): 641-648.
- Storz, G., J. Vogel i K. M. Wassarman (2011). "Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers." *Mol Cell* **43**(6): 880-891.
- Stougaard, P., S. Molin i K. Nordstrom (1981). "RNAs involved in copy-number control and incompatibility of plasmid R1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(10): 6008-6012.
- Sudarsan, N., E. R. Lee, Z. Weinberg, R. H. Moy, J. N. Kim, K. H. Link i R. R. Breaker (2008). "Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP." *Science* **321**(5887): 411-413.
- Sukhodolets, M. V. i S. Garges (2003). "Interaction of *Escherichia coli* RNA polymerase with the ribosomal protein S1 and the Sm-like ATPase Hfq." *Biochemistry* **42**(26): 8022-8034.
- Sun, Y. i C. K. Vanderpool (2013). "Physiological consequences of multiple-target regulation by the small RNA SgrS in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **195**(21): 4804-4815.
- Takada, A., M. Wachi, A. Kaidow, M. Takamura i K. Nagai (1997). "DNA binding properties of the hfq gene product of *Escherichia coli*." *Biochem Biophys Res Commun* **236**(3): 576-579.
- Tan, J. Y. i A. C. Marques (2016). "miRNA-mediated crosstalk between transcripts: The missing "linc"?" *Bioessays* **38**(3): 295-301.
- Tjaden, B., S. S. Goodwin, J. A. Opdyke, M. Guillier, D. X. Fu, S. Gottesman i G. Storz (2006). "Target prediction for small, noncoding RNAs in bacteria." *Nucleic Acids Res* **34**(9): 2791-2802.
- Tolstorukov, M. Y., K. M. Virnik, S. Adhya i V. B. Zhurkin (2005). "A-tract clusters may facilitate DNA packaging in bacterial nucleoid." *Nucleic Acids Res* **33**(12): 3907-3918.

- Tomizawa, J. i T. Itoh (1981). "Plasmid ColE1 incompatibility determined by interaction of RNA I with primer transcript." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(10): 6096-6100.
- Tree, J. J., S. Granneman, S. P. McAteer, D. Tollervey i D. L. Gally (2014). "Identification of bacteriophage-encoded anti-sRNAs in pathogenic *Escherichia coli*." Mol Cell **55**(2): 199-213.
- Tsui, H. C., G. Feng i M. E. Winkler (1996). "Transcription of the *mutL* repair, *miaA* tRNA modification, *hfq* pleiotropic regulator, and *hflA* region protease genes of *Escherichia coli* K-12 from clustered  $\sigma^{32}$ -specific promoters during heat shock." J Bacteriol **178**(19): 5719-5731.
- Tsui, H. C. i M. E. Winkler (1994). "Transcriptional patterns of the *mutL*-*miaA* superoperon of *Escherichia coli* K-12 suggest a model for posttranscriptional regulation." Biochimie **76**(12): 1168-1177.
- Udekwi, K. I., F. Darfeuille, J. Vogel, J. Reimegard, E. Holmqvist i E. G. Wagner (2005). "Hfq-dependent regulation of OmpA synthesis is mediated by an antisense RNA." Genes Dev **19**(19): 2355-2366.
- Updegrave, T., N. Wilf, X. Sun i R. M. Wartell (2008). "Effect of Hfq on RprA-rpoS mRNA pairing: Hfq-RNA binding and the influence of the 5' rpoS mRNA leader region." Biochemistry **47**(43): 11184-11195.
- Updegrave, T. B., J. J. Correia, R. Galletto, W. Bujalowski i R. M. Wartell (2010). "E. coli DNA associated with isolated Hfq interacts with Hfq's distal surface and C-terminal domain." Biochim Biophys Acta **1799**(8): 588-596.
- Updegrave, T. B., A. Zhang i G. Storz (2016). "Hfq: the flexible RNA matchmaker." Curr Opin Microbiol **30**: 133-138.
- Vakulskas, C. A., Y. Leng, H. Abe, T. Amaki, A. Okayama, P. Babitzke, K. Suzuki i T. Romeo (2016). "Antagonistic control of the turnover pathway for the global regulatory sRNA CsrB by the CsrA and CsrD proteins." Nucleic Acids Res **44**(16): 7896-7910.
- Valentin-Hansen, P., M. Eriksen i C. Udesen (2004). "The bacterial Sm-like protein Hfq: a key player in RNA transactions." Mol Microbiol **51**(6): 1525-1533.
- Vanderpool, C. K. i S. Gottesman (2004). "Involvement of a novel transcriptional activator and small RNA in post-transcriptional regulation of the glucose phosphoenolpyruvate phosphotransferase system." Mol Microbiol **54**(4): 1076-1089.
- Vecerek, B., I. Moll i U. Blasi (2005). "Translational autocontrol of the *Escherichia coli* hfq RNA chaperone gene." RNA **11**(6): 976-984.
- Viegas, S. C., V. Pfeiffer, A. Sittka, I. J. Silva, J. Vogel i C. M. Arraiano (2007). "Characterization of the role of ribonucleases in *Salmonella* small RNA decay." Nucleic Acids Res **35**(22): 7651-7664.
- Vogel, J. i B. F. Luisi (2011). "Hfq and its constellation of RNA." Nat Rev Microbiol **9**(8): 578-589.
- Vytvytska, O., J. S. Jakobsen, G. Balcunaite, J. S. Andersen, M. Baccharini i A. von Gabain (1998). "Host factor I, Hfq, binds to *Escherichia coli* ompA mRNA in a

