

Maciej Basczok
Doktorant
Tel.: 724633268
Pracownia Biochemii RNA
Instytut Biologii Molekularnej
i Biotechnologii
Wydział Biologii UAM

STRESZCZENIE

Regulacja ekspresji genów z udziałem małych niekodujących cząsteczek RNA (sRNA) u bakterii jest często zależna od białek opiekuńczych. Oznacza to, że aby prawidłowo i efektywnie oddziaływać z mRNA, sRNA współpracują z odpowiednimi białkami. Najlepiej poznanym bakteryjnym białkiem opiekuńczym wiążącym RNA jest Hfq. Białko to wchodzi w interakcje z setkami transkryptów, zarówno sRNA, mRNA i tRNA, co czyni je centralnym elementem wielu sieci molekularnych oraz mechanizmów regulacyjnych i adaptacyjnych. Z kolei niedawne odkrycia pozwoliły na rozpoznanie nowej, znacznie bardziej zróżnicowanej rodziny białek opiekuńczych u bakterii – białek z domeną FinO. Białka z domeną FinO nie różnią się między sobą wyłącznie strukturą, ale także liczbą wiązanych RNA, niektóre wiążą ich wiele, inne zaledwie kilka. Mimo znacznego postępu jaki został poczyniony w zrozumieniu biologii białek z domeną FinO, szczegóły ich interakcji z RNA pozostają w większości nieznanne.

Z opublikowanych wcześniej przez inne zespoły danych z technik profilowania transkryptomu (CLIP-seq, RIL-seq i RIP-seq) wiadomo, że jedynym motywem strukturalnym w RNA rozpoznawanym przez białko ProQ, należące do rodziny białek z domeną FinO, jest Rho-niezależny terminator transkrypcji. Co ciekawe, motyw ten jest również jedynym znanym motywem w strukturze RNA wiążanym przez białko Hfq. Jednocześnie pule RNA wiązanych przez ProQ i Hfq pozostają zasadniczo odrębne. Nasuwa się zatem pytanie o motyw w strukturze terminatora, który mógłby decydować o tym, z którym białkiem, ProQ czy Hfq, dany RNA będzie oddziaływać. W pulach ligandów białek Hfq i ProQ wiązanych poprzez region Rho-niezależnego terminatora transkrypcji dotychczas nie znaleziono żadnych motywów w jego sekwencji lub strukturze, które byłyby odmienne. Dlatego też w pierwszej części pracy postanowiłem zbadać skład nukleotydowy 10-nukleotydowej sekwencji po stronie 5' spinek terminatorowych RNA wiązanych przez ProQ i Hfq u trzech bakterii: *E. coli*, *S. enterica* i *N. meningitidis*. Dane na temat RNA wiązanych przez Hfq i ProQ pochodziły z eksperymentów wykonanych przez zespoły prof. Giseli Storz i prof. Jörga Vogela. Analizowałem dane z: RIL-seq i CLIP-seq dla ProQ z *E. coli*, RIL-seq dla Hfq z *E. coli*, CLIP-seq dla ProQ i Hfq z *S. enterica*, CLIP-seq dla ProQ z *N. meningitidis* oraz z RIP-seq dla Hfq z *N. meningitidis*. Wykazałem, że RNA zawierające Rho-niezależny terminator transkrypcji wiązane przez białka ProQ i Hfq u *E. coli* i *S. enterica* wykazują istotną statystycznie różnicę w składzie nukleotydowym sekwencji po stronie 5' spinki terminatorowej. Ligandy białka ProQ były wzbogacone w adenozyne, natomiast ligandy białka Hfq w urydynie. Obecność adenozyne w tym regionie okazała się być motywem osłabiającym wiązanie przez Hfq, stanowi więc element konkurencji o ligandy między ProQ i Hfq. Z kolei u *N. meningitidis* pule RNA wiązane przez białka ProQ i Hfq wykazują jednakowe wzbogacenie w adenozyne w sekwencji po stronie 5' terminatora. Co ciekawe, wzbogacenie to jest cechą całego transkryptomu *N. meningitidis*. Zatem pytanie o przyczynę, dzięki której pule RNA wiązane przez białka ProQ i Hfq z *N. meningitidis* są zasadniczo odrębne, pozostaje otwarte.

W drugiej części pracy postanowiłem zbadać jak dotąd nieznanne szczegóły interakcji między białkiem ProQ z *N. meningitidis* a RNA. W eksperymentach in vitro wyznaczałem stałą równowagi dysocjacji podczas wiązania białka ProQ z *N. meningitidis* z szeregiem cząsteczek RNA, zarówno znanych jako jego ligandy oraz takich, które nie były notowane jako oddziałujące z ProQ. Wykazałem, że w warunkach in vitro białko ProQ z *N. meningitidis* specyficznie rozpoznaje i wiąże w RNA strukturę Rho-niezależnego terminatora transkrypcji, którego dostępność na końcu 3' ma krytyczne znaczenie dla siły wiązania. Pozbawienie cząsteczki RNA struktury terminatora prowadziło do zaniku oddziaływania z białkiem. Ponadto wydłużenie 3'-terminalnej sekwencji ogona oligo(U) skutkowało spadkiem powinowactwa do białka *N. meningitidis* ProQ. W samym oddziaływaniu uczestniczy również sekwencja po stronie 5' spinki terminatorowej, chociaż zakres jej wpływu na wiązanie może się różnić pomiędzy cząsteczkami RNA. W przypadku sRNA AniS skrócenie jej do 6

nukleotydów całkowicie uchyliło wiązanie, podczas gdy sekwencja o tej samej długości pozwalała na wciąż silne oddziaływanie rpmG-3'UTR z ProQ. Eksperymenty ze skróconym o górne pary nukleotydów regionem dwuniciowym spinki terminatorowej nie wykazały spadku siły wiązania RNA z białkiem *N. meningitidis* ProQ, co świadczy o tym, że interakcja zachodzi za pośrednictwem jej dolnej części. Ponadto udowodniłem kluczową rolę 3'-terminalnej sekwencji ogona oligo(U) w tym oddziaływaniu, ponieważ jego skrócenie poniżej sześciu reszt urydyny skutkowało osłabieniem powinowactwa RNA do białka ProQ.

Podsumowując, w pierwszej części pracy wykazałem, że u *E. coli* i *S. enterica* RNA wiązane przez białko ProQ są wzbogacone w adenozyne w sekwencji po stronie 5'spinki terminatorowej, a RNA oddziałujące z Hfq w analogicznym regionie są wzbogacone w urydynie, co może stanowić element mechanizmu konkurencji o RNA wiązane w regionie Rho-niezależnego terminatora transkrypcji przez oba białka. Jednakże u *N. meningitidis* takiej różnicy nie zaobserwowałem. W drugiej części pracy udowodniłem, że w interakcji z białkiem ProQ z *N. meningitidis* bierze udział dolna część spinki terminatorowej wraz z przyległą sekwencją po stronie 5' oraz 3'-terminalną sekwencją ogona oligo(U).