

**mgr Maria Danuta Mamońska**

**Streszczenie rozprawy doktorskiej pt. „Kompetycja pomiędzy białkami wiążącymi cząsteczki RNA u *Escherichia coli*” w języku polskim**

## **STRESZCZENIE**

Organizmy bakteryjne wykształciły różnorodne mechanizmy w celu szybkiej adaptacji do zmieniających się warunków środowiska. Istotną rolę w potranskrypcyjnej regulacji genów u bakterii pełnią małe niekodujące cząsteczki RNA (sRNA), które biorą udział w regulacji większości szlaków komórkowych, procesów metabolicznych i reakcji stresowych w komórce. Mechanizm działania sRNA polega na oddziaływaniu z ich docelowymi mRNA do czego często wymagana jest obecność białek wiążących cząsteczki RNA. Białka te przyczyniają się między innymi do stabilizacji struktury RNA, ochrony przed degradacją oraz ułatwiają oddziaływanie pomiędzy cząsteczkami RNA.

Najlepiej poznanym bakteryjnym białkiem wiążącym cząsteczki RNA jest białko Hfq. W ostatnich latach zidentyfikowano również nową rodzinę białek wiążących RNA, które zawierają domenę FinO. Białka należące do rodziny FinO są wysoce konserwatywne i szeroko rozpowszechnione w różnych  $\beta$ - i  $\gamma$ -proteobakteriach, takich jak *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* oraz *Neisseria meningitidis*, które mają istotne znaczenie dla zdrowia człowieka. Komórki bakteryjne *Escherichia coli* posiadają dwa białka z domeną FinO: plazmidowe białko FinO oraz chromosomalne białko ProQ.

Analizy globalnego wiązania cząsteczek RNA w komórkach *Escherichia coli* oraz *Salmonella enterica* wykazały, że białka ProQ i Hfq oddziałują z różnymi, lecz częściowo nakładającymi się pulami cząsteczek RNA. Wykazano, że białka ProQ, Hfq oraz FinO wiążą RNA w obrębie regionów wewnętrznych spinek terminatorów transkrypcji. Dodatkowo, udowodniono, że obecność motywów bogatych w reszty adenosyny w RNA regulowanych przez ProQ ogranicza ich wiązanie przez Hfq. Nadal jednak nie wiadomo, jakie czynniki determinują specyficzność tych białek wobec docelowych cząsteczek RNA oraz jaki jest wpływ kompetycji i wzajemnych oddziaływań tych białek na selekcję RNA.

Celem niniejszej pracy doktorskiej było zbadanie mechanizmów selektywnego rozpoznawania cząsteczek RNA przez wybrane białka wiążące RNA u *Escherichia coli* oraz określenie czynników determinujących konkurencję i wzajemne oddziaływanie pomiędzy tymi białkami. W związku z tym skupiłam się na trzech uzupełniających się kierunkach badań: identyfikacji cech sekwencyjnych i strukturalnych cząsteczek RNA odpowiedzialnych za ich rozpoznawanie

przez białka z domeną FinO, analizie roli wybranych reszt aminokwasowych domeny FinO białka ProQ na wiązanie cząsteczek RNA w komórkach *Escherichia coli* oraz na zbadaniu znaczenia kompetycji i wzajemnych oddziaływań pomiędzy białkiem ProQ i Hfq na wiązane cząsteczek RNA w warunkach *in vivo*.

W pierwszej części pracy udowodniłam, że sekwencja nukleotydowa u podstawy spinki terminatorowej jest kluczowa w specyficznym rozpoznawaniu cząsteczek RNA przez białko ProQ i FinO. Nawet niewielkie różnice nukleotydowe w tym regionie mogą zmienić preferencje wiązania RNA przez badane białka. W drugiej części pracy doktorskiej zbadłam znaczenie wybranych reszt aminokwasowych w domenie FinO białka ProQ na wiązanie cząsteczek RNA w warunkach *in vivo*. Wyniki analizy RIP-seq wykazały, że mutacje w obrębie domeny FinO wpływają w zróżnicowany sposób na zdolność wiązania różnych cząsteczek RNA. Szczególnie istotna okazała się mutacja reszty argininy w pozycji 80, ponieważ prowadziła do znacznego osłabienia wiązania wielu RNA, szczególnie antysensowych RNA oraz cząsteczek należących do systemów toksyna-antytoksyna, takich jak cząsteczki z rodziny Sib RNA. Dalsze analizy strukturalne oraz mapowanie miejsc wiązania na cząsteczkach SibA oraz SibC wykazały, że białko ProQ oraz jego domena FinO wiąże się w rejonie spinki terminatorowej oraz w sąsiadujących elementach struktury drugorzędowej, co powoduje zmiany struktury badanego RNA. Co więcej, na przykładzie SibA i SibC sRNA wykazałam, że domena FinO rozpoznaje RNA zawierające terminator transkrypcji, podczas gdy pełnej długości białko ProQ wiąże również cząsteczki pozbawione tej struktury. Sugeruje to udział innych regionów białka w tworzeniu kompleksów RNA-białko. W ostatniej części pracy zbadłam kompetycję oraz wzajemne oddziaływania pomiędzy białkami ProQ i Hfq w komórkach *Escherichia coli*. Analiza RIL-seq pokazała, że białka te tworzą dynamiczny system regulacyjny, w którym wzajemnie na siebie wpływają. Zmiany poziomu stężenia jednego białka skutkowały zmianami w wiązanych parach RNA-RNA przez drugie białko, natomiast efekt ten różnił się w zależności od konkretnej pary RNA-RNA.

Podsumowując, wyniki niniejszej pracy doktorskiej wykazały, że selektywność oraz zakres oddziaływań białek ProQ, FinO oraz Hfq z wiazanymi cząsteczkami RNA są determinowane w sposób wielopoziomowy. Pojedyncze różnice w sekwencji nukleotydowej u podstawy struktury terminatora transkrypcji RNA zmieniają preferencje wiązania, natomiast mutacje w domenie FinO białka ProQ modyfikują oddziaływania z określonymi cząsteczkami RNA w komórce. Dodatkowo, kompetycja oraz wzajemne oddziaływanie pomiędzy białkiem ProQ i

Hfq kształtują pulę wiązanych RNA u *Escherichia coli*, stanowiąc ważny mechanizm regulacyjny, umożliwiający adaptację komórki do zmieniających się warunków środowiska.