

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Wydział Biologii



Maria Danuta Mamońska

**Kompetycja pomiędzy białkami wiążącymi
cząsteczki RNA u *Escherichia coli***

Rozprawa doktorska wykonana w Pracowni Biochemii RNA

pod kierunkiem prof. dr hab. Mikołaja Olejniczaka

Poznań 2026

*Najserdeczniejsze podziękowania składam mojemu opiekunowi naukowemu, **prof. dr hab. Mikołajowi Olejniczakowi** za poświęcony czas, opiekę merytoryczną, okazywaną życzliwość i nieocenioną pomoc w trakcie powstawania pracy doktorskiej.*

*Dziękuję byłym i obecnym **pracownikom Pracowni Biochemii RNA** za pomoc, przekazywaną wiedzę, cenne porady, a szczególnie za miłą atmosferę podczas pracy.*

*Chciałabym również podziękować moim **Rodzicom** za wiarę we mnie i nieustające wsparcie na każdym etapie.*

*Ogromne podziękowania kieruję dla mojego **Męża Łukasza** za nieopisane zrozumienie, wsparcie, cierpliwość i motywację w chwilach zwątpienia.*

Spis treści

STRESZCZENIE	6
ABSTRACT	8
1. WSTĘP	10
1.1. Wprowadzenie	10
1.2. Regulatorowe RNA u bakterii.....	11
1.2.1. Ryboprzełączniki.....	11
1.2.2. Termometry RNA.....	12
1.2.3. CRISPR RNA.....	12
1.2.4. Małe niekodujące cząsteczki RNA (sRNA)	13
1.3. Białka bakteryjne zaangażowane w regulację zależną od sRNA.....	15
1.3.1. Białko Hfq.....	17
1.3.2. Białka z rodziny FinO	20
2. CELE PRACY	29
3. MATERIAŁY	30
3.1. Odczynniki.....	30
3.2. Enzymy	32
3.3. Zestawy.....	33
3.4. Bufory i roztwory.....	33
3.4.1. Bufory komercyjne.....	33
3.4.2. Bufory przygotowywane	34
3.4.3. Roztwory	35
3.5. Szczepy bakteryjne	35
3.6. Plazmidy bakteryjne.....	36
3.7. Oligodeksyrybonukleotydy wykorzystane w reakcji wydłużania starterów	37
3.8. Oligodeksyrybonukleotydy użyte do konstrukcji biblioteki w metodzie RIL-seq.....	38
3.9. Oligodeksyrybonukleotydy wykorzystane do reakcji łańcuchowej polimerazy w procesie tworzenia konstruktów	39
4. METODY	40
4.1. Otrzymywanie cząsteczek DNA	40
4.1.1. Oczyszczanie oligodeksyrybonukleotydów	40
4.1.2. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR).....	40
4.1.3. Reakcja wydłużania starterów	42
4.2. Otrzymywanie cząsteczek RNA	43
4.2.1. Transkrypcja <i>in vitro</i>	43
4.2.2. Oczyszczanie RNA po reakcji transkrypcji <i>in vitro</i>	44
4.2.3. Znakowanie cząsteczek RNA.....	44

4.3.	Elektroforeza.....	45
4.3.1.	Elektroforeza w żelu agarozowym.....	45
4.3.2.	Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących.....	45
4.3.3.	Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym z dodecylsiarczanem sodu (SDS-PAGE).....	46
4.4.	Metody inżynierii genetycznej.....	46
4.4.1.	Projektowanie i przygotowanie konstruktów do nadekspresji	46
4.4.2.	Wprowadzenie sekwencji kodującej miejsce Shine-Dalgarno do wektora pNM46....	47
4.4.3.	Trawienie restrykcyjne	48
4.4.4.	Defosforylacja plazmidu	49
4.4.5.	Ligacja.....	49
4.5.	Metody mikrobiologiczne	50
4.5.1.	Transformacja.....	50
4.5.2.	Kolonijny PCR	50
4.5.3.	Izolacja plazmidów	51
4.5.4.	Otrzymywanie komórek kompetentnych	51
4.6.	Metody biologii molekularnej.....	52
4.6.1.	Western blot.....	52
4.6.2.	Wyznaczanie stałej równowagi dysocjacji (K_d) dla kompleksów RNA-białko.....	53
4.6.3.	Test kompetycji	54
4.6.4.	Technika oddziaływania RNA przez ligację i sekwencjonowanie (RIL-seq)	55
4.6.5.	Immunoprecypitacja RNA połączona z sekwencjonowaniem (RIP-seq).....	63
4.6.6.	Wyznaczanie struktury drugorzędowej RNA metodą hydrolizy enzymatycznej oraz cięcia jonami ołowiu (II)	65
4.6.7.	Wyznaczenie miejsc wiązania białka w cząsteczce RNA za pomocą hydrolizy enzymatycznej	67
5.	WYNIKI.....	68
5.1.	Znaczenie sekwencji nukleotydowych otaczających spinki terminatorowe w rozróżnianiu cząsteczek RNA przez białka ProQ i FinO	68
5.1.1.	Porównanie wiązania cząsteczek RNA <i>malM-3'</i> i FinP przez białka ProQ i FinO	68
5.1.2.	Sekwencje znajdujące się u podstawy spinki terminatorowej są odpowiedzialne za rozpoznawanie cząsteczek RNA <i>malM-3'</i> i FinP przez białka ProQ i FinO	70
5.1.3.	Preferencyjne rozpoznawanie RNA <i>cspE81-3'</i> przez białko ProQ jest zależne od sekwencji znajdujących się u podstawy spinki terminatorowej	72
5.1.4.	Preferencyjne rozpoznawanie RNA RepX przez białko FinO jest zależne od sekwencji znajdujących się u podstawy spinki terminatorowej	76
5.1.5.	Analiza elementów sekwencji RNA odpowiedzialnych za ich rozpoznawanie przez białka ProQ i FinO na przykładzie mutantów <i>malM-3'</i> i FinP	80
5.1.6.	Analiza kompetycji pomiędzy białkiem ProQ i FinO o wiązanie cząsteczek RNA....	85

5.2.	Rozpoznawanie różnych cząsteczek RNA przez białko ProQ w komórkach <i>Escherichia coli</i>	91
5.2.1.	Charakterystyka mutantów białka ProQ i przygotowanie prób do immunoprecypitacji RNA połączonej z sekwencjonowaniem (RIP-seq)	92
5.2.2.	Analiza globalnego profilu RNA oddziałujących z mutantami białka ProQ metodą RIP-seq	94
5.2.3.	Znaczenie motywu terminatora transkrypcji dla wiązania cząsteczek SibA i SibC sRNA przez białko ProQ oraz domenę FinO białka ProQ (ProQ ^{NTD})	100
5.2.4.	Analiza struktury drugorzędowej cząsteczek SibA oraz SibC sRNA	102
5.2.5.	Analiza oddziaływania cząsteczek SibA i SibC sRNA z białkiem ProQ oraz domeną FinO (ProQ ^{NTD}).....	106
5.3.	Znaczenie kompetycji oraz funkcjonalnej zależności pomiędzy ProQ i Hfq dla wiązania RNA przez te białka w warunkach <i>in vivo</i>	110
5.3.1.	Otrzymanie i walidacja plazmidów ekspresyjnych kodujących białka ProQ i Hfq oraz optymalizacja warunków nadekspresji	111
5.3.2.	Globalna analiza zmian w oddziaływaniach RNA-RNA metodą RIL-seq: porównanie szczepów Hfq-FLAG i ProQ-3XFLAG przy ekspresji drugiego białka z endogennego genu	114
5.3.3.	Globalna analiza zmian w oddziaływaniach RNA-RNA związanych z Hfq-FLAG metodą RIL-seq w warunkach nadekspresji białka ProQ	118
5.3.4.	Globalna analiza zmian w oddziaływaniach RNA-RNA związanych z ProQ-3XFLAG metodą RIL-seq w warunkach nadekspresji Hfq	121
6.	DYSKUSJA.....	125
6.1.	Sekwencja nukleotydowa otaczająca podstawę spinki terminatorowej decyduje o selektywnym rozpoznawaniu cząsteczek RNA przez białko ProQ i FinO	126
6.2.	Znaczenie reszt aminokwasowych domeny FinO białka ProQ dla wiązania cząsteczek RNA <i>in vivo</i> u <i>Escherichia coli</i>	130
6.3.	Kompetycja oraz wzajemne oddziaływania pomiędzy białkami ProQ i Hfq jako mechanizm regulujący pulę RNA <i>in vivo</i> u <i>Escherichia coli</i>	133
7.	WNIOSKI.....	137
	SPIS STOSOWANYCH SKRÓTÓW I SYMBOLI.....	139
	BIBLIOGRAFIA.....	142

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 β - i γ -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 adenozyliny 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 zbadalam 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 zbadalam 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.

ABSTRACT

Bacterial organisms have evolved a variety of mechanisms that enable rapid adaptation to changing environmental conditions. Small non-coding RNAs (sRNAs) play a crucial role in post-transcriptional gene regulation in bacteria, participating in the regulation of most cellular pathways, metabolic processes and stress responses. The mechanism of sRNA action relies on interactions with their target mRNAs, which often require the presence of RNA-binding proteins. These proteins contribute, among other functions, to the stabilization of RNA structure, protection against degradation and facilitation of RNA-RNA interactions.

The most characterized bacterial RNA-binding protein is Hfq. In recent years, a new family of RNA-binding proteins containing the FinO domain has also been identified. Proteins that belong to the FinO family are highly conserved and widely distributed among various β - and γ -proteobacteria, such as *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Neisseria meningitidis*, which are significant for human health. *Escherichia coli* cells encode two FinO-domain proteins: the plasmid-encoded FinO protein and the chromosomally encoded ProQ protein.

Global analyses of RNA binding in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* have shown that ProQ and Hfq interact with distinct but partially overlapping pools of RNA molecules. It has been demonstrated that ProQ, Hfq and FinO bind RNA within internal regions of transcription terminator hairpins. Furthermore, the presence of adenosine-rich motifs in ProQ-regulated RNAs has been shown to limit their binding by Hfq. However, the factors that determine the specificity of these proteins toward their target RNAs, as well as the impact of competition and mutual interactions between these proteins on RNA selection, remain largely unknown.

The aim of this doctoral thesis was to investigate the mechanisms underlying selective RNA recognition by selected RNA-binding proteins in *Escherichia coli* and to identify factors determining competition and mutual interactions between these proteins. This work focused on three complementary research directions: identification of sequence and structural features of RNA molecules responsible for their recognition by FinO-domain proteins, analysis of the role of selected amino acid residues within the FinO domain of ProQ in RNA binding in *Escherichia coli* cells, and investigation of the significance of competition and mutual interactions between ProQ and Hfq in shaping RNA binding *in vivo*.

In the first part of this work, I demonstrated that the nucleotide sequence at the base of the transcription terminator hairpin is critical for the specific recognition of RNA molecules by ProQ and FinO. Even minor nucleotide differences in this region can alter RNA-binding

preferences of the studied protein. In the second part of the thesis, I examined the role of selected amino acid residues within the FinO domain of ProQ in RNA binding under *in vivo* conditions. RIP-seq analysis revealed that mutations within the FinO domain differentially affect the binding capacity of ProQ toward distinct RNA molecules. A mutation of the arginine residue at position 80 proved to be particularly significant, as it resulted in a substantial reduction in the binding of many RNAs, especially antisense RNAs and RNAs that belong to toxin-antitoxin systems, such as members of the Sib RNA family.

Further structural analyses and mapping of binding sites on SibA and SibC RNAs showed that ProQ and its FinO domain bind within the terminator hairpin region as well as adjacent secondary structure elements, inducing structural changes in the RNA. Moreover, using SibA and SibC sRNAs as examples, I demonstrated that the FinO domain recognizes RNAs containing a transcription terminator, whereas full-length ProQ is also capable of binding RNAs lacking this structure. This suggests that regions outside the FinO domain contribute to RNA-protein complex formation. In the final part of this work, I investigated competition and interactions between ProQ and Hfq in *Escherichia coli* cells. RIL-seq analysis showed that these proteins form a dynamic regulatory system in which they influence each other. Changes in the cellular level of one protein resulted in alterations in RNA-RNA pairs bound by the other protein, with the magnitude and direction of the effect depending on the specific RNA-RNA pair.

In summary, the results of this doctoral thesis demonstrate that the selectivity and range of interactions between ProQ, FinO and Hfq and their associated RNA molecules are determined in a multilayered manner. Single nucleotide differences at the base of RNA transcription terminator structures alter binding preferences, while mutations within the FinO domain of ProQ modulate interactions with specific RNA molecules in the cell. In addition, competition and mutual interactions between ProQ and Hfq shape the pool of bound RNAs in *Escherichia coli*, representing an important regulatory mechanism that enables cellular adaptation to changing environmental conditions.

1. WSTĘP

1.1. Wprowadzenie

Regulacja ekspresji genów u bakterii jest kluczowym procesem, który umożliwia adaptację do zmieniających się warunków środowiska. Proces ten może zachodzić na różnych poziomach: transkrypcyjnym, potranskrypcyjnym, translacyjnym oraz potranslacyjnym. Pierwszym etapem regulacji ekspresji genów jest proces transkrypcji, podczas której informacja genetyczna zawarta w cząsteczce DNA jest przepisywana na cząsteczkę matrycowego RNA (mRNA). Inicjacja transkrypcji jest kontrolowana przez białka regulatorowe, takie jak aktywatory i represory, które wpływają na ekspresję genów, dostosowując ją do aktualnych potrzeb komórki (Kormanec 2022). Poziom potranskrypcyjny obejmuje mechanizmy kontrolujące transkrypty mRNA wpływające na ich dojrzewanie, stabilność oraz efektywność translacji. Z kolei, regulacja translacyjna zachodzi podczas syntezy białek na matrycy mRNA, natomiast potranslacyjna wpływa na aktywność powstałych białek poprzez ich modyfikacje, takie jak acetylacja czy fosforylacja (Tollerson i Ibba 2020).

Istotną rolę w regulacji ekspresji genów odgrywają cząsteczki RNA, które uczestniczą w różnych etapach tego procesu, pełniąc funkcję pośredniczącą oraz regulatorową. Rola pośrednicząca RNA polega na przekazywaniu informacji genetycznej zawartej w DNA do miejsca syntezy białka. Przykładem RNA pełniącego funkcję pośredniczącą są między innymi cząsteczki mRNA, które stanowią matrycę dla rybosomu w trakcie syntezy białek oraz transportowe RNA (tRNA), które transportują aminokwasy do rybosomów w trakcie powstawania białka w procesie translacji (Alberts i wsp. 2003).

Cząsteczki RNA pełnią również funkcje regulatorowe w ekspresji genów u bakterii, co jest szczególnie istotne w związku z odpowiedzią na często zmieniające się warunki środowiska. Wspecjalizowane mechanizmy regulacyjne przyczyniają się do precyzyjnego dostosowania aktywności metabolicznej oraz odpowiedzi na czynniki stresowe, takie jak między innymi zmiany temperatury, niedobór składników odżywczych czy obecność antybiotyków. Regulatorowe cząsteczki RNA u bakterii, często wymagają udziału białek wiążących RNA, takich jak ProQ, Hfq czy FinO, które wpływają na oddziaływania między tymi cząsteczkami, a ich docelowymi mRNA na poziomie potranskrypcyjnym, wpływając na ich stabilność, degradację czy translację (Attaiech i wsp. 2017; Hör i wsp. 2020).

W niniejszej pracy doktorskiej zbadano proces kompetycji oraz oddziaływań białka ProQ, Hfq i FinO z *Escherichia coli* z cząsteczkami RNA. W tym celu wybrano RNA specyficzne dla

każdego z badanych białek oraz wprowadzono mutacje nukleotydowe w określonych regionach, co pozwoliło na zidentyfikowanie motywów istotnych dla rozpoznawania RNA przez badane białka. Dodatkowo, zbadano w jaki sposób konkurencji między białkami wiążącymi RNA wpływa na pulę RNA wiązanych przez białko ProQ i Hfq *in vivo* oraz wykazano, w jaki sposób mutacje w białku ProQ wpływają na oddziaływanie z docelowymi cząsteczkami RNA w komórce.

1.2. Regulatorowe RNA u bakterii

Regulatorowe cząsteczki RNA u bakterii uczestniczą w kluczowych mechanizmach ekspresji genów umożliwiając kontrolę w licznych procesach biologicznych takich jak tworzenie biofilmu, wirulencja czy odpowiedź na czynniki stresowe oraz antybiotyki. Cząsteczki te mogą wpływać na różne etapy ekspresji genów, między innymi na transkrypcję, stabilność mRNA oraz translację (Mahendran i wsp. 2022).

Ze względu na lokalizację rozróżnia się regulatorowe RNA kodowane w *cis* oraz w *trans*. Cząsteczki RNA kodowane w *cis*, są kodowane na przeciwnej nici DNA do regulowanego RNA i są do niego w pełni komplementarne. Natomiast cząsteczki RNA kodowane w *trans*, są zlokalizowane w innym miejscu genomu niż ich docelowe RNA i charakteryzują się tylko częściową komplementarnością względem siebie. Do regulatorowych RNA kodowanych w *cis* zalicza się przede wszystkim ryboprzełączniki, termometry RNA oraz część małych niekodujących RNA (sRNA). Z kolei, regulatorowe RNA kodowane w *trans* to przede wszystkim większość cząsteczek sRNA. Odrębną grupę regulatorowych RNA u bakterii stanowią RNA w systemie CRISPR w postaci cząsteczek CRISPR RNA (crRNA). Cząsteczki te kierują białko Cas w celu rozpoznania oraz degradacji obcego DNA, zapewniając oporność bakterii na bakteriofagi (Waters i Storz 2009).

1.2.1. Ryboprzełączniki

Ryboprzełączniki należą do grupy regulatorowych RNA kodowanych w *cis*, które najczęściej zlokalizowane są w rejonie 5' nieulegającym translacji (5'UTR) w cząsteczkach mRNA u bakterii. Zbudowane są z dwóch regionów: aptamerowego oraz platformy ekspresyjnej, zlokalizowanej bezpośrednio za nim. Funkcja ryboprzełączników polega na wykrywaniu małych cząsteczek lub jonów i na ich selektywnym wiązaniu w rejonie aptamerowym. W konsekwencji ich przyłączenia następuje zmiana konformacyjna platformy ekspresyjnej powodująca różne efekty regulacji ekspresji genów. Skutkiem zmian struktury ryboprzełącznika może być między innymi zatrzymanie procesu syntezy powstającego mRNA

lub blokowanie miejsca wiązania rybosomu do mRNA, sekwencji Shine-Dalgarno, co powoduje zahamowanie procesu translacji. Ze względu na swoją selektywność, ryboprzełączniki stały się potencjalnym celem terapeutycznym, za pomocą którego można potencjalnie wpływać na kontrolowanie namnażania się komórek bakteryjnych w organizmie (Mahendran i wsp. 2022).

1.2.2. Termometry RNA

Organizmy bakteryjne stosują różnorodne strategie aby regulować ekspresję genów w zależności od temperatury. Przykładem regulatorowych RNA u bakterii, których działanie zależy od temperatury są termometry RNA. Struktury te zazwyczaj występują w regionie 5' w cząsteczce mRNA, nie ulegającym translacji (5'UTR). Ich działanie polega na zmianie swojej struktury przestrzennej w odpowiedzi na warunki termiczne, kontrolując przez to proces translacji. Zmiana ta wpływa na dostępność sekwencji Shine-Dalgarno, co w konsekwencji może prowadzić do zahamowania lub uruchomienia syntezy białek. Termometry RNA są szczególnie ważne dla genów odpowiedzialnych między innymi za wirulencję oraz produkcję białek szoku cieplnego. W rezultacie organizmy bakteryjne są w stanie dostosować swoje procesy metaboliczne oraz strategie przetrwania do zmiennych warunków środowiskowych (Kortmann i wsp. 2012).

1.2.3. CRISPR RNA

System CRISPR (ang. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) został zaobserwowany po raz pierwszy w 1987 roku u *Escherichia coli* i stanowi jedno z najbardziej przełomowych odkryć ostatnich lat w dziedzinie biologii molekularnej (Ishino i wsp. 1987). W kolejnych latach wykazano, że służy on do obrony przed infekcjami wirusowymi oraz zapobiega koniugacji plazmidów u bakterii. Co więcej, system CRISPR wykorzystano do opracowania narzędzia do precyzyjnej edycji genomu organizmów oraz kontrolowania poziomu transkrypcji określonych genów, co znacząco przyczyniło się do rozwoju biotechnologii i genetyki (Doudna i Charpentier 2014).

System CRISPR występuje u licznych gatunków bakteryjnych i złożony jest z powtarzających się sekwencji CRISPR oraz genów Cas. Sekwencje CRISPR obejmują region liderowy oraz następujące po nim serie sekwencji powtarzających się, oddzielonych od siebie przerywnikami, pochodzącymi od wirusów lub plazmidów. Z kolei, geny *Cas*, kodują białka Cas, które mogą wykazywać zróżnicowane funkcje, w tym aktywność endonukleazową, egzonukleazową i helikazową. Dodatkowo, białka Cas mogą posiadać domeny wiążące cząsteczki RNA i DNA

oraz mogą uczestniczyć w regulacji transkrypcji. Jednym z ważniejszych elementów w systemie CRISPR jest białko Cas9, endonukleaza przecinająca obcą sekwencję DNA, w konsekwencji powodując ochronę przed infekcjami wirusowymi i plazmidami (Sorek i wsp. 2008; Waters i Storz 2009).

Proces obronny w systemie CRISPR składa się z trzech etapów: adaptacji, transkrypcji oraz interferencji. W pierwszym etapie po zakażeniu bakteriofagiem lub plazmidem kompleks białkowy składający się z białka Cas 1 i 2 łączy obce DNA i włącza je do sekwencji CRISPR w postaci nowego przerywnika. Następnie, podczas etapu transkrypcji, sekwencja CRISPR jest transkrybowana w celu wytworzenia cząsteczek crRNA, zawierających sekwencje pochodzące z obcego DNA. W ostatnim etapie, w momencie ponownego zakażenia wirusem, cząsteczka crRNA komplementarnie wiąże się do obcego DNA i aktywuje białko Cas 9, które przecina wirusowe lub plazmidowe DNA, uniemożliwiając dalszą infekcję. W konsekwencji, system CRISPR tworzy mechanizm ochronny, dzięki któremu organizmy bakteryjne mogą skutecznie zapobiegać infekcjom (Mu i wsp. 2022).

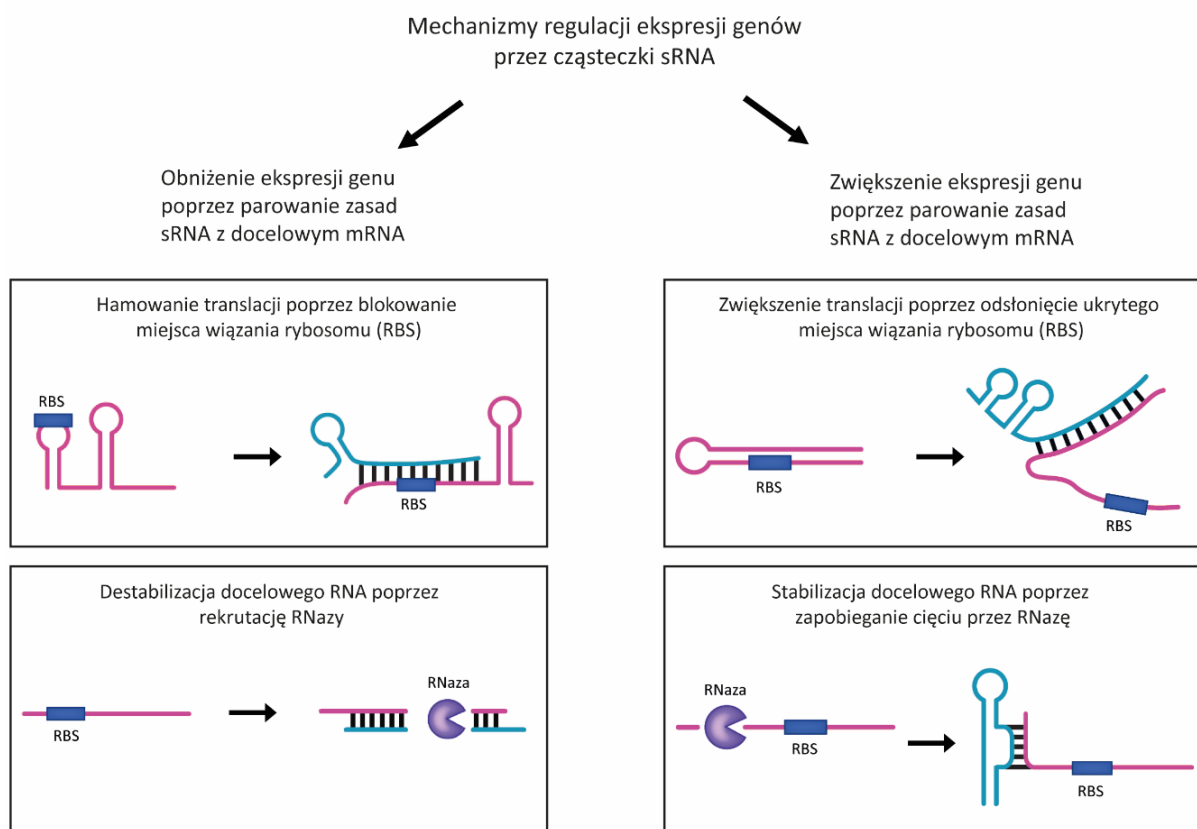
1.2.4. Małe niekodujące cząsteczki RNA (sRNA)

Małe niekodujące RNA (sRNA) są niezwykle ważnymi cząsteczkami związanymi z potranskrypcyjną regulacją ekspresji genów u większości gatunków bakteryjnych. Zbudowane są zazwyczaj z 50 do 400 nukleotydów i mogą być kodowane w układzie *cis* lub *trans*. Dominującą grupę stanowią cząsteczki sRNA kodowane w *trans*, których sekwencja zlokalizowana jest w innym miejscu niż regulowane mRNA, z którymi wykazują tylko częściową komplementarność (Nitzan i wsp. 2017).

Cząsteczki sRNA były głównie identyfikowane w regionach międzygenowych, jednak z biegiem lat wykazano, że wiele sRNA powstaje w wyniku modyfikacji cząsteczek mRNA, pochodząc również z ich regionów 5' UTR (Wen i wsp. 2012) oraz 3' UTR, które nie ulegają translacji (Kim i wsp. 2014). Co więcej, niektóre cząsteczki sRNA mogą znajdować się między genami operonu i regulować jego ekspresję. Przykładem jest cząsteczka RyhB sRNA u *Escherichia coli*, która jest komplementarna do części operonu *sdhCDAB*, wpływając na regulację genów zaangażowanych w metabolizm żelaza i reagując na jego niedobór w komórkach (Massé i wsp. 2002).

Cząsteczki sRNA są zazwyczaj zbudowane z trzech głównych domen: sekwencji oddziałującej z docelową cząsteczką RNA, miejscem wiązania białka wiążącego RNA oraz terminatora transkrypcji (Papenfort i Melamed 2023). Małe niekodujące RNA regulują ekspresję wielu

genów, głównie na poziomie potranskrypcyjnym, co sprawia, że są one częścią złożonych sieci regulacyjnych u organizmów bakteryjnych (Brosse i Guillier 2018). Ich działanie polega na wiązaniu się z docelowym mRNA wpływając na jego stabilność oraz translację. Oddziaływanie sRNA z mRNA w większości prowadzi do negatywnych skutków, takich jak między innymi zablokowanie miejsca wiązania rybosomu, degradacja cząsteczki mRNA, czy wczesna terminacja transkrypcji. Niemniej jednak, niektóre małe niekodujące cząsteczki RNA mogą wpływać pozytywnie na translację, poprzez zmianę struktury mRNA odblokowując miejsce Shine-Dalgarno pozwalając na związanie rybosomu lub na stabilizację mRNA oraz ochronę przed cięciem enzymatycznym (Rys. 1) (Waters i Storz 2009).



Rysunek 1. Mechanizmy potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów przez cząsteczki sRNA. Wykonano na podstawie (Nitzan i wsp. 2017), zmodyfikowano.

Cząsteczki sRNA zaangażowane są w liczne procesy komórkowe oraz odgrywają kluczową rolę w odpowiedzi na dostępność składników odżywczych. Przykładem takiego mechanizmu jest cząsteczka sRNA ChiX, która kontroluje syntezę transporterów chityny w zależności od jej dostępności. Przy niskim poziomie chityny, cząsteczka ChiX hamuje ekspresję operonów *chiZPQ* i *chbBCARFG*, które kodują białka zaangażowane w jej transport, co pozwala na adaptację metabolizmu komórki do zmieniających się warunków środowiskowych. Innym

przykładem jest cząsteczka sRNA FarS u *Vibrio cholerae*, która hamuje ekspresję enzymów FadE, które biorą udział w degradacji kwasów tłuszczowych. Oznacza to, że gdy komórka syntetyzuje kwasy tłuszczowe, FarS działa, aby zapobiec ich (jednoczesnej) degradacji, co umożliwia efektywną regulację metabolizmu (Papenfort i Storz 2024).

Dodatkowo, cząsteczki sRNA wpływają między innymi na tworzenie biofilmu, wirulencję, odpowiedź na stres czy adaptację do zmieniających się warunków środowiska. W celu pełnienia swoich funkcji cząsteczki sRNA często do swojego działania wymagają obecności białek wiążących RNA, które pomagają w wiązaniu, stabilizacji, czy oddziaływaniu z docelowymi cząsteczkami mRNA (Nitzan i wsp. 2017).

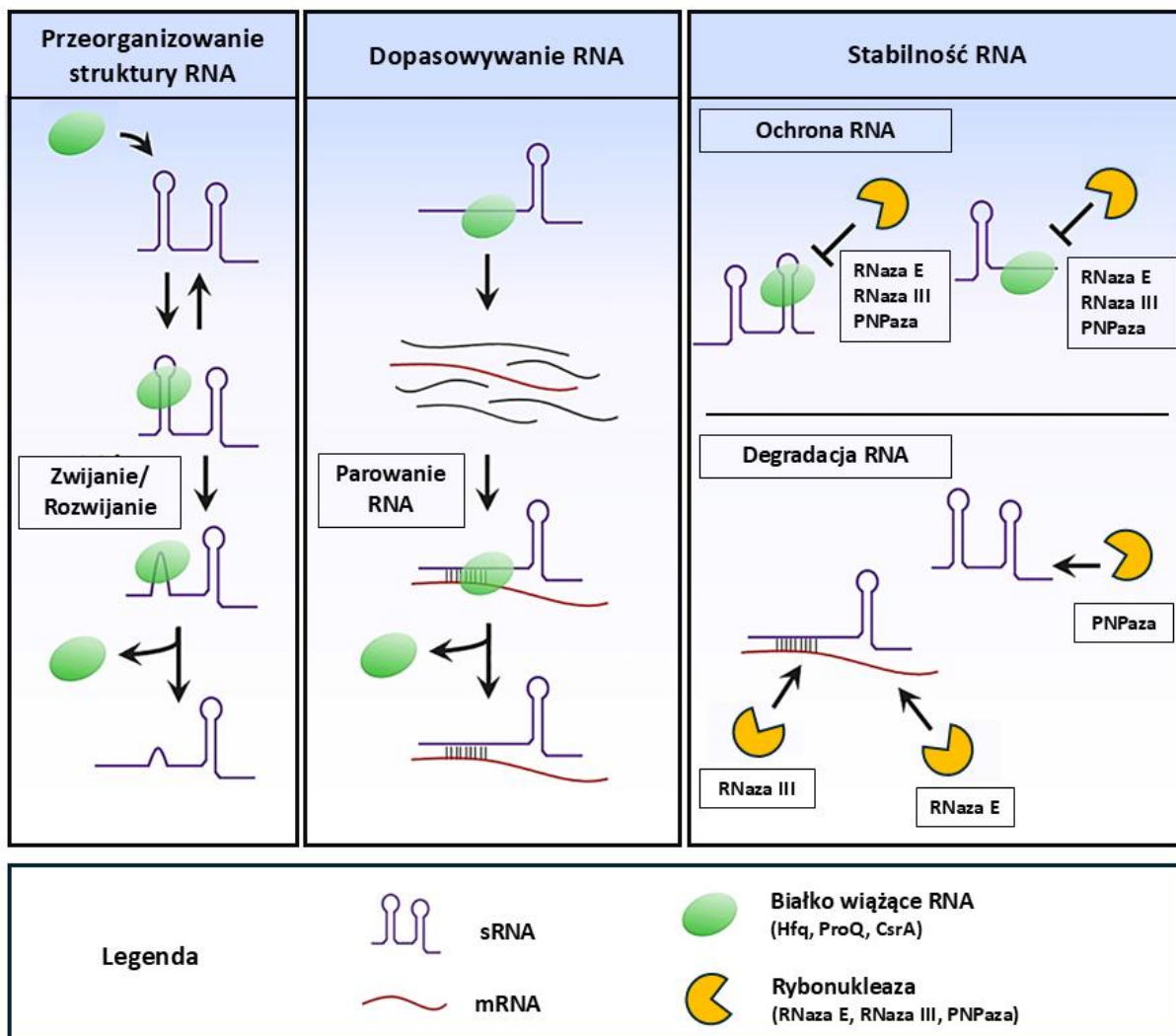
1.3. Białka bakteryjne zaangażowane w regulację zależną od sRNA

U organizmów bakteryjnych małe niekodujące cząsteczki RNA (sRNA) pełnią kluczową rolę w potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów. W zdecydowanej większości działanie cząsteczek sRNA jest ściśle zależne od białek wiążących RNA (ang. *RNA-binding proteins*, RBP) (Holmqvist i Vogel 2018).

Działanie białek wiążących RNA polega głównie na ułatwianiu parowania zasad pomiędzy cząsteczką sRNA, a jej docelowym mRNA (Rys. 2). W konsekwencji, wspomagają one tworzenie kompleksów sRNA-mRNA. Co więcej, białka wiążące RNA mogą wpływać na zmianę aranżacji struktury drugorzędowej sRNA, co może prowadzić do optymalizacji ich funkcji regulatorowych. Destabilizacja motywów drugorzędowych RNA może powodować odsłonięcie sekwencji niezbędnych do parowania z docelowymi cząsteczkami RNA, co ułatwia tworzenie się kompleksów sRNA-mRNA (Holmqvist i Vogel 2018; Quendera i wsp. 2020). Ponadto, białka te mogą wpływać również na strukturę mRNA, czego przykładem jest białko CspE u *Escherichia coli*, które wiążąc się do *rpoS* mRNA powoduje rozwinięcie jego struktury drugorzędowej stymulując translację. Cząsteczka *rpoS* mRNA koduje czynnik sigma S, który jest głównym regulatorem odpowiedzi komórki na różne formy stresu, takie jak stres oksydacyjny, osmotyczny czy zmiany temperatury (Phadtare i wsp. 2002).

Białka wiążące RNA mogą także wpływać na stabilność cząsteczek RNA poprzez ich ochronę przed degradującym działaniem rybonukleaz, takich jak RNaza E, RNaza III, czy PNPaza, które są odpowiedzialne za degradację RNA (Quendera i wsp. 2020).

Białka wiążące RNA są zatem kluczowe dla większości procesów komórkowych u bakterii, a do najlepiej scharakteryzowanych tego typu białek należą Hfq oraz ProQ (Quendera i wsp. 2020).

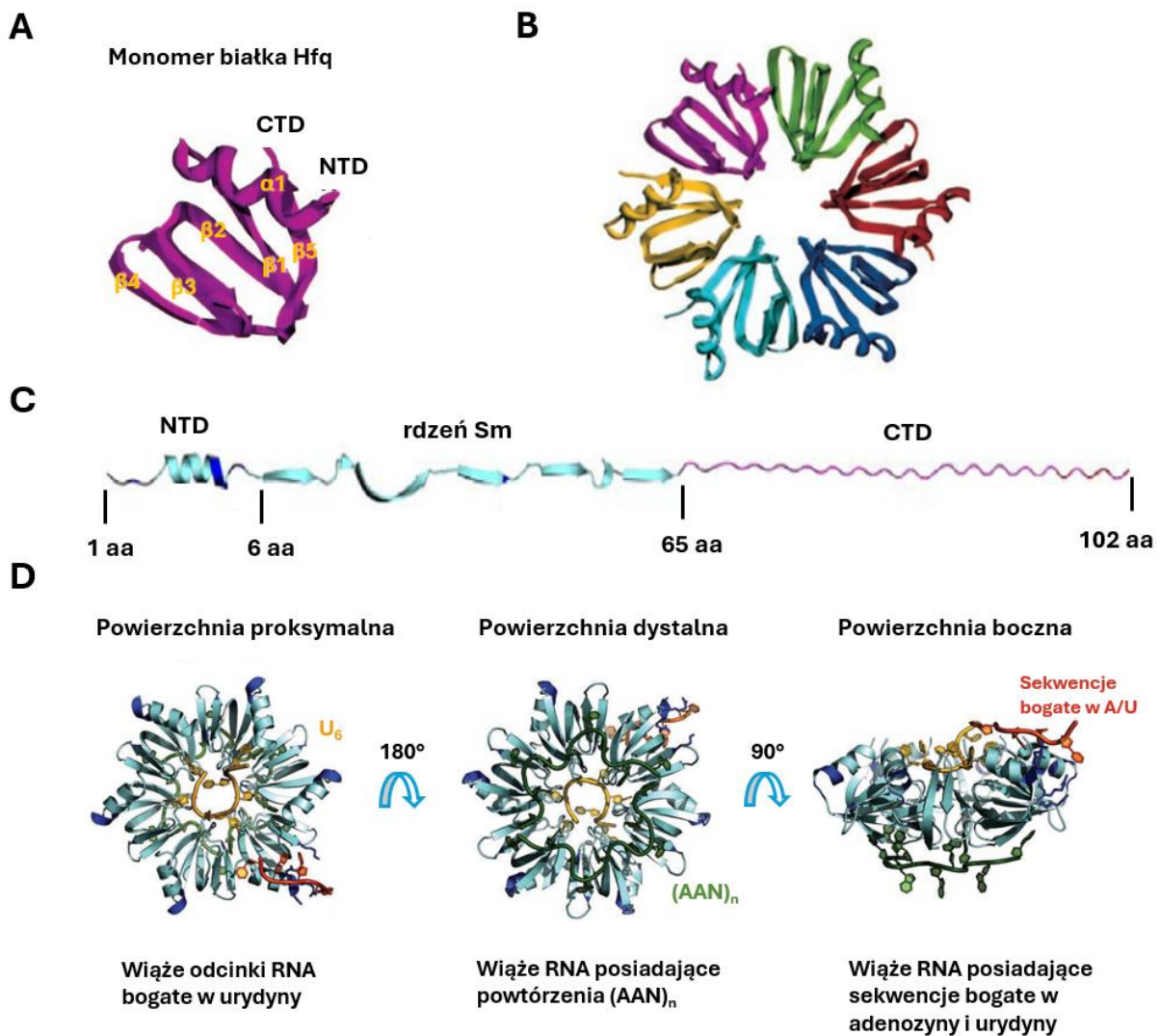


Rysunek 2. Schemat działania białek wiążących RNA na cząsteczki sRNA. Wykonano na podstawie (Quendera i wsp. 2020), zmodyfikowano.

1.3.1. Białko Hfq

Najlepiej poznanym białkiem wiążącym cząsteczki RNA, które reguluje ekspresję genów na poziomie potranskrypcyjnym u bakterii jest białko Hfq (ang. *Host factor for phage Q β replication*). Białko to jest filogenetycznie zakonserwowane i występuje u licznych gatunków *Proteobacteria* takich jak *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Yersinia pestis*, *Pseudomonas aeruginosa* czy *Vibrio cholerae* (Sun i wsp. 2002). Początkowo zostało zidentyfikowane jako czynnik gospodarza wymagany do replikacji faga Q β , natomiast dalsze badania wykazały, że jego główną funkcją jest regulacja ekspresji genów, realizowana poprzez oddziaływanie z małymi niekodującymi RNA (sRNA) oraz ich docelowymi cząsteczkami mRNA (Franze de Fernandez i wsp. 1968; Cech i wsp. 2016).