- growth rate-dependent fashion and regulates its stability." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(24): 14118-14123.
- Wadler, C. S. i C. K. Vanderpool (2007). "A dual function for a bacterial small RNA: SgrS performs base pairing-dependent regulation and encodes a functional polypeptide." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(51): 20454-20459.
- Wagner, E. G. (2009). "Kill the messenger: bacterial antisense RNA promotes mRNA decay." Nat Struct Mol Biol **16**(8): 804-806.
- Wagner, E. G., S. Altuvia i P. Romby (2002). "Antisense RNAs in bacteria and their genetic elements." Adv Genet **46**: 361-398.
- Wagner, E. G. i P. Romby (2015). "Small RNAs in bacteria and archaea: who they are, what they do, and how they do it." Adv Genet **90**: 133-208.
- Wagner, E. G. i C. Unoson (2012). "The toxin-antitoxin system tisB-istR1: Expression, regulation, and biological role in persister phenotypes." RNA Biol **9**(12): 1513-1519.
- Wang, L., W. Wang, F. Li, J. Zhang, J. Wu, Q. Gong i Y. Shi (2015). "Structural insights into the recognition of the internal A-rich linker from OxyS sRNA by Escherichia coli Hfq." Nucleic Acids Res **43**(4): 2400-2411.
- Wang, W., L. Wang, J. Wu, Q. Gong i Y. Shi (2013). "Hfq-bridged ternary complex is important for translation activation of rpoS by DsrA." Nucleic Acids Res **41**(11): 5938-5948.
- Wassarman, K. M. i G. Storz (2000). "6S RNA regulates E. coli RNA polymerase activity." Cell **101**(6): 613-623.
- Wassarman, K. M., A. Zhang i G. Storz (1999). "Small RNAs in Escherichia coli." Trends Microbiol **7**(1): 37-45.
- Wilusz, C. J. i J. Wilusz (2013). "Lsm proteins and Hfq: Life at the 3' end." RNA Biol **10**(4): 592-601.
- Windbichler, N., F. von Pelchrzim, O. Mayer, E. Csaszar i R. Schroeder (2008). "Isolation of small RNA-binding proteins from E. coli: evidence for frequent interaction of RNAs with RNA polymerase." RNA Biol **5**(1): 30-40.
- Winkler, W., A. Nahvi i R. R. Breaker (2002). "Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression." Nature **419**(6910): 952-956.
- Wright, P. R., A. S. Richter, K. Papenfort, M. Mann, J. Vogel, W. R. Hess, R. Backofen i J. Georg (2013). "Comparative genomics boosts target prediction for bacterial small RNAs." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(37): E3487-3496.
- Wroblewska, Z. i M. Olejniczak (2016). "Hfq assists small RNAs in binding to the coding sequence of ompD mRNA and in rearranging its structure." RNA **22**(7): 979-994.
- Wu, X. G., H. M. Duan, T. Tian, N. Yao, H. Y. Zhou i L. Q. Zhang (2010). "Effect of the hfq gene on 2,4-diacetylphloroglucinol production and the PcoI/PcoR quorum-sensing system in Pseudomonas fluorescens 2P24." FEMS Microbiol Lett **309**(1): 16-24.

Zaher, H. S. i R. Green (2014). "In vitro synthesis of proteins in bacterial extracts." Methods Enzymol **539**: 3-15.

Zhang, A., D. J. Schu, B. C. Tjaden, G. Storz i S. Gottesman (2013). "Mutations in interaction surfaces differentially impact E. coli Hfq association with small RNAs and their mRNA targets." J Mol Biol **425**(19): 3678-3697.

Zhang, A., K. M. Wassarman, J. Ortega, A. C. Steven i G. Storz (2002). "The Sm-like Hfq protein increases OxyS RNA interaction with target mRNAs." Mol Cell **9**(1): 11-22.

Zhou, X., R. Keller, R. Volkmer, N. Krauss, P. Scheerer i S. Hunke (2011). "Structural basis for two-component system inhibition and pilus sensing by the auxiliary CpxP protein." J Biol Chem **286**(11): 9805-9814.