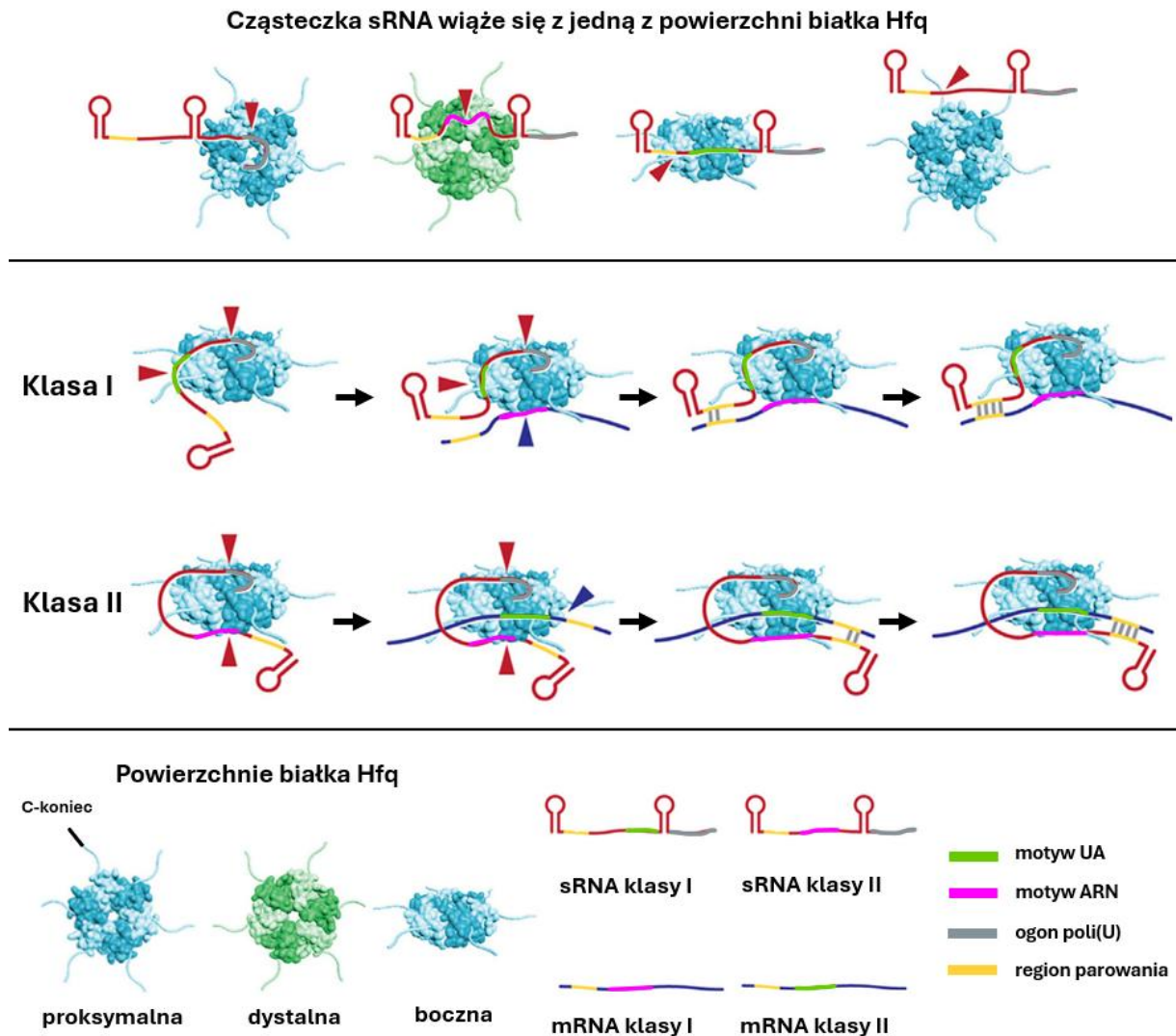
Analiza strukturalna białka Hfq wykazała, że jest ono podobne do eukariotycznych białek Sm, które wchodzi w skład spliceosomu odpowiedzialnego za dojrzewanie pre-mRNA poprzez usuwanie intronów. Białko Hfq tworzy homoheksameryczny pierścień, zbudowany z sześciu identycznych podjednostek, z których każda ma masę około 11 kDa (Rys. 3A,B,C). Podjednostka Hfq zawiera charakterystyczny dla rodziny białek Sm motyw strukturalny, obejmujący pięć antyrównoległych elementów β -harmonijki oraz pojedynczej α -helisy (Schumacher i wsp. 2002). W strukturze białka Hfq wyróżnia się cztery regiony, które mogą oddziaływać z cząsteczkami RNA: powierzchnię proksymalną, dystalną, boczną oraz C-koniec (Rys. 3D). Strona proksymalna jest kluczowa do formowania kompleksu RNA-mRNA, wiążąc głównie cząsteczki sRNA oraz wykazując wysokie powinowactwo do odcinków RNA bogatych w reszty urydyny. Powierzchnia dystalna uczestniczy głównie w wiązaniu cząsteczek mRNA oraz posiada powinowactwo do sekwencji zawierających powtórzenia (AAN)_n, w których A oznacza resztę adenozyiny, a N dowolny nukleotyd. Strona boczna wiąże sekwencje, które są bogate w reszty adenozyiny i urydyny i zaangażowana jest w dodatkowe interakcje z cząsteczkami RNA. Z kolei, C-koniec białka Hfq uczestniczy w wiązaniu niektórych cząsteczek sRNA (Lay i wsp. 2013; Robinson i wsp. 2014; Santiago-Frangos i Woodson 2018; Watkins i Arya 2023).



Rysunek 3. Budowa oraz powierzchnie wiążące białka Hfq. (A) Struktura monomeru białka Hfq. (B) Struktura heksameru białka Hfq. (C) Struktura drugorzędowa monomeru białka Hfq. (D) Struktury krystalograficzne powierzchni białka Hfq związanych z oligomerami RNA z uwzględnieniem rozpoznawanych motywów sekwencyjnych. Wykonano na podstawie (Schumacher i wsp. 2002; Santiago-Frangos i Woodson 2018), zmodyfikowano.

Ze względu na sposób wiązania małych cząsteczek RNA do białka Hfq wyróżniono dwie klasy sRNA, które różnią się preferencją względem powierzchni oddziaływania z tym białkiem (Rys. 4). Cząsteczki sRNA należące do klasy I zawierają motywy sekwencyjne bogate w reszty adenozyny oraz urydyny, które oddziałują z powierzchnią boczną Hfq. Dodatkowo, posiadają ogon poliurydynowy poli(U) wiążący się z powierzchnią proksymalną białka. Z kolei, ich regulowane cząsteczki mRNA oddziałują ze stroną dystalną Hfq za pomocą motywów typu ARN, gdzie A to adenozyna, R oznacza purynę, a N dowolny nukleozyd (Schu i wsp. 2015).

Cząsteczki sRNA klasy II również zawierają motywy typu ARN, dzięki którym wiążą się z powierzchnią dystalną Hfq. Natomiast ich ogon poli(U), podobnie jak w przypadku sRNA klasy I, oddziałuje z powierzchnią proksymalną białka. W odróżnieniu od klasy I, ich docelowe cząsteczki mRNA wiążą się z powierzchnią boczną białka Hfq za pomocą motywów bogatych w reszty adenozyyny oraz urydyny (Schu i wsp. 2015).



Rysunek 4. Model wiązania cząsteczek sRNA klasy I i II do białka Hfq. Wykonano na podstawie (Updegrave i wsp. 2016), zmodyfikowano.

Białko Hfq odgrywa kluczową rolę w regulacji potranskrypcyjnej poprzez wspomaganie oddziaływania między cząsteczkami sRNA a regulowanymi przez nie mRNA. Jednym z pierwszych odkryć było wykazanie wpływu białka Hfq na oddziaływanie z OxyS sRNA, którego ekspresja jest indukowana w odpowiedzi na stres oksydacyjny. Badania wykazały, że białko Hfq wiąże się z OxyS sRNA, stabilizując jego strukturę i ułatwiając tworzenie kompleksu z *rpoS* mRNA, co powoduje zahamowanie procesu translacji oraz dostosowanie odpowiedzi komórki bakteryjnej na warunki stresowe (Storz i wsp. 2004). W późniejszym czasie udowodniono, że białko Hfq oddziałuje z wieloma cząsteczkami sRNA oraz setkami mRNA, co powoduje szeroki wpływ na regulację ekspresji genów u bakterii (Wagner i Romby 2015; Melamed i wsp. 2016; Olejniczak i Storz 2017).

Podsumowując, białko Hfq ma istotny wpływ na organizmy bakteryjne poprzez między innymi regulację translacji, stabilizację RNA, odpowiedź na stres, zmiany pH czy wpływ na wirulencję. Jego brak prowadzi do poważnych zaburzeń fizjologicznych i skutkuje zmniejszoną przeżywalnością komórki bakteryjnej (Chiang i wsp. 2011; Vogel i Luisi 2011; Sobrero i Valverde 2012; Cui i wsp. 2013; Kim i wsp. 2015; Updegrave i wsp. 2016).

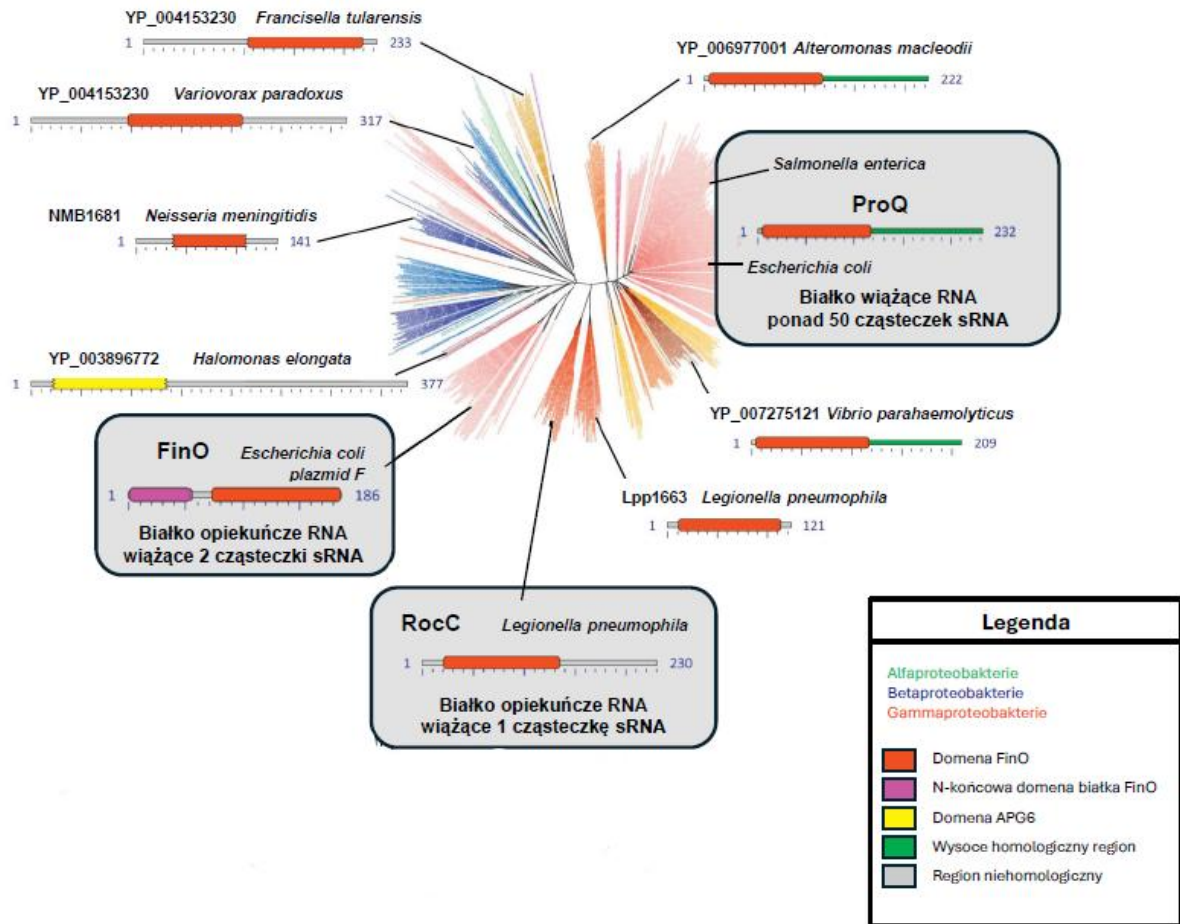
1.3.2. Białka z rodziny FinO

Białka należące do rodziny FinO są szeroko rozpowszechnione u organizmów bakteryjnych z rodzaju Proteobacteria (Rys. 5). Ich główną funkcją jest regulacja ekspresji genów na poziomie potranskrypcyjnym poprzez wspomaganie oddziaływania cząsteczek sRNA z ich docelowymi mRNA. Białka z rodziny FinO uczestniczą również w stabilizacji oraz ochronie sRNA przed degradacją. W konsekwencji, wpływają na liczne funkcje fizjologiczne oraz adaptacyjne komórek poprzez między innymi regulację translacji oraz stabilność docelowych cząsteczek mRNA (Attaiech i wsp. 2017; Olejniczak i Storz 2017).

Struktura białek z rodziny FinO zawiera przede wszystkim domenę FinO, która uważana jest za główne miejsce wiązania cząsteczek RNA. Wykazano, że białka te rozpoznają i wiążą cząsteczki RNA w obrębie terminatora transkrypcji, który zlokalizowany jest na końcu 3'. Struktury te składają się z charakterystycznej struktury spinki oraz ogona poliurydynowego (poliU) (Attaiech i wsp. 2017; Olejniczak i Storz 2017; Kim i wsp. 2022).

Co ciekawe, w obrębie rodziny białek FinO znajdują się białka, które wiążą dużą liczbę cząsteczek RNA, jak na przykład białko ProQ, które wiąże setki różnych RNA (Holmqvist i wsp. 2018; Melamed i wsp. 2020). Z drugiej strony, należą do niej również białka o wysokiej

specyficzności, takie jak FinO, które oddziałuje tylko z kilkoma cząsteczkami RNA (Arthur i wsp. 2003; El Mouali i wsp. 2021) (Rys. 5).

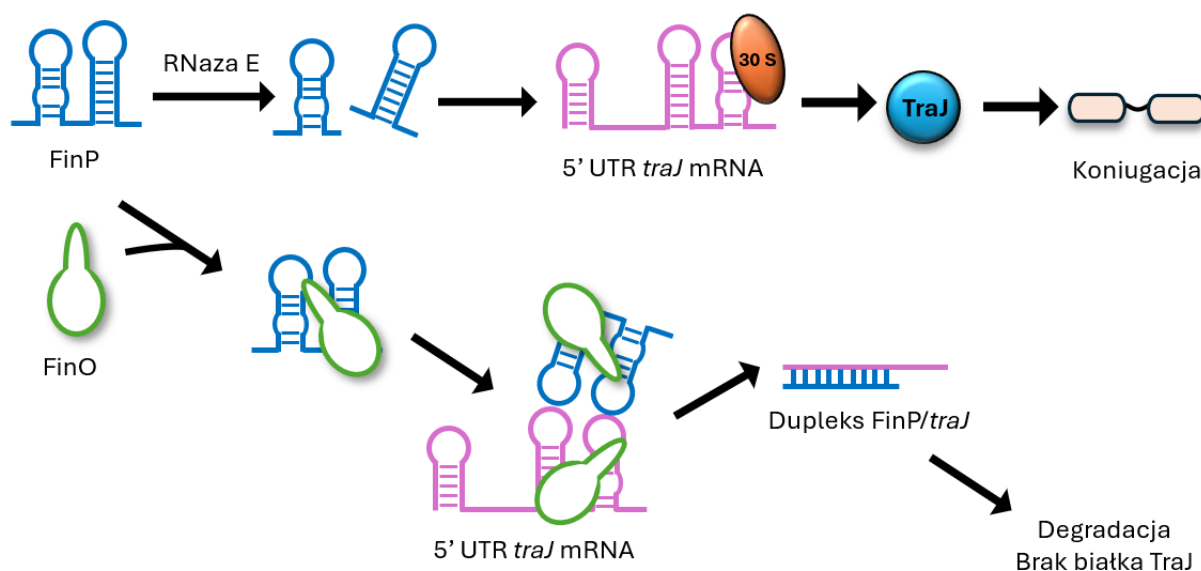


Rysunek 5. Drzewo filogenetyczne białek zawierających domenę FinO. Wykonano na podstawie (Attaiech i wsp. 2017; El Mouali i wsp. 2021), zmodyfikowano.

1.3.2.1. Białko FinO

Białko FinO zostało odkryte w 1978 roku w plazmidzie opornościowym R6-5 podczas badań nad mechanizmami hamowania transferu plazmidów pomiędzy komórkami bakteryjnymi, charakterystycznymi dla plazmidów koniugacyjnych typu F (Timmis i wsp. 1978). Plazmidy typu F są to plazmidy, które umożliwiają koniugację, czyli bezpośredni transfer DNA z jednej komórki bakteryjnej do drugiej. Przenoszą geny oporności na antybiotyki oraz są kluczowym elementem poziomego transferu genów, wpływając na ewolucję bakterii oraz ich adaptację do zmieniających się warunków środowiskowych (Frost i wsp. 2005; Fernandez-Lopez i wsp. 2016; Koraimann 2018).

Białko FinO odgrywa kluczową rolę w procesie koniugacji plazmidów typu F poprzez blokowanie syntezy białka TraJ, które jest aktywatorem transkrypcji genów operonu *tra*, koniecznych do koniugacji bakterii (Rys. 6). Białko FinO oddziałuje zarówno z mRNA *traJ*, jak i z jego antysensownym RNA FinP. Poprzez stabilizację FinP RNA oraz jego ochronę przed degradacją przez RNAzę E, białko FinO umożliwia tworzenie się kompleksu FinP sRNA-*traJ* mRNA, co prowadzi do zablokowania miejsca wiązania rybosomu na cząsteczce mRNA *traJ* i zahamowania jego translacji i tym samym zahamowania transkrypcji operonu *tra*.

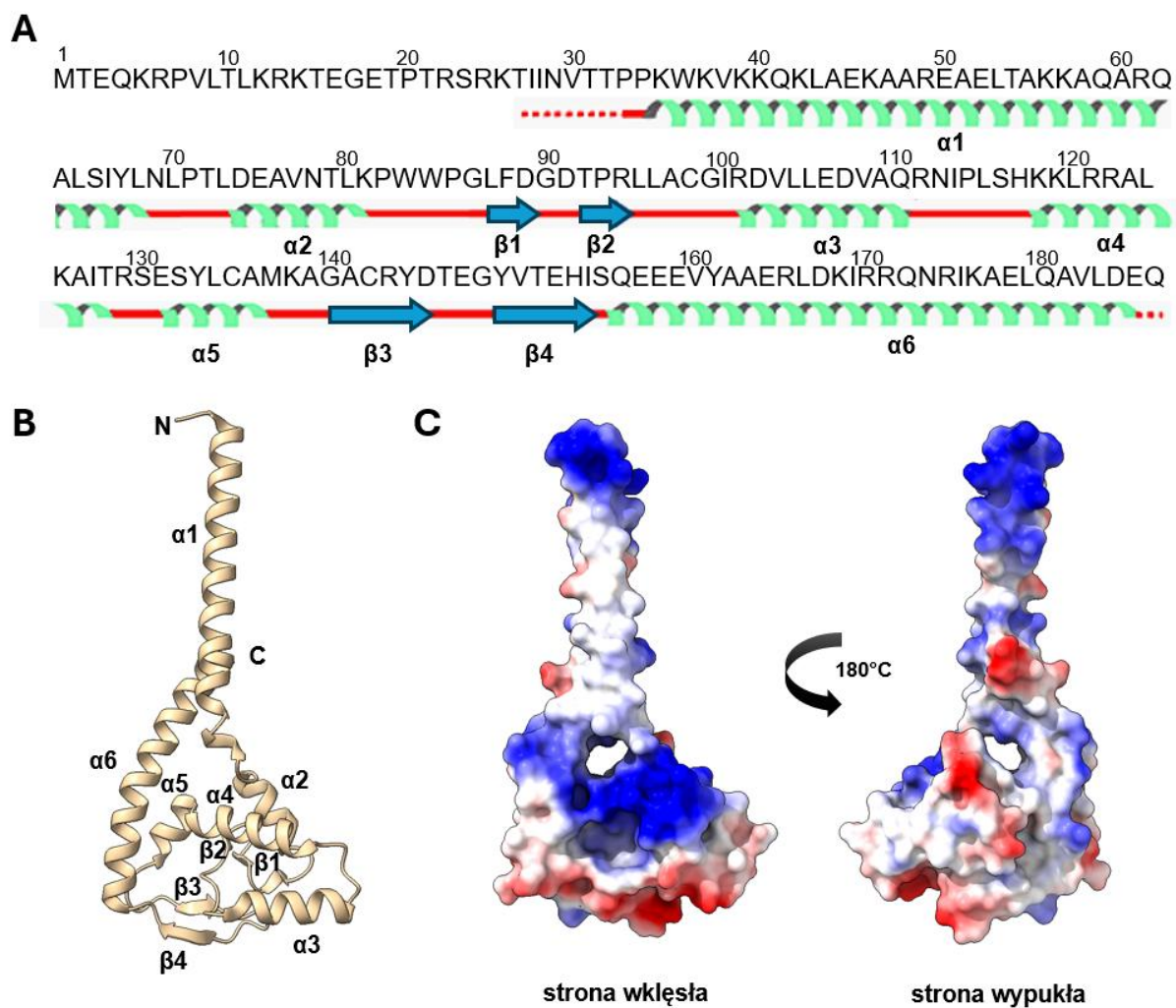


Rysunek 6. Mechanizm działania białka FinO w regulacji koniugacji komórek bakteryjnych. Wykonano na podstawie (Glover i wsp. 2015), zmodyfikowano.

Do niedawna uważano, że białko FinO wiąże tylko jedną parę RNA, czyli FinP sRNA oraz *traJ* mRNA. Natomiast niedawne szerokoprofilowe analizy transkryptomów u *Salmonella enterica* wykazały, że drugą cząsteczką wiązaną przez FinO jest sRNA RepX, pochodzący z plazmidu pRSF1010. Cząsteczki RNA FinP i RepX nie mają wspólnych motywów sekwencyjnych, natomiast są do siebie bardzo podobne względem długości i struktury, co może świadczyć o selektywności białka FinO względem cech strukturalnych RNA (El Mouali i wsp. 2021).

Białko FinO, kodowane przez plazmidy typu F, jest zbudowane z 186 aminokwasów i posiada masę około 21,2 kDa (Ghetu i wsp. 1999). Struktura krystaliczna tego białka ujawniła, że ma ono wydłużoną, głównie helikalną konformację, która przypomina zaciśniętą pięść z wyciągniętym do góry palcem wskazującym (Rys. 7). Część odpowiadająca „pięści” stanowi domenę FinO, charakterystyczną dla całej rodziny białek FinO, natomiast „palec” odpowiada N-końcowemu fragmentowi białka (Ghetu i wsp. 2000). W strukturze białka FinO wyróżniono dwie powierzchnie: wypukłą oraz wklęsłą, która jest dodatkowo naładowana (Olejniczak i Storz 2017).

Badania biochemiczne wykazały, że białko FinO wiąże cząsteczki RNA jako monomer, rozpoznając struktury drugorzędowe typu „spinka do włosów”, zakończone jednoniciowymi końcami 5' oraz 3' (Ghetu i wsp. 1999; Jerome i wsp. 1999; Ghetu i wsp. 2002). Ponadto wykazano, że FinO pełni funkcję białka opiekuńczego, stabilizując antysensową cząsteczkę sRNA FinP i ułatwiając jej oddziaływanie z docelowym *traJ* mRNA, co prowadzi do skutecznego zablokowania jego translacji (Arthur i wsp. 2003; Arthur i wsp. 2011).



Rysunek 7. Struktura białka FinO. (A) Sekwencja aminokwasowa białka FinO z oznaczeniami struktury drugorzędowej. (B) Model wstążkowy białka FinO (reszty 26-186) (C) Model powierzchni elektrostatycznej białka FinO (reszty 26-186). Na niebiesko zaznaczono obszary o dodatnim potencjale elektrostatycznym, natomiast na czerwono obszary o ujemnym potencjale elektrostatycznym. Wykonano na podstawie (Ghetu i wsp. 2000), zmodyfikowano.

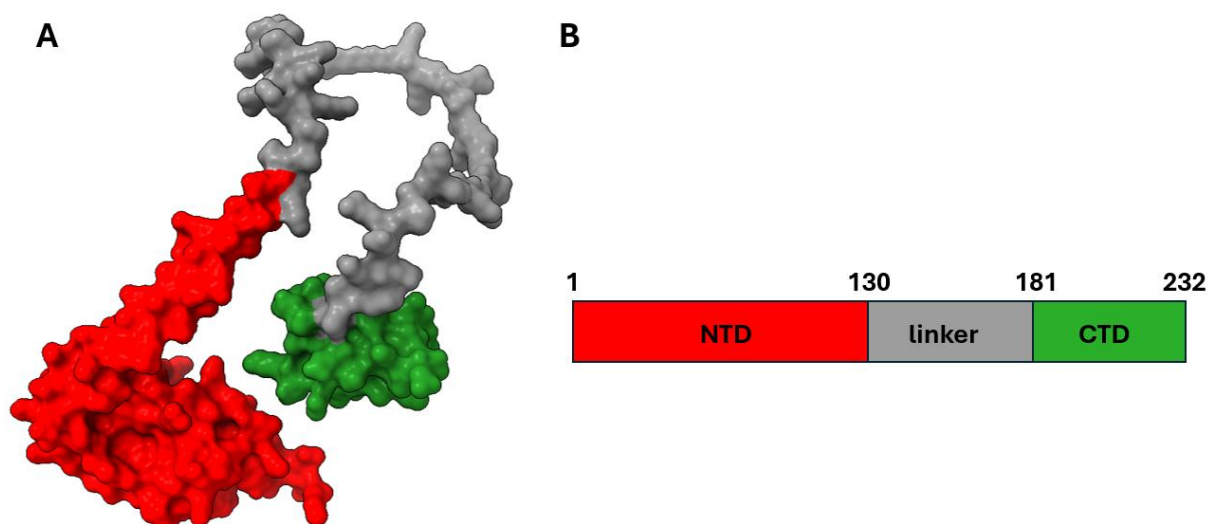
1.3.2.2. Białko ProQ

Białko ProQ u *Escherichia coli* zostało odkryte w 1989 roku podczas badania mutantów opornych na 3,4-dehydroprolinę, która jest toksycznym analogiem proliny (Milner i Wood 1989). Mutacje w obrębie genu *proQ* wpływały na obniżoną aktywność transportera prolinowego (ProP) w zależności od warunków wzrostu, nie zmieniając jednak ekspresji jego mRNA. Wprowadzenie komórek w warunki stresu osmotycznego częściowo przywracało aktywność ProP, co sugerowało, że ProQ reguluje aktywność tego transportera na poziomie potranskrypcyjnym (Chaulk i wsp. 2011). W rezultacie uważano, że białko ProQ bierze udział w transporcie proliny przez błonę komórkową, natomiast jego dokładny mechanizm działania pozostawał niejasny i podejrzewano, że białko to może pełnić również inną rolę.

Przełomowe odkrycie nastąpiło w 2016 roku, kiedy badania metodą GradSeq u *Salmonella enterica* wykazały, że ProQ jest białkiem wiążącym RNA i oddziałuje z wieloma cząsteczkami sRNA. Udowodniono, że białko to odgrywa istotną rolę w regulacji ekspresji genów na poziomie potranskrypcyjnym (Smirnov i wsp. 2016). Co więcej, podobnie jak Hfq i CsrA, ProQ zaliczono do głównych chaperonów, które wspomagają wiązanie cząsteczek sRNA z ich regulowanymi mRNA (Smirnov i wsp. 2016; Olejniczak i Storz 2017; Holmqvist i wsp. 2018).

Białko ProQ u *Escherichia coli* zbudowane jest z 232 aminokwasów i jego masa wynosi około 26 kDa. W jego strukturze wyróżnia się trzy domeny: zakonserwowaną domenę FinO na N-końcu (NTD), nieustrukturyzowany linker oraz domenę C-końcową (CTD) (Rys. 8).

Domena NTD zbudowana jest ze 130 aminokwasów i wykazuje wysokie podobieństwo strukturalne do domeny FinO, dlatego białko to jest zaliczane do rodziny białek FinO. Pomimo niewielkiego podobieństwa sekwencyjnego między przedstawicielami tej rodziny, domeny FinO charakteryzują się zbliżoną ogólną strukturą przestrzenną, obejmującą pięć segmentów w formie helis α (Chaulk i wsp. 2011). Zgodnie z najnowszymi badaniami, domena NTD białka ProQ uważana jest za główne miejsce wiązania cząsteczek RNA (Immer i wsp. 2020; Pandey i wsp. 2020; Stein i wsp. 2020; Stein i wsp. 2023). Ich wiązanie zazwyczaj następuje w obrębie dwuniciowych struktur z ogonem poliurydynowym (poliU) na końcach 3' RNA, które często mają charakter spinek terminatorowych (Gonzalez i wsp. 2017; Olejniczak i Storz 2017; Holmqvist i wsp. 2018; Holmqvist i Vogel 2018; Stein i wsp. 2020).



Rysunek 8. Struktura i organizacja domen białka ProQ u *Escherichia coli*. (A) Przewidywana struktura przestrzenna pełnej długości białka ProQ u *Escherichia coli* uzyskana za pomocą oprogramowania AlphaFold. Na czerwono zaznaczono domenę N-kończową (NTD), na szaro linker, a na zielono domenę C-kończową (CTD). (B) Schematyczne przedstawienie organizacji domen białka ProQ. Liczby wskazują pozycje aminokwasów wyznaczające granice domen. Wykonano na podstawie (Chaulk i wsp. 2011; Jumper i wsp. 2021), zmodyfikowano.

Domena N-kończowa jest połączona z domeną C-kończową za pomocą nieuporządkowanego i elastycznego regionu linkerowego, który charakteryzuje się znaczną zawartością dodatnio naładowanych reszt aminokwasowych. Z kolei, domena C-kończowa (CTD) zbudowana jest z około 50 aminokwasów i przyjmuje strukturę bogatą w β -harmonijki. Badania strukturalne wykazały podobieństwo tej domeny do eukariotycznych domen typu Tudor, biorących między innymi udział w rozpoznawaniu zmodyfikowanych reszt aminokwasowych. Podobieństwo to sugeruje, że domena ta mogła zostać nabyta przez organizmy prokariotyczne w wyniku horizontalnego transferu genów (Gonzalez i wsp. 2017).

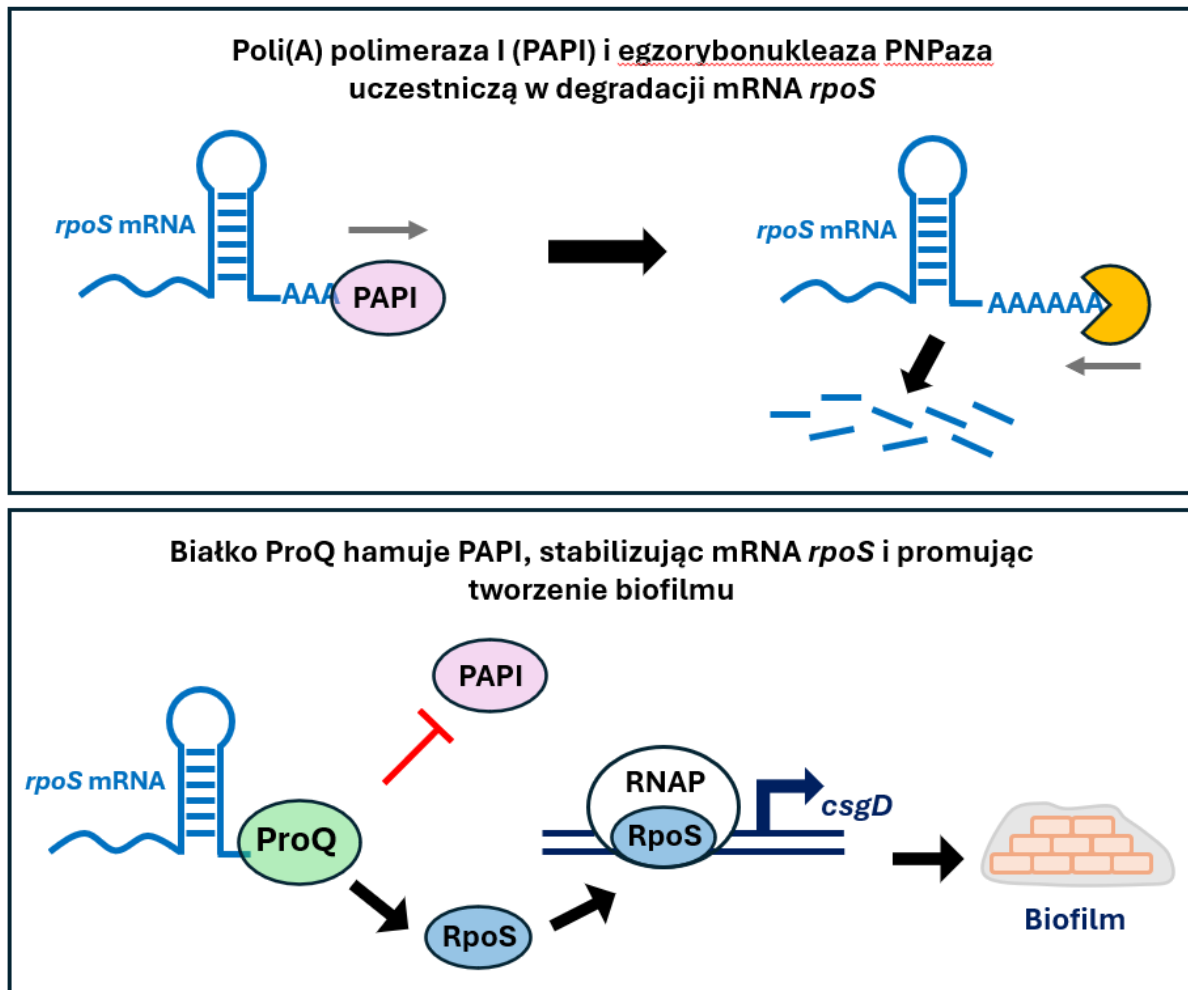
Funkcją białka ProQ jest przede wszystkim regulacja ekspresji genów na poziomie potranskrypcyjnym poprzez oddziaływanie z ponad 50 cząsteczkami sRNA i ponad 400 cząsteczkami mRNA (Olejniczak i Storz 2017). Choć mechanizm jego działania nie został nadal w pełni wyjaśniony, najwięcej danych wskazuje na istotną rolę domeny N-kończowej, jako głównego miejsca wiązania regulowanych RNA. Domena ta jest niezbędna do rozpoznawania i wiązania cząsteczek sRNA i mRNA wykorzystując oddziaływania elektrostatyczne, hydrofobowe oraz wiązania wodorowe (Pandey i wsp. 2020).

Z kolei, eksperymenty z zastosowaniem techniki wymiany wodoru na deuter (HDX) wykazały udział linkera oraz domeny C-końcowej w oddziaływaniu z sRNA SraB. Wyniki te sugerują, że również i te regiony białka mogą uczestniczyć w wiązaniu niektórych cząsteczek RNA (Gonzalez i wsp. 2017).

Wyniki badań wskazują, że cząsteczki RNA wiążące przez białko ProQ nie posiadają charakterystycznego motywu sekwencyjnego, natomiast charakteryzują się stabilną strukturą drugorzędową (Holmqvist i wsp. 2018). Co więcej, analizy CLIP-seq oraz RIL-seq wykazały, że miejsce wiązania białka ProQ zlokalizowane jest głównie w regionach dwuniciowych bogatych w reszty cytozyny i guanozyny, po których występują regiony bogate w reszty urydyny (Holmqvist i wsp. 2018; Melamed i wsp. 2020). Dodatkowo, najnowsze eksperymenty *in vitro* przeprowadzone w naszym laboratorium wykazały, że domena FinO białka ProQ z *Escherichia coli* oraz *Neisseria meningitidis* rozpoznaje i specyficznie wiąże cząsteczki RNA posiadające terminatory transkrypcji znajdujące się na końcu 3' (Stein i wsp. 2020; Basczok i Olejniczak 2025).

Białko ProQ odgrywa istotną rolę u bakterii ze względu na wiązanie wielu cząsteczek sRNA i mRNA, które uczestniczą w licznych procesach fizjologicznych komórki. Bierze ono udział między innymi w ochronie przed stresem oksydacyjnym (Bauriedl i wsp. 2020), wirulencji, regulacji ruchu komórek bakteryjnych (Westermann i wsp. 2019) oraz utrzymywaniu homeostazy komórkowej (Attaiech i wsp. 2016; Smirnov i wsp. 2016).

Białko ProQ pełni także istotną rolę w ochronie cząsteczek RNA przed degradacją oraz w regulacji tworzenia biofilmu. Przykładem jest kontrola poziomu czynnika sigma RpoS poprzez stabilizację jego mRNA (Rys. 9). Białko ProQ poprzez oddziaływanie z *rpoS* mRNA hamuje poliadenylację katalizowaną przez poli(A) polimerazę I (PAPI), co zapobiega degradacji przez egzorybonukleazę PNPazę. W efekcie stabilizacji *rpoS* mRNA dochodzi do zwiększenia poziomu białka RpoS, które z kolei aktywuje ekspresję genów zaangażowanych w proces tworzenia biofilmu (Bergman i wsp. 2025).



Rysunek 9. Rola białka ProQ w regulacji tworzenia biofilmu poprzez stabilizację *rpoS* mRNA. Na podstawie (Bergman i wsp. 2025), zmodyfikowano.

Ze względu na szeroki zakres procesów komórkowych, które może regulować, białko ProQ jest uznawane za jedno z ważniejszych białek wiążących RNA biorących udział w regulacji potranskrypcyjnej genów u bakterii. Jednakże, pomimo licznych badań, dokładny mechanizm jego działania wciąż pozostaje niejasny i wymaga dalszych szczegółowych analiz.

2. CELE PRACY

Niniejsza rozprawa doktorska koncentruje się na badaniach mechanizmów selektywnego rozpoznawania cząsteczek RNA przez białka ProQ, FinO oraz Hfq u *Escherichia coli* oraz na czynnikach determinujących konkurencję pomiędzy tymi białkami. Pracę doktorską podzieliłam na trzy główne części:

Pierwsza część badań dotyczyła analizy sekwencji nukleotydowych oraz cech strukturalnych cząsteczek RNA odpowiedzialnych za rozróżnianie ich wiązania przez białko ProQ lub FinO.

W związku z tym postawiłam następujące cele:

1. Identyfikacja sekwencji oraz elementów strukturalnych cząsteczek RNA, które decydują o selektywnym wiązaniu przez białko ProQ lub FinO z *Escherichia coli*, ze szczególnym uwzględnieniem sekwencji przy podstawie spinki terminatorowej.
2. Sprawdzenie, jak transplantacja sekwencji u podstawy spinki terminatorowej pomiędzy cząsteczkami RNA specyficznymi dla białka ProQ i FinO zmienia ich powinowactwo do obu białek.

W drugiej części pracy doktorskiej badałam znaczenie domeny FinO białka ProQ dla jego zdolności rozpoznawania RNA w warunkach *in vivo* i postawiłam następujące cele badawcze:

3. Określenie wpływu mutacji w domenie FinO białka ProQ na jego oddziaływanie z cząsteczkami RNA w komórkach *Escherichia coli* metodą RIP-seq.
4. Zbadanie różnic w oddziaływaniu białka ProQ z cząsteczkami sRNA z rodziny Sib oraz opisanie miejsc wiązania białka ProQ do tych cząsteczek RNA i zbadanie jak wiązanie ProQ wpływa na ich strukturę drugorzędową.

W trzeciej części pracy skupiłam się na roli kompetycji i wzajemnych oddziaływań białka ProQ i Hfq. Celem tych badań było:

5. Określenie, w jaki sposób kompetycja pomiędzy białkiem ProQ i Hfq wpływa na skład par RNA-RNA wiązanych przez te białka w warunkach *in vivo*.
6. Analiza zmian w interaktomach ProQ i Hfq w różnych warunkach ekspresji oraz fazach wzrostu komórek, w celu identyfikacji interakcji RNA-RNA, których występowanie ulega zmianie w zależności od obecności ProQ lub Hfq oraz kontekstu fizjologicznego komórki.

3. MATERIAŁY

3.1. Odczynniki

Odczynnik	Producent
20 % (w/v) roztwór dodecylosiarczanu sodu (SDS)	Bio-Rad
2-β-merkaptioetanol	Sigma Aldrich
50% (w/v) Glikol polietylenowy 8000 (PEG 8000)	Rigaku
Adaptory z kodami kreskowymi i adaptory Illumina do przygotowania bibliotek sekwencjonowania nowej generacji (NGS)	Illumina
Adenozyno-5'-trifosforan (ATP)	EURx
Agaroza	Prona
Akrylamid:bisakrylamid 19:1	BioShop
Akrylamid:bisakrylamid 29:1	BioShop
Albumina surowicy bydłowej (BSA)	BioShop
Alkohol etylowy (96%)	POCH
Alkohol izopropylowy	J.T. Baker
Alkohol metylowy (metanol) (99,9%)	POCH, Sigma Aldrich
Ampicylina	Sigma Aldrich
Barwnik anionowy do wizualizacji białek Ponceau S	Bio-Rad
Barwnik do barwienia kwasów nukleinowych w żelu Midori Green	Nippon Genetics
Błękit brylantowy Coomassie Brilliant Blue R-250	Sigma Aldrich
Bromofenol	Sigma Aldrich
Chlorek cynku (ZnCl ₂)	Sigma Aldrich
Chlorek magnezu (MgCl ₂)	Sigma Aldrich
Chlorek potasu (KCl)	Sigma Aldrich
Chlorek sodu (NaCl)	Sigma Aldrich
Chlorek wapnia (CaCl ₂)	Sigma Aldrich
Chloroform	MP Biomedicals
Cytydino-5'-trifosforan (CTP)	EURx
Dihydrofosforan sodu (NaH ₂ PO ₄)	Mallinckrodt Chemicals
Dimetylosulfotlenek (DMSO)	Sigma Aldrich
Ditiotreitol (DTT)	Sigma Aldrich
Drożdżowe RNA	Invitrogen
Ekstrakt drożdżowy	BD Difco
Fenol:Chloroform:Alkohol izoamylowy (25:24:1)	BioShop
Formamid	Sigma Aldrich
Glicerol	BioShop
Guanozyna	Sigma Aldrich
Guanozyno-5'-trifosforan (GTP)	EURx
Imidazol	Sigma Aldrich

Inhibitor RNaz (RRI)	New England BioLabs
Inhibitor rybonukleazy SUPERase In	Invitrogen
Izopropyl β -D-1-tiogalaktopiranozyd (IPTG)	ROTH
Kanamycyna	Sigma Aldrich
Koktajl inhibitorów proteaz III, bez EDTA	Calbiochem
Kopolimer glikogenu z barwnikiem (GlycoBlue)	Invitrogen
Ksylencjanol	Sigma Aldrich
Kulki Sepharose z białkiem A	Amersham Biosciences
Kwas borowy	BioShop
Kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA)	Sigma Aldrich
Kwas octowy	POCH
Kwas octowy lodowaty (CH ₃ COOH)	MP Biomedicals
Laurylosiarczan sodu (SDS)	Sigma Aldrich
Magnetyczne kulki AMPure XP	Beckman Coulter
Magnetyczne kulki RNAClean XP	Beckman Coulter
Magnetyczne kulki z białkiem A/G	Thermo Scientific
Marker wielkości białek Color	New England BioLabs
Marker wielkości białek PageRuler Plus	Thermo Scientific
Marker wielkości DNA GeneRuler 1 kb	Thermo Scientific
Marker wielkości DNA GeneRuler 100 bp	Thermo Scientific
Mieszanina deoksyrybonukleotydów (dNTP)	Thermo Scientific
Mieszanina kwasu guanidynotocyjanowego, fenolu i chloroformu (TriReagent)	Sigma Aldrich
Mocznik	BioShop
Mysie przeciwciała monoklonalne M2 przeciwko epitopowi Flag	Sigma Aldrich
N,N,N',N'-Tetrametyloetylenodiamina (TEMED)	BioShop
Nadsiarczan amonu (APS)	Sigma Aldrich
Niejonowy detergent (oktylofenylopolietoksyetanol) IGEPAL CA-630	Sigma Aldrich
Niejonowy detergent Triton X-100	Sigma Aldrich
Niejonowy detergent Tween 20	Thermo Scientific
Octan ołowiu (II)	Sigma Aldrich
Octan sodu	Sigma Aldrich
Odłuszczone mleko w proszku	Bio-Rad
Pożywka płynna Luria-Bertani (LB Broth Miller)	BioShop
Pożywka stała Luria-Bertani z agarem (LB Broth Agar)	BioShop
Rekombinowany inhibitor RNaz	New England BioLabs
Sefarozowe kulki z białkiem A	Amersham Biosciences
Spermidyna	Sigma Aldrich
Substrat chemiluminescencyjny do detekcji białek w Western blot (SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate)	Thermo Scientific

Szklane kulki o średnicy 0,1 mm	Biospec
Tris(2-Amino-2-hydroksymetylopropan-1,3-diol) (Trizma base)	Sigma Aldrich
Tris(hydroksymetylo)aminometan	BioShop
Trizol	Invitrogen
Trypton	BD Difco
Urydyno-5'-trifosforan (UTP)	EURx
Woda traktowana dietylo-pirokarbonianem (DEPC)	Invitrogen
Woda wolna od RNaz i DNaz	Kd Medical
Wodorofosforan disodu (Na ₂ HPO ₄)	J.T. Baker
Wodorotlenek sodu (NaOH)	Sigma Aldrich, J.T. Baker
γ-32P-Adenozyno-5'-trifosforan (ATP) (222TBq(6000Ci/mmol 370MBq(10mCi/ml)))	Hartmann Analytic

3.2. Enzymy

Odczynnik	Producent
Alkaliczna fosfataza (FastAP)	Thermo Scientific
Alkaliczna fosfataza FastAP	Thermo Scientific
Deoksyrybonukleaza I (DNaza I)	Thermo Scientific
Enzym restrykcyjny EcoRI	Thermo Scientific
Enzym restrykcyjny SalI	Thermo Scientific
Kinaza polinukleotydomowa faga T4 (PNK)	New England BioLabs, Thermo Scientific
Ligaza DNA faga T4	Thermo Scientific
Ligaza RNA T4	New England BioLabs
Mieszanka reakcyjna Q5 High-Fidelity 2X Master Mix zawierająca polimerazę DNA	New England Biolabs
Mieszanka rybonukleaz A i T1	Thermo Scientific
Nukleaza Cas9	New England BioLabs
Nukleaza S1	Thermo Scientific
Polimeraza DNA o wysokiej wierności (HIFI HotStart RM)	Kapa Biosystems
Polimeraza DNA Pfu Turbo Cx Hotstart	Agilent
Polimeraza DreamTaq	Thermo Scientific
Polimeraza RNA z faga T7	Pracownia Biochemii RNA
Proteinaza K	Invitrogen Ambion
Rybonukleaza III	Invitrogen
Rybonukleaza T1	Invitrogen
TURBO DNaza	Invitrogen Ambion

3.3. Zestawy

Odczynnik	Producent
Zestaw do analizy jakości RNA przy użyciu mikrochipów i elektroforezy kapilarnej (Bioanalyzer RNA 6000 Nano kit)	Agilent Technologies
Zestaw do ilościowego oznaczania dwuniciowego DNA metodą fluorescencyjną (Qubit dsDNA HS Assay Kit)	Invitrogen
Zestaw do oczyszczania DNA z żelu agarozowego i reakcji PCR (NucleoSpin Gel and PCR Clean-up)	Macherey-Nagel
Zestaw do oczyszczania i koncentracji RNA (RNA Clean & Concentrator-5 kit)	Zymo Research
Zestaw do oczyszczania oligonukleotydów i krótkich fragmentów RNA/DNA (Oligo Clean and Concentrator kit)	Zymo Research
Zestaw do oczyszczania RNA na membranach krzemionkowych (Monarch Spin RNA Cleanup Kit)	New England BioLabs
Zestaw do syntezy pierwszej nici cDNA, zawierający odwrotną transkryptazę SuperScript III	Invitrogen
Zestaw do wysokoczułej analizy próbek DNA za pomocą automatycznej elektroforezy (High-sensitivity D1000 ScreenTape)	Agilent Technologies
Zestaw Monarch Spin Miniprep do izolacji plazmidów	New England Biolabs
Zestaw Plasmid Mini AX do izolacji plazmidów	A&A Biotechnology

3.4. Bufory i roztwory

3.4.1. Bufory komercyjne

Odczynnik	Producent
Bufor A dla kinazy polinukleotydowej	Thermo Scientific
Bufor Cut Smart	New England BioLabs
Bufor denaturujący do przygotowania próbek białkowych do elektroforezy, 6× stężony (6x Laemmli sample buffer)	Bio-Rad
Bufor dla alkalicznej fosfatazy FastAP 10× stężony	Thermo Scientific
Bufor dla ligazy DNA faga T4	Thermo Scientific
Bufor dla ligazy RNA T4 10× stężony	New England BioLabs
Bufor dla nukleazy Cas9 10× stężony	New England BioLabs
Bufor dla polimerazy DreamTaq 10× stężony	Thermo Scientific
Bufor dla polimerazy Pfu Turbo Cx	Agilent
Bufor do lizy RLT	Qiagen
Bufor do sekwencjonowania (Sequencing buffer)	Invitrogen
Bufor fosforanowy 10× stężony (PBS 10x)	Kd Medical
Bufor do inaktywacji i strącania (Inactivation/precipitation buffer)	Invitrogen
Bufor obciążający II (Loading Buffer II)	Invitrogen

Bufor proteazowy zawierający PMSF	Thermo Scientific
Bufor SDS PAGE 10× stężony	BioShop
Bufor strukturalny (Structure buffer)	Invitrogen
Bufor Tris-Glicyna-SDS 10× stężony	Bio-Rad

3.4.2. Bufory przygotowywane

Nazwa	Skład
10× stężony bufor do transkrypcji <i>in vitro</i>	800 mM Tris-HCl pH 8, 20 mM spermidyna, 100 mM NaCl, 200 mM MgCl ₂
10× stężony TBE	89 mM Tris-HCl pH 8, 55% kwas borowy (w/v), 20 mM EDTA
2× stężony bufor Laemmli	0,125 M Tris-HCl pH 6,8, 20% glicerol (v/v), 4% SDS (w/v), 10% 2-β-merkaptoetanol (v/v), 0,004% błękit bromofenolowy (w/v)
4× stężony bufor „górny” do żelu rozdzielającego	1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 0,4% SDS (w/v)
4x stężony bufor „górny” do żelu zagęszczającego	1,5 M Tris-HCl pH 6,8, 0,4% SDS (w/v)
5× stężony bufor do reakcji wiązania	25 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 5% glicerol (v/v)
6× stężony bufor obciążający	10 mM Tris-HCl pH 7,6, 0,3% bromofenol (w/v), 0,3% ksylencjanol (w/v), 60 mM EDTA, 60% glicerol (v/v),
Bufor do blokowania	1x bufor PBST, 3% odtłuszczone mleko w proszku (w/v)
Bufor do elucji RIL-seq	50 mM fosforan sodu (Na ₂ HPO ₄ oraz NaH ₂ PO ₄) pH 8,0, 300 mM NaCl, 300 mM imidazol, 0,1 U/μl RRI
Bufor do lizy RIP-seq	20 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM KCl, 1 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
Bufor do transferu Western blot	1x buforu Tris-Glicyna-SDS, 0,14% SDS (v/v), 20% methanol (v/v)
Bufor Net do koimmunoprecypitacji	50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,05% Triton X-100 (v/v)
Bufor PBST	1x PBS, 0,1% Tween 20 (v/v)
Bufor płuczący RIL-seq	50 mM fosforan sodu (Na ₂ HPO ₄ oraz NaH ₂ PO ₄) pH 8,0, 300 mM NaCl, 0,1% IGEPAL (v/v), 10 mM imidazol, 0,1 U/μl RRI, Koktajl inhibitorów proteaz III, bez EDTA
Bufor z BSA do opłaszczania płytek 96-dółkowych	10 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,0025% BSA (v/v)
Bufor z formamidem i MgCl ₂	98% formamid (v/v), 4 mM MgCl ₂

3.4.3. Roztwory

Nazwa	Skład
Roztwór barwiący do żeli białkowych	0,1% Coomassie błękitu brylantowego (w/v), 50% metanol (v/v), 10% kwas octowy (v/v)
Roztwór denaturującego żelu do hydrolizy enzymatycznej	10% roztworu akrylamid:bisakrylamid 29:1 (v/v), 7M mocznik, 1x TBE
Roztwór denaturującego żelu poliakrylamidowego do oczyszczania DNA i RNA	10% roztworu akrylamid:bisakrylamid 29:1 (v/v), 8M mocznik, 1x TBE
Roztwór natywnego żelu poliakrylamidowego	6% roztworu akrylamid:bisakrylamid 19:1 (v/v), 1x TBE
Roztwór odbarwiający do żeli białkowych	40% metanol (v/v), 10% kwas octowy (v/v)
Roztwór żelu agarozowego	1% agaroz (w/v), 1x TBE
Roztwór żelu rozdzielającego	15% roztworu akrylamid:bisakrylamid 29:1 (v/v), 1x bufor żelu rozdzielającego (bufor „dolny”)
Roztwór żelu zagęszczającego	4,5% roztworu akrylamid:bisakrylamid 29:1 (v/v), 1x bufor żelu zagęszczającego (bufor „górny”)

3.5. Szczepy bakteryjne

Nazwa	Zastosowanie	Źródło
<i>E. coli</i> DH5 α	Szczep wykorzystany do amplifikacji wektorów bakteryjnych	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21 Δ <i>hfq::kan</i>	Szczep wykorzystany do oceny nadekspresji białek z wektorów ekspresyjnych zawierających sklonowane sekwencje genów <i>proQ</i> lub <i>hfq</i>	Uzyskany dzięki uprzejmości prof. Agnieszki Szalewskiej-Pałasz z Uniwersytetu Gdańskiego
<i>E. coli</i> MG1655	Szczep wykorzystany jako kontrola w eksperymentach RIP-seq do oceny wpływu mutacji w białku ProQ na wiązane cząsteczki RNA	Wykorzystane w trakcie pobytu w laboratorium prof. Giseli Storz w Narodowym Instytucie Zdrowia Dziecka i Rozwoju Człowieka NIH
<i>E. coli</i> MG1655 ProQ-K35A	Szczepy wykorzystane w eksperymentach RIP-seq do oceny wpływu mutacji w białku ProQ na wiązane cząsteczki RNA	
<i>E. coli</i> MG1655 ProQ-K54A		
<i>E. coli</i> MG1655 ProQ-R62A		
<i>E. coli</i> MG1655 ProQ-R69A		
<i>E. coli</i> MG1655 ProQ-R80K		
<i>E. coli</i> MG1655 Hfq-FLAG	Szczepy wykorzystane w eksperymentach RIL-seq do analizy, jak nadekspresja ProQ lub Hfq wpływa na wiązane cząsteczki RNA przez drugie, endogennie eksprymowane białko	
<i>E. coli</i> MG1655 Hfq-FLAG Δ <i>proQ::kan</i>		
<i>E. coli</i> MG1655 ProQ-3XFLAG		
<i>E. coli</i> MG1655 ProQ-3XFLAG Δ <i>hfq::cat-sacB</i>		

3.6. Plazmidy bakteryjne

Nazwa	Zastosowanie	Źródło
pBAD24	Plazmid ekspresyjny wykorzystany jako wektor do klonowania sekwencji genu <i>proQ</i> lub <i>hfq</i> oraz jako kontrola w analizie poziomu białek ProQ i Hfq podczas nadekspresji indukowanej różnymi stężeniami arabinozy	NovoPro
pBAD24- <i>proQ</i>	Plazmid ekspresyjny wykorzystany w analizie poziomu białka ProQ podczas nadekspresji indukowanej różnymi stężeniami arabinozy	Niniejsza praca doktorska
pBAD24- <i>hfq</i>	Plazmid ekspresyjny wykorzystany w analizie poziomu białka Hfq podczas nadekspresji indukowanej różnymi stężeniami arabinozy	Niniejsza praca doktorska
pNM46	Plazmid ekspresyjny wykorzystany jako wektor do klonowania sekwencji genu <i>proQ</i> lub <i>hfq</i> , jako kontrola w analizie poziomu białek ProQ i Hfq podczas nadekspresji indukowanej różnymi stężeniami arabinozy oraz jako kontrola w eksperymentach RIL-seq	Uzyskane dzięki uprzejmości prof. Giseli Storz z Narodowego Instytutu Zdrowia Dziecka i Rozwoju Człowieka NIH
pNM46- <i>proQ</i>	Plazmid ekspresyjny wykorzystany w analizie poziomu białka ProQ podczas nadekspresji indukowanej różnymi stężeniami arabinozy oraz w eksperymentach RIL-seq	Niniejsza praca doktorska
pNM46- <i>hfq</i>	Plazmid ekspresyjny wykorzystany w analizie poziomu białka Hfq podczas nadekspresji indukowanej różnymi stężeniami arabinozy oraz w eksperymentach RIL-seq	Niniejsza praca doktorska

3.7. Oligodeoksyrybonukleotydy wykorzystane w reakcji wydłużania starterów

Lp.	Nazwa	Sekwencja (od końca 5' do 3')
1.	malM-3'-F	TAATACGACTCACTATAGCTTTATCAGCAGTGTA AAAAGGCAAGGGGTAATTACGCC CCACAGTGCTGATT
2.	malM-3'-R	AAAAAAAGGTGCGCCAGGAGACGCACCAGTTGTTGCAAAATCAGCACTGTGGG GCGTA
3.	malM-FinP-R	AAAATCGGTGCGCCAGGAGACGCACCTGTTGTTGCAAAATCAGCACTGTGGGGC GTA
4.	malM-RepX-R	AGAGCGGTGCGCCAGGAGACGCACCTAATGTTGCAAAATCAGCACTGTGGGGCG TA
5.	malM-A-GU ₆ -R	AAAAAACGGTGCAGGAGACGCACCTGTTGTTGCAAAATCAGCACTGTGGGG CGTA
6.	malM-A-GAU ₅ -R	AAAAATCGGTGCGCCAGGAGACGCACCTGTTGTTGCAAAATCAGCACTGTGGGG CGTA
7.	malM-A-GAU ₇ -R	AAAAAAATCGGTGCGCCAGGAGACGCACCTGTTGTTGCAAAATCAGCACTGTGG GCGTA
8.	FinP-F	TAATACGACTCACTATAGGATACATAGGAACCTCCTCACAAAGGATTCTATGGACA GTCGATGCAGGG
9.	FinP-R	AAAATCGCCGATGCAGGGAGACGTGAACTCCCTGCATCGACTGTCCATAGAATCC T
10.	FinP-malM-F	TAATACGACTCACTATAGGATACATAGGAACCTCCTCACAAAGGATTCTATGGACT GTCGATGCAGGG
11.	FinP-malM-R	AAAAAAAGCCGATGCAGGGAGACGTGAACTCCCTGCATCGACAGTCCATAGAAT CCT
12.	FinP-U-UAU ₄ -R	AAAATAGCCGATGCAGGGAGACGTGAACTCCCTGCATCGACAGTCCATAGAATCC T
13.	FinP-U-U ₆ -R	AAAAAAGCCGATGCAGGGAGACGTGAACTCCCTGCATCGACAGTCCATAGAATC CT
14.	FinP-U-U ₄ -R	AAAAGCCGATGCAGGGAGACGTGAACTCCCTGCATCGACAGTCCATAGAATCCT
15.	RepX-F	TAATACGACTCACTATAGCATTGATTGCCTCCTTGCAGGCAGTTGGTGGTTAGGC GCTGGCGGGG
16.	RepX-R	AGAGCGGCGCAGGGCGGGGGTAGTGACCCCGCCAGCGCCTAACCACCAACTGCC
17.	RepX-malM-F	TAATACGACTCACTATAGCATTGATTGCCTCCTTGCAGGCAGTTGGTGGACTGGC GCTGGCGGGG
18.	RepX-malM-R	AAAAAAAGGCGCAGGGCGGGGGTAGTGACCCCGCCAGCGCCAGTCCACCAAC
19.	cspE81-3'-F	TAATACGACTCACTATAGGCCCTTCTGCTGCAAACGTAATCGCTCTGTAAGATACG TCAGCAAG
20.	cspE81-3'-R	AAAAAAAACCCGCTGATTAAGCGGGTTTTGAATTCTTGCTGACGTATCTTACAGA G
21.	cspE81-FinP-R	AAAATCCCCGCTGATTAAGCGGGTGTGTAATTCTTGCTGACGTATCTTACAGAG
22.	cspE81-FinP-stem-R	AAAATCGCCGCTGATTAAGCGACTGTTGAATTCTTGCTGACGTATCTTACAGAG
23.	SibA-F	TAATACGACTCACTATAGAGGGTTAGGGAGAGGTTTCCCCCTCCCCCTGGTGTTC TAGTAAGCCTGGAAGCTAATCACTAAGAGTATCACC
24.	SibA-R	GGGAAAGCCTCTCCCGGAGAAGAGGGCTTTAATAAGGAAAGGGTTATGATGAA GCACGTCATCATACTGGTGATACTCTTAGTGATTAGC
25.	SibA-skrócona-F	TAATACGACTCACTATAGAGGGTTAGGGAGAGGTTTCCCCCTCCCCCTGGTGTTC TAGTAAGCCTGGAAGCTAATC
26.	SibA-skrócona-R	AAGGAAAGGGTTATGATGAAGCACGTCATCATACTGGTGATACTCTTAGTGATTAG CTCCAGGCTTACTAAGAACAC
27.	SibC-F	TAATACGACTCACTATAGAGGGTTAAGGAGGATTGCTCCTCCCCTGAGACTGACT GTTAATAAGCGCTGAACTTATGAGTAACAG
28.	SibC-R	GGTAAAGCCCTACCGAAGCGAGGGCTTGAAGGAGAAGGGTTATGATGCGACTT GTCATCATACTGATTGACTGTTACTCATAAGTTTCAGC
29.	SibC-skrócona-F	TAATACGACTCACTATAGAGGGTTAAGGAGGATTGCTCCTCCCCTGAGACTGACT GTTAATAAGCGCTGAACTTATGAGTAACAG
30.	SibC-skrócona-R	GAGAAGGGTTATGATGCGACTTGTATCATACTGATTGTACTGTTACTCATAAGTTT CAGCGC

3.8. Oligodeoksyrybonukleotydy użyte do konstrukcji biblioteki w metodzie RIL-seq

Lp.	Nazwa	Zastosowanie	Sekwencja (od końca 5' do 3')
1.	3Tr3	Ligacja do końca 3' cDNA	P-AGATCGGAAGAGCACACGTCTG-ddC
2.	AR2	Starter do odwrotnej transkrypcji	TACACGACGCTCTCCGAT
3.	BC1_adaptor	Ligacja do końca 3' RNA	P- AACATTATT AGATCGGAAGAGCGTCGTGTA -ddC
4.	BC2_adaptor		P- AAAGTGTG AGATCGGAAGAGCGTCGTGTA -ddC
5.	BC3_adaptor		P- AAGAATTAT AGATCGGAAGAGCGTCGTGTA -ddC
6.	BC4_adaptor		P- AATATGGAC AGATCGGAAGAGCGTCGTGTA -ddC
7.	BC5_adaptor		P- AATCACTTG AGATCGGAAGAGCGTCGTGTA -ddC
8.	BC6_adaptor		P- ACCAAGTCG AGATCGGAAGAGCGTCGTGTA -ddC
9.	BC7_adaptor		P- ACAACCTCGC AGATCGGAAGAGCGTCGTGTA -ddC
10.	BC8_adaptor		P- ACCCGTCTT AGATCGGAAGAGCGTCGTGTA -ddC
11.	BC9_adaptor		P- ACCCTACAG AGATCGGAAGAGCGTCGTGTA -ddC
12.	BC10_adaptor		P- ACCCTCGGC AGATCGGAAGAGCGTCGTGTA -ddC
13.	BC11_adaptor		P- ACCGGTACC AGATCGGAAGAGCGTCGTGTA -ddC
14.	BC12_adaptor		P- ACGGAGGGC AGATCGGAAGAGCGTCGTGTA -ddC
15.	BC13_adaptor		P- ACTCGGTAC AGATCGGAAGAGCGTCGTGTA -ddC
16.	BC14_adaptor		P- ACGGCACTT AGATCGGAAGAGCGTCGTGTA -ddC
17.	BC15_adaptor		P- ACTCTAACT AGATCGGAAGAGCGTCGTGTA -ddC
18.	BC16_adaptor		P- ACTGGATCG AGATCGGAAGAGCGTCGTGTA -ddC
19.	BC17_adaptor		P- AGCAGCCAC AGATCGGAAGAGCGTCGTGTA -ddC
20.	BC18_adaptor		P- AGAGATTGT AGATCGGAAGAGCGTCGTGTA -ddC
21.	BC19_adaptor		P- AGAGCCATC AGATCGGAAGAGCGTCGTGTA -ddC
22.	BC20_adaptor		P- AGTAACTGC AGATCGGAAGAGCGTCGTGTA -ddC
23.	BC21_adaptor		P- ATCCCGCGG AGATCGGAAGAGCGTCGTGTA -ddC
24.	BC22_adaptor		P- ATTTCTAAC AGATCGGAAGAGCGTCGTGTA -ddC
25.	BC23_adaptor		P- ATGGGAGAC AGATCGGAAGAGCGTCGTGTA -ddC
26.	BC24_adaptor		P- ATGAACCAG AGATCGGAAGAGCGTCGTGTA -ddC
27.	P5_Enr	Wzbogacenie metodą PCR	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTA CACGACGCTCTCCGATCT
28.	P7_BC1_Enr	Wzbogacenie metodą PCR	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCGTGTGCGTGACT GGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCT
29.	P7_BC2_Enr	Wzbogacenie metodą PCR	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCGCCAGAGTGAC TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCT

Wewnętrzne kody kreskowe, które umożliwiały rozróżnienie produktów ligacji oraz specyficzne w obrębie jednej próbki są zaznaczone kolorem czerwonym. Zewnętrzne kody kreskowe, które służyły do jednoznacznego przypisania odczytów sekwencyjnych do właściwych bibliotek po ich łącznym sekwencjonowaniu, są podkreślone. Wspólna część w adapterach 3Tr3 i BC jest podkreślona i napisana kursywą. „P-” oznacza fosforylację końca 5'. „-ddC” oznacza dideoksy-C na końcu 3'.

3.9. Oligodeoksyrybonukleotydy wykorzystane do reakcji łańcuchowej polimerazy w procesie tworzenia konstruktów

Lp.	Nazwa	Sekwencja (od końca 5' do 3')
1.	Hfq-EcoRI-F	<u>GCCG</u> GAATTC ATGGCTAAGGGGCAATCTTTACAAGATCCG
2.	ProQ-EcoRI-F	<u>GCCG</u> GAATTC ATGGAAAATCAACCTAAGTTGAATAGC
3.	ProQ-SalI-F	<u>GCCG</u> GTCGAC ATGGAAAATCAACCTAAGTTGAATAGC
4.	ProQ-SalI-R	<u>GCCG</u> GTCGAC TCAGAACACCAGGTGTTCTGC
5.	Hfq-SalI-F	<u>GCCG</u> GTCGAC ATGGCTAAGGGGCAATCTTTACAAGATCCG
6.	Hfq-SalI-R	<u>GCCG</u> GTCGAC TTATTCGGTTTCTTCGCTGTCCTGTTGCG
7.	pNM46-RBS-F	<u>AGGAGG</u> GTCGAC <u>TTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCG</u>
8.	pNM46-RBS-R	<u>AATGGTTTCTTAGACGTCAGTATCTTGTTATCCGCTCACAATGTC</u>

Żółtym kolorem zaznaczono miejsce rozpoznawane i cięte przez enzym restrykcyjny SalI, natomiast zielonym przez enzym restrykcyjny EcoRI. Niebieski kolor wskazuje dodatkową sekwencję, która ułatwia efektywne trawienie przez enzym restrykcyjny. Z kolei, na czerwono zaznaczono miejsce wiązania rybosomu, czyli sekwencję Shine-Dalgarno, wprowadzoną do plazmidu pNM46. Sekwencję kodującą białko ProQ lub Hfq oznaczono kolorem szarym, natomiast fragment komplementarny do plazmidu pNM46 wyróżniono podkreśleniem.

4. METODY

4.1. Otrzymywanie cząsteczek DNA

4.1.1. Oczyszczanie oligodeoksyrybonukleotydów

Proces syntezy oligodeoksyrybonukleotydów może prowadzić do powstania różnorodnych zanieczyszczeń, w tym krótkich, niepożądanych fragmentów DNA, które mogą obniżać efektywność reakcji łańcuchowego wydłużania starterów przez polimerazę (PCR). W celu eliminacji produktów ubocznych syntezy oligodeoksyrybonukleotydów dostarczonych przez firmę Metabion, przeprowadzono ich oczyszczanie za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących.

Oligodeoksyrybonukleotydy w formie liofilizatu zawieszono w wodzie dejonizowanej o wysokiej czystości (Mili-Q) do końcowego stężenia 500 μM . Następnie do 12 μl rozpuszczonych oligomerów dodano 6 μl 8M mocznika, po czym mieszaninę poddano denaturacji przez 2 minuty w temperaturze 90°C. W kolejnym etapie, zdenaturowane próbki nałożono na uprzednio przygotowany 10% denaturujący żel poliakrylamidowy (29:1), a elektroforezę prowadzono przy mocy 15 W w buforze 1× TBE. Po zakończeniu elektroforezy, żel poliakrylamidowy umieszczono na płycie kwarcowej, a oczyszczone prążki wizualizowano pod lampą UV przy długości fali 260 nm. Następnie, fragmenty żelu zawierające oligodeoksyrybonukleotydy wycięto z żelu i umieszczono w probówkach z 500 μl buforu do elucji. Elucję prowadzono w temperaturze 4°C, przy wytrząsaniu 300 rpm przez noc. Następnego dnia, bufor przeniesiono do nowej próbki, do której dodano 1500 μl zimnego 96% etanolu i inkubowano w temperaturze -80°C przez godzinę. W kolejnym etapie, próbki poddano wirowaniu w temperaturze 4°C przy 14 000 rpm przez 40 minut. Odrzucono supernatant, a osad osuszono w suszarce próżniowej Speedvac, a następnie rozpuszczono w 50 μl wody dejonizowanej o wysokiej czystości. Pomiar stężenia uzyskanych oligodeoksyrybonukleotydów przeprowadzono za pomocą spektrofotometru NanoDrop 1000.

4.1.2. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR)

Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) jest powszechnie stosowaną techniką polegającą na amplifikacji specyficznego fragmentu dwuniciowego DNA. W tym procesie wykorzystuje się dwa oligodeoksyrybonukleotydy, które są komplementarne do docelowej sekwencji DNA. W reakcji uczestniczy termostabilna polimeraza DNA, która katalizuje przyłączanie nukleotydów do oligodeoksyrybonukleotydów. Reakcja PCR składa się z cyklicznego powtarzania trzech

etapów: denaturacji, przyłączania oligodeoksyrybonukleotydów oraz wydłużania łańcucha polinukleotydowego DNA.

Skład mieszaniny reakcyjnej:

Składnik	Stężenie końcowe/ilość
Bufor dla polimerazy Phusion 5x stężony	1x
Matryca DNA	2 ng/μl
Mieszanina deoksyrybonukleotydów (dNTP)	0,2 mM
Starter sensowny (F)	0,5 μM
Starter antysensowny (R)	0,5 μM
Polimeraza DNA Phusion o wysokiej wierności	0,02 U/μl
Woda MiliQ	do 50 μl

Profil reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR):

Nazwa etapu	Temperatura	Czas	Liczba cykli
Wstępna denaturacja	98°C	30 sekund	1
Denaturacja	98°C	10 sekund	30
Przyłączanie starterów	Temperatura dobrana dla danych starterów	30 sekund	30
Elongacja	72°C	30 sekund/kb	30
Końcowa elongacja	72°C	10 minut	1

Po zakończonej reakcji PCR, mieszaninę przeniesiono do nowej probówki, do której dodano 50 μl mieszaniny fenol:chloroform:alkohol izoamyłowy. Po krótkim, intensywnym wytrząsaniu w celu zmieszania faz, próbki poddano wirowaniu. Fazę wodną przeniesiono do nowej probówki, dodano 0,1 objętości 3 M octanu sodu oraz trzykrotną objętość 96% etanolu. Próbki inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze -80°C, a następnie zwirowano przez 40 minut przy 14 000 rpm. Supernatant usunięto, a osad wysuszono w suszarce próżniowej SpeedVac i zawieszono w 50 μl wody. Pomiar stężenia uzyskanego produktu PCR przeprowadzono za pomocą spektrofotometru NanoDrop 1000, a jakość produktu oceniono na 1% żelu agarozowym.

4.1.3. Reakcja wydłużania starterów

Reakcja wydłużania starterów jest procesem PCR wykorzystywanym do otrzymania dwuniciowej cząsteczki DNA. Matrycą są dwa oligodeoksyrybonukleotydy, których fragmenty są do siebie komplementarne. W trakcie etapu amplifikacji startery ulegają wydłużeniu, tworząc dłuższy fragment dwuniciowej cząsteczki DNA.

Skład mieszaniny reakcyjnej:

Składnik	Stężenie końcowe/ilość
Bufor dla polimerazy DreamTaq 10x stężony	1x
Mieszanina deoksyrybonukleotydów (dNTP)	0,2 mM
Starter sensowny (F)	1,5 μ M
Starter antysensowny (R)	1,5 μ M
Polimeraza DreamTaq	0,05 U/ μ l
Woda MiliQ	do 200 μ l

Profil reakcji wydłużania starterów:

Nazwa etapu	Temperatura	Czas	Liczba cykli
Wstępna denaturacja	94°C	2 minuty	1
Denaturacja	94°C	1 minut 15 sekund	7
Przyłączanie starterów	55°C	2 minuty	7
Elongacja	72°C	2 minuty	7
Końcowa elongacja	72°C	10 minut	1

Po zakończeniu reakcji, mieszaninę przeniesiono do nowej probówki, do której dodano mieszaninę fenol:chloroform:alkohol izoamylowy w stosunku 1:1. Po intensywnym wytrząsaniu, w celu dokładnego zmieszania faz, próbki poddano wirowaniu. Następnie, fazę wodną przeniesiono do czystej probówki, dodano 0,1 objętości 3 M octanu sodu oraz trzykrotną objętość 96% etanolu. Próbkę inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze -80°C, a po tym czasie przeprowadzono wirowanie przez 40 minut przy 14 000 rpm. Supernatant usunięto, a osad wysuszono w suszarce próżniowej SpeedVac, a następnie zawieszono w 50 μ l wody Milli-Q. Stężenie uzyskanego produktu PCR zmierzono za pomocą spektrofotometru NanoDrop 1000, a jakość produktu oceniono za pomocą 1% żelu agarozowego.

4.2. Otrzymywanie cząsteczek RNA

4.2.1. Transkrypcja *in vitro*

W celu uzyskania badanych cząsteczek RNA, przeprowadzono reakcję transkrypcji *in vitro*, która polega na syntezie cząsteczki RNA na matrycy DNA. Reakcja ta zachodzi przy wykorzystaniu polimerazy RNA z bakteriofaga T7, która wymaga określonej sekwencji promotora do rozpoczęcia syntezy.

Skład mieszaniny reakcyjnej:

Składnik	Stężenie końcowe/iłość
Matryca DNA	10 µl
Bufor do transkrypcji 10x stężony	1x
Adenozyno-5'-trifosforan (ATP)	4 mM
Cytydino-5'-trifosforan (CTP)	4 mM
Guanozyno-5'-trifosforan (GTP)	4 mM
Urydino-5'-trifosforan (UTP)	4 mM
Guanozyna	2 mM
Ditiotreitol (DTT)	25 mM
MgCl ₂	18 mM
Polimeraza RNA z bakteriofaga T7	4,5 µg
Woda MiliQ	Do 100 µl

Matrycę DNA zdenaturowano przez 2 minuty w 90°C, a następnie przeprowadzono renaturację przez 10 minut w temperaturze pokojowej. W kolejnym kroku do matrycy dodano pozostałe składniki i inkubowano przez 4 godziny w temperaturze 37°C, przy wytrząsaniu 300 rpm. Po reakcji dodano 33,3 µl 100 mM kwasu etylenodiaminotetraoctowego (EDTA) o pH 8, który wiąże jony magnezu, niezbędne dla aktywności polimerazy RNA, w celu zatrzymania reakcji transkrypcji *in vitro*.

4.2.2. Oczyszczanie RNA po reakcji transkrypcji *in vitro*

Cząsteczki RNA uzyskane w reakcji transkrypcji *in vitro* oczyszczono za pomocą żelu poliakrylamidowego w warunkach denaturujących. W pierwszej kolejności do próby dodano 13 µl 3M octanu sodu (NaOAc) o pH 5,4 oraz 300 µl 96% etanolu. Następnie próby inkubowano przez godzinę w temperaturze -80°C. Po upływie tego czasu przeprowadzono wirowanie przez 40 minut przy prędkości 14 000 rpm. Supernatant usunięto, a osad wysuszono w suszarce próżniowej SpeedVac i rozpuszczono w 30 µl 8 M mocznika. Następnie próby zdenaturowano przez 2 minuty w 95°C i nałożono na żel poliakrylamidowy (29:1). Po zakończeniu elektroforezy, prążki były wizualizowane przy użyciu płytki kwarcowej pod lampą UV o długości fali 260 nm. Prążki żelu, zawierające cząsteczki RNA, znajdujące się na pożądanej wysokości wycięto skalpelem i umieszczono w probówce z 500 µl buforu do elucji. Następnie próbki wytrząsano przez noc w temperaturze 4°C przy 300 rpm. Następnego dnia supernatant przeniesiono do nowej probówki zawierającej 1500 µl 96% etanolu, wymieszano i inkubowano przez godzinę w -80°C. Kolejno, zwirowano w temperaturze 4°C przy 14 000 rpm przez 40 minut, supernatant usunięto, a osad wysuszono w suszarce próżniowej SpeedVac. Osuszony osad rozpuszczono w 20-30 µl wody.

4.2.3. Znakowanie cząsteczek RNA

W celu wizualizacji cząsteczek RNA używanych w eksperymentach wyznaczania stałej równowagi wiązania RNA z białkiem, cząsteczki RNA wyznakowano radioaktywnym izotopem fosforu ³²P. Do reakcji wykorzystano kinazę polinukleotydomową z bakteriofaga T4, która przenosi grupę fosforanową z radioaktywnego adenozyntrifosforanu (³²P-γ-ATP) na koniec 5' cząsteczki RNA.

Skład mieszaniny reakcyjnej:

Składnik	Stężenie końcowe/iłość
RNA	1000 ng
Bufor A 10x stężony	1x
³² P-γ-ATP	25 µCi
Kinaza polinukleotydomowa z faga T4 (PNK)	1 U
Woda MiliQ	Do 20 µl

Reakcję znakowania prowadzono przez godzinę w 37°C, po tym czasie dodano 3 U DNazy I w celu usunięcia pozostałości matrycy DNA po reakcji transkrypcji *in vitro* i inkubowano w

temperaturze 37°C przez 15 minut. W dalszym etapie, do reakcji dodano 20 µl wody Milli-Q oraz 40 µl mieszaniny fenol:chloroform:alkohol izoamylowy. Próbkę wymieszano w celu dokładnego zmieszania faz, próbki poddano krótkiemu wirowaniu. Następnie, fazę wodną przeniesiono do nowej probówki i dodano 20 µl 8 M mocznika i nałożono na 10% żel poliakrylamidowy (29:1) w warunkach denaturujących. Elektroforezę prowadzono w buforze 1x TBE przy mocy 15 W. Po zakończonej elektroforezie, do żelu poliakrylamidowego przyłożono ekran Fujifilm, który następnie zeskanowano w celu wizualizacji oczyszczonych prążków. Wybrane prążki, które znajdowały się na odpowiedniej wysokości, zostały wycięte i umieszczone w probówce z 500 µl buforu do elucji i probówki umieszczono w temperaturze 4°C, przy wytrząsaniu 300 rpm przez noc. Następnego dnia, supernatant umieszczono w probówce z 1500 µl 96% etanolu, wymieszano i inkubowano przez godzinę w temperaturze -80°C. Następnie próby zwirowano przez 40 minut przy prędkości 14 000 rpm. Po usunięciu supernatantu, osad wysuszono w suszarce próżniowej SpeedVac i rozpuszczono w 50 µl wody.

4.3. Elektroforeza

4.3.1. Elektroforeza w żelu agarozowym

W celu analizy jakości oraz długości fragmentów otrzymanych metodą wydłużania starterów oraz PCR, a także do sprawdzenia poszczególnych etapów konstrukcji wektorów wykonano elektroforezę w 1% żelu agarozowym. Po rozpuszczeniu agarozy w 1x stężonym buforze TBE, do przestudzonej mieszaniny dodano 2 µl barwnika Midori Green, który umożliwił wizualizację kwasów nukleinowych. Do nakładanych prób dodano również 6x stężony bufor obciążający w proporcji 5:1. Elektroforezę prowadzono w temperaturze pokojowej, w buforze 1x TBE, przy napięciu 100 V przez około 30 minut. Do analizy i dokumentacji żeli agarozowych wykorzystano urządzenie G:BOX.

4.3.2. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących

Elektroforezę w żelu poliakrylamidowym (PAGE) w warunkach denaturujących wykorzystywano do rozdziału i oczyszczania jednoniciowych kwasów nukleinowych. Żel zbudowany jest z usieciowanych cząsteczek akrylamidu i bisakrylamidu, który tworzy mostki poprzeczne między łańcuchami akrylamidu. Wielkość porów żelu, zależy od stosunku akrylamidu do bisakrylamidu, co pozwala na rozdział cząsteczek o różnej wielkości. W celu przygotowania żelu poliakrylamidowego w warunkach denaturujących rozpuszczono na mieszadle magnetycznym mocznik oraz mieszaninę akrylamidu i bisakrylamidu. Następnie, do zainicjowania reakcji polimeryzacji dodano nadsiarczan amonu (APS) oraz N,N,N',N'-

tetrametyloetylenodiaminę (TEMED). Elektroforezę prowadzono w temperaturze pokojowej, w buforze 1x TBE, przy mocy 15 W.

4.3.3. Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym z dodecylsiarczanem sodu (SDS-PAGE)

W celu rozdzielenia białek według masy cząsteczkowej wykorzystano elektroforezę SDS-PAGE. Do żelu poliakrylamidowego dodano dodecylsiarczan sodu (SDS), który niszczy strukturę białek i nadaje im ładunek ujemny, dzięki czemu ich migracja zależy przede wszystkim od wielkości białka. Żel składał się z górnej części zagęszczającej oraz dolnej części rozdzielającej. Do prób zawierających analizowane białka dodano bufor obciążający Laemmli, które następnie zdenaturowano 2 minuty w 95°C i naniesiono na żel. Elektroforezę prowadzono w buforze do SDS-PAGE (Tris-Glicyna-SDS) o stężeniu 1x przy początkowym napięciu 120 V, które następnie zwiększono do 180 V. Po zakończonej elektroforezie, żel umieszczono w roztworze barwiącym błękitie Coomassie Brilliant Blue R-250 na 30 minut, po tym czasie przeniesiono do buforu odbarwiającego i inkubowano do momentu uwidocznienia prążków.

4.4. Metody inżynierii genetycznej

4.4.1. Projektowanie i przygotowanie konstruktów do nadekspresji

W celu otrzymania konstruktów umożliwiających nadekspresję białka ProQ lub Hfq wklonowano sekwencje kodujące te białka do wektora pBAD24 oraz pNM46. Wektor pBAD24 był stosowany w poprzednich badaniach w naszym laboratorium, natomiast plazmid pNM46 otrzymano dzięki uprzejmości profesor Giseli Storz. Grupa badawcza profesor Storz z Narodowego Instytutu Zdrowia Dziecka i Rozwoju Człowieka w Narodowych Instytutach Zdrowia NIH w Stanach Zjednoczonych posiada bogate doświadczenie w wykorzystaniu tego wektora w eksperymentach opartych na głębokim sekwencjonowaniu. Równoległe przygotowanie konstruktów w dwóch różnych wektorach umożliwiło zarówno kontrolę eksperymentalną, jak i ocenę efektywności ekspresji analizowanych genów w zależności od użytego systemu.

W przypadku wektora pBAD24 do klonowania użyto dwóch miejsc restrykcyjnych – BamHI oraz NcoI. Zaprojektowany starter sensowny (F) posiadał na końcu 5' miejsce cięcia dla enzymu BamHI, a starter antysensowny (R) miejsce cięcia dla enzymu NcoI. Z kolei, w przypadku wektora pNM46 użyto miejsca restrykcyjnego NcoI. Plazmid pBAD24 posiada w swojej sekwencji miejsce wiązania rybosomu przed miejscem restrykcyjnym BamHI, w wyniku czego wykorzystanie tego miejsca restrykcyjnego umożliwiło pomyślną translację białka ProQ lub

Hfq. Natomiast, w przypadku plazmidu pNM46 konieczne było wprowadzenie do sekwencji plazmidu sekwencji kodującej miejsce Shine-Dalgarno.

4.4.2. Wprowadzenie sekwencji kodującej miejsce Shine-Dalgarno do wektora pNM46

W celu przygotowania konstruktów, w pierwszej kolejności konieczne było wprowadzenie do wektora pNM46 sekwencji odpowiadającej miejscu wiązania rybosomu. Proces ten rozpoczęto od przeprowadzenia reakcji PCR, zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 4.1.2, z wykorzystaniem zaprojektowanych starterów zawierających sekwencję Shine-Dalgarno i komplementarnych do sekwencji plazmidu.

4.4.2.1. Fosforylacja produktu PCR

Następnie uzyskany produkt PCR, zawierający sekwencję pełnej cząsteczki plazmidu pNM46 wraz z wprowadzoną sekwencją Shine-Dalgarno, poddano reakcji fosforylacji w celu dodania grup fosforanowych do końców 5', co umożliwiło skuteczną ligację produktu do formy cyrkularnej. Proces fosforylacji przeprowadzono z wykorzystaniem polinukleotydowej kinazy T4 w obecności ATP, który służył jako donor grup fosforanowych.

Skład mieszaniny reakcyjnej:

Składnik	Stężenie końcowe/ilość
Produkt PCR	20 pmol
Bufor A 10x stężony	1x
10 mM ATP	1 mM
Kinaza polinukleotydowa z faga T4 (PNK)	0,5 U
Woda MiliQ	do 20 μ l

Reakcję prowadzono przez godzinę w 37°C, następnie w celu inaktywacji kinazy próbę inkubowano przez 10 minut w 75°C.

4.4.2.2. Ligacja plazmidu po reakcji fosforylacji

W celu uzyskania formy cyrkularnej plazmidu pNM46 z wprowadzoną sekwencją kodującą miejsce wiązania rybosomu, po przeprowadzeniu reakcji fosforylacji, plazmid poddano reakcji ligacji.

Skład mieszaniny reakcyjnej:

Składnik	Stężenie końcowe/ilość
Plazmid po reakcji fosforylacji	1 µg
Bufor dla ligazy DNA faga T4 5x stężony	1x
Ligaza DNA faga T4	1 U
Woda MiliQ	do 20 µl

Reakcję ligacji prowadzono przez noc w temperaturze 14°C, po czym przeprowadzono transformację do komórek bakteryjnych szczepu DH5α zgodnie z protokołem opisanym w podrozdziale 4.5.1. Plazmidy izolowano przy użyciu metody opisanej w podrozdziale 4.5.3. Następnie, w celu potwierdzenia obecności wprowadzonej sekwencji miejsca wiązania rybosomu w wektorze pNM46, wyizolowane plazmidy przekazano do sekwencjonowania w Wydziałowej Pracowni Techniki Biologii Molekularnej Uniwersytetu imienia Adama Mickiewicza w Poznaniu.

4.4.3. Trawienie restrykcyjne

Sekwencje kodujące białko ProQ i Hfq amplifikowane metodą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) oraz plazmidów pNM46 i pBAD24, zostały poddane trawieniu enzymatycznemu przy użyciu enzymów restrykcyjnych. W przypadku plazmidu pNM46 użyto enzym NcoI, natomiast dla pBAD24 zastosowano enzymy BamHI oraz NcoI.

Skład mieszaniny reakcyjnej:

Składnik	Stężenie końcowe/ilość
Produkt PCR/plazmid pNM46/pBAD24	3 mg
Bufor CutSmart New England Biolabs 10x stężony	1x
Enzym restrykcyjny (BamHi i/lub NcoI)	2,5 ul
Woda MiliQ	do 50 µl

Reakcję trawienia prowadzono w temperaturze 37°C przez 3 godziny. Następnie produkt po trawieniu oczyszczano przy użyciu zestawu do oczyszczania DNA - Nucleospin PCR cleanup. Pomiar stężenia DNA przeprowadzono za pomocą spektrofotometru NanoDrop 1000.

4.4.4. Defosforylacja plazmidu

W celu uniknięcia samoligacji plazmidu po trawieniu enzymami restrykcyjnymi przeprowadzono defosforylację wektora z wykorzystaniem alkalicznej fosfatazy.

Skład mieszaniny reakcyjnej:

Składnik	Stężenie końcowe/ilość
Plazmid pNM46/pBAD24	3 mg
Bufor dla fosfatazy 10x stężony	1x
Alkaliczna fosfataza FastAP	2,5 ul
Woda MiliQ	do 20 µl

Reakcję prowadzono przez godzinę w temperaturze 37°C. Następnie dezaktywowano alkaliczną fosfatazę poprzez inkubację reakcji w temperaturze 75° przez 5 minut. Oczyszczanie przeprowadzono z wykorzystaniem kolumnienek z zestawu Nucleospin PCR cleanup, a stężenie plazmidu zmierzono za pomocą spektrofotometru NanoDrop 1000.

4.4.5. Ligacja

Oczyszczony insert zawierający sekwencję białka ProQ lub Hfq poddano ligacji do wcześniej zdefosforylowanego plazmidu pNM46 lub pBAD24.

Skład mieszaniny reakcyjnej:

Składnik	Stężenie końcowe/ilość
Plazmid pNM46/pBAD24	100 ng
Insert trawiony odpowiednimi enzymami restrykcyjnymi	300 ng
Bufor dla ligazy DNA faga T4, 10x stężony	1x
Ligaza DNA faga T4	1 U
Woda MiliQ	do 20 µl

Reakcję prowadzono w temperaturze 16°C przez noc, po czym dezaktywowano ligazę poprzez 5-minutową inkubację w 70°C.

4.5. Metody mikrobiologiczne

4.5.1. Transformacja

W niniejszej pracy doktorskiej transformację komórek bakteryjnych przeprowadzano przy wykorzystaniu metody szoku cieplnego. Technika ta polega na chwilowym podwyższeniu temperatury, a następnie na jej obniżeniu, co prowadzi do zwiększenia przepuszczalności błony komórkowej bakterii i umożliwia wniknięcie cząsteczki DNA do wnętrza komórki.

W pierwszym kroku, przygotowane wcześniej komórki kompetentne rozmrożono na lodzie, po czym w sterylnych warunkach dodano 35 ng cząsteczki DNA. Próby inkubowano przez 30 minut na lodzie. Następnie, próbki umieszczono w 42°C na 40 sekund, po czym przez 5 minut chłodzono na lodzie. Po przeprowadzeniu szoku cieplnego dodano do probówek po 1 ml płynnej pożywki LB i inkubowano w 37°C przez godzinę w warunkach wytrząsania 180 rpm. W następnym kroku, próby zwirowano, odrzucono większość supernatantu, w pozostałej ilości rozpuszczono osad i wysiano na pożywce agarowej z odpowiednimi antybiotykami i inkubowano w temperaturze 37°C przez noc.

4.5.2. Kolonijny PCR

Kolonijny PCR to metoda stosowana do szybkiej analizy obecności określonego fragmentu DNA w komórkach bakteryjnych, które wyrosły na pożywce, na przykład po procesie transformacji. Technika ta pozwala na potwierdzenie obecności konkretnego genu lub sekwencji nukleotydowej eliminując konieczność wcześniejszej izolacji materiału genetycznego.

W celu wykonania kolonijnego PCR w pierwszej kolejności pobrano za pomocą sterylnej ezy badaną kolonię bakteryjną i rozpuszczono w 50 µl wody Mili-Q. Następnie próbkę umieszczono w 95°C na 5 minut i tak powstały lizat z kolonii bakteryjnej służył jako matryca w reakcji PCR.

Skład mieszaniny reakcyjnej:

Składnik	Stężenie końcowe/ilość
Lizat z kolonii bakteryjnej	5 µl
Starter sensowny (F)	0,5 µM
Starter antysensowny (R)	0,5 µM
Mieszanina reakcyjna Q5 High-Fidelity 2X Master Mix, zawierająca polimerazę DNA	25 µl
Woda MiliQ	do 50 µl

Profil reakcji kolonijnego PCR:

Nazwa etapu	Temperatura	Czas	Liczba cykli
Wstępna denaturacja	98°C	30 sekund	1
Denaturacja	98°C	10 sekund	30
Przylączanie starterów	Temperatura dobrana dla danych starterów (50–72°C)	30 sekund	30
Elongacja	72°C	30 sekund/kb	30
Końcowa elongacja	72°C	2 minuty	1

4.5.3. Izolacja plazmidów

Plazmidy izolowano zgodnie z instrukcją producenta gotowych zestawów do izolacji:

- Zestaw Plasmid Mini AX do izolacji plazmidów (A&A Biotechnology)
- Zestaw Monarch Spin do izolacji plazmidów (New England Biolabs)

4.5.4. Otrzymywanie komórek kompetentnych

Komórki kompetentne to komórki bakteryjne zdolne do przyjęcia cząsteczki DNA z otoczenia w procesie transformacji. Kompetencja może występować zarówno w sposób naturalny, jak i być indukowana w warunkach laboratoryjnych. Do najczęściej stosowanych metod laboratoryjnych należy między innymi metoda chemiczna przy użyciu chlorku wapnia, która została zastosowana w niniejszej pracy doktorskiej w celu uzyskania kompetentnych komórek bakteryjnych.

Aby otrzymać komórki kompetentne, pojedynczą kolonię pożądanego szczepu bakteryjnego zaszczerpiono do płynnej pożywki LB i prowadzono hodowlę w 37°C przez noc z wytrząsaniem przy prędkości 180 rpm. Następnego dnia, hodowlę nocną przeniesiono do 30 ml świeżej pożywki LB w stosunku objętościowym 1:100 i inkubowano w 37°C z wytrząsaniem, aż do osiągnięcia wartości $OD_{600} = 0,4 - 0,5$. Następnie, hodowlę zwirowano przez 10 minut w temperaturze 4°C przy prędkości 4500 rpm. Supernatant odrzucono, a osad rozpuszczono w 20 ml schłodzonego roztworu 0,1 M chlorku wapnia ($CaCl_2$). Zawiesinę inkubowano na lodzie przez godzinę, po czym komórki ponownie zwirowano przez 10 minut w temperaturze 4°C przy prędkości 4500 rpm. Supernatant odrzucono, a osad rozpuszczono w 2,5 µl schłodzonego roztworu chlorku wapnia i dodano 500 µl 80% glicerolu. Przygotowane komórki kompetentne

rozporcjowano do sterylnych probówek po 50 μ l i zamrożono za pomocą ciekłego azotu i przechowywano w temperaturze -80°C .

4.6. Metody biologii molekularnej

4.6.1. Western blot

Technika Western blot jest powszechnie stosowaną metodą służącą do wykrywania i identyfikacji specyficznych białek w badanej próbce. Procedura obejmuje trzy główne etapy: elektroforezę białek w żelu poliakrylamidowym z dodecylosiarczanem sodu (SDS-PAGE), transfer białek na membranę oraz ich detekcję przy użyciu specyficznych przeciwciał.

W niniejszej pracy, w pierwszym etapie przeprowadzono elektroforezę białek SDS-PAGE, zgodnie z protokołem opisanym w podrozdziale 4.3.3. W dalszej kolejności żel umieszczono w buforze transferowym (1x), na jego powierzchnię nałożono membranę nitrocellulozową o średnicy porów $0,2\ \mu\text{m}$ oraz z dwóch stron bibułę Whatman. Elektrotransfer przeprowadzono metodą moką w temperaturze 4°C , w buforze 1x PBST, przy napięciu 16 V przez noc. W celu oceny efektywności transferu, membranę wybarwiono roztworem Ponceau S, po czym barwnik usunięto poprzez płukanie w buforze 1x PBST oraz wodzie dejonizowanej.

W kolejnym etapie, aby zapobiec niespecyficznemu wiązaniu przeciwciał, membranę poddano blokowaniu w 3% roztworze odtłuszczonego mleka w buforze 1x PBST. Inkubację prowadzono przez godzinę w temperaturze pokojowej na wytrząsarce orbitalnej. Następnie, membranę poddano inkubacji z przeciwciałami pierwszorzędowymi przez noc w temperaturze 4°C , w warunkach wytrząsania. W kolejnym etapie, przeprowadzono inkubację z przeciwciałami drugorzędowymi, sprzężonymi z peroksydazą chrzanową, w temperaturze pokojowej przez godzinę. Po każdej inkubacji membranę płukano w buforze 1x PBST w celu usunięcia niespecyficznie związanych przeciwciał.

W celu wizualizacji uzyskanych wyników wykorzystano zestaw SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate. Procedura polegała na dwuminutowej inkubacji membrany z substratem peroksydazy chrzanowej, umożliwiając reakcję chemiluminescencyjną.

Detekcja sygnału została przeprowadzona przy wykorzystaniu aparatu do obrazowania ChemiDoc MP firmy BioRad, co pozwoliło na uwidocznienie prążków białkowych oraz ich analizę ilościową i jakościową.

4.6.2. Wyznaczanie stałej równowagi dysocjacji (K_d) dla kompleksów RNA-białko

W celu wyznaczenia stałej równowagi dysocjacji kompleksu RNA-białko zastosowano technikę różnicowej migracji kompleksów w żelu poliakrylamidowym (ang. *Electromobility Shift Assay*, EMSA). Jest to metoda powszechnie stosowana w biologii molekularnej określająca siłę wiązania między ligandem a receptorem.

W pierwszej kolejności badaną cząsteczkę RNA, która została uprzednio wyznakowana radioaktywnym izotopem fosforu ^{32}P , denaturowano w temperaturze 90°C przez 2 minuty. Następnie próbę renaturowano na lodzie przez 5 minut, po czym dodano do niej bufor do wiązania o końcowym stężeniu 1x (25 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 5% glicerol).

Reakcję wiązania przeprowadzano na płytce 96 dołkowej, wcześniej opłaszczanej przy pomocy buforu zawierającego 0,0025% BSA. Reakcję wiązania przygotowano poprzez nałożenie na opłaszczoną płytkę 10 μl roztworu ^{32}P -RNA, o stężeniu końcowym 1 nM, do dołków zawierających różne stężenie białka ProQ lub FinO. Stężenia białka przygotowano poprzez wykonanie szeregu rozcieńczeń w 1x stężonym buforze do wiązania. Mieszaninę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 30 minut, po czym 5 μl mieszaniny nałożono na 6% żel poliakrylamidowy (19:1). Elektroforezę prowadzono przez godzinę w buforze 0,5x TBE w temperaturze 4°C przy mocy 8W. Po zakończeniu elektroforezy, żel wysuszone, przeniesiono do kasety z ekranem fosforowym (Fuji) i naświetlano przez noc. Następnego dnia, wykonano odczyt przy użyciu skanera Amersham Typhoon (GE Healthcare). Frakcję związaną obliczono przy użyciu oprogramowania MultiGauche, jako stosunek intensywności sygnału odpowiadającemu kompleksowi RNA-białko do sumy intensywności sygnału kompleksu oraz wolnego RNA. Wartości stałej równowagi dysocjacji (K_d) wyznaczono w programie GraphPad przy użyciu równania kwadratowego:

$$Y = Y_0 + \Delta Y \frac{[E]_0 + [S]_0 + K_d - \sqrt{([E]_0 + [S]_0 + K_d)^2 - 4[E]_0[S]_0}}{2[E]_0}$$

gdzie Y jest frakcją związaną, Y_0 to dolna wartość plateau, ΔY to różnica między górnym a dolnym plateau, $[E]_0$ to stężenie znakowanej cząsteczki ^{32}P -RNA, $[S]_0$ to stężenie białka, a K_d to stała równowagi dysocjacji. Odchylenia standardowe obliczono na podstawie co najmniej trzech niezależnych eksperymentów.

4.6.3. Test kompetycji

W celu zbadania interakcji pomiędzy cząsteczkami RNA, a białkami ProQ i FinO wykonano test konkurencyjnego wiązania. Metoda ta pozwala na ocenę specyficzności wiązania cząsteczki RNA do białka w warunkach obecności obydwu białek jednocześnie. W konsekwencji możliwe jest określenie, które z białek, ProQ czy FinO, wykazuje silniejsze powinowactwo do badanego RNA w warunkach konkurencyjnych.

W pierwszym etapie badaną i wyznakowaną cząsteczkę RNA poddano denaturacji przez 2 minuty w temperaturze 90°C i renaturacji na lodzie przez 5 minut. Reakcję wiązania inicjowano poprzez zmieszanie zdenaturowanej cząsteczki ³²P-RNA, której stężenie końcowe w reakcji wynosiło 1 nM, z białkiem ProQ i/lub FinO (każde o końcowym stężeniu 100 nM) w buforze wiążącym (150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH 7,5, 5% glicerolu, 1 mM MgCl₂). Reakcję wiązania prowadzono przez 30 minut w temperaturze pokojowej, w niskoadhezyjnych, niewiążących probówkach Eppendorfa. Po tym czasie, 10 μl reakcji nałożono na 6% żel poliakrylamidowy (19:1). Elektroforezę prowadzono w temperaturze 4°C w buforze 0,5x TBE, przy mocy 8W. Następnie żel wysuszono i poddano ekspozycji na ekran fosforowy przez noc. Kwantyfikację sygnału przeprowadzono przy użyciu skanera Amersham Typhoon (GE Healthcare) oraz oprogramowania MultiGauge (Fuji FLA-5000). Frakcję związaną obliczano jako stosunek wartości sygnału odpowiadającego określönemu kompleksowi ³²P-RNA-białko (³²P-RNA-ProQ lub ³²P-RNA-FinO) do sumy wartości sygnału wszystkich prążków ³²P-RNA, zarówno wolnego, jak i w kompleksach białkowych, zgodnie z równaniem:

$$Fb = \frac{S_{p-RNA}}{S_{p-RNA} + S_{RNA} + S_{p*-RNA}}$$

gdzie: *Fb* to frakcja związana, *S_{p-RNA}* to sygnał odpowiadający specyficznemu kompleksowi białko-RNA (z ProQ lub FinO), *S_{RNA}* to sygnał odpowiadający wolnemu RNA, *S_{p*-RNA}* to sygnał odpowiadający kompleksowi RNA z drugim białkiem.

Średnią wartość frakcji związanej obliczono na podstawie co najmniej trzech niezależnych eksperymentów, a wyniki zaprezentowano przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism.

4.6.4. Technika oddziaływania RNA przez ligację i sekwencjonowanie (RIL-seq)

Technika RIL-seq (ang. *RNA Interaction by Ligation and Sequencing*) to eksperymentalna metoda pozwalająca na identyfikację interakcji pomiędzy małymi niekodującymi cząsteczkami RNA (sRNA), a ich regulowanymi RNA, związanymi jednocześnie z białkiem wiążącym cząsteczki RNA w komórce jak i na identyfikację pojedynczych RNA związanych z białkiem. Metoda RIL-Seq jest techniką złożoną i wymagającą starannej optymalizacji na każdym etapie. Główne wyzwania tej metody obejmują precyzyjną stabilizację oddziaływania RNA-RNA *in vivo*, efektywną izolację kompleksów RNA-białko oraz zaawansowaną analizę bioinformatyczną uzyskanych danych sekwencyjnych.

4.6.4.1. Sיעiowanie krzyżowe cząsteczek RNA i zamrażanie hodowli bakteryjnej

W pierwszym etapie przygotowano nocną hodowlę bakteryjną badanych szczepów, którą prowadzono w pożywce LB przy wytrząsaniu 200 rpm, w temperaturze 37°C przez noc. Następnego dnia hodowlę rozcieńczono stukrotnie w świeżej pożywce LB i kontynuowano inkubację w temperaturze 37°C przy wytrząsaniu 200 rpm, do osiągnięcia wartości $OD_{600} = 0,5$. Następnie obliczoną objętość hodowli, zgodnie ze wzorem: objętość hodowli = $40/OD_{600}$, zwirowano w temperaturze 4°C przy 4500 g przez 15 minut. Odrzucono supernatant, a osad bakteryjny zawieszono w 20 ml schłodzonego buforu PBS (1x). Zawiesinę ponownie zwirowano w temperaturze 4°C przy 4500 g przez 10 minut. Supernatant odrzucono, a osad zawieszono w 10 ml schłodzonego buforu PBS (1x). Następnie, 10 ml zawiesiny komórkowej przeniesiono na szalkę Petriego i umieszczono na metalowym bloku, uprzednio schłodzonym do temperatury -20°C. Tak przygotowane komórki poddano ekspozycji na promieniowanie UV o długości fali 254 nm i dawce 80 000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ z odległości 3 cm przy użyciu urządzenia UVP HL-2000 HybriLinker Hybridization Oven. Napromieniowane komórki bakteryjne przeniesiono do schłodzonej probówki 50 ml i umieszczono na lodzie. Zawiesinę komórkową zwirowano przy 4500 g przez 10 minut w temperaturze 4°C. Osad zawieszono w 1 ml schłodzonego 1x stężonego PBS i przeniesiono do schłodzonych probówek o pojemności 2 ml. Następnie, próby zwirowano przy 17 000 g przez 3 min w temperaturze 4°C, supernatant usunięto, a uzyskany osad bakteryjny zamrożono przy pomocy ciekłego azotu i przechowywano w temperaturze -80 °C.

4.6.4.2. Przygotowanie lizatu oraz wstępne oczyszczanie

Zamrożone osady komórkowe rozmrożono na lodzie i zawieszono w 800 μ l buforu płuczącego. Zawiesiny komórkowe przeniesiono do nowych, wcześniej przygotowanych probówek, które zawierały kulki szklane o średnicy 0,1 mm. Licz komórek przeprowadzano poprzez wytrząsanie za pomocą wytrząsarki dziesięć razy po 30 sekund. Następnie, komórki zwirowano przy prędkości 14 000 rpm przez 3 minuty w temperaturze 4°C. Supernatant przeniesiono do nowej probówki.

Z każdej próbki pobrano 75 μ l lizatu do ekstrakcji całkowitego RNA. W tym celu do próbki dodano 225 μ l buforu płuczącego oraz 900 μ l odczynnika Tri, wymieszano i przechowywano w temperaturze -80°C.

W celu oczyszczenia lizatu w pierwszej kolejności do nowej probówki dodano 20 μ l kulek magnetycznych z białkiem A/G do których dodano 200 μ l buforu płuczącego. Po wymieszaniu, probówki przeniesiono na stojak magnetyczny i odrzucono bufor. Następnie do kulek dodano 750 μ l lizatu komórkowego i inkubowano przez godzinę w temperaturze 4°C z rotacją 25 rpm. Następnie probówki krótko zwirowano i przeniesiono na stojak magnetyczny. Po rozjaśnieniu roztworu, oczyszczony lizat przeniesiono do nowych probówek.

4.6.4.3. Koimmunoprecypitacja z wykorzystaniem przeciwciał anti-Flag

Dla każdej próby przygotowano w nowej probówce 20 μ l kulek magnetycznych z białkiem A/G, do których dodano 200 μ l buforu płuczącego. Po wymieszaniu, probówki umieszczono na stojaku magnetycznym i po rozjaśnieniu roztworu odrzucono bufor unikając dotykania kulek.

Do przemytych kulek dodano 200 μ l buforu płuczącego i 3 μ l mysich przeciwciał monoklonalnych M2 przeciwko epitopowi Flag (anti-Flag). W celu związania przeciwciał z kulkami magnetycznymi probówki inkubowano przez 30 minut w 4°C z rotacją 25 rpm. Po tym czasie probówki krótko zwirowano i umieszczono na stojaku magnetycznym. Po rozjaśnieniu roztworu supernatant odrzucono. Probówki ponownie przemywano buforem płuczącym, a następnie przechowywano na lodzie.

Oczyszczony lizat komórkowy przeniesiono do probówek zawierających kulki magnetyczne z przeciwciałem anti-Flag. Próby inkubowano przez 90 minut w 4°C z rotacją 25 rpm, w celu związania białka z przeciwciałem monoklonalnym przeciwko epitopowi Flag. Po tym czasie, próby zwirowano przez 10 sekund przy prędkości 1500 rpm i umieszczono na stojaku magnetycznym. Po 5 minutach usunięto lizat, a kulki magnetyczne przemywano przez dodanie

do nich 200 μ l zimnego buforu płuczącego i rotację przez 10 minut w 4°C. Probówki zwirowano, umieszczono na stojaku magnetycznym i po rozjaśnieniu roztworu odrzucano bufor. Proces czyszczenia powtarzano czterokrotnie.

4.6.4.4. Przycinanie końców RNA

W celu przycięcia końców RNA do każdej z prób dodano 480 μ l przygotowanego buforu trawiącego RNazą (0,5 U/ μ l RNaza A/T1, bufor płuczący) i inkubowano przez 7 minut, w temperaturze 22°C z wytrząsaniem 300 rpm. Następnie próby zwirowano przy 1500 g przez 10 sekund i umieszczono na stojaku magnetycznym. Po rozjaśnieniu roztworu usunięto bufor i dodano 200 μ l zimnego buforu SUPERase In zawierającego inhibitor rybonukleazy i inkubowano przez 5 minut, w temperaturze 4°C z rotacją. Następnie próby zwirowano, umieszczono na stojaku magnetycznym i odrzucono bufor. Procedurę płukania powtarzano dwukrotnie.

4.6.4.5. Fosforylacja końców 5'OH, defosforylacja końców 2'P/3'P oraz ligacja sąsiadujących cząsteczek RNA

Podczas kolejnego etapu modyfikowano końce RNA, które powstały w wyniku działania RNazy. Mieszanina reakcyjna zawierała kinazę polinukleotydową faga T4 (PNK), która fosforyluje koniec 5'OH oraz defosforyluje końce 2'P/3'P cząsteczek RNA. W konsekwencji, powstały fragmenty z końcami 5'P oraz 3'OH, które mogły zostać poddane ligacji.

W celu fosforylacji końców cząsteczek RNA probówki z poprzedniego etapu umieszczono na stojaku magnetycznym i usunięto bufor płuczący. Następnie do prób dodano 80 μ l mieszaniny reakcyjnej PNK (1x bufor PNK, 1 mM rATP, 1 U/ μ l RRI, 0,5 U/ μ l T4 PNK) i inkubowano przez 2 godziny w temperaturze 22°C z wytrząsaniem 300 rpm. Po tym czasie probówki umieszczono na stojaku magnetycznym, usunięto bufor, dodano 200 μ l schłodzonego buforu płuczącego i inkubowano przez 5 minut, w 4°C z rotacją. Następnie próby zwirowano, umieszczono na stojaku magnetycznym i odrzucono bufor. Procedurę płukania powtarzano dwukrotnie.

Ligację przeprowadzono przez dodanie do każdej próby 80 μ l wcześniej przygotowanej mieszaniny ligacyjnej (1x bufor dla ligazy T4 RNA, 1 mM ATP, 0,6 U/ μ l RRI, 2,7 U/ μ l ligaza RNA T4, 9% DMSO, 20% PEG). Próby wymieszano i inkubowano przez noc w temperaturze 22°C.

4.6.4.6. Proteoliza białek

Próby po nocnej inkubacji umieszczono na stojaku magnetycznym i po uzyskaniu klarownego roztworu usunięto mieszaninę ligacyjną. Następnie dodano 200 µl schłodzonego buforu płuczającego i mieszano przez 5 minut w 4°C. Probówki zwirowano, umieszczono na stojaku magnetycznym i po rozjaśnieniu roztworu odrzucono bufor. Proces czyszczenia powtarzano dwukrotnie. W dalszej kolejności do prób dodano 300 µl buforu do proteolizy białek (50 mM Tris-HCl pH 7,8, 50 mM NaCl, 0,1% IGEPAL, 10 mM imidazol, 1% SDS, 5 mM EDTA pH 8, 5 mM 2-β-merkaptoetanol, 0,1 U/µl RRI, 0,33 mg/ml proteinazy K), wymieszano i inkubowano przez 2 godziny w temperaturze 55°C przy wytrząsaniu 300 rpm.

4.6.4.7. Izolacja RNA

W celu izolacji RNA do prób dodano 900 µl odczynnika TriReagent LS, wymieszano i inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Następnie dodano 200 µl chloroformu i inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Po tym czasie próby zwirowano przez 10 minut w temperaturze 4°C przy 17 000 g i górną fazę przeniesiono do nowej probówki. W kolejnym kroku do prób dodano 500 µl izopropanolu i inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Aby uwidocznić osad zawierający cząsteczki RNA dodano 1,5 µl odczynnika GlycoBlue i inkubowano w temperaturze -20°C przez noc.

Kolejnego dnia przeprowadzono płukanie osadu poprzez dodanie 1 ml 75% etanolu i zwirowanie przez 5 minut przy prędkości 12 000 rpm w temperaturze 4°C. Supernatant usunięto, a osad wysuszono i rozpuszczono w 20 µl wody traktowanej DEPC.

4.6.4.8. Analiza wyizolowanego RNA przy użyciu urządzenia TapeStation

W celu oznaczenia stężenia oraz długości cząsteczek RNA wykorzystano zestaw Bioanalyzer RNA 6000 Pico oraz urządzenie TapeStation. Analizę przeprowadzono zgodnie z instrukcją od producenta. Dodatkowo, w celu określenia stężenia RNA wykorzystano również spektrofotometr firmy NanoDrop. Następnie przygotowano próby tak, aby stężenie końcowe RNA wynosiło 400 ng w 15 µl wody traktowanej DEPC, po czym do prób dodano 1 µl inhibitora RNazy i przechowywano w temperaturze -80°C.

4.6.4.9. Fragmentacja oraz obróbka enzymatyczne DNazą oraz alkaliczną fosfatazą FastAP

W celu stworzenia biblioteki, w pierwszym etapie do prób dodano 4 µl buforu dla alkalicznej fosfatazy FastAP i inkubowano w termocyklerze przez 3 minuty w temperaturze 92°C, po czym umieszczono na lodzie. Następnie dodano 20 µl mieszaniny reakcyjnej zawierającej DNazę i

alkaliczną fosfatazę (1 U/ μ l RRI, 0,2 U/ μ l TURBO DNaza, 0,25 U/ μ l FastAP) i inkubowano przez 30 minut w temperaturze 37°C.

Oczyszczanie RNA z produktów reakcji wykonano przy użyciu gotowego zestawu do oczyszczania RNA Clean & Concentrator-5 zgodnie z instrukcją od producenta. W celu kontroli i sprawdzenia efektywności fragmentacji RNA wykonano analizę TapeStation używając test RNA ScreenTape o wysokiej czułości.

4.6.4.10. Ligacja adaptera na końcu 3' oraz łączenie bibliotek

W probówce umieszczono 5 μ l określonego dla każdej z prób adaptera, których nazwy oraz sekwencje znajdują się w tabeli w podrozdziale 3.8, dodano do niego 100 μ M oczyszczonego RNA i inkubowano przez 2 minuty w 70°C. Następnie dodano 14 μ l mieszaniny ligacyjnej (1x bufor dla ligazy RNA T4, 1 mM ATP, 0,6 U/ μ l RRI, 2,55 U/ μ l ligazy RNA T4, 9% DMSO, 20% PEG), wymieszano i inkubowano przez 2 godziny w 22°C. Po tym czasie, do każdej próby dodano 60 μ l buforu RLT, aby zahamować aktywność ligazy. Następnie wszystkie próby połączono w jednej probówce i oczyszczono przy użyciu gotowego zestawu do oczyszczania RNA Clean & Concentrator-5 zgodnie z instrukcją od producenta.

4.6.4.11. Synteza pierwszej nici cDNA z wykorzystaniem systemu Superscript III First-Strand Synthesis

Syntezę pierwszej nici cDNA na matrycy oczyszczonego RNA przeprowadzono przy użyciu systemu Superscript III. W tym celu, do próby dodano 1 μ l startera AR2 o stężeniu 50 μ M i tak przygotowaną mieszaninę inkubowano przez 2 minuty w 70°C. W następnym kroku do próby dodano 13 μ l buforu do odwrotnej transkrypcji (0,5 mM dNTP, 1x bufor RT, 5 mM MgCl₂, 0,01 M DTT, 0,8 U/ μ l RNazaOUT) wraz z enzymem odwrotnej transkryptazy SuperScript III o stężeniu końcowym 10 U/ μ l, wymieszano i inkubowano przez 55 minut w temperaturze 50°C.

4.6.4.12. Degradacja RNA i oczyszczanie cDNA

Procedurę degradacji RNA przeprowadzono poprzez dodanie do próby 2,5 μ l 1 M wodorotlenku sodu i inkubację przez 12 minut w temperaturze 70°C. Następnie do próby dodano 5 μ l 0,5 M kwasu octowego i dokładnie wymieszano.

W celu oczyszczenia otrzymanych cząsteczek cDNA do próby dodano wody, tak aby otrzymać końcową objętość 40 μ l, po czym dodano 1,5x objętości izopropanolu oraz 2,5x objętości kulek RNACleanXP, próbę wymieszano i inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Następnie otwartą probówkę umieszczono na stojaku magnetycznym i suszono przez 15 minut.

Po tym czasie, kulki zawieszono w 5 µl wody traktowanej DEPC i inkubowano przez 2 minuty w temperaturze pokojowej.

4.6.4.13. Ligacja drugiego adaptera na końcu 3' cDNA (ssDNA/ssDNA) oraz dwustopniowe oczyszczanie cDNA w celu usunięcia pozostałych adapterów

Ligację drugiego adaptera na końcu 3' przeprowadzono poprzez dodanie do próby oczyszczonych cząsteczek cDNA z magnetycznymi kulkami RNACleanXP adaptera 3Tr3 o stężeniu 40 µM i inkubację przez 3 minuty w 75°C. Po tym czasie do probówki dodano 13 µl mieszaniny ligacyjnej (PEG 8000, DMSO), wymieszano, zwirowano i inkubowano w temperaturze 22°C przez noc.

W celu pozbycia się niezwiązanych adapterów z próby wykonano dwustopniowe oczyszczanie cDNA. W pierwszej kolejności dodano wody traktowanej DEPC do końcowej objętości 40 µl, 1,5x objętości izopropanolu oraz 2,5x objętości kulek RNACleanXP. Próbę wymieszano i inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Po tym czasie, probówkę umieszczono na stojaku magnetycznym i po rozjaśnieniu roztworu usunięto supernatant. Pozostałe w probówce na stojaku kulki przemyto 200 µl 80% etanolu i inkubowano przez 30 sekund, po czym usunięto supernatant i otwartą probówkę pozostawiono do osuszenia. Następnie kulki zawieszono w 25 µl wody traktowanej DEPC i inkubowano przez 2 minuty w temperaturze pokojowej, po czym umieszczono na stojaku magnetycznym. Następnie, po uzyskaniu klarownego roztworu supernatant, który zawierał oczyszczone cDNA przeniesiono do nowej probówki. Procedurę powtórzono dwukrotnie i oczyszczone cDNA przechowywano w -20°C.

4.6.4.14. Usuwanie rybosomalnych RNA (rRNA) poprzez hybrydyzację (DASH)

W celu usunięcia rRNA z otrzymanych prób, zastosowano metodę selektywnego usuwania obfitych, niepożądanych cząsteczek RNA poprzez hybrydyzację DASH (ang. *Depletion of Abundant Sequences by Hybridization*). Technika ta polega na usunięciu niekorzystnych RNA z próbki cDNA, wykorzystując cząsteczek sgRNA i nukleazy Cas9. Usuwanie fragmentów sekwencji rRNA ma na celu poprawę jakości prób, eliminując te sekwencje, które mogłyby utrudniać analizę wyników z procesu sekwencjonowania oraz późniejsze procedury bioinformatyczne.

W pierwszej kolejności inkubowano pulę cząsteczek sgRNA, zaprojektowanych specjalnie przez firmę IDT dla organizmu *Escherichia coli* i zawierających sekwencje rRNA, przez 3

minuty w temperaturze 94°C. Następnie, po ochłodzeniu próby na lodzie, dodano 10x stężony bufor dla nukleazy Cas9 o stężeniu końcowym 1,8x oraz nukleazę Cas9 i inkubowano przez 15 minut w 37°C, w celu utworzenia kompleksów Cas9-sgRNA. Stosunek molowy Cas9 do sgRNA wynosiło 100:1000. Po tym czasie do próby dodano 8 µl oczyszczonego cDNA i inkubowano przez 2 godziny w 37°C.

Po zakończonej reakcji przeprowadzono trawienie nukleazy Cas9 przy użyciu proteiny K. W tym celu do prób dodano 1 µl proteiny K i inkubowano przez 15 minut w 37°C. Aby zahamować dalszą aktywność enzymu, do próbki dodano bufor PMSF o końcowym stężeniu 1 mM. Następnie, w celu oczyszczenia próbki, zastosowano kulki magnetyczne AMPure XP w stosunku 1,5:1 do objętości próbki. Próbę wymieszano i inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Po tym czasie próbkę umieszczono na stojaku magnetycznym, a po wyklarowaniu roztworu usunięto supernatant. Kulki przemyto 200 µl 80% etanolu, a po usunięciu supernatantu proces płukania powtórzono dwukrotnie. Po ostatnim płukaniu, kulki zostały wysuszone, a oczyszczone cDNA eluowano przez dodanie 12 µl wody traktowanej DEPC i zebraniu supernatantu do nowej próbki.

4.6.4.15. Test wzbogacenia PCR służący do określenia ostatecznej liczby cykli PCR, oczyszczanie produktów PCR oraz analiza przy użyciu systemu TapeStation

W celu otrzymania biblioteki cDNA wykonano test wzbogacenia PCR, który służył do określenia ostatecznej liczby cykli PCR. Amplifikacja uzyskanego materiału w poprzednich etapach pozwala na zwiększenie ilości DNA oraz na dodanie adapterów potrzebnych do zsekwencjonowania. Ważne jest, że najlepsza jest jak najmniejsza liczba wymaganych cykli PCR, aby zminimalizować powstawanie artefaktów oraz nie równomierniej amplifikacji różnych fragmentów DNA, co może spowodować odstępstwa od reprezentatywności biblioteki.

W celu określenia jak najmniejszej liczby cykli PCR, w pierwszej kolejności przygotowano mieszaninę reakcyjną i następnie podzielono ją na trzy próbki zawierające po 8 µl mieszaniny reakcyjnej. Amplifikację cDNA przeprowadzono z zastosowaniem 3, 6 lub 9 cykli PCR.

Skład mieszaniny reakcyjnej:

Składnik	Stężenie końcowe/ilość
cDNA	5 µl
Starter P5_Enr	1 µM
Starter P7_BC1_Enr	1 µM
Mieszanina reakcyjna KAPA HIFI HotStart	12,5 µl
Woda traktowana DEPC	do 25 µl

Profil reakcji testu wzbogacenia PCR:

Nazwa etapu	Temperatura	Czas	Liczba cykli
Wstępna denaturacja	95°C	3 minuty	1
Denaturacja	95°C	30 sekund	3/6/9
Przyłączanie starterów	55°C	30 sekund	3/6/9
Elongacja	72°C	30 sekund	3/6/9
Końcowa elongacja	72°C	10 minut	1

Po reakcji PCR oczyszczano uzyskane produkty z wykorzystaniem kulek magnetycznych AMPure XP w stosunku 1,2:1 do objętości próbki. Próbę wymieszano i inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Po tym czasie próbkę umieszczono na stojaku magnetycznym, a po wyklarowaniu roztworu usunięto supernatant. Kulki przemyto 200 µl 80% etanolu, a po usunięciu supernatantu proces płukania powtórzono dwukrotnie. Po ostatnim płukaniu, kulki zostały wysuszone, a oczyszczone cDNA eluowano przez dodanie 11 µl wody traktowanej DEPC i zebraniu supernatantu do nowej próbki.

Do określenia stężenia oraz długości cząsteczek cDNA zastosowano zestaw D1000 ScreenTape o wysokiej czułości oraz system TapeStation, przeprowadzając analizę zgodnie z wytycznymi producenta. Ponadto, w celu pomiaru stężenia cDNA, wykorzystano spektrofotometr NanoDrop oraz fluorymetr Qubit.

4.6.4.16. Amplifikacja biblioteki cDNA metodą PCR

Do sekwencjonowania wybrano liczbę cykli, przy których osiągnięto odpowiednie stężenie DNA do sekwencjonowania i pożądaną profil, zawierający długości fragmentów co najmniej 185 nukleotydów. W naszym przypadku reakcję PCR powtórzono z wykorzystaniem 6 cykli amplifikacji.

Skład mieszaniny reakcyjnej:

Składnik	Stężenie końcowe/ilość
cDNA	10 μ l
Starter P5_Enr	1 μ M
Starter P7_BC1_Enr	1 μ M
Mieszanina reakcyjna KAPA HIFI HotStart	25 μ l
Woda traktowana DEPC	do 50 μ l

Profil reakcji testu wzbogacenia PCR:

Nazwa etapu	Temperatura	Czas	Liczba cykli
Wstępna denaturacja	95°C	3 minuty	1
Denaturacja	95°C	30 sekund	6
Przyłączanie starterów	55°C	30 sekund	6
Elongacja	72°C	30 sekund	6
Końcowa elongacja	72°C	10 minut	1

Po amplifikacji PCR uzyskane produkty poddano oczyszczaniu oraz analizie tak samo jak w poprzednim etapie/w punkcie 4.6.4.15. Uzyskaną próbę oddano do sekwencjonowania, które przeprowadzono w Centrum Sekwencjonowania Narodowych Instytutów Zdrowia (NIH), a analizę bioinformatyczną uzyskanych wyników wykonał Zespół Bioinformatyki i Programowania Naukowego w NIH, w Stanach Zjednoczonych.

4.6.5. Immunoprecypitacja RNA połączona z sekwencjonowaniem (RIP-seq)

Metoda immunoprecypitacji RNA połączona z sekwencjonowaniem (RIP-seq) polega na immunoprecypitacji kompleksów RNA-białko z użyciem przeciwciała specyficznego dla badanego białka, a następnie izolacji współprecypitowanych RNA i oznaczeniu sekwencji. W konsekwencji, można ustalić, jakie cząsteczki RNA są wiązane przez badane białko.

4.6.5.1. Przygotowanie osadu komórkowego oraz nośników sprzężonych z przeciwciałem specyficznym dla badanego białka

W pierwszym etapie przygotowano hodowlę bakteryjną badanych szczepów, którą prowadzono w pożywce LB przy wytrząsaniu 200 rpm, w temperaturze 37°C przez noc. Następnego dnia hodowlę rozcieńczono stukrotnie w świeżej pożywce LB i kontynuowano inkubację w temperaturze 37°C przy wytrząsaniu 200 rpm, do osiągnięcia wartości $OD_{600} = 1,0$. Kolejno, 20 ml hodowli zwirowano w temperaturze 4°C przy 4500 g przez 15 minut. Odrzucono supernatant, a osad bakteryjny zawieszono w 1 ml pożywki LB. Zawiesinę przeniesiono do próbówki Eppendorfa, zwirowano w temperaturze 4°C przy 4500 g przez 15 minut. Supernatant odrzucono, a uzyskany osad bakteryjny zamrożono przy pomocy ciekłego azotu i przechowywano w temperaturze -80 °C.

Następnie w próbówce typu Falcon odważono 120 mg sefarozyowych kulek opłaszczonych białkiem A i dodano 1 ml buforu Net2 oraz 100 µl przeciwciał anti-ProQ. Przeciwciała z kulkami inkubowano na mieszadle rolkowym w temperaturze 4°C przez noc. Następnego dnia, w celu pozbycia się niezwiązanych przeciwciał, sefarozyowe kulki przemyto trzykrotnie 10 ml buforu Net i przechowywano w 4°C.

4.6.5.2. Liza komórek oraz izolacja całkowitego RNA

Do każdej próby z rozmrożonym osadem bakteryjnym odważono około 600 mg kulek szklanych i dodano 400 µl buforu do lizy (20 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT) oraz 2 µl inhibitora RNAzy (RRI). Próbówki poddawano cykлом krótkiego wytrząsania przez 30 s naprzemiennie z chłodzeniem na lodzie przez 30 sekund, wykonując łącznie 10 takich cykli. Kolejno, dodano 800 µl buforu do lizy, wytrząsano przez 30 sekund i zwirowano w temperaturze 4°C przy 4500 g przez 10 minut.

W celu izolacji całkowitego RNA, pobrano 50 µl lizatu komórkowego do nowej próbówki i dodano 1 ml Trizolu, dokładnie wymieszano i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 minut. Następnie dodano 200 µl chloroformu, wymieszano i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 3 minuty. Próby zwirowano w temperaturze 4°C przy 14 000 rpm przez 15 minut i 600 µl górnej fazy przeniesiono do świeżej próbówki Eppendorfa. Dodano 500 µl alkoholu izopropylowego, wymieszano i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 20 minut. Próby zwirowano w temperaturze 4°C przy 14 000 rpm przez 10 minut, odrzucono supernatant, a osad przemyto 70% etanolem i ponownie zwirowano przez 5 minut w temperaturze 4°C przy 14 000 rpm. Supernatant odrzucono, a osad rozpuszczono w 15 µl wody

traktowanej DEPC. Pomiar stężenia całkowitego RNA przeprowadzono za pomocą spektrofotometru NanoDrop 1000. Próby przechowywano w temperaturze -80°C.

4.6.5.3. Izolacja cząsteczek RNA związanych z białkiem

W celu izolacji cząsteczek RNA związanych z białkiem pobrano 950 µl lizatu komórkowego i dodano do uprzednio przygotowanych sefarozowych kulek z białkiem A i przeciwciałami anti-ProQ. Następnie dodano 950 µl buforu Net oraz 5 µl inhibitora RNAzy (RRI) i inkubowano na mieszadle rotacyjnym w temperaturze 4°C przez dwie godziny. Próby zwirowano w temperaturze 4°C przy 14 000 rpm przez 10 minut, odrzucono supernatant, a osad przemyto trzykrotnie buforem Net i ponownie zwirowano. Supernatant odrzucono i dodano 2,2 ml buforu Net, 250 µl 3 molowego octanu sodu oraz 25 µl 10% SDS oraz 3 ml mieszaniny fenol:chloroform: alkohol izoamylowy. Próby wymieszano i zwirowano w temperaturze 4°C przy 14 000 rpm przez 10 minut. Kolejno, przeniesiono 2,5 ml fazy górnej do nowej probówki typu Falcon, dodano 5 µl Glycoblue, 6,25 ml etanolu i strącono w -80°C przez noc. Następnego dnia próby zwirowano w temperaturze 4°C przy 4150 rpm przez godzinę, odrzucono supernatant, a osad przemyto 10 ml etanolem. Wirowanie powtórzono, osad przemyto 1 ml etanolem i przeniesiono do probówki Eppendorfa i zwirowano w temperaturze 4°C przy 14 000 rpm przez 10 minut. Supernatant odrzucono, osad wysuszono w temperaturze pokojowej przez 15 minut i rozpuszczono w 15 µl wody traktowanej DEPC. Pomiar stężenia całkowitego RNA przeprowadzono za pomocą spektrofotometru NanoDrop 1000. Próby przechowywano w temperaturze -80°C.

Próby z izolacji RNA związanych z białkiem oraz próby całkowitego RNA wykorzystano do stworzenia bibliotek cDNA, według procedury opisanej w rozdziałach od 4.6.4.9 – 4.6.4.16. Tak przygotowane biblioteki zostały oddane do sekwencjonowania, które przeprowadzono w Centrum Sekwencjonowania Narodowych Instytutów Zdrowia (NIH), a analizę bioinformatyczne uzyskanych wyników wykonał Zespół Bioinformatyki i Programowania Naukowego w NIH, w Stanach Zjednoczonych.

4.6.6. Wyznaczanie struktury drugorzędowej RNA metodą hydrolizy enzymatycznej oraz cięcia jonami ołowiu (II)

W celu wyznaczenia struktury drugorzędowej RNA zastosowałam metodę hydrolizy enzymatycznej, która pozwala na identyfikację rejonów jednoniciowych, dwuniciowych oraz tworzących stabilne motywy strukturalne. Wykorzystałam do tego zestaw enzymów różnicujących strukturę RNA: RNazę III (tnącą sekwencje dwuniciowe), RNazę T1

(preferującą nukleotydy G w regionach jednoniciowych). Ponadto wykorzystałam w badaniach hydrolizę indukowaną jonami ołowiu (Pb^{2+}), które tną regiony jednoniciowe i regiony podatne na zmiany konformacyjne.

Badaną cząsteczkę RNA, która została uprzednio wyznakowana radioaktywnym izotopem fosforu ^{32}P przygotowano w końcowym stężeniu 20 nM. Próby denaturowano w temperaturze $95^{\circ}C$ przez minutę. Następnie próby schłodzono na lodzie przez 5 minut, po czym dodano do nich bufor strukturalny (Invitrogen) do końcowego stężenia 1x.

Reakcję hydrolizy prowadzono w objętości 10 μ l, dodając odpowiednie stężenia RNazy III, jonów ołowiu lub RNazy T1. W przypadku RNazy III, do reakcji dodano również 1 mM DTT i po dodaniu enzymu reakcję inkubowano przez 30 minut w $20^{\circ}C$. W przypadku reakcji cięcia za pomocą jonów ołowiu próby inkubowano przez 10 minut w $20^{\circ}C$, a przy użyciu RNazy T1 przez 5 minut w $37^{\circ}C$. W reakcjach kontrolnych zamiast enzymu lub jonów ołowiu do prób dodano wodę traktowaną DEPC. Reakcję zatrzymywano poprzez dodanie 20 μ l buforu inaktywującego i strącającego (Invitrogen) oraz 1 μ l Glycoblue. Następnie próby strącano w $-80^{\circ}C$ przez godzinę i zwirowano w temperaturze $4^{\circ}C$ przy 14 000 rpm przez 40 minut. Supernatant odrzucono, a osad rozpuszczono w 7 μ l buforu obciążającego II (Invitrogen) i przechowywano w $-20^{\circ}C$.

Reakcję kontrolną dla danej cząsteczki RNA przygotowano w wodzie traktowanej DEPC. Z kolei, reakcję trawienia RNazą T1 w warunkach denaturujących przygotowano w buforze do sekwencjonowania, który zawierał z 7 molowy mocznik (Invitrogen). Próbę kontrolną oraz z RNazą T1 w warunkach denaturujących najpierw poddano denaturacji, ochłodzono w temperaturze $37^{\circ}C$ przez 5 minut. Następnie dodano odpowiednio wodę lub RNazę T1 i inkubowano w temperaturze $37^{\circ}C$ przez 5 minut. Z kolei, drabinkę alkaliczną przygotowano w buforze z formamidem i $MgCl_2$ i inkubowano przez 8 minut w $90^{\circ}C$. Po tym czasie do wszystkich prób dodano bufor obciążający II (Invitrogen) i próby przechowywano w $-20^{\circ}C$.

Produkty hydrolizy przed nałożeniem na żel zdenaturowano w $90^{\circ}C$ przez 5 minut oraz krótko wirowano. Próby rozdzielano na 10% żelu poliakrylamidowym z 7 molowym mocznikiem. Elektroforezę prowadzono w 1x stężonym buforze TBE przy mocy 70 W. Następnie, żel mrożono w $-20^{\circ}C$ i eksponowano na ekran fosforowy (Fuji) przez noc. Ekran skanowano przy użyciu skanera Amersham Typhoon (GE Healthcare), a intensywność prążków analizowano za pomocą programu MultiGauge (Fuji).

4.6.7. Wyznaczenie miejsc wiązania białka w cząsteczce RNA za pomocą hydrolizy enzymatycznej

Metoda wyznaczania miejsc wiązania białka w cząsteczkach RNA za pomocą hydrolizy enzymatycznej (ang. *RNA footprinting*) służy do analizy wiązania białek do cząsteczek kwasów nukleinowych. Technika ta polega na inkubacji badanego kwasu nukleinowego z białkiem, a następnie na trawieniu RNA nukleazami lub odczynnikami chemicznymi. Fragmenty chronione przez związane białko nie ulegają cięciu, co jest widoczne po rozdiale elektroforetycznym produktów na żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. Porównanie próby badanej z próbą kontrolną, w której nie dodano białka, pozwala na precyzyjne określenie miejsc wiązania białka oraz zmian konformacyjnych w strukturze RNA.

Reakcję mapowania miejsc wiązania przeprowadzano w probówkach niewiążących, do których dodano zrenaturowane RNA o końcowym stężeniu 20 nM oraz białko o odpowiednim stężeniu w buforze strukturalnym 1x stężonym (Invitrogen). Reakcję inkubowano przez 30 minut w 20°C. Następnie do reakcji dodano odpowiednie enzymy lub jony ołowiu i dalsze etapy przeprowadzano w ten sam sposób, jak w przypadku wyznaczania struktury drugorzędowej RNA.

5. WYNIKI

5.1. Znaczenie sekwencji nukleotydowych otaczających spinki terminatorowe w rozróżnianiu cząsteczek RNA przez białka ProQ i FinO

W komórkach *Escherichia coli* i *Salmonella enterica* występują dwa białka z rodziny FinO: globalne białko ProQ, które wiąże setki RNA, oraz wyspecjalizowane białko FinO, rozpoznające głównie dwie cząsteczki sRNA: FinP i RepX (Smirnov i wsp. 2016; Holmqvist i wsp. 2018; Melamed i wsp. 2020; El Mouali i wsp. 2021). Pomimo, że obydwa białka oddziałują z RNA zawierającymi wewnętrzne terminatory transkrypcji, mechanizmy określające ich selektywność pozostają niejasne.

Celem badań opisanych w niniejszej części pracy doktorskiej było zidentyfikowanie sekwencji nukleotydowych i cech strukturalnych wybranych RNA determinujących selektywne wiązanie przez białka z rodziny FinO - ProQ i FinO oraz określenie, w jakim stopniu regiony przylegające do spinek terminatorowych mają znaczenie dla specyficzności tego rozpoznawania. Wyniki przedstawione w poniższym rozdziale zostały opublikowane w czasopiśmie RNA w 2025 roku (Mamońska i wsp. 2025).

5.1.1. Porównanie wiązania cząsteczek RNA *malM-3'* i FinP przez białka ProQ i FinO

W celu zbadania determinantów specyficzności wiązania RNA dr Maciej Basczok z naszego laboratorium przeprowadził analizę sekwencji i struktur cząsteczek RNA specyficznych dla białek ProQ i FinO *in silico*, obejmującą spinkę terminatorową, 10 nukleotydów po stronie 5' od terminatora oraz ogon poliurydynowy po stronie 3'. Analiza wykazała, że trzy położone najniżej pary zasad w spince terminatorowej to w większości pary G-C lub C-G, co sugeruje, że sama sekwencja w tym regionie nie determinuje ich selektywności. Natomiast istotne różnice zaobserwowano w sekwencjach bezpośrednio przylegających do zamykającej pary zasad struktury drugorzędowej terminatora oraz w regionie ogona poliurydynowego (poliU).

W przypadku cząsteczek RNA specyficznych dla białka ProQ, nukleotydy w dwóch pozycjach najbliższej podstawy spinki terminatorowej, zarówno po stronie 5' jak i 3', tworzyły pary A-U, U-A, G-U lub pary pirymidyna-pirymidyna (C-U, U-U, C-C). Natomiast w przypadku cząsteczek wiążących się z białkiem FinO, wykazano że w tym rejonie posiadają pary puryna-puryna. Wyniki te sugerują, że sekwencje nukleotydowe bezpośrednio przylegające do struktury spinki terminatorowej mogą determinować strukturę RNA oraz mieć znaczenie dla rozróżniania RNA przez białka ProQ i FinO (Mamońska i wsp. 2025).

W celu eksperymentalnego potwierdzenia ustaleń wynikających z analizy komputerowej w pierwszej kolejności wybrałam cząsteczki specyficzne dla białek ProQ i FinO. Zgodnie z wynikami głębokiego sekwencjonowania RIL-seq oraz CLIP-seq cząsteczka *malM* (*malM*-3') jest jedną z najważniejszych cząsteczek RNA wiązaną przez białko ProQ (Holmqvist i wsp. 2018; Melamed i wsp. 2020). Natomiast główną cząsteczką wiązaną przez białko FinO u *Escherichia coli* oraz *Salmonella enterica* jest FinP sRNA (Rys. 10A) (van Biesen i Frost 1994; El Mouali i wsp. 2021).

W pierwszej kolejności porównałam wiązanie powyższych cząsteczek RNA do trzech białek: białka ProQ, jego izolowanej N-końcowej domeny FinO obejmującej aminokwasy w pozycjach 1 do 130 (ProQ^{NTD}) oraz białka FinO (Rys. 10B-E). Wcześniejsze badania *in vitro* wykazały, że pełnowymiarowe białko ProQ wiąże się z podobnie dużym powinowactwem zarówno do RNA zawierających terminatory transkrypcji, jak i do RNA pozbawionych tych struktur. Sugeruje to, że przynajmniej w części wiązanie RNA przez pełnowymiarowe białko ProQ nie jest uzależnione od obecności spinek terminatorowych. Natomiast wyizolowana domena FinO białka ProQ rozpoznaje wyłącznie RNA, posiadające na końcu 3' strukturę terminatora transkrypcji (Chaulk i wsp. 2011; Pandey i wsp. 2020; Stein i wsp. 2020).

Wyniki analizy powinowactwa białek ProQ, ProQ^{NTD} oraz FinO do cząsteczek RNA, które są przez nie wiązane, wykazały wyraźną specyficzność tych oddziaływań. Pełnej długości ProQ wiązało *malM*-3' z wartością stałej równowagi dysocjacji (K_d) wynoszącą 27 ± 12 nM, natomiast cząsteczka FinP sRNA wykazywała trzykrotnie słabsze oddziaływanie. Wartości te ujęte są w Tabeli 1.

Podobną tendencję zaobserwowałam w przypadku białka ProQ^{NTD}, które wiązało cząsteczkę *malM*-3' z wartością K_d wynoszącą $5,8 \pm 0,7$ nM, a FinP z wartością około trzykrotnie wyższą. Co więcej, maksymalna frakcja związana kompleksu FinP-ProQ^{NTD} nie przekraczała 50%, natomiast w przypadku kompleksu *malM*-ProQ^{NTD} osiągała 80%, co potwierdza silniejsze i bardziej stabilne wiązanie cząsteczki *malM*-3' przez białko ProQ^{NTD}.

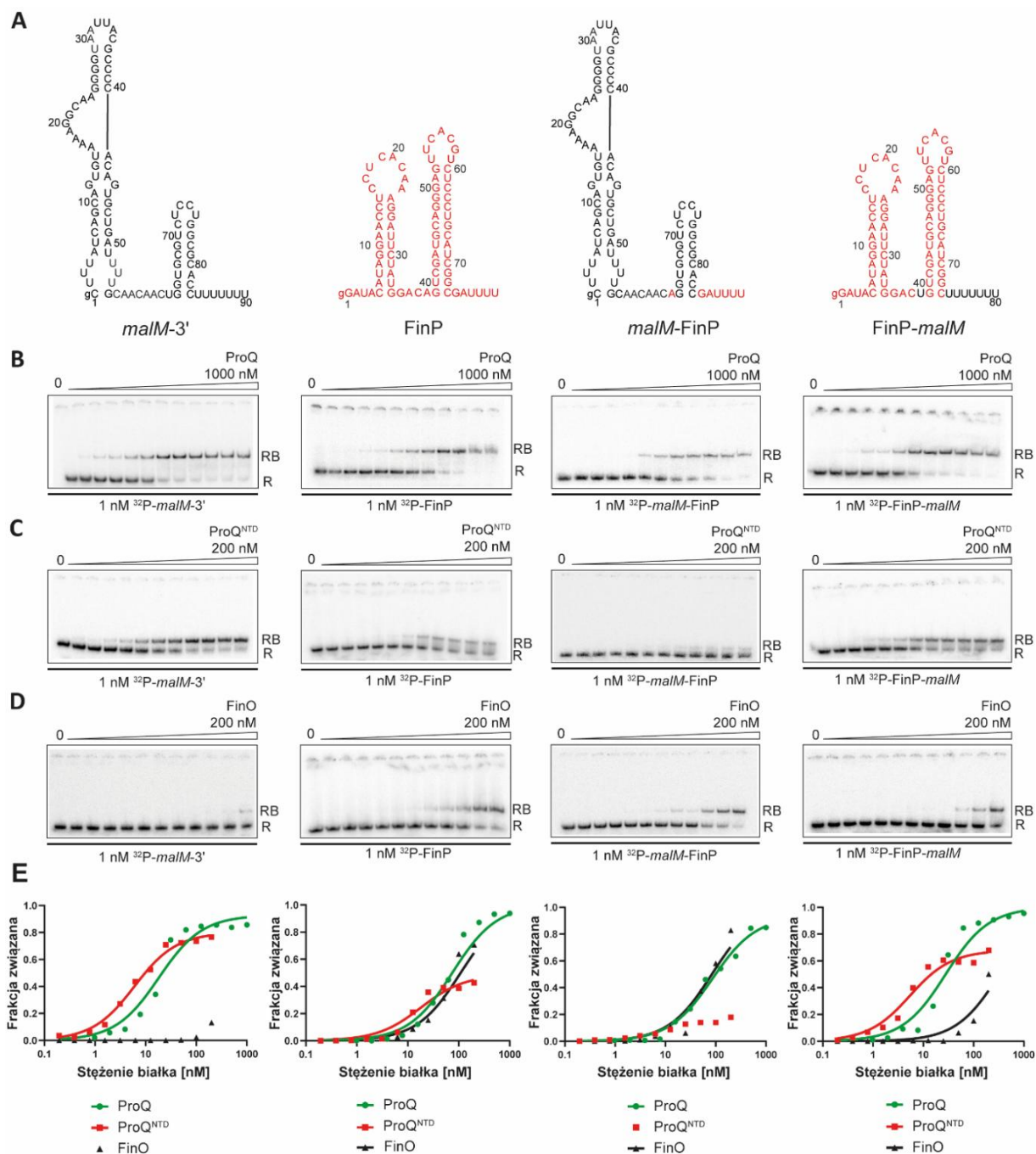
Z kolei, w przypadku białka FinO zaobserwowałam odwrotny efekt. Cząsteczka FinP, która jest specyficzna dla białka FinO, wiązała się do niego z wartością stałej równowagi dysocjacji K_d wynoszącą 110 ± 16 nM, a maksymalna frakcja związana wynosiła powyżej 70%. Natomiast oddziaływanie FinP z cząsteczką *malM*-3' było bardzo słabe i maksymalna frakcja związana przy najwyższym stężeniu białka osiągała tylko około 15% (Tabela 1).

5.1.2. Sekwencje znajdujące się u podstawy spinki terminatorowej są odpowiedzialne za rozpoznawanie cząsteczek RNA *malM-3'* i FinP przez białka ProQ i FinO

Następnie porównałam sekwencje nukleotydowe oraz struktury drugorzędowe cząsteczek *malM-3'* oraz FinP i zaprojektowałam mutanty, w których wymieniłam pomiędzy nimi fragmenty obejmujące region u podstawy terminatora transkrypcji, trzy nukleotydy po stronie 5' oraz region ogona poliU po stronie 3' od struktury spinki terminatorowej (Rys. 10A). W rezultacie powstała cząsteczka *malM-FinP*, zawierająca trzy nukleotydy po stronie 5' od terminatora transkrypcji oraz cały ogon poliU identycznie jak w cząsteczce FinP, a także *FinP-malM*, w której te regiony pochodziły z cząsteczki *malM-3'*.

Wyniki wiązania mutantu *malM-FinP* do białka ProQ wykazały, że oddziałuje z podobnym powinowactwem jak z cząsteczką FinP, a wiąże się około trzykrotnie słabiej niż cząsteczka *malM-3'* o naturalnej sekwencji. W przypadku domeny FinO białka ProQ (ProQ^{NTD}) *malM-FinP* wiązało się jeszcze słabiej, a maksymalna frakcja związana przy najwyższym stężeniu białka wynosiła maksymalnie 25%. Z kolei, odwrotną tendencję zaobserwowałam dla białka FinO, z którym *malM-FinP* oddziaływało podobnie jak z cząsteczką FinP (Rys. 10B-E, Tabela 1).

W przypadku mutantu *FinP-malM*, który posiada region u podstawy spinki terminatorowej pochodzący z cząsteczki *malM-3'*, oddziaływanie z pełnym białkiem ProQ oraz ProQ^{NTD} było podobne jak u *malM-3'*. Natomiast jego wiązanie do białka FinO było dwukrotnie słabsze w porównaniu z cząsteczką FinP o naturalnej sekwencji, jednak wyraźnie silniejsze niż *malM-3'*. Silniejsze wiązanie *FinP-malM* z FinO w porównaniu z *malM-3'* może sugerować, że rozpoznawanie cząsteczek RNA przez FinO zależy zarówno od sekwencji nukleotydowej jak również od kontekstu strukturalnego cząsteczki RNA.



Rysunek 10. Porównanie wiązania cząsteczek RNA *malM-3'*, *FinP*, *malM-FinP* oraz *FinP-malM* do białek *ProQ*, *ProQ^{NTD}* oraz *FinO*. (A) Struktury drugorzędowe badanych RNA, które zostały uzyskane przy użyciu oprogramowania RNAstructure. Kolorem czarnym zaznaczona jest sekwencja nukleotydowa pochodząca z *malM-3'*, a czerwonym z *FinP* sRNA. Wiązanie z *ProQ* (B), *ProQ^{NTD}* (C) oraz *FinO* (D) monitorowano techniką EMSA. R – niezwiązane RNA, RB – kompleks RNA-białko. (E) Dane zależności frakcji związanej RNA od stężenia białka, do których dopasowałam równanie kwadratowe w programie GraphPad. Dane pochodzą z eksperymentu reprezentatywnego spośród co najmniej trzech niezależnych powtórzeń. (Mamonska i wsp. 2025, zmodyfikowano)

5.1.3. Preferencyjne rozpoznawanie RNA *cspE81-3'* przez białko ProQ jest zależne od sekwencji znajdujących się u podstawy spinki terminatorowej

W celu potwierdzenia powyższych obserwacji, dodatkowo wybrałam cząsteczkę *cspE81-3'*, należącą również do najlepiej scharakteryzowanych RNA oddziałujących z białkiem ProQ (Holmqvist i wsp. 2018; Melamed i wsp. 2020). Szczególnie istotne jest to, że w przeciwieństwie do *malM-3'*, cząsteczka ta posiada parę A-U u podstawy spinki terminatorowej. Zgodnie z wcześniejszą analizą *in silico*, taka para w tym regionie jest najczęściej obserwowana wśród RNA rozpoznawanych przez białko ProQ.

W zamiarze zbadania, czy wiązanie *cspE81-3'*, zależy również od sekwencji nukleotydowej otaczającej spinkę terminatorową, zaprojektowałam mutantą tej cząsteczki, w którym regiony przylegające do terminatora transkrypcji zostały wymienione z odpowiednimi fragmentami FinP, analogicznie jak wykonano to w przypadku *malM-3'* (Rys. 11A). W rezultacie powstał mutant *cspE81-FinP*, w którym trzy nukleotydy po stronie 5' od spinki terminatorowej oraz ogon poliU były identyczne jak w cząsteczce FinP. Ze względu na fakt, że jedynie dwie pary zasad u podstawy spinki terminatorowej po stronie 5' różniły się pomiędzy *cspE81-3'* a FinP, zaprojektowałam dodatkowego mutantą *cspE81-FinP-stem*, w którym również dwie ostatnie pary w strukturze terminatora były identyczne jak w FinP. Celem tej modyfikacji było sprawdzenie, czy zarówno sekwencja otaczająca, jak i sekwencja dolnej części spinki terminatorowej mają znaczenie w wiązaniu RNA przez białka ProQ i FinO.

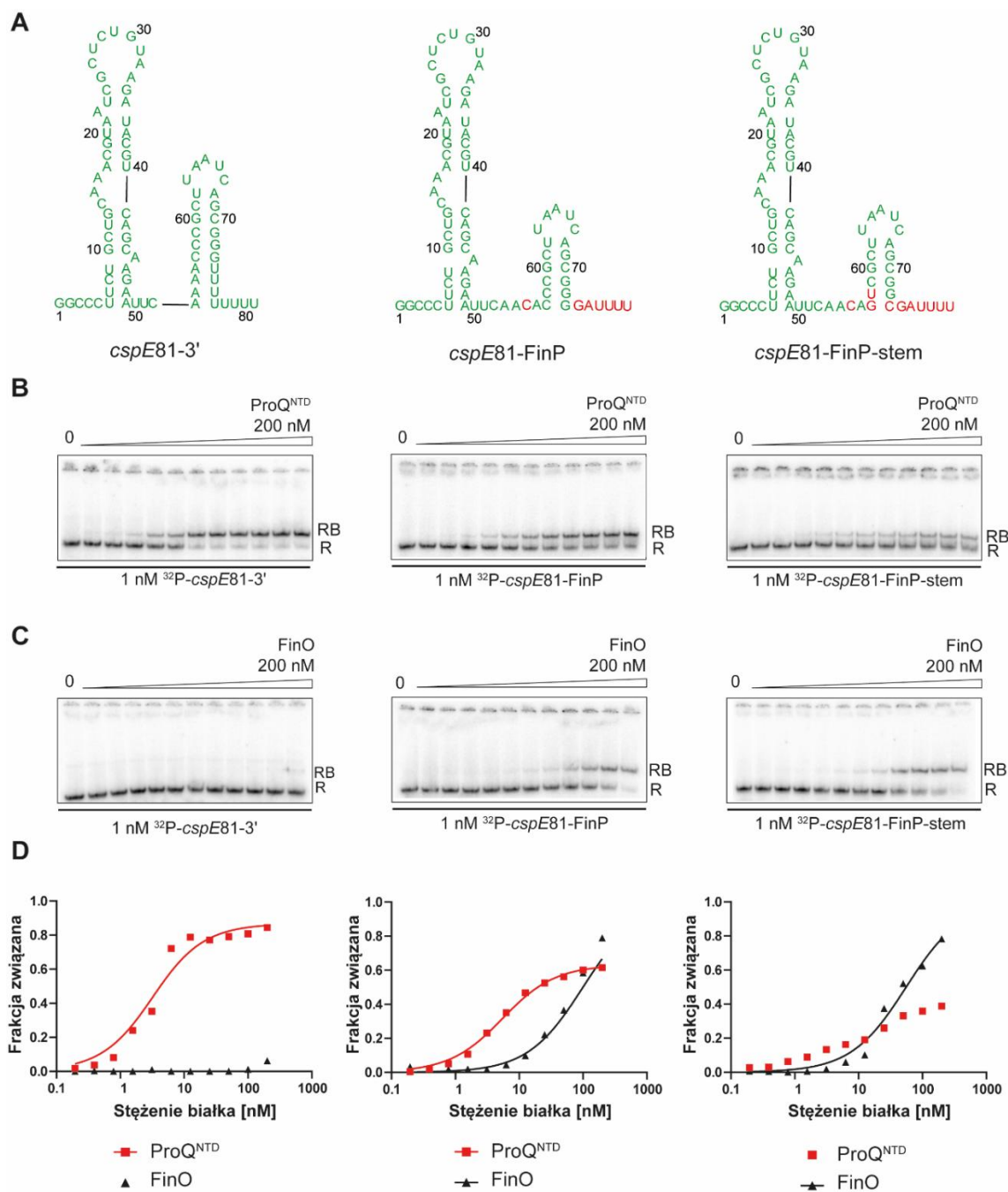
Wyniki eksperymentów wiązania wykazały, że cząsteczka *cspE81-3'* wiązała się bardzo silnie z białkiem ProQ^{NTD} z wartością stałej równowagi dysocjacji $2,4 \pm 0,27$ nM oraz maksymalną frakcją związania wynoszącą 85% przy najwyższym stężeniu białka. Natomiast oddziaływanie tej cząsteczki z białkiem FinO było znikome, a maksymalna frakcja związana wynosiła 10% (Rys. 11B-D, Tabela 1).

Natomiast mutant *cspE81-FinP*, który posiadał sekwencję nukleotydową u podstawy spinki taką samą jak w cząsteczce FinP, wiązał się do białka ProQ^{NTD} około dwukrotnie słabiej niż cząsteczka *cspE81-3'*, osiągając K_d $4,9 \pm 0,32$ nM przy jednoczesnym obniżeniu maksymalnej frakcji związania do 61%. Jednocześnie wiązanie tego mutantą z białkiem FinO było podobne jak w przypadku FinP sRNA i osiągało wartość stałej równowagi dysocjacji 88 ± 39 nM.

Z kolei cząsteczka *cspE81-FinP-stem*, zawierająca zarówno sekwencję u podstawy, jak i dwie najniższe pary zasad spinki terminatorowej identyczne jak FinP sRNA, wiązała się z białkiem FinO podobnie jak cząsteczka *cspE81-FinP*, osiągając wartość K_d 56 ± 16 oraz maksymalną

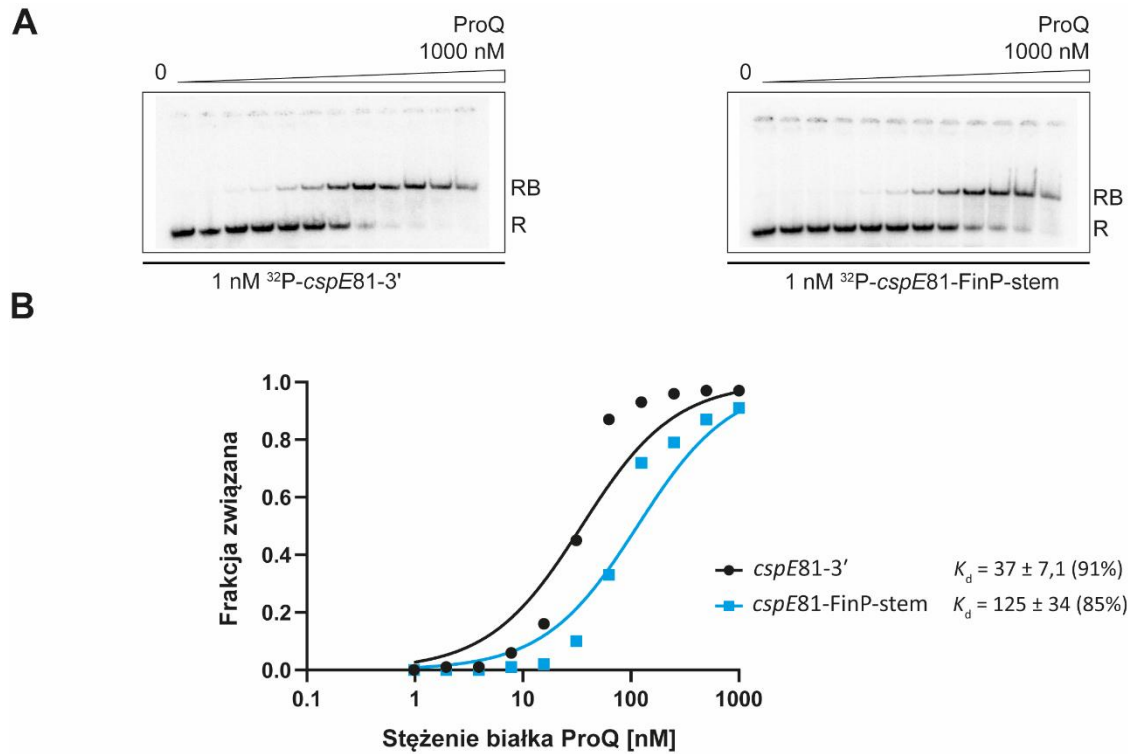
frakcję wiązania 72%. Natomiast dodatkowe zmiany w obrębie terminatora transkrypcji spowodowały dalsze osłabienie oddziaływania z ProQ^{NTD}, w porównaniu z mutantem *cspE81-FinP*. Wartość stałej równowagi dysocjacji tego wiązania oszacowałam jako większą niż 200 nM, podczas gdy maksymalna frakcja wiązania osiągała 37%.

Wyniki te świadczą o tym, że w kontekście cząsteczki *cspE81-3'* zarówno sekwencja otaczająca spinkę terminatorową jak i dwie pary zasad spinki u jej podstawy mają znaczenie w rozpoznawaniu RNA przez ProQ^{NTD}, podczas gdy sama sekwencja otaczająca terminator wystarcza do zapewnienia rozpoznawania przez FinO.



Rysunek 11. Porównanie wiązania cząsteczek RNA *cspE81-3'*, *cspE81-FinP* oraz *cspE81-FinP-stem* do domeny FinO białka ProQ (ProQ^{NTD}) oraz białka FinO. (A) Struktury drugorzędowe badanych RNA, które zostały uzyskane przy użyciu oprogramowania RNAstructure. Kolorem zielonym zaznaczona jest sekwencja nukleotydowa pochodząca z *cspE81-3'*, a czerwonym z *FinP* sRNA. Wiązanie z ProQ (B), ProQ^{NTD} (C) oraz FinO (D) monitorowano techniką EMSA. R – niezwiązane RNA, RB – kompleks RNA-białko. (E) Dane zależności frakcji związanej RNA od stężenia białka, do których dopasowałam równanie kwadratowe w programie GraphPad. Dane pochodzą z eksperymentu reprezentatywnego spośród co najmniej trzech niezależnych powtórzeń (Mamonska i wsp. 2025, zmodyfikowano).

Dodatkowo, w celu potwierdzenia uzyskanych wyników zmierzyłam również wiązanie *cspE81-3'* oraz *cspE81-FinP-stem* do białka ProQ o pełnej długości. Wyniki wykazały, że mutant *cspE81-FinP-stem* oddziaływał z ProQ ponad trzykrotnie słabiej niż *cspE81-3'* (Rys. 12).



Rysunek 12. Porównanie wiązania cząsteczek RNA *cspE81-3'* oraz *cspE81-FinP-stem* do pełnej długości białka ProQ. (A) Wiązanie z białkiem ProQ monitorowano za pomocą techniki EMSA. (B) Dane zależności frakcji związanej RNA od stężenia białka, do których dopasowałam równanie kwadratowe w programie GraphPad. Dane pochodzą z eksperymentu reprezentatywnego spośród co najmniej trzech niezależnych powtórzeń (Mamonska i wsp. 2025, zmodyfikowano).

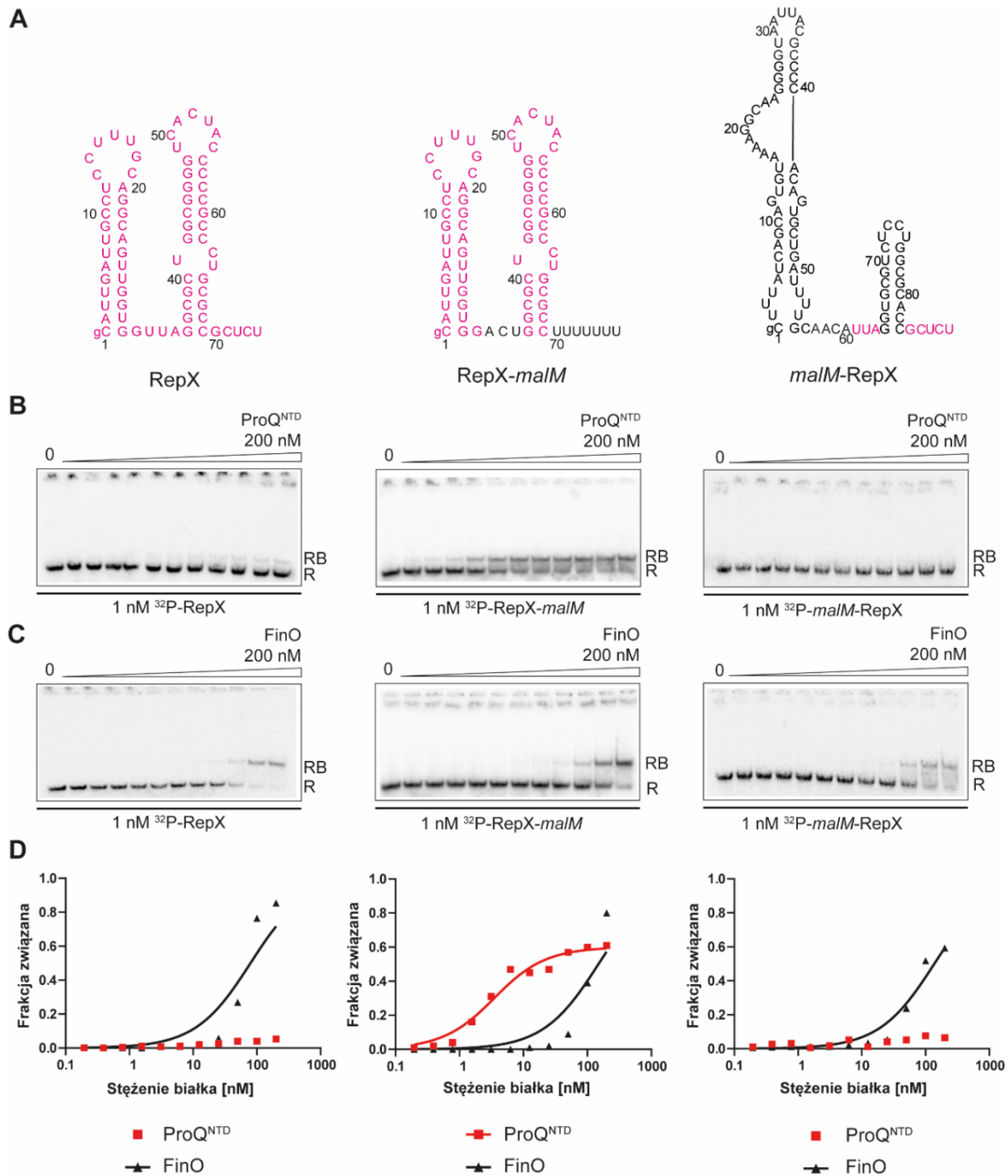
5.1.4. Preferencyjne rozpoznawanie RNA RepX przez białko FinO jest zależne od sekwencji znajdujących się u podstawy spinki terminatorowej

Zgodnie z najnowszymi badaniami, cząsteczką wiązaną przez białko FinO jest nie tylko FinP sRNA, ale i również RepX sRNA (El Mouali i wsp. 2021). W związku z tym, chciałam sprawdzić, czy również w przypadku RepX elementy sekwencji nukleotydowej otaczające spinkę terminatorową są kluczowe dla rozpoznawania RNA przez białko FinO. W tym celu zaprojektowałam dwa mutanty: RepX-*malM*, w którym trzy nukleotydy po stronie 5' od spinki terminatorowej oraz ogon poliU były identyczne jak w cząsteczce *malM*-3', oraz *malM*-RepX, w którym te regiony pochodziły z cząsteczki RepX sRNA.

Wyniki wykazały, że cząsteczka RepX sRNA oddziaływała bardzo silnie z białkiem FinO, osiągając wartość K_d 61 ± 23 nM oraz maksymalną frakcję związaną na poziomie 86% (Rys. 13). Jednocześnie, cząsteczka ta praktycznie nie wiązała się z białkiem ProQ^{NTD}, ponieważ jej maksymalna frakcja związana nie przekraczała 6% przy najwyższym stężeniu białka.

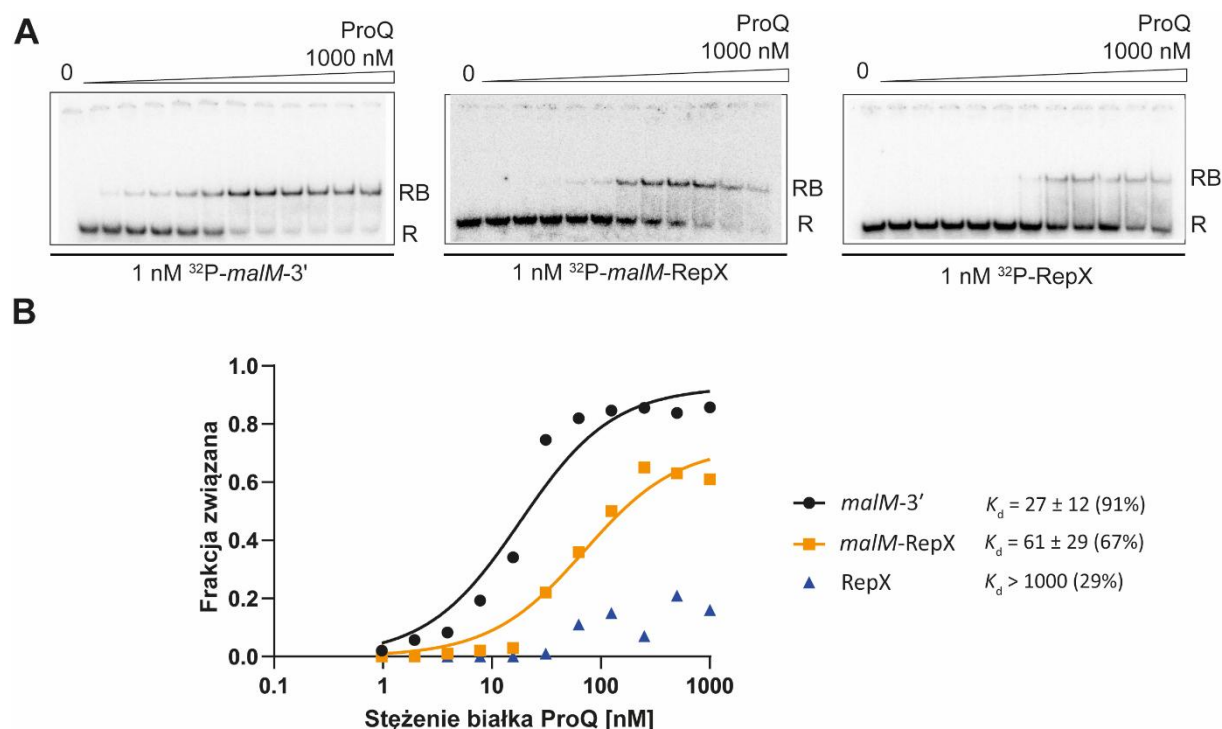
Mutant RepX-*malM* wiązał się z białkiem FinO z dwukrotnie słabszą wartością stałej równowagi dysocjacji w porównaniu do RepX sRNA, a z białkiem ProQ^{NTD} z wartością K_d osiągającą $3,2 \pm 1,6$ nM oraz maksymalną frakcją związaną ponad 60%. Wyniki te potwierdzają istotność zmian w obrębie podstawy terminatora transkrypcji dla rozpoznawania tej cząsteczki przez oba białka.

Z kolei, w przypadku mutanta *malM*-RepX obserwowałam odwrotną tendencję. Wiązanie z białkiem ProQ^{NTD} było znikome, ponieważ frakcja związania przy najwyższym stężeniu tego białka wynosiła maksymalnie 8%. Natomiast, cząsteczka ta oddziaływała z białkiem FinO z wartością K_d równą 150 ± 67 nM oraz maksymalną frakcją związania na poziomie 77%, podczas gdy dla cząsteczki *malM*-3' frakcja ta nie przekraczała 15%.



Rysunek 13. Porównanie wiązania cząsteczek RNA RepX, RepX-*malM* oraz *malM*-RepX do domeny FinO białka ProQ (ProQ^{NTD}) oraz białka FinO. (A) Struktury drugorzędowe badanych RNA, które zostały uzyskane przy użyciu oprogramowania RNAstructure. Kolorem różowym zaznaczona jest sekwencja nukleotydu pochodząca z RepX sRNA, a czarnym z *malM*-3'. Wiązanie z ProQ^{NTD} (B), FinO (C) monitorowano techniką EMSA. R – niezwiązane RNA, RB – kompleks RNA-białko. (E) Dane zależności frakcji związanej RNA od stężenia białka, do których dopasowałam równanie kwadratowe w programie GraphPad. Dane pochodzą z eksperymentu reprezentatywnego spośród co najmniej trzech niezależnych powtórzeń (Mamonska i wsp. 2025, zmodyfikowano).

Dodatkowo, sprawdziłam wiązanie cząsteczek RepX oraz *malM*-RepX do białka ProQ o pełnej długości, aby potwierdzić uzyskane wyniki (Rys. 14). Zaobserwowałam, że mutant *malM*-RepX wykazywał słabsze powinowactwo do ProQ, w porównaniu z cząsteczką *malM*-3', osiągając wartość K_d równą 61 ± 29 nM oraz maksymalną frakcję związaną wynoszącą 67%, podczas gdy dla cząsteczki *malM*-3' wartości te wynosiły odpowiednio 27 ± 12 nM i 91%. Natomiast cząsteczka RepX słabo wiązała się z ProQ, z maksymalną frakcją związaną na poziomie 29%.



Rysunek 14. Porównanie wiązania cząsteczek RNA *malM*-3', *malM*-RepX oraz RepX do pełnej długości białka ProQ. (A) Wiązanie z białkiem ProQ monitorowano za pomocą techniki EMSA. (B) Dane zależności frakcji związanej RNA od stężenia białka, do których dopasowałam równanie kwadratowe w programie GraphPad. Dane pochodzą z eksperymentu reprezentatywnego spośród co najmniej trzech niezależnych powtórzeń (Mamonska i wsp. 2025, zmodyfikowano).

Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują, że sekwencja nukleotydowa i struktura regionu u podstawy terminatora transkrypcji są kluczowe w prawidłowym rozpoznawaniu RNA przez białka z rodziny FinO. Dane z eksperymentów wiązania zaprojektowanych mutantów wykazały, że różnice w sekwencji otaczającej spinę terminatorową mają istotne znaczenie dla wiązania przez białko ProQ i FinO.

³² P-RNA	<i>K_d</i> [nM] (% średniej maksymalnej frakcji związanej)		
	ProQ	ProQ ^{NTD}	FinO
<i>malM-3'</i>	27 ± 12 (91%)	5,8 ± 0,7 (80%)	>200 (15%)
FinP	79 ± 18 (85%)	19 ± 6 (44%)	110 ± 16 (76%)
<i>malM-FinP</i>	78 ± 22 (91%)	>200 (23%)	86 ± 17 (82%)
FinP-malM	25 ± 6,7 (79%)	5,3 ± 1,5 (62%)	280 ± 110 (57%)
<i>cspE81-3'</i>	37 ± 7,1 (91%)	2,4 ± 0,27 (85%)	>200 (10%)
<i>cspE81-FinP</i>	-	4,9 ± 0,32 (61%)	88 ± 39 (74%)
<i>cspE81-FinP-stem</i>	130 ± 34 (85%)	>200 (37%)	56 ± 16 (72%)
RepX	>1000 (29%)	>200 (6%)	61 ± 23 (86%)
RepX-malM	-	3,2 ± 1,6 (62%)	150 ± 67 (77%)
<i>malM-RepX</i>	61 ± 29 (67%)	>200 (8%)	180 ± 93 (55%)

Tabela 1. Wiązanie cząsteczek RNA specyficznych dla białek ProQ i FinO oraz ich mutantów z transpląntowaną sekwencją regionu przy podstawie spinki terminatorowej z pełnej długości białkiem ProQ, domeną FinO białka ProQ (ProQ^{NTD}) oraz białkiem FinO. Wartości stałej równowagi dysocjacji *K_d* obliczono w programie GraphPad poprzez dopasowanie danych wykresu zależności frakcji związanej RNA od stężenia białka do równania kwadratowego. Podane wartości *K_d* stanowią średnią z co najmniej trzech niezależnych powtórzeń eksperymentów (Mamonska i wsp. 2025, zmodyfikowano).

5.1.5. Analiza elementów sekwencji RNA odpowiedzialnych za ich rozpoznawanie przez białka ProQ i FinO na przykładzie mutantów *malM-3'* i FinP

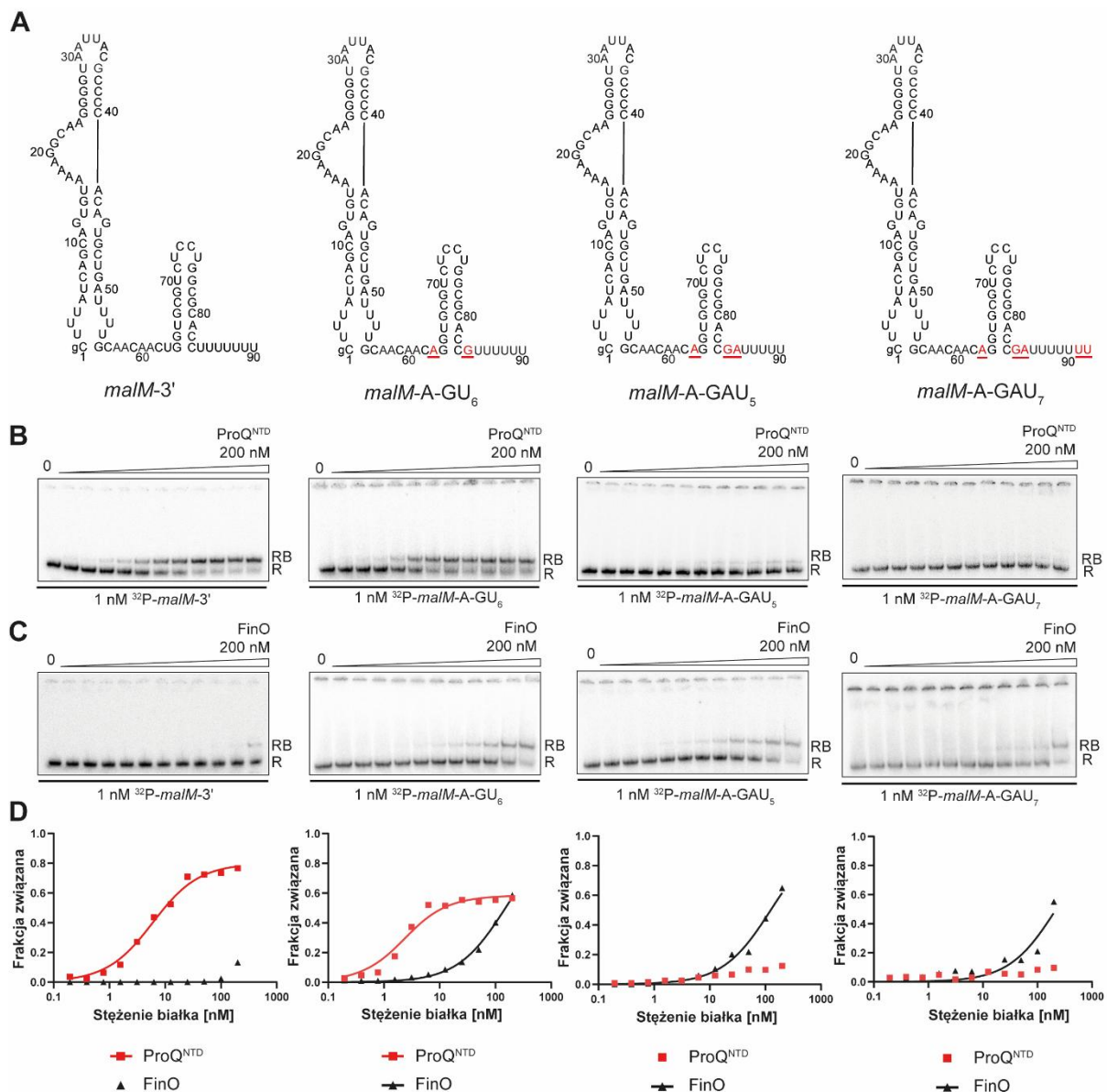
W celu określenia, które elementy sekwencji cząsteczek RNA wiążą się specyficznym do białka ProQ i FinO, zaprojektowałam mutanty *malM-3'* oraz FinP, pomiędzy którymi zamieniłam jedynie nukleotydy znajdujące się najbliżej spinki terminatorowej.

W przypadku cząsteczki *malM-3'* zaprojektowałam trzy mutanty (Rys. 15A). Mutant *malM-A-GU₆*, posiadał jeden nukleotyd zarówno po stronie 5' i 3' od spinki terminatorowej zastąpiony odpowiednio adenozyzną i guanozyzną, zgodnie z sekwencją cząsteczki FinP. Drugi mutant, *malM-A-GAU₅*, dodatkowo posiadał adenozyne w drugiej pozycji po stronie 3' od terminatora transkrypcji. Trzeci mutant *malM-A-GAU₇*, posiadał ogon poliU składający się z siedmiu urydyn, tak jak w cząsteczce *malM-3'* o naturalnej sekwencji.

Wyniki wiązania wykazały, że wprowadzenie zmian w najbliższych pozycjach u podstawy terminatora transkrypcji u *malM-A-GU₆* nie zmieniło znacząco wiązania z białkiem ProQ^{NTD} w porównaniu z *malM-3'*, ponieważ wartość K_d wyniosła $1,9 \pm 0,59$ nM, chociaż maksymalna frakcja związana spadła z 80% do 56%. Natomiast w przypadku wiązania z białkiem FinO, zmiana ta istotnie poprawiła powinowactwo tej cząsteczki osiągając K_d równą 150 ± 40 , co jest porównywalne do wartości uzyskanej dla FinP (Rys. 15B-D, Tabela 2).

Mutant *malM-A-GAU₅*, który posiadał adenozyne w drugiej pozycji po stronie 3' od terminatora transkrypcji, nie wykazywał poprawy wiązania z białkiem FinO, w porównaniu do *malM-A-GU₆*. Natomiast jego wiązanie do ProQ^{NTD} było istotnie osłabione gdyż maksymalna frakcja związana wynosiła 21%. Efekt ten nie zależał od skrócenia ogona poliU, ponieważ wiązanie trzeciego mutantu *malM-A-GAU₇*, który posiadał taką samą liczbę urydyn w ogonie poliU jak *malM-3'*, nie spowodowało poprawy wiązania z białkiem ProQ^{NTD}, gdyż maksymalna frakcja związana wynosiła 8%. Wiązanie tego mutantu z białkiem FinO było słabsze w porównaniu do pozostałych mutantów, ponieważ wartość K_d wyniosła 197 ± 86 z maksymalną frakcją związaną równą 56%.

Otrzymane wyniki wskazują, że obecność pojedynczej pary A-G u podstawy spinki terminatorowej wystarcza do zwiększenia oddziaływania RNA z białkiem FinO, natomiast dodatkowe zmiany po stronie 3' od terminatora transkrypcji lub modyfikacje długości ogona poliU skutkują istotnym osłabieniem wiązania z białkiem ProQ^{NTD}.

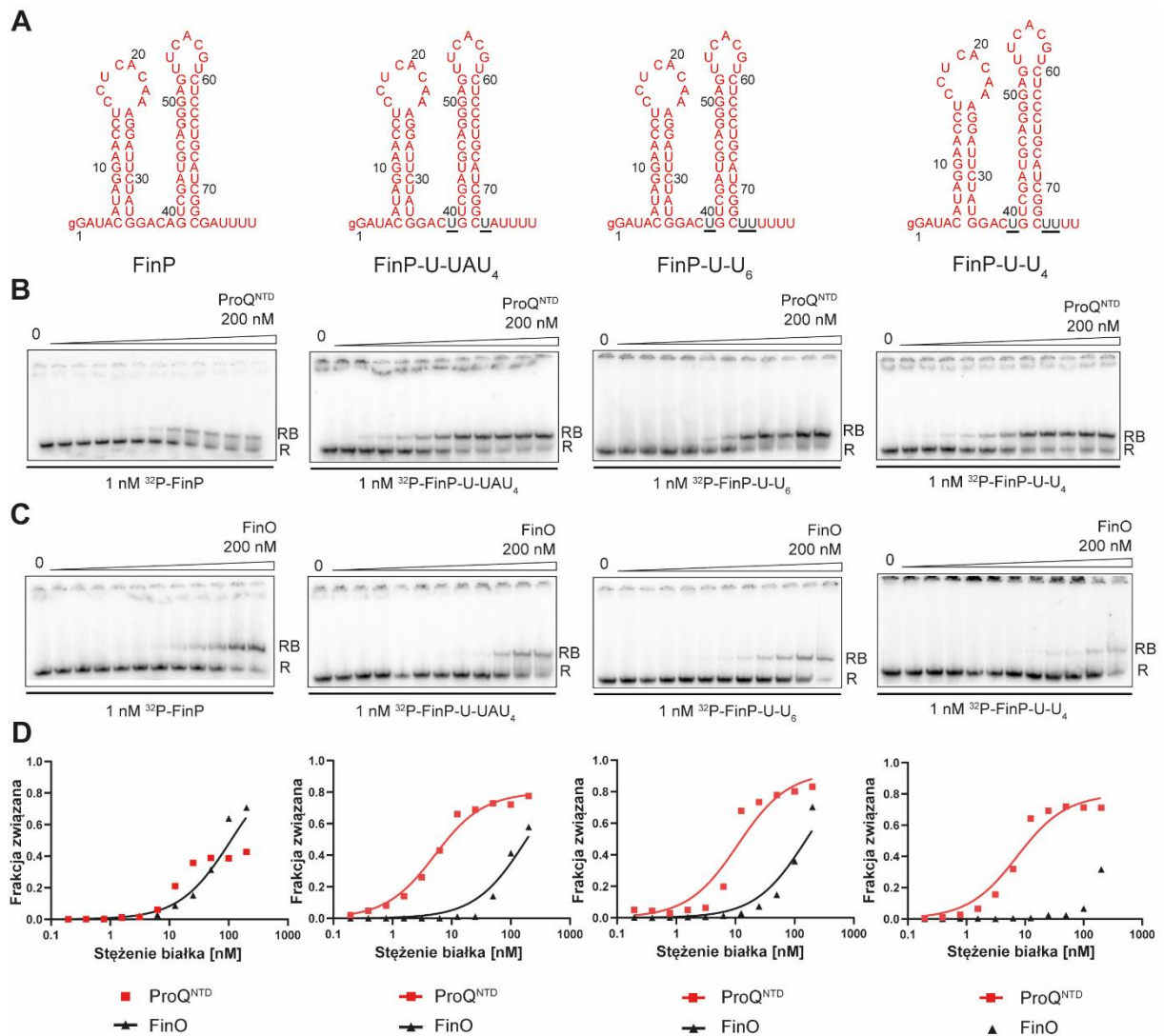


Rysunek 15. Porównanie wiązania cząsteczek RNA *malM-3'*, *malM-A-GU₆*, *malM-A-GAU₅* oraz *malM-A-GAU₇* do domeny FinO białka ProQ (ProQ^{NTD}) oraz białka FinO. (A) Struktury drugorzędowe badanych RNA, które zostały uzyskane przy użyciu oprogramowania RNAstructure. Kolorem czarnym zaznaczony jest region pochodzący z *malM-3'*, a czerwonym z FinP sRNA. Wiązanie z ProQ^{NTD} (B) oraz FinO (C) monitorowano techniką EMSA. R – niezwiązane RNA, RB – kompleks RNA-białko. (D) Dane zależności frakcji związanej RNA od stężenia białka, do których dopasowałam równanie kwadratowe w programie GraphPad. Dane pochodzą z eksperymentu reprezentatywnego spośród co najmniej trzech niezależnych powtórzeń. Dane dla cząsteczki *malM-3'* są takie same jak na Rysunku 1 (Mamonska i wsp. 2025, zmodyfikowano).

W przypadku cząsteczki FinP również zaprojektowałam trzy mutanty w celu określenia, czy elementy sekwencji w dwóch pozycjach położonych najbliżej terminatora transkrypcji warunkują jego rozpoznawanie przez ProQ i FinO (Rys. 16A). Pierwszy mutant, FinP-U-UAU₄, posiadał jeden nukleotyd zarówno po stronie 5' i 3' od spinki terminatorowej zastąpiony na urydynę, zgodnie z sekwencją cząsteczki *malM-3'*. Drugi mutant, FinP-U-U₆, dodatkowo posiadał urydynę w drugiej pozycji po stronie 3' od terminatora transkrypcji. Trzeci mutant, FinP-U-U₄, posiadał skrócony ogon poliU złożony z czterech urydyn, tak jak w cząsteczce FinP o naturalnej sekwencji.

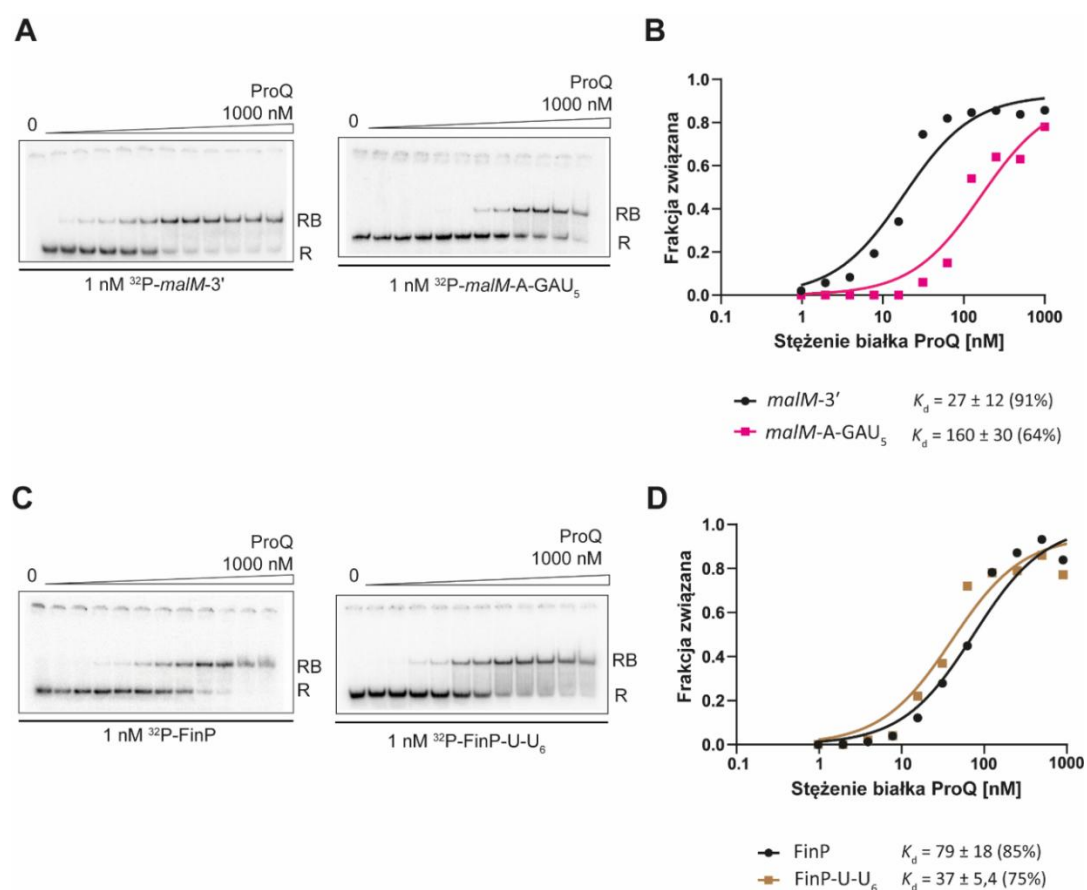
Otrzymane wyniki wykazały, że zamiana pierwszych nukleotydów zlokalizowanych bezpośrednio przy spince terminatorowej na urydyny w FinP-U-UAU₄ wystarczyła do istotnego poprawienia wiązania tej cząsteczki z białkiem ProQ^{NTD}. Wartość K_d tego oddziaływania wyniosła $6,2 \pm 3,1$, a maksymalna frakcja związana osiągnęła 78% (Rys. 16B-D, Tabela 2). Natomiast zmiany te miały tylko dwukrotnie mniejsze znaczenie dla wiązania z białkiem FinO, w porównaniu do cząsteczki FinP o naturalnej sekwencji. Z kolei, w przypadku mutantu FinP-U-U₆ oddziaływania zarówno z białkiem ProQ^{NTD} jak i FinO nie różniły się od efektu jaki zaobserwowałam przy pierwszym mutancie. Świadczy to o tym, że dodatkowa urydyna po stronie 3' spinki terminatorowej nie ma istotnego znaczenia dla powinowactwa tego RNA do żadnego z badanych białek. Natomiast mutant FinP-U-U₄, który posiadał taką samą liczbę urydyn w ogonie poliU jak FinP o naturalnej sekwencji, wykazał słabsze wiązanie z białkiem FinO, w porównaniu z pozostałymi mutantami.

Uzyskane wyniki wskazują, że w cząsteczce FinP kluczową rolę w rozpoznawaniu przez białko ProQ^{NTD} odgrywają nukleotydy znajdujące się bezpośrednio przy podstawie spinki terminatorowej. Wprowadzenie w tym regionie urydyn wystarczy do znacznego zwiększenia powinowactwa tego RNA do domeny FinO białka ProQ, jednocześnie powodując umiarkowany spadek wiązania z białkiem FinO. Dodatkowo, wyniki sugerują, że białko FinO jest bardziej wrażliwe na długość ogona poliU w cząsteczce FinP.



Rysunek 16. Porównanie wiązania cząsteczek RNA FinP, FinP-U-UAU₄, FinP-U-U₆ oraz FinP-U-U₄ do domeny FinO białka ProQ (ProQ^{NTD}) oraz białka FinO. (A) Struktury drugorzędowe badanych RNA, które zostały uzyskane przy użyciu oprogramowania RNAstructure. Kolorem czerwonym zaznaczona jest sekwencja nukleotydowa pochodząca z FinP sRNA, a czarnym z *malm-3'*. Wiązanie z ProQ^{NTD} (B), FinO (C) monitorowano techniką EMSA. R – niezwiązane RNA, RB – kompleks RNA-białko. (E) Dane zależności frakcji związanej RNA od stężenia białka, do których dopasowałam równanie kwadratowe w programie GraphPad. Dane pochodzą z eksperymentu reprezentatywnego spośród co najmniej trzech niezależnych powtórzeń. Dane dla cząsteczki FinP sRNA są takie same jak przedstawione na Rysunku 1 (Mamonska i wsp. 2025, zmodyfikowano).

Dodatkowo, w celu potwierdzenia, że obserwowane zmiany w wiązaniu wynikają z właściwości domeny FinO, a nie z powodu skrócenia białka, sprawdziłam również wiązanie dwóch mutantów, *malM-A-GAU₅* oraz FinP-U-U₆ z pełnej długości białkiem ProQ (Rys. 17, Tabela 2). Wyniki wykazały, że mutant *malM-A-GAU₅* wiązał się ponad pięć razy słabiej niż cząsteczka *malM-3'*. Z kolei w przypadku FinP-U-U₆ wartość stałej równowagi dysocjacji była na poziomie $37 \pm 5,4$, która jest zbliżona do wartości K_d dla cząsteczki *malM-3'*.



Rysunek 17. Porównanie wiązania cząsteczek RNA *malM-3'*, *malM-A-GAU₅*, FinP oraz FinP-U-U₆ do pełnej długości białka ProQ. (A) Wiązanie cząsteczek *malM-3'* oraz *malM-A-GAU₅* z białkiem ProQ monitorowano za pomocą techniki EMSA. **(B)** Dane zależności frakcji związanej *malM-3'* oraz *malM-A-GAU₅* od stężenia białka dopasowane do równania kwadratowego w programie GraphPad. **(C)** Wiązanie cząsteczek FinP oraz FinP-U-U₆ z białkiem ProQ monitorowano za pomocą techniki EMSA. **(D)** Dane zależności frakcji związanej FinP oraz FinP-U-U₆ od stężenia białka, do których dopasowałam równanie kwadratowe w programie GraphPad. Dane pochodzą z eksperymentu reprezentatywnego spośród co najmniej trzech niezależnych powtórzeń. Dane dla cząsteczek *malM-3'* oraz FinP sRNA są takie same jak na Rysunku 1 (Mamonska i wsp. 2025, zmodyfikowano).

Podsumowując, wyniki dla cząsteczek *malM-3'* oraz FinP sRNA i ich mutantów świadczą o tym, że rozpoznawanie cząsteczek RNA przez białko ProQ i FinO zależy od obecności nukleotydów zlokalizowanych bezpośrednio przy podstawie spinki terminatorowej. Uzyskane dane wskazują, że obecność pary A-G determinuje wiązanie z FinO, natomiast para U-U zwiększa powinowactwo do ProQ. W konsekwencji, oznacza to, że nawet niewielka zmiana w sekwencji nukleotydowej u podstawy terminatora transkrypcji może być decydująca dla prawidłowego rozróżniania cząsteczek RNA przez białka ProQ i FinO.

³² P-RNA	<i>K_d</i> [nM] (% średniej maksymalnej frakcji związanej)		
	ProQ	ProQ ^{NTD}	FinO
<i>malM-3'</i>	27 ± 12 (91%)	5,8 ± 0,7 (80%)	>200 (15%)
FinP	79 ± 18 (85%)	19 ± 6 (44%)	110 ± 16 (76%)
<i>malM-A-GU</i> ₆	-	1,9 ± 0,59(56%)	150 ± 40 (59%)
<i>malM-A-GAU</i> ₅	160 ± 30 (64%)	>200 (21%)	130 ± 18 (73%)
<i>malM-A-GAU</i> ₇	-	>200 (8%)	194 ± 86 (56%)
FinP-U-UAU ₄	-	6,2 ± 3,1 (78%)	200 ± 73 (60%)
FinP-U-U ₆	37 ± 5,4 (75%)	9,4 ± 4,5 (82%)	170 ± 45 (68%)
FinP-U-U ₄	-	7,6 ± 3,0 (71%)	>200 (30%)

Tabela 2. Wiązanie cząsteczek *malM-3'* oraz FinP oraz ich mutantów zawierających punktowe mutacje u podstawy spinki terminatorowej z białkiem ProQ o pełnej długości, domeną FinO białka ProQ (ProQ^{NTD}) oraz białkiem FinO. Wartości stałej równowagi dysocjacji *K_d* obliczono w programie GraphPad poprzez dopasowanie danych wykresu zależności frakcji związanego RNA do stężenia białka do równania kwadratowego. Podane wartości *K_d* stanowią średnią z co najmniej trzech niezależnych powtórzeń eksperymentów (Mamonska i wsp. 2025, zmodyfikowano).

5.1.6. Analiza kompetycji pomiędzy białkiem ProQ i FinO o wiązanie cząsteczek RNA

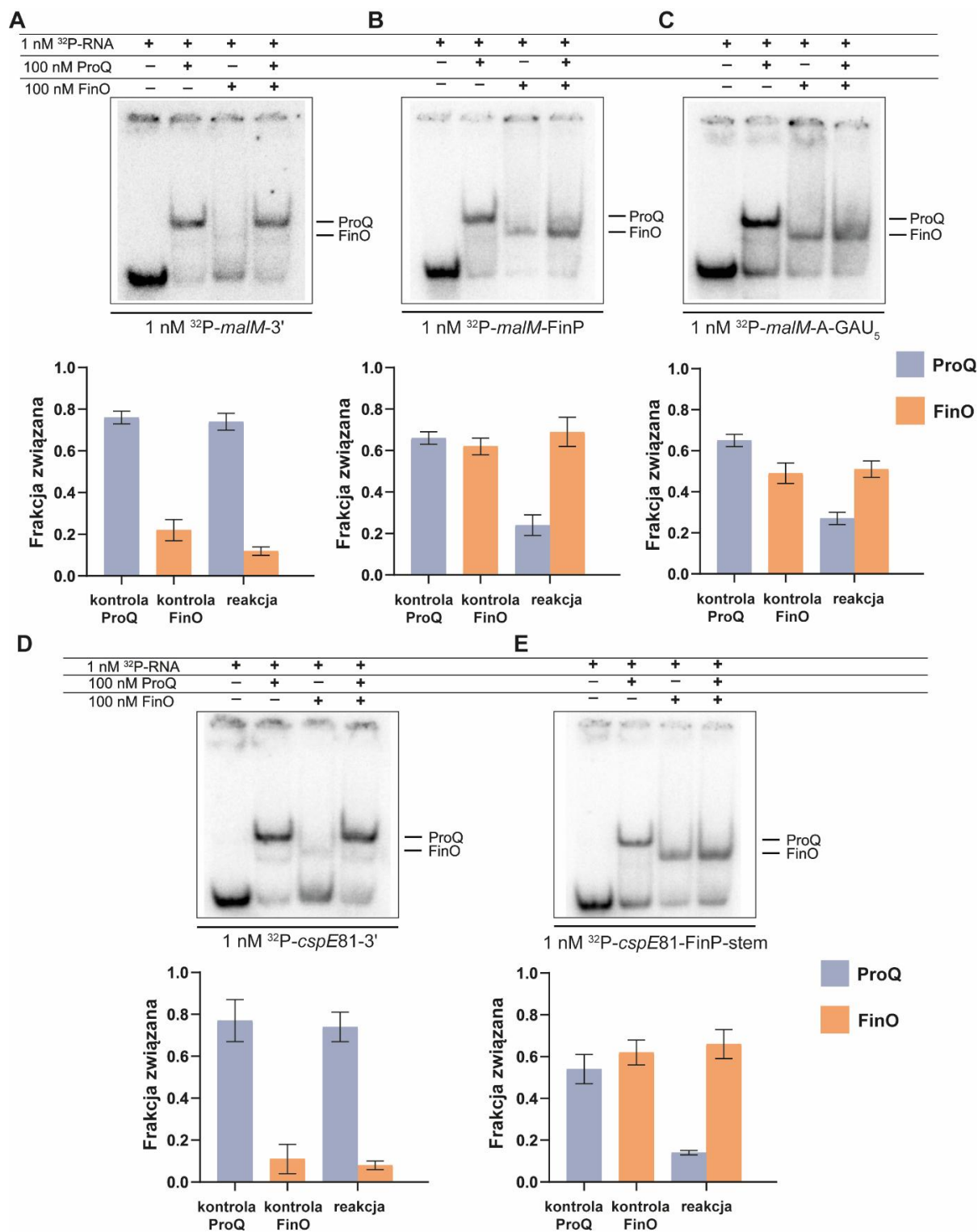
W celu dokładniejszego zbadania, w jaki sposób sekwencja nukleotydowa przy podstawie spinki terminatorowej determinuje rozróżnianie RNA przez białko ProQ i FinO, wykonałam testy kompetycji z wykorzystaniem badanych cząsteczek i ich mutantów. Metoda ta jest opisana

w podrozdziale 4.6.3 i polega na porównaniu wiązania badanej cząsteczki RNA do ProQ i FinO znajdujących się w tym samym stężeniu w próbówce. Rozdział kompleksów zarówno z ProQ, jak i FinO był możliwy ze względu na ich różną mobilność elektroforetyczną.

W pierwszej kolejności zbadalam cząsteczki specyficzne dla białka ProQ, czyli *malM-3'* i *cspE81-3'* oraz ich mutanty. W przypadku cząsteczki *malM-3'* dane wykazały, że w reakcji, gdzie były obecne oba białka, większość RNA była związana z ProQ (Rys. 18A). Co więcej, frakcja związana z białkiem FinO w reakcji konkurencyjnej była mniejsza niż w kontroli z samym białkiem FinO. Wynik ten świadczy o tym, że białko ProQ wyparło FinO z kompleksu *malM-3'*-FinO. W przypadku cząsteczki *cspE81-3'* obserwowana tendencja była dokładnie taka sama (Rys. 18D).

Następnie porównalam, jak wprowadzenie elementów sekwencji nukleotydowej z cząsteczki FinP do *malM-3'* wpłynie na kompetycję pomiędzy tymi białkami. W przypadku mutanta *malM-FinP*, który posiadał trzy nukleotydy po stronie 5' oraz cały region 3' od spinki terminatorowej pochodzące z FinP, w reakcjach kontrolnych zbliżone frakcje RNA były związane zarówno z ProQ, jak i z FinO (Rys. 18B). Natomiast w reakcji konkurencyjnej cząsteczka ta była związana w około 70% z białkiem FinO, a z białkiem ProQ w 24%, co świadczy o wyparciu białka ProQ z kompleksu z tym RNA. Dodatkowo do testu wybrałam mutanta *malM-A-GAU₅*, który posiadał adenozyne po stronie 5', a guanozyne oraz adenozyne po stronie 3' od spinki terminatorowej, zgodnie z sekwencją cząsteczki FinP. Wynik dla tego mutanta był bardzo podobny jak w przypadku *malM-FinP*, ponieważ w reakcjach kontrolnych frakcje związane z każdym z białek były na poziomie od 50 do 60% (Rys. 18C). Natomiast w reakcji konkurencyjnej *malM-A-GAU₅* większość RNA była związana z białkiem FinO.

Dodatkowo, zbadalam również mutanta cząsteczki *cspE81-3'*, *cspE81-FinP-stem*, który posiadał trzy nukleotydy po stronie 5' od spinki terminatorowej, ogon poliU oraz dwie ostatnie pary w strukturze terminatora, które były identyczne jak w FinP. Cząsteczka ta została wybrana do analizy, ponieważ wcześniejsze wyniki wykazywały najsilniejszy efekt w kontekście badanych oddziaływań w przypadku mutantów *cspE81-3'*. Wyniki testu kompetycji tego RNA wykazały, że większość cząsteczek w reakcji z obydwoma białkami była związana z FinO, pomimo tego, że w reakcjach kontrolnych frakcje związane z każdym z białek były podobne (Rys. 18E).



Rysunek 18. Kompetycja białek ProQ i FinO o wiązanie z cząsteczkami *malM-3'*, *malM-FinP*, *malM-A-GAU₅*, *cspE81-3'* oraz *cspE81-FinP-stem*. Analiza różnicowej migracji kompleksów w żelu poliakrylamidowym oraz odpowiadające jej wykresy słupkowe przedstawiające procent frakcji RNA związanej z ProQ lub FinO z (A) *malM-3'*, (B) *malM-FinP*, (C) *malM-A-GAU₅*, (D) *cspE81-3'* oraz (E) *cspE81-FinP-stem*. Przedstawione wartości stanowią średnią z co najmniej trzech niezależnych powtórzeń (Mamonska i wsp. 2025, zmodyfikowano).

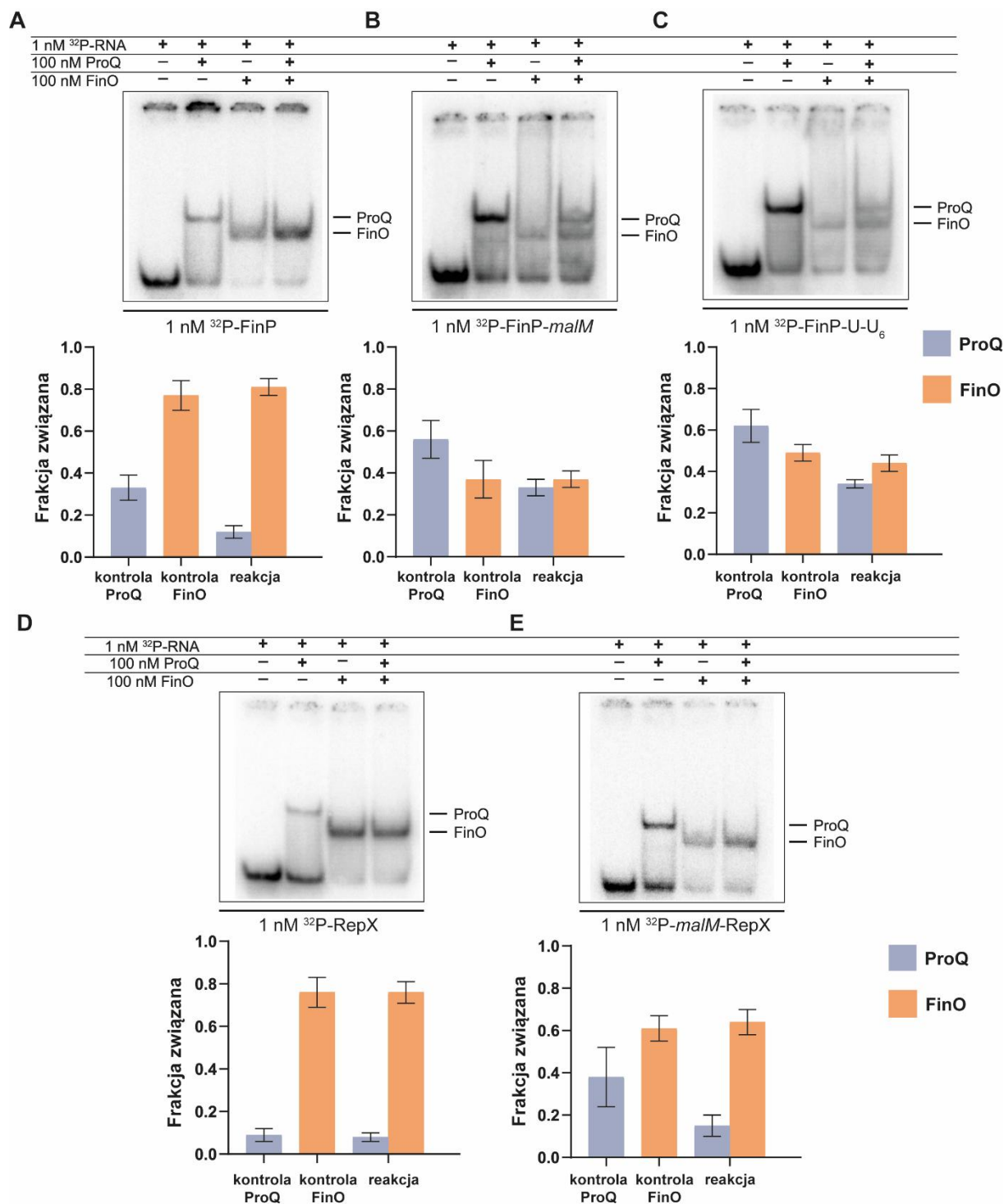
W kolejnym etapie porównałam cząsteczkę specyficzną dla białka FinO, czyli FinP oraz jej mutanty. W przypadku cząsteczki FinP wyniki wykazały, że w reakcji konkurencyjnej zdecydowana większość, ponieważ aż 81 %, tego RNA była związana z FinO (Rys. 19A). Dodatkowo zauważyłam, że nastąpiło zmniejszenie frakcji FinP związanej z białkiem ProQ w reakcji kontrolnej, co potwierdza, że białko FinO wyparło ProQ z wiązania z FinP w próbie z obydwoma białkami.

Następnie porównałam, jak wprowadzenie sekwencji nukleotydowych znajdujących się u podstawy spinki terminatorowej z cząsteczki *malM-3'* do cząsteczki FinP wpłynie na konkurencję pomiędzy ProQ a FinO. Pierwszym mutantem była cząsteczka FinP-*malM*, która posiadała trzy nukleotydy po stronie 5' oraz cały region 3' od spinki terminatorowej pochodzące z *malM-3'*. W reakcji konkurencyjnej, podobne frakcje tego RNA były związane z ProQ i FinO, pomimo tego, że w reakcjach kontrolnych większa część cząsteczek była związana z ProQ niż z FinO (Rys. 19B). Z kolei, drugim badanym mutantem była cząsteczka FinP-U-U₆, która posiadała zastąpiony jeden nukleotyd po stronie 5' na urydinę oraz dwie urydyny po stronie 3' od spinki terminatorowej, zgodnie z sekwencją cząsteczki *malM-3'*. Wynik testu kompetycji tego mutantu wykazał podobny efekt jak w przypadku FinP-*malM*, ponieważ podobne frakcje tego RNA były związane z ProQ i FinO (Rys. 19C). Natomiast, warto zauważyć, że zarówno w przypadku mutantu FinP-*malM*, jak i FinP-U-U₆, w reakcjach konkurencyjnych frakcja związana z białkiem ProQ jest zdecydowanie większa niż frakcja FinP związana z ProQ. Wynik ten potwierdza, że wprowadzenie elementów sekwencji u podstawy terminatora transkrypcji z cząsteczki *malM-3'* do FinP RNA powoduje rozpoznawanie przez białko ProQ.

Następnie zbadalam cząsteczkę RepX, specyficzną dla białka FinO. Wynik przeprowadzonej reakcji konkurencyjnej wykazał tendencję podobną jak w przypadku FinP sRNA, ponieważ aż 76% cząsteczek tego RNA była związana z białkiem FinO w reakcji, w której były obecne obydwa białka (Rys. 19D). Jako reakcję dodatkową sprawdziłam również cząsteczkę *malM-RepX*, która pochodzi z cząsteczki *malM-3'*, natomiast u podstawy terminatora transkrypcji posiada sekwencję pochodzącą z RepX sRNA. Wyniki wykazały, że w reakcji konkurencyjnej większość tego RNA jest związana z białkiem FinO (Rys. 19E). Co więcej, frakcja związana z białkiem ProQ w reakcji konkurencyjnej zmniejszyła się z 61% do 15% w kontroli z samym białkiem ProQ. Wynik ten świadczy o tym, że białko FinO wyparło ProQ z kompleksu z *malM-RepX*.

Podsumowując, wyniki testów kompetycji potwierdziły, że rozpoznawanie RNA przez ProQ czy FinO zależy od sekwencji nukleotydowej zlokalizowanej u podstawy spinki

terminatorowej. W przypadku cząsteczek specyficznych dla białka ProQ, białko to skutecznie wypiera FinO z kompleksu z RNA. Natomiast wprowadzenie elementów z FinP lub RepX sRNA zmieniało ich preferencję wiązania na białko FinO. Z kolei, wprowadzenie sekwencji z *malM-3'* u podstawy spinki terminatorowej w cząsteczkach specyficznych dla białka FinO zwiększało wiązanie z białkiem ProQ. Wyniki te potwierdzają, że nawet niewielkie różnice w sekwencji położonej u podstawy terminatora transkrypcji mają znaczenie dla rozpoznawania RNA przez białka ProQ oraz FinO, także w warunkach bezpośredniej konkurencji między tymi białkami.



Rysunek 19. Kompetycja białek ProQ i FinO o wiązanie z cząsteczkami FinP, FinP-*malM*, FinP-U-U₆, RepX oraz *malM*-RepX. Analiza różnicowej migracji kompleksów w żelu poliakrylamidowym oraz odpowiadające jej wykresy słupkowe przedstawiające procent frakcji RNA związanej z ProQ lub FinO z (A) FinP, (B) FinP-*malM*, (C) FinP-U-U₆, (D) RepX oraz (E) *malM*-RepX. Przedstawione wartości stanowią średnią z co najmniej trzech niezależnych powtórzeń. (Mamonska i wsp. 2025, zmodyfikowano).

5.2. Rozpoznawanie różnych cząsteczek RNA przez białko ProQ w komórkach *Escherichia coli*

Białko ProQ, należące do rodziny białek FinO, w ostatnich latach uznano za jedno z głównych białek wiążących cząsteczki RNA u bakterii. Badania wykazały, że białko to oddziałuje z ponad 50 cząsteczkami sRNA oraz ponad 400 cząsteczkami mRNA i w efekcie odgrywa ważną rolę w regulacji ekspresji genów na poziomie potranskrypcyjnym (Olejniczak i Storz 2017). U *Escherichia coli* ProQ jest jednym z ważniejszych białek wiążących cząsteczki RNA, które mają znaczenie dla licznych procesów fizjologicznych komórki takie jak między innymi utrzymywanie homeostazy komórkowej, wirulencja, ruch komórek czy ochrona przed stresem oksydacyjnym (Qian i wsp. 2025, Mihaita i wsp. 2025).

Białko ProQ jest zbudowane z trzech domen: N-końcowej domeny FinO, dodatkowo naładowanego linkera oraz domeny C-końcowej. Niedawne badania wykazały, że to domena FinO białka ProQ jest głównie odpowiedzialna za wiązanie z docelowymi cząsteczkami RNA (Stein i wsp. 2020, Pandey i wsp. 2020, Stein i wsp. 2023).

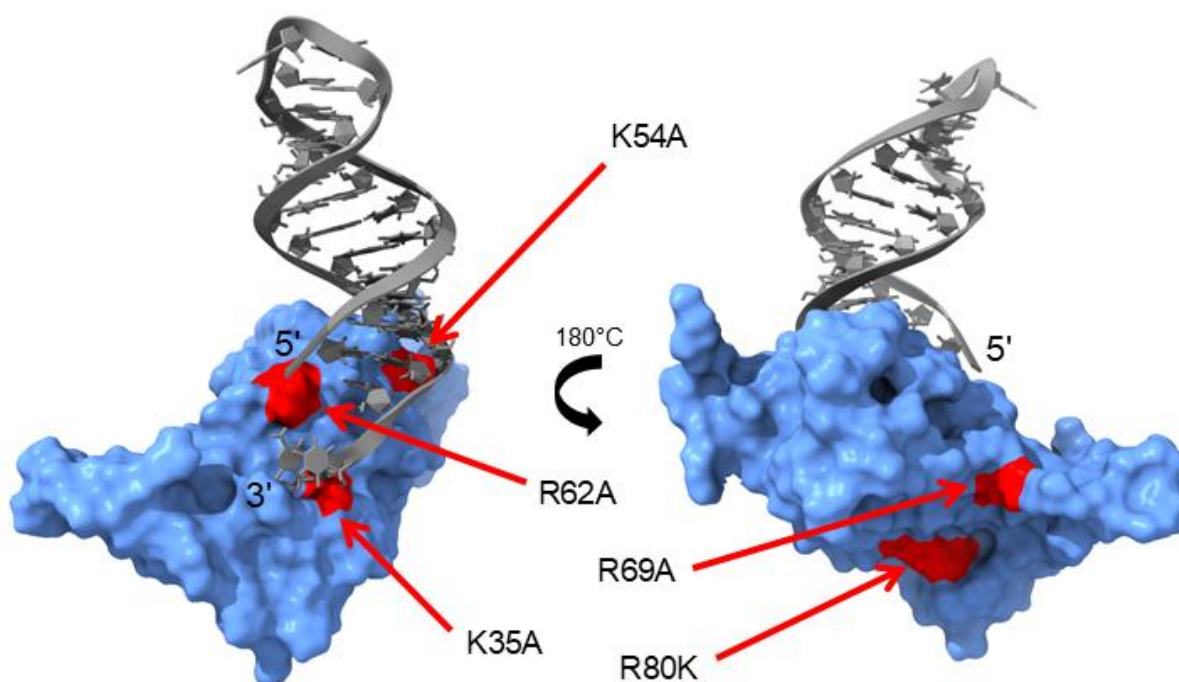
Co więcej, badania biochemiczne i strukturalne przeprowadzone przez dr Ewę Stein w naszym laboratorium dostarczyły szczegółowych informacji na temat reszt aminokwasowych, które są kluczowe w wiązaniu RNA przez domenę FinO w warunkach *in vitro*. Wyniki eksperymentów nad mutantami białka ProQ wykazały, że niektóre reszty aminokwasowe, takie jak R58, Y70 oraz R80 są kluczowe dla wiązania z cząsteczkami RNA. Szczególnie mutacja w miejscu R80 powodowała całkowite zahamowanie wiązania ze zdecydowaną większością badanych RNA. Z kolei, mutacje reszt aminokwasowych K54 oraz R62 skutkowały jedynie umiarkowanym osłabieniem wiązania cząsteczek RNA. Jednocześnie, zmiany w regionie reszt K35 oraz R69, które pomimo zmienności ewolucyjnej znajdują się blisko konserwatywnych reszt aminokwasowych, miały różne znaczenie dla wiązania poszczególnych RNA. Wykazano również, że mutacje K54A oraz R62A negatywnie wpływają na wiązanie dwuniciowej struktury spinki terminatorowej obecnej w cząsteczkach RNA. Natomiast mutacje K35A, R69A oraz R80K mają znaczenie dla wiązania końca 3' spinki terminatorowej (Stein i wsp. 2023).

Powyższe wyniki pozwoliły na identyfikację regionów białka ProQ odpowiedzialnych za oddziaływanie z cząsteczkami RNA oraz stabilizację kompleksu RNA-białko w warunkach *in vitro*. Natomiast znaczenie tych reszt aminokwasowych dla oddziaływania ProQ z cząsteczkami RNA w komórce pozostawało niewyjaśnione.

W celu zrozumienia znaczenia mutacji w domenie FinO białka ProQ na jego oddziaływanie z RNA w komórkach *Escherichia coli* wykonałam analizę immunoprecypitacji RNA w warunkach natywnych połączoną z sekwencjonowaniem RNA (RIP-seq) dla szczepów z chromosomalnymi wariantami ProQ zawierającymi pojedyncze mutacje w domenie FinO.

5.2.1. Charakterystyka mutantów białka ProQ i przygotowanie prób do immunoprecypitacji RNA połączonej z sekwencjonowaniem (RIP-seq)

W celu zbadania, jak mutacje w białku ProQ mają znaczenie dla wiązania cząsteczki RNA w warunkach *in vivo* dr Shuwen Shen z laboratorium prof. Giseli Storz (NIH, Stany Zjednoczone) zaprojektowała oraz otrzymała szczepy *Escherichia coli* MG1655 z wybranymi pięcioma mutacjami: K35A, K54A, R62A, R69A oraz R80K (Rys. 20), których istotne znaczenie dla oddziaływania z cząsteczkami RNA w warunkach *in vitro* potwierdziły wcześniejsze badania dr Ewy Stein z naszego laboratorium. Poprawność konstrukcji mutantów zweryfikowaliśmy za pomocą sekwencjonowania, a ekspresję pożądanego białka za pomocą techniki Western blot.

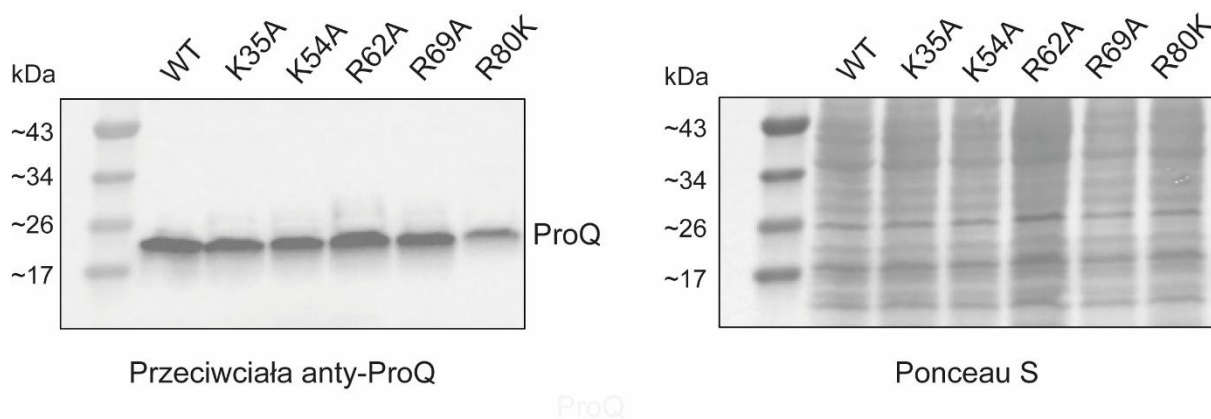


Rysunek 20. Struktura domeny FinO białka ProQ z *E. coli* w kompleksie z RNA, z zaznaczonymi wprowadzonymi mutacjami. Model został utworzony przeze mnie przy użyciu oprogramowania ChimeraX, na podstawie struktury NMR białka ProQ (Gonzalez i wsp. 2017) oraz struktury krystalograficznej kompleksu RocR i RocC (Kim i wsp. 2022). Czerwonym kolorem oraz strzałkami zaznaczono wprowadzone mutacje.

Następnie w czasie stażu w pracowni prof. Giseli Storz, przeprowadziłam immunoprecypitację RNA w warunkach natywnych połączoną z sekwencjonowaniem (RIP-seq), zgodnie z protokołem opisanym w podrozdziale 4.6.5. W tym celu w pierwszej kolejności wykonałam hodowle następujących szczepów bakteryjnych:

- 1) *Escherichia coli* MG1655
- 2) *Escherichia coli* MG1655 ProQ-K35A
- 3) *Escherichia coli* MG1655 ProQ-K54A
- 4) *Escherichia coli* MG1655 ProQ-R62A
- 5) *Escherichia coli* MG1655 ProQ-R69A
- 6) *Escherichia coli* MG1655 ProQ-R80K

Hodowle szczepu *Escherichia coli* MG1655 typu dzikiego oraz pozostałych szczepów z mutacjami prowadziłam do otrzymania OD₆₀₀ równego 1,0. Poziom białka ProQ w każdym ze szczepów sprawdziłam za pomocą techniki Western blot (Rys. 21). Następnie wykonałam lizę komórek, a otrzymane lizaty użyłam do immunoprecypitacji białka ProQ przy użyciu przeciwciał anti-ProQ. Przy użyciu protokołu do RNA-seq opisanego w podrozdziałach od 4.6.4.9 do 4.6.4.16, pozyskałam RNA, które były związane z immunoprecypitowanym białkiem, a następnie stworzyłam biblioteki cDNA.



Rysunek 21. Analiza poziomu białka ProQ w próbach wykorzystanych do eksperymentu RIP-seq określona metodą Western blot z wykorzystaniem przeciwciał anti-ProQ. Membrana zabarwiona barwnikiem Ponceau S służy jako potwierdzenie porównywalnej ilości białka w każdej ścieżce.

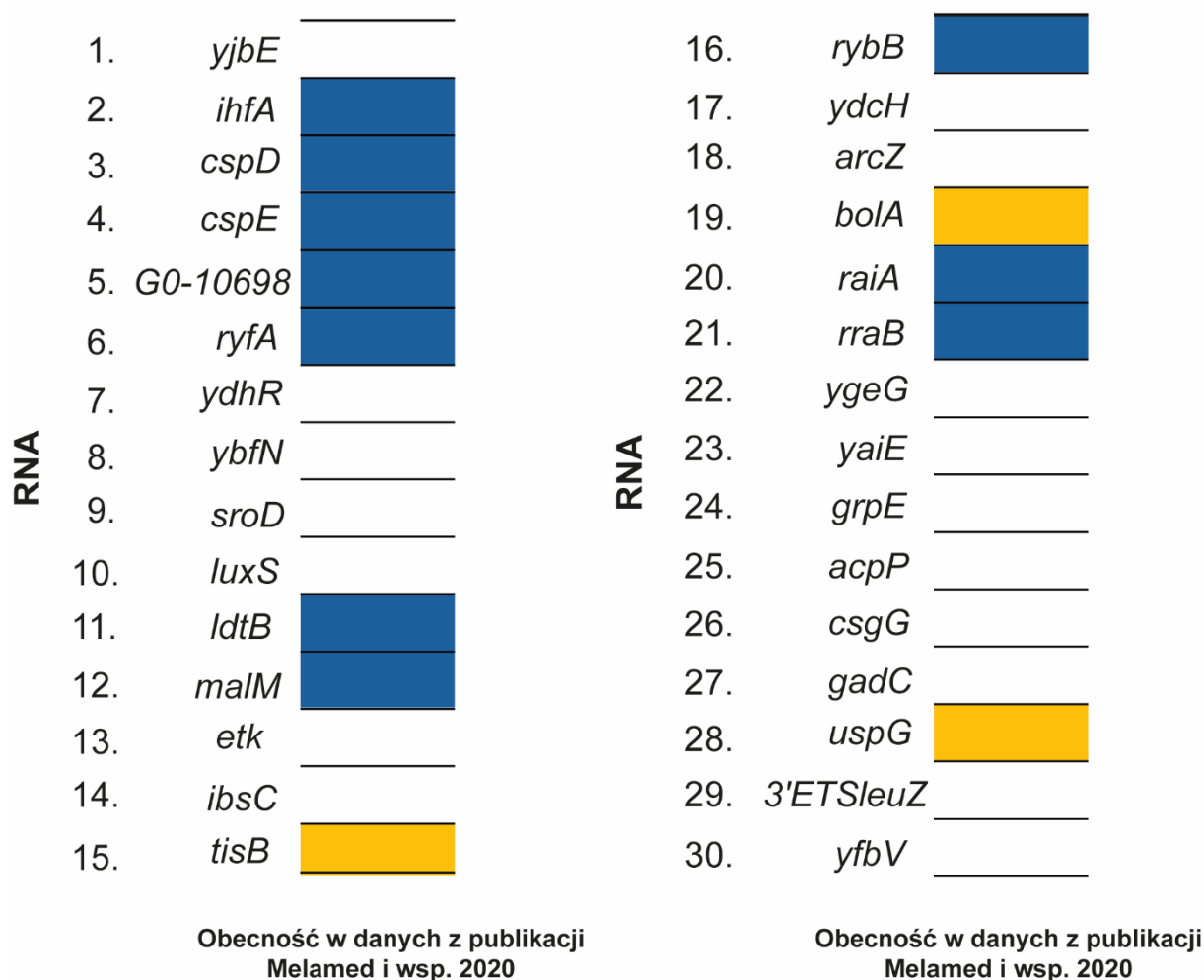
Pierwsze powtórzenie zostało przygotowane i przeprowadzone przez mnie w trakcie pobytu w laboratorium prof. Giseli Storz, natomiast drugie obejmujące identyczny zestaw prób, wykonała dr Shuwen Shen z tego laboratorium. Sekwencjonowanie przygotowanych bibliotek przeprowadzono w Centrum Sekwencjonowania DNA i Genomiki NIH w Stanach Zjednoczonych. Analiza bioinformatyczna obejmująca wstępną obróbkę danych, mapowanie odczytów, ocenę jakości bibliotek oraz analizę różnic w poziomach związania RNA z białkiem ProQ została przeprowadzona przez dr Caroline Esnault z zespołu bioinformatycznego w Narodowym Instytucie Zdrowia Dziecka i Rozwoju Człowieka NIH w Stanach Zjednoczonych. Na podstawie uzyskanych wyników dr Caroline Esnault przygotowała zestawienia wzbogacenia RNA w próbach immunoprecypitowanych w porównaniu z całkowitym RNA, a także porównała poziom związania RNA pomiędzy szczepami z mutacjami białka ProQ, a szczepem typu dzikiego. Dane te posłużyły do przeprowadzenia dalszych analiz i interpretacji znaczenia mutacji w białku ProQ, które przeprowadziłam w ramach wykonywania niniejszej pracy doktorskiej.

5.2.2. Analiza globalnego profilu RNA oddziałujących z mutantami białka ProQ metodą RIP-seq

W celu oceny znaczenia mutacji w obrębie domeny FinO w białku ProQ na wiązanie cząsteczek RNA przeprowadzono analizę danych z eksperymentu RIP-seq po obróbce bioinformatycznej. Do eksperymentu wykorzystano pięć szczepów *Escherichia coli* MG1655, które zawierały mutacje w genie *proQ*: K35A, K54A, R62A, R69A oraz R80K.

W pierwszym etapie, w celu sprawdzenia wiarygodności otrzymanych wyników, w porównaniu z wcześniejszymi danymi literaturowymi, przeanalizowałam wyniki zidentyfikowanych RNA, które były związane z białkiem ProQ w szczepie *Escherichia coli* MG1655 typu dzikiego. Porównanie trzydziestu najbardziej wzbogaconych RNA z eksperymentu RIP-seq z wynikami opublikowanymi przez Melamed i wsp. 2020, ujawniło, że jednaście z nich pokrywa się z trzydziestoma cząsteczkami RNA najsilniej związanymi z ProQ zidentyfikowanymi we wspomnianej publikacji (Rys. 22) (Melamed i wsp. 2020). Wśród nich zaobserwowałam obecność, między innymi, dobrze scharakteryzowanych cząsteczek RNA wiązanych przez białko ProQ, takich jak *malM* oraz *cspE*, które są przedstawiane jako RNA wiązane przez białko ProQ również w innych badaniach, w tym przy użyciu metody CLIP-seq (Holmqvist i wsp. 2018). Wyniki te wskazują na zgodność i powtarzalność uzyskanych przeze mnie wyników z opublikowanymi wcześniej danymi literaturowymi, stanowiąc podstawę do dalszej oceny znaczenia mutacji w białku ProQ na jego profil wiązania cząsteczek RNA.

RIP-seq dla szczepu *Escherichia coli* MG1655



Legenda

- Częsteczka RNA obecna w pierwszej 30 u Melamed i wsp. 2020
- Częsteczka RNA obecna w pierwszej 100 u Melamed i wsp. 2020

Rysunek 22. Porównanie najbardziej wzbogaconych cząsteczek RNA w eksperymencie RIP-seq przeprowadzonym w szczepie *E. coli* z wynikami opublikowanymi przez Melamed i wsp. 2020. Na niebiesko zaznaczono cząsteczki RNA obecne w pierwszej trzydziestce w danych opublikowanych przez Melamed i wsp. 2020, a na żółto RNA obecne w pierwszej setce. Cząsteczki RNA niewystępujące w tym zestawie oznaczono kolorem białym.

W celu porównania znaczenia badanych mutacji w białku ProQ dr Caroline Esnault wykonała analizę rozkładu wzbogacenia RNA w postaci wykresów MA. Jest to porównanie poziomu wzbogacenia poszczególnych RNA, które ulegały immunoprecypitacji razem z białkiem ProQ w wariantach zmutowanych względem wyników uzyskanych dla szczepu *E. coli* typu dzikiego.

Analiza rozkładu wzbogacenia RNA na wykresach MA wykazała, że mutacje wprowadzone w obrębie domeny FinO w dużej mierze osłabiają wiązanie RNA przez białko ProQ (Rys. 23). Najsilniejszy efekt jest widoczny dla mutantu R80K, co jest spójne z wcześniejszymi badaniami *in vitro*, które wykazały istotne znaczenie tej reszty aminokwasowej w oddziaływaniu białka ProQ z cząsteczkami RNA (Stein i wsp. 2023).

Dodatkowo, na podstawie danych przedstawionych na wykresach MA zauważyłam, że mutacje w domenie FinO białka ProQ miały największe znaczenie dla cząsteczek sRNA z rodziny Sib (Rys. 23). Cząsteczki z rodziny Sib należą do systemu toksyna-antytoksyna, w którym Sib są antysensowymi sRNA względem mRNA kodujących toksyny z rodziny *ibs* (Fozo i wsp. 2008). Zaobserwowałam także, że mutacje negatywnie wpłynęły również na wiązanie innego RNA należącego do systemu toksyna-antytoksyna, IstR sRNA, który jest regulatorem dla mRNA toksyny *tisB* (Vogel i wsp. 2004).

Systemy toksyna-antytoksyna odgrywają istotną rolę u organizmów bakteryjnych, pełniąc funkcje regulacyjne, obronne oraz umożliwiające adaptację do warunków stresowych poprzez, między innymi, czasowe zahamowanie procesów metabolicznych i wzrostu komórek (Yamaguchi i wsp. 2011, Ostyn i wsp. 2025).

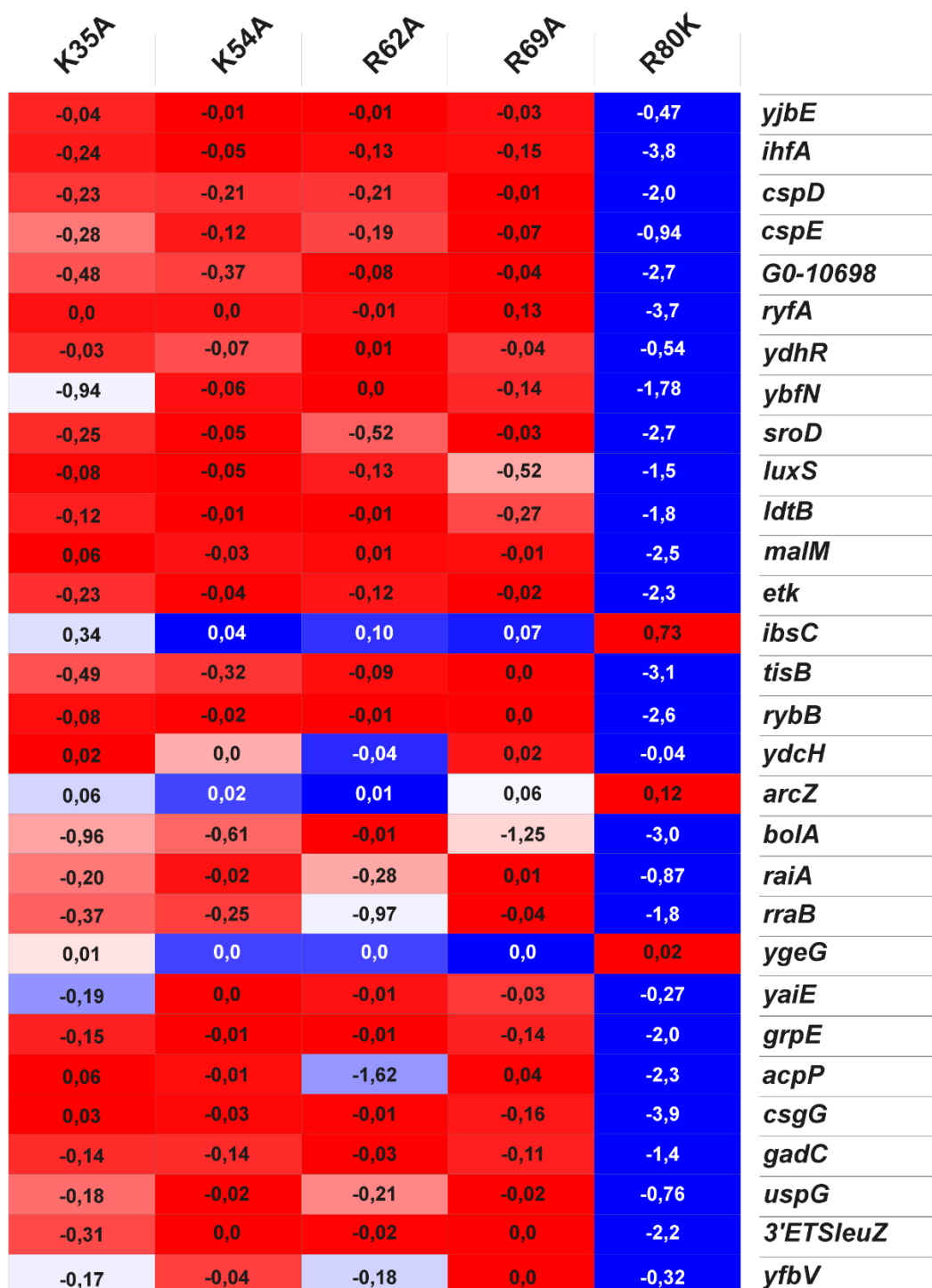
Zaobserwowałam również różnice pomiędzy poszczególnymi mutantami białka ProQ. Na przykład mutacja R62A wykazywała silniejsze negatywne znaczenie dla wiązania cząsteczki SibC niż SibA, natomiast mutacja R69A powodowała mocniejsze obniżenie wiązania cząsteczki SibA niż SibC sRNA. Wyniki te zostały potwierdzone analizą Northern blot wykonaną przez dr Aixię Zhang oraz dr Shuwen Shen w laboratorium prof. Giseli Storz (dane nieopublikowane).

W celu uzupełnienia wykonałam również analizę trzydziestu najbardziej wzbogaconych cząsteczek RNA w dzikim szczepie *E. coli* w postaci *Heatmapy* (Rys. 24). Przedstawia ona wartości sygnału dla poszczególnych mutantów względem szczepu dzikiego. Analiza ta również wykazała, że mutacja R80K powoduje najsilniejsze i najbardziej konsekwentne obniżenie sygnału dla większości analizowanych cząsteczek RNA. Wyniki te są widoczne zarówno dla cząsteczek sRNA, jak i fragmentów mRNA, takich jak *cspE*, *cspD* czy *malM*. Wskazuje to na kluczowe znaczenie tej reszty aminokwasowej dla stabilnego oddziaływania białka ProQ z cząsteczkami RNA.

Jednocześnie zauważyłam, że wpływ pozostałych badanych mutacji białka ProQ (K35A, K54A, R62A oraz R69A) był bardziej zróżnicowany i zależny od konkretnej cząsteczki RNA. Przykładowo, mutacja R62A powodowała wyraźne obniżenie sygnału dla *acpP* oraz *rraB*, podczas gdy dla innych RNA efekt ten był niewielki. Z kolei mutacja R69A białka ProQ szczególnie silnie wpływała na wiązanie *luxS*, natomiast pozostałe mutacje w przypadku tego RNA miały umiarkowane znaczenie. W przypadku *bolA* RNA wyraźnie widać negatywny wpływ zarówno mutacji R69A, jak i K35A, a mutacja R62A nie wpływała na jego wiązanie.

Co więcej, dla części RNA, takich jak między innymi *arcZ*, *ygeG* czy *ydcH*, wartości sygnałów pozostawały bliskie zeru we wszystkich analizowanych mutantach. Wynik ten sugeruje mniejszą zależność ich oddziaływania z badanymi resztami aminokwasowymi w białku ProQ.

Podsumowując, uzyskane wyniki wskazują, że domena FinO białka ProQ odgrywa istotną rolę w wiązaniu cząsteczek RNA, przy czym poszczególne reszty aminokwasowe w obrębie tej domeny w różnym stopniu przyczyniają się do tych oddziaływań. Mutacja R80K prowadzi do najsilniejszego osłabienia wiązania cząsteczek RNA, natomiast pozostałe mutacje wywierają bardziej selektywny, zależny od konkretnego RNA, wpływ na oddziaływanie z badanym białkiem. Szczególnie wyraźna wrażliwość na mutacje w domenie FinO została zaobserwowana dla cząsteczek sRNA z rodziny Sib.Z tego względu oraz ze względu na ich rolę w systemach toksyna-antytoksyna, w dalszym etapie mojej pracy doktorskiej, skupiłam się na analizie struktury tych RNA oraz na ich oddziaływaniu z białkiem ProQ.



Rysunek 24. Analiza zmian w wiązaniu RNA przez mutanty białka ProQ metodą RIP-seq. *Heatmapa* przedstawia 30 najbardziej wzbogaconych cząsteczek RNA w dzikim szczepie *E. coli* oraz porównanie wartości sygnału w szczepach niosących mutacje białka ProQ: K35A, K54A, R62A, R69A i R80K względem szczepu dzikiego. Kolory oznaczają wartości znormalizowane w obrębie wiersza (niebieski – minimum, czerwony – maksimum).

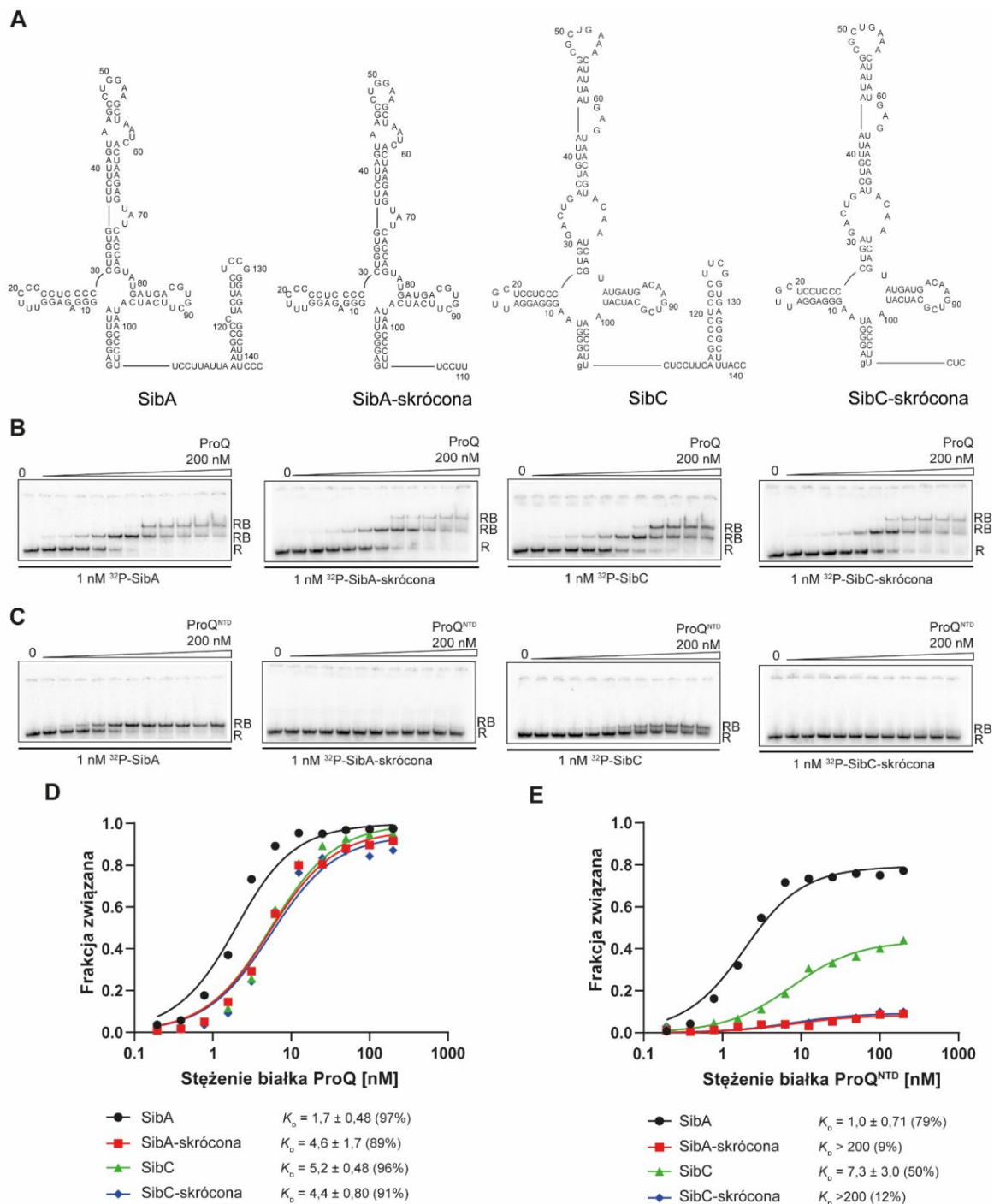
5.2.3. Znaczenie motywu terminatora transkrypcji dla wiązania cząsteczek SibA i SibC sRNA przez białko ProQ oraz domenę FinO białka ProQ (ProQ^{NTD})

Wcześniejsze badania nad cząsteczkami Sib wykazały, że cząsteczki te występują w dwóch formach w komórce – długiej oraz krótkiej. Długa forma to pełna sekwencja cząsteczek Sib sRNA, natomiast krótsza jest pozbawiona motywu terminatora transkrypcji w regionie 3' (Fozo i wsp. 2008, Adams i wsp. 2021). Obecność obu form została potwierdzona również przez metodę Northern blot wykonaną przez dr Aixię Zhang oraz dr Shuwen Shen w laboratorium prof. Giseli Storz, gdzie zaobserwowały dwa warianty długości badanych RNA (informacja prywatna, dane nieopublikowane).

W celu zbadania, w jaki sposób białko ProQ oddziałuje z długimi oraz krótkimi formami RNA z rodziny Sib, wybrałam do analizy dwie reprezentatywne cząsteczki SibA oraz SibC. W eksperymencie RIP-seq wykazały one obniżone wiązanie z mutantami białka ProQ. Aby porównać ich wiązanie z białkiem ProQ oraz izolowaną domeną FinO białka ProQ (ProQ^{NTD}) wykonałam test różnicowej migracji kompleksów w żelu poliakrylamidowym (EMSA) (Rys. 25).

Uzyskane wyniki wykazały, że pełnej długości białko ProQ wiązało zarówno długie, jak i krótsze formy SibA oraz SibC z podobnym powinowactwem. Dane te mogą świadczyć o tym, że regiony w białku ProQ poza domeną FinO mogą również mieć znaczenie dla stabilizacji kompleksów RNA-białko. Natomiast, izolowana domena FinO białka ProQ wiązała cząsteczkę SibA około siedmiokrotnie silniej niż SibC. Co więcej, nie zaobserwowałam wiązania krótkich form obu cząsteczek sRNA.

Wyniki te sugerują, że domena FinO białka ProQ rozpoznaje długie formy SibA i SibC, które posiadają terminatory transkrypcji. Brak oddziaływania z krótkimi formami tych cząsteczek, świadczy o tym, że motyw terminatora transkrypcji odgrywa kluczową rolę w rozpoznawaniu tych RNA przez domenę FinO.



Rysunek 25. Porównanie wiązania cząsteczek SibA i SibC sRNA oraz ich skróconych wariantów, pozbawionych terminatora transkrypcji, do białka ProQ oraz ProQ^{NTD}. (A) Struktury drugorzędowe badanych RNA, które zostały uzyskane przy użyciu oprogramowania RNAstructure. Wiązanie z ProQ (B) oraz ProQ^{NTD} (C) monitorowane techniką EMSA. R – niezwiązane RNA, RB – kompleks RNA-białko. Zależność frakcji związanej RNA od stężenia białka ProQ (D) lub ProQ^{NTD} (E) dane dopasowane do równania kwadratowego w programie GraphPad. Dane pochodzą z eksperymentu reprezentatywnego spośród co najmniej trzech niezależnych powtórzeń.

5.2.4. Analiza struktury drugorzędowej cząsteczek SibA oraz SibC sRNA

W związku z uzyskanymi wynikami wskazującymi na istotną rolę motywu terminatora transkrypcji w rozpoznawaniu cząsteczek SibA oraz SibC przez domenę FinO, w kolejnym etapie przeprowadziłam analizę struktury drugorzędowej tych cząsteczek RNA. Elementy strukturalne RNA mogą determinować dostępność regionów wiązania oraz wpływać na stabilność kompleksów RNA-białko, dlatego ich charakterystyka była istotna dla dalszej interpretacji wyników.

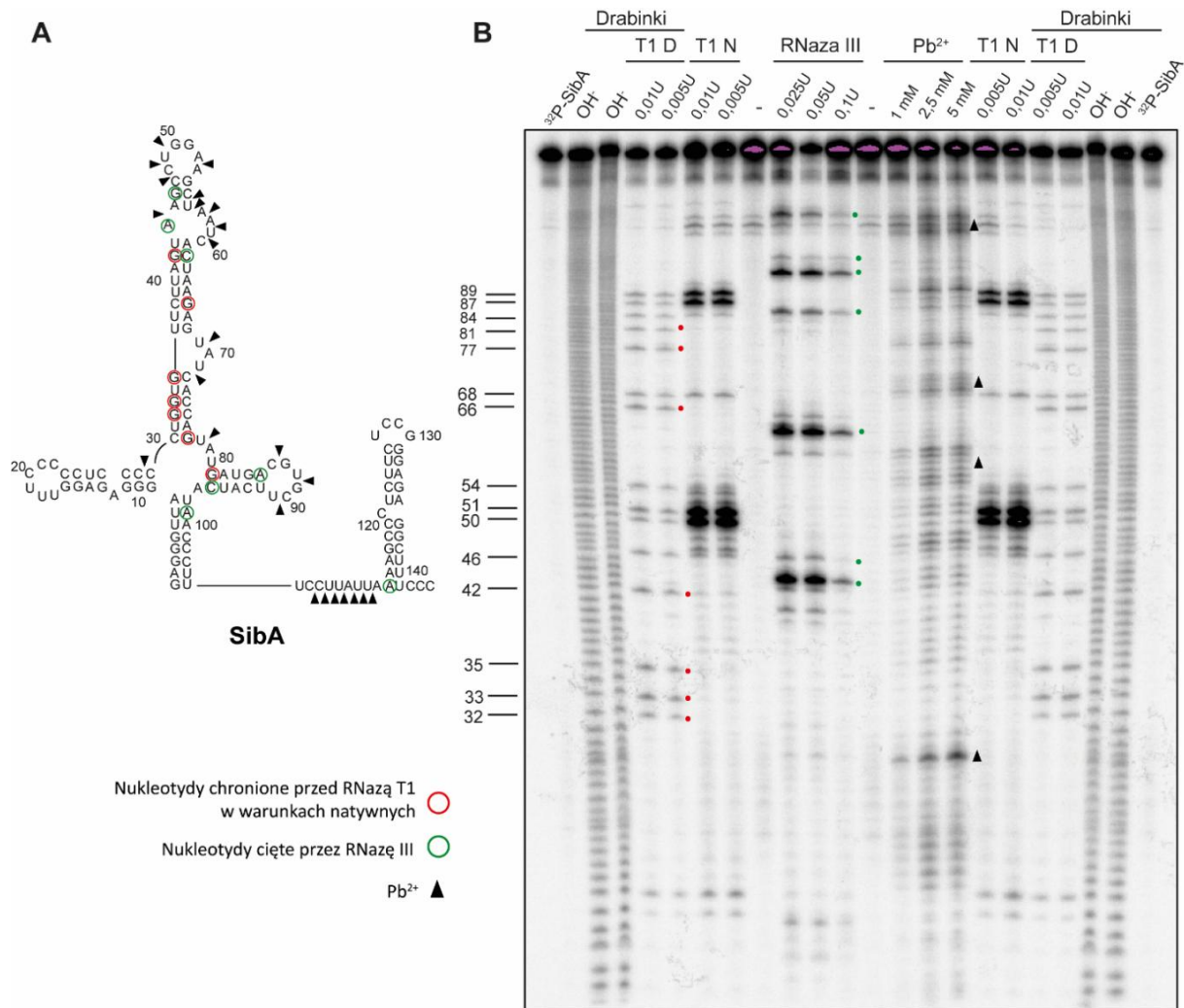
W pierwszej kolejności przeanalizowałam struktury drugorzędowe dwóch cząsteczek RNA: SibA oraz SibC, które w eksperymencie RIP-seq wykazywały obniżone wiązanie z mutantami białka ProQ. Analizę przeprowadziłam z wykorzystaniem metody hydrolizy enzymatyczno-chemicznej przy użyciu jonów ołowiu (Pb^{2+}), RNazy III oraz RNazy T1. Zgodnie z przewidywaniami uzyskanymi przez oprogramowanie RNAstructure (Reuter i Mathews 2010) struktura drugorzędowa tych RNA jest bardzo podobna i składa się z dwóch głównych motywów strukturalnych: czteroramiennej spinki w części 5' cząsteczki oraz spinki terminatorowej na końcu 3' oddzielonych od siebie krótkim regionem łącznikowym (Rys. 26A, 27A).

W celu potwierdzenia przewidywań komputerowych wykonałam mapowanie strukturalne cząsteczek SibA (Rys. 26B) oraz SibC w roztworze (Rys. 27B). Wyniki uzyskane przy użyciu RNazy III, która rozpoznaje i przecina dwuniciowe fragmenty RNA, wykazały obecność przewidywanych struktur dwuniciowych w obrębie czteroramiennej spinki w części 5', w przypadku obydwu badanych RNA. Co więcej, zaobserwowałam słabsze cięcia w pozycjach guanozyn w tym samym obrębie RNA, uzyskanych przy wykorzystaniu RNazy T1, która specyficjnie rozcina RNA przy jednoniciowych resztach guanozyny. Wyniki te również świadczą o obecności struktur dwuniciowych w tym obszarze, co jest spójne z wcześniejszymi przewidywaniami uzyskanymi przy użyciu oprogramowania RNAstructure.

Z kolei, reakcja cięcia przy użyciu jonów ołowiu Pb^{2+} , które tną regiony jednoniciowe oraz charakteryzuje się zwiększoną dynamiką, pokazała jednoniciowe i nieuporządkowane fragmenty w obrębie połączenia czterech ramion spinki na końcu 3' w SibA oraz SibC. Co więcej, degradacja w regionie od U104 do A117 w SibA oraz od U105 do C113 w SibC sugeruje, że nie tylko region łącznika, ale również dolne części struktur obejmujące pary A-U są częściowo odsłonięte i dostępne.

Podczas porównania obu cząsteczek zauważyłam również, że czteroramienna spinka po stronie 5' w cząsteczce SibC była mniej podatna na cięcie przez RNazę III, a bardziej na degradację indukowaną przez Pb^{2+} , w porównaniu z SibA. Może to świadczyć o tym, że struktura ta jest bardziej dynamiczna w cząsteczce SibC niż w SibA, co jest spójne z tym, że region czteroramiennej spinki w SibC zawiera dłuższe niesparowane fragmenty.

Podsumowując, uzyskane przeze mnie wyniki potwierdzają drugorzędowy model strukturalny uzyskany przy użyciu oprogramowania RNAstructure, jednocześnie wskazując na różnice w stabilności i dynamice struktur w cząsteczkach SibA oraz SibC.



Rysunek 26. Struktura drugorzędowa cząsteczki SibA sRNA.

(A) Struktura drugorzędowa cząsteczki SibA wyznaczona przy użyciu oprogramowania RNAstructure. Pozycje odporne na trawienie RNazą T1 w warunkach natywnych oraz trawione przez RNazę III służyły jako identyfikacja nukleotydów znajdujących się w regionach dwuniciowych i oznaczone zostały odpowiednio czerwonymi i zielonymi kółkami. Fragmenty wrażliwe na działanie jonów Pb^{2+} , odpowiadające odcinkom jednoniciowym, oznaczono czarnymi trójkątami.

(B) Autoradiogram hydrolizy enzymatycznej cząsteczki ^{32}P -SibA sRNA. Numery umieszczone po lewej stronie autoradiogramu odpowiadają pozycjom guanozyn w sekwencji SibA. Ścieżka oznaczona jako ^{32}P -SibA przedstawia reakcję kontrolną, natomiast OH^- pokazuje produkty degradacji pod wpływem formamidu. Nad autoradiogramem znajdują się oznaczenia użytych: nukleazy oraz jonów Pb^{2+} wraz z ich stężeniami zastosowanymi w reakcjach hydrolizy. T1 D oznacza reakcję z użyciem RNazy T1 w warunkach denaturujących, natomiast T1 N reakcję w warunkach natywnych.

5.2.5. Analiza oddziaływania cząsteczek SibA i SibC sRNA z białkiem ProQ oraz domeną FinO (ProQ^{NTD})

W kolejnym etapie postanowiłam zidentyfikować regiony oddziaływania białka ProQ oraz jego wyizolowanej domeny FinO z cząsteczkami SibA oraz SibC sRNA. W tym celu przeprowadziłam eksperymenty oznaczenia miejsc wiązania białka w cząsteczkach RNA za pomocą hydrolizy enzymatycznej (ang. *RNA footprinting*) przy użyciu RNazy III oraz jonów ołowiu Pb²⁺. Eksperyment ten polega na wyznaczeniu miejsc oddziaływania białka ze znakowaną radioaktywnie cząsteczką RNA, poprzez identyfikację regionów RNA, które są chronione lub bardziej podatne na cięcie przez enzymy lub odczynniki chemiczne po związaniu białka.

W przypadku cząsteczki SibA, po dodaniu domeny FinO białka ProQ (ProQ^{NTD}) o rosnącym stężeniu również zaobserwowałam osłabienie cięć indukowanych przez jony ołowiu w regionie łącznika położonym w pobliżu spinki terminatorowej oraz w obrębie pętli czwartego ramienia spinki po stronie 5' (Rys. 28A, B). Równocześnie, reakcje z RNazą III skutkowały nasileniem degradacji w pozycji G84, znajdującej się w czwartym ramieniu spinki po stronie 5', wraz ze wzrostem stężenia białka ProQ^{NTD}. Co więcej, zaobserwowałam zanikanie cięcia za pomocą RNazy III w pozycji A114, która znajduje się przy podstawie spinki terminatorowej cząsteczki SibA. Wynik ten świadczy o tym, że wiązanie domeny FinO białka ProQ ma znaczenie nie tylko dla regionów znajdujących się u podstawy terminatora transkrypcji, ale również dla struktur w obrębie czwartego ramienia spinki po stronie 5', prawdopodobnie w wyniku zmian konformacyjnych powstałych po związaniu białka.

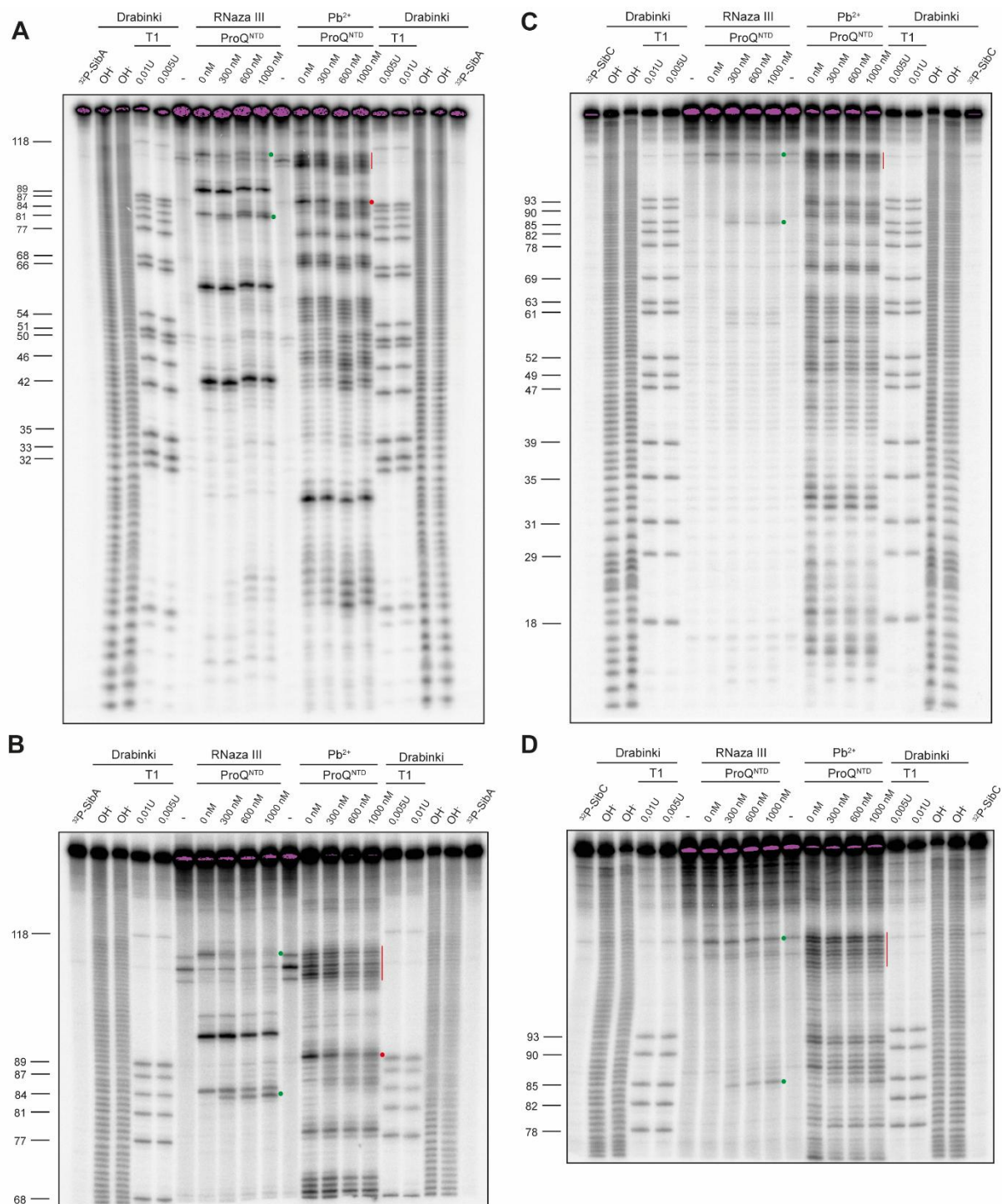
W przypadku cząsteczki SibC, po dodaniu białka ProQ^{NTD} o wzrastającym stężeniu również zaobserwowałam zahamowanie cięć indukowanych przez jony ołowiu w regionie łącznika w pobliżu spinki terminatorowej, natomiast efekt ten był zdecydowanie mniej wyraźny niż dla cząsteczki SibA sRNA (Rys. 28C, D). Ponadto, analogicznie jak w przypadku SibA, zauważyłam cięcie RNazą III w pozycji G85 oraz osłabienie intensywności cięcia w pozycji C113 u podstawy spinki terminatorowej. Wyniki te świadczą o tym, że wiązanie ProQ^{NTD} ma znaczenie dla podobnych regionów w cząsteczkach SibA oraz SibC, jednak efekt strukturalny w przypadku cząsteczki SibC jest zdecydowanie słabszy.

Z kolei, po dodaniu pełnej długości białka ProQ do cząsteczki SibA zaobserwowałam podobne zmiany jak w przypadku ProQ^{NTD}, natomiast efekt był już widoczny przy użyciu mniejszych stężeń białka. W reakcjach z użyciem RNazy III, wraz ze wzrostem stężenia białka ProQ

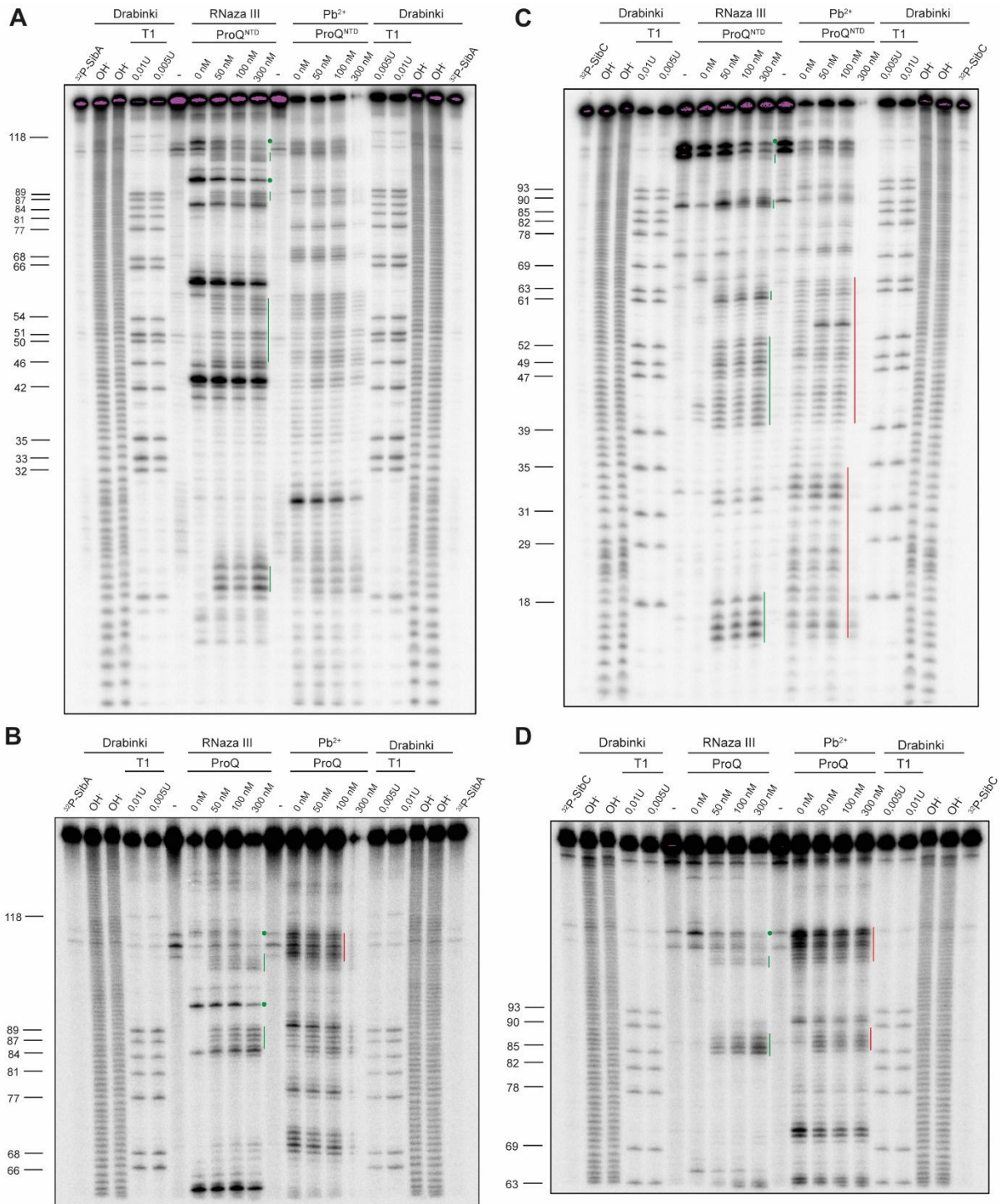
zaobserwowałam nasilenie degradacji w regionie pętli czwartego ramienia spinki po stronie 5' oraz osłabienie cięcia w regionie A114 u podstawy spinki terminatorowej (Rys. 29A, B). Wynik ten wskazuje, że pełnej długości białko ProQ oddziałuje z tymi samymi elementami strukturalnymi co ProQ^{NTD}.

W obecności pełnej długości białka ProQ w cząsteczce SibC zaobserwowałam podobne efekty, jak w przypadku cząsteczki SibA (Rys. 29C, D). Zauważyłam silniejszą degradację w regionie pętli czwartego ramienia spinki, zarówno zależną od RNAzy III, jak i jonów ołowiu. Dodatkowo, zaobserwowałam osłabienie cięcia w regionie C113 u podstawy spinki terminatorowej. Wyniki te są zgodne z obserwacjami dla SibA, co wskazuje, że pełnej długości białko ProQ oddziałuje z obydwoma sRNA, mając znaczenie dla podobnych regionów cząsteczek.

Podsumowując, uzyskane wyniki świadczą o tym, że domena FinO białka ProQ wiąże się silniej z cząsteczką SibA niż SibC. Dodatkowo, wykazałam, że domena ta, jak i białko ProQ o pełnej długości oddziałują w regionie podstawy spinki terminatorowej obydwu cząsteczek sRNA, jednocześnie powodując zmiany konformacyjne w obrębie regionów sąsiadujących.



Rysunek 28. Oddziaływanie białka ProQ^{NTD} z cząsteczkami SibA oraz SibC monitorowane za pomocą mapowania interakcji RNA-białko metodą footprintingu (ang. *RNA footprinting*). Autoradiogram hydrolizy enzymatycznej cząsteczki ³²P-SibA (A, B) oraz ³²P-SibC (C, D) w obecności białka ProQ^{NTD}. Panele (A) oraz (C) pokazują krótsze biegi żeli, a (B) i (D) biegi dłuższe, umożliwiające rozdzielenie dalszych fragmentów sekwencji. Numery umieszczone po lewej stronie autoradiogramu odpowiadają pozycjom guanozyn w sekwencji RNA. Ścieżka oznaczona jako OH⁻ pokazuje produkty degradacji pod wpływem formamidu. Nad autoradiogramem znajdują się oznaczenia użytych: nukleazy oraz jonów Pb²⁺ wraz z ich stężeniami zastosowanymi w reakcjach hydrolizy.



Rysunek 29. Oddziaływanie białka ProQ z cząsteczkami SibA oraz SibC monitorowane za pomocą mapowania interakcji RNA-białko metodą footprintingu (ang. *RNA footprinting*). Autoradiogram hydrolizy enzymatycznej cząsteczki ³²P-SibA (A, B) oraz ³²P-SibC (C, D) w obecności białka ProQ. Panele (A) oraz (C) pokazują krótsze biegi żeli, a (B) i (D) biegi dłuższe, umożliwiające rozdzielenie dalszych fragmentów sekwencji. Numery umieszczone po lewej stronie autoradiogramu odpowiadają pozycjom guanozyn w sekwencji RNA. Ścieżka oznaczona jako OH pokazuje produkty degradacji pod wpływem formamidu. Nad autoradiogramem znajdują się oznaczenia użytych: nukleazy oraz jonów Pb²⁺ wraz z ich stężeniami zastosowanymi w reakcjach hydrolizy.

5.3. Znaczenie kompetycji oraz funkcjonalnej zależności pomiędzy ProQ i Hfq dla wiązania RNA przez te białka w warunkach *in vivo*

Analizy interaktomów przy użyciu metod głębokiego sekwencjonowania RNA ujawniły, że białka ProQ oraz Hfq wiążą zarówno odrębne, jak i nakładające się pule cząsteczek RNA u *Escherichia coli* oraz *Salmonella enterica*. Wykazano, że ProQ wiąże głównie struktury spinek terminatorowych oraz ogony poliurydynowe terminatorów transkrypcji w RNA, podczas gdy Hfq oddziałuje z jednołańcuchowymi regionami bogatymi w adenozyiny i urydyny oraz również wiąże ogony poliurydynowe terminatorów transkrypcji. Wiązanie terminatorów transkrypcji zarówno przez białko ProQ, jak i Hfq stawia pytanie, w jaki sposób białka te osiągają specyficzną wiązania swoich docelowych cząsteczek RNA (Holmqvist i wsp. 2016; Smirnov i wsp. 2016; Holmqvist i wsp. 2018; Melamed i wsp. 2020).

Dodatkowo, niedawne badania za pomocą metody RIL-seq ujawniły, że interaktomy ProQ i Hfq ulegały zmianom w szczepach z delecją genów *proQ* lub *hfq* (Melamed i wsp. 2020). Wyniki uzyskane w naszym laboratorium pokazały, że cząsteczki RNA wiązane przez ProQ zawierały motyw sekwencji bogaty w adenozyiny, który działał jako anty-determinant wiązania dla Hfq, co potwierdzono zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*. Co więcej, badania z wykorzystaniem bakteryjnego testu trójhybrydowego wykazały, że wiązanie ProQ do mutantów RNA, w których motyw bogaty w adenozyiny został zastąpiony urydynami, było słabsze w komórkach z endogenną ekspresją białka Hfq niż w komórkach pozbawionych genu *hfq* (Stein i wsp. 2020). Wyniki te sugerują, że białka ProQ i Hfq konkurują o wiązanie swoich docelowych cząsteczek RNA, co prowadzi do pytania, w jaki sposób ta konkurencja i wzajemne oddziaływanie mają znaczenie dla wiązania RNA przez każde z tych białek w warunkach *in vivo*.

Metoda RIL-seq (ang. *RNA Interaction by Ligation and Sequencing*) jest szczególnie użyteczną metodą do badania globalnych sieci oddziaływań RNA zależnych od białek wiążących RNA w warunkach *in vivo*. Umożliwia ona identyfikację nie tylko pojedynczych cząsteczek RNA związanych z danym białkiem, lecz także par RNA pozostających w bezpośrednim kontakcie i stabilizowanych przez to białko. Pozwala to na określenie oddziaływań badanego białka, w szczególności oddziaływań sRNA-mRNA. Metoda ta została pierwotnie opracowana i wykorzystana do badania interaktomu białka Hfq, co umożliwiło na globalne mapowanie sieci regulatorowych RNA zależnych od tego białka oraz identyfikację licznych nowych par RNA (Melamed i wsp. 2016). Następnie, wykorzystano ją również do wspomnianego wcześniej

badania interaktomu białka ProQ, co pozwoliło wykazać, że posiada ono odrębną, choć częściowo nakładającą się pulę cząsteczek RNA z białkiem Hfq (Melamed i wsp. 2020).

W celu zbadania, w jaki sposób kompetycja i wzajemne oddziaływania między białkami ProQ i Hfq mają znaczenie dla puli cząsteczek RNA wiązanych przez te białka w komórkach *Escherichia coli*, przeprowadziłam nadekspresję ProQ lub Hfq z plazmidów *in vivo*. Następnie wykonałam analizę RIL-seq, aby porównać profile RNA wiązanych przez drugie białko, które było eksprymowane endogennie z chromosomu.

5.3.1. Otrzymanie i walidacja plazmidów ekspresyjnych kodujących białka ProQ i Hfq oraz optymalizacja warunków nadekspresji

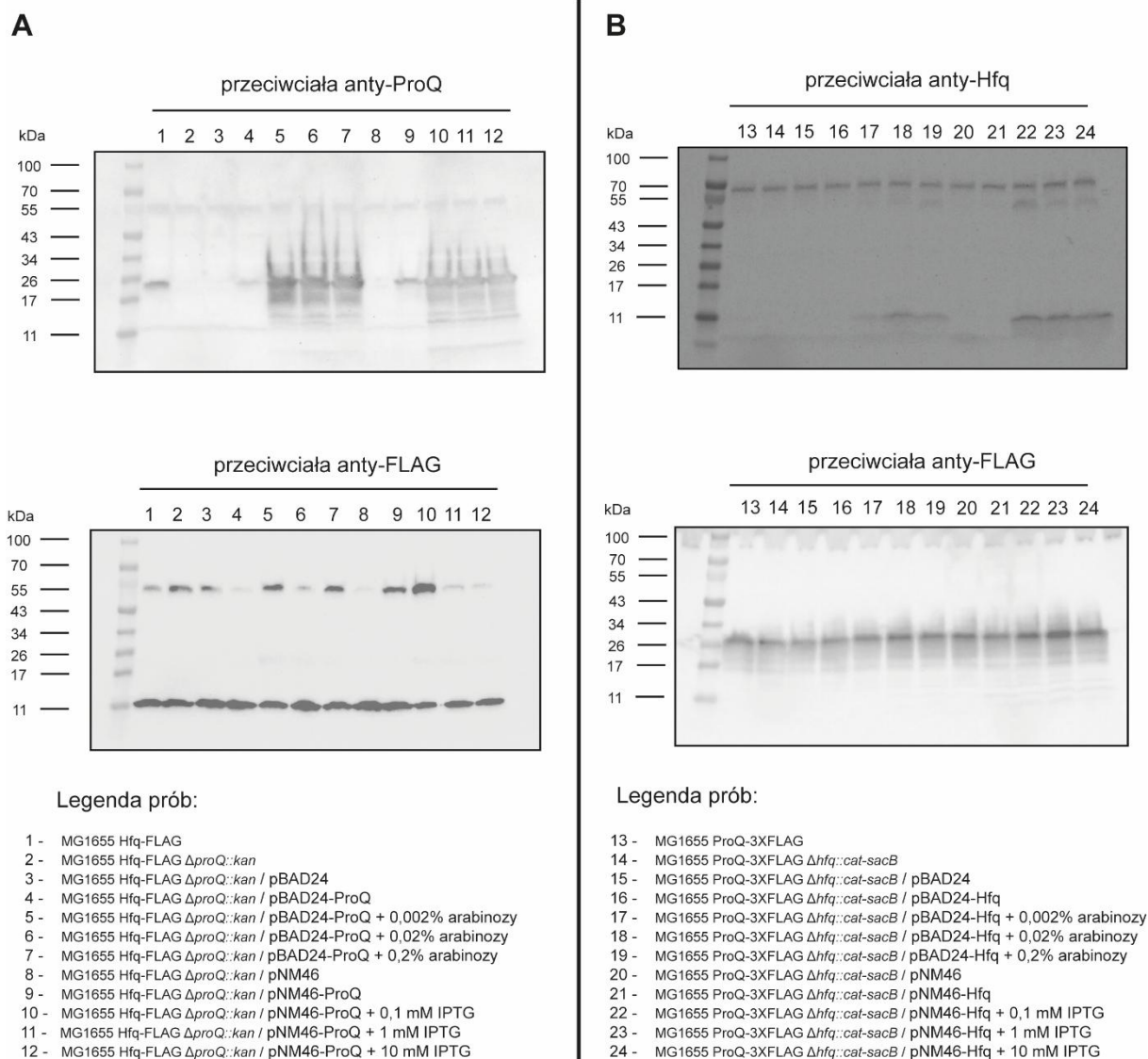
Geny kodujące białka ProQ lub Hfq u *Escherichia coli* wklonowałam do plazmidów ekspresyjnych pBAD24 oraz pNM46, który uzyskałam dzięki uprzejmości prof. Giseli Storz z laboratorium Regulacji Genów Środowiskowych w Narodowych Instytutach Zdrowia w Stanach Zjednoczonych (NIH). Klonowanie przeprowadziłam zgodnie z protokołem opisanym w podrozdziale 4.4, a poprawność otrzymanych wektorów została potwierdzona poprzez sekwencjonowanie DNA w Laboratorium Techniki Biologii Molekularnej na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza. Sekwencje uzyskanych konstruktów porównałam z sekwencjami referencyjnymi potwierdzając brak mutacji w obrębie sekwencji kodujących białka ProQ oraz Hfq.

W celu oceny efektywności nadekspresji białek ProQ i Hfq, wykonałam transformację plazmidów do odpowiednich szczepów *E. coli*. Plazmidy z genem Hfq wprowadziłam do szczepu ProQ 3x-FLAG $\Delta hfq::cat-sacB$, a plazmidy z genem ProQ do szczepu Hfq-FLAG $\Delta proQ::kan$. Wybrałam te szczepy ze względu na planowane później eksperymenty RIL-seq, w których do immunoprecypitacji białek docelowych wykorzystywałam przeciwciała anti-FLAG. Nadekspresję z plazmidu monitorowałam za pomocą metody western blot (Rys. 29). Do detekcji pożądaných produktów białkowych, w pierwszej kolejności użyłam przeciwciał specyficznych dla danego białka w celu sprawdzenia poprawnego działania uzyskanych wektorów. Ponadto, testowałam różne stężenia induktora, aby określić optymalne warunki nadekspresji, aby uzyskać maksymalny poziom białka przy minimalnym stresie dla komórek bakteryjnych.

Uzyskane wyniki wskazały, że obydwa białka mogą ulegać nadekspresji w systemie pBAD24 i pNM46. Do dalszych eksperymentów zdecydowałam się jednak na wykorzystanie plazmidów pNM46, ze względu na wcześniejsze doświadczenie zespołu prof. Giseli Storz w pracy z tym

wektorem, co zwiększało wiarygodność uzyskiwanych wyników. Maksymalny poziom białka z tego plazmidu został uzyskany już przy najmniejszym stężeniu induktora, dlatego do nadekspresji w dalszych eksperymentach zastosowałam stężenie 0,1 mM IPTG.

Dodatkowo, w celu zbadania wzajemnych interakcji i znaczenia obecności jednego białka w dużym stężeniu dla stabilności drugiego, monitorowałam poziom białek ekspresyjnych z chromosomu przy użyciu przeciwciał anti-FLAG. Wyniki wykazały, że nadekspresja jednego białka nie ma znaczenia dla poziomu drugiego, co stanowiło solidną podstawę do przeprowadzenia dalszych eksperymentów głębokiego sekwencjonowania RIL-seq (Rys. 30).



Rysunek 30. Analiza poziomu białek ProQ i Hfq w szczepach *Escherichia coli* z plazmidami ekspresyjnymi przy różnych stężeniach induktorów użytych do nadekspresji. (A) Western blot dla szczepów Hfq-FLAG (próbki 1-12). Ta sama membrana została kolejno inkubowana z przeciwciałami anti-ProQ i anti-FLAG. (B) Western blot dla szczepów ProQ-3XFLAG (próbki 13-24). Ta sama membrana została kolejno inkubowana z przeciwciałami anti-Hfq i anti-FLAG. Szczegółowy skład próbek podano w legendzie. Białko ProQ ma masę około 26 kDa, a w wersji ProQ-3XFLAG około 28 kDa. Białko Hfq występuje w postaci monomeru o masie około 11 kDa lub heksameru o masie około 66 kDa. W wersji Hfq-FLAG białko to posiada masę około 12 kDa w postaci monomeru lub około 68 kDa w wersji heksameru.

5.3.2. Globalna analiza zmian w oddziaływaniach RNA-RNA metodą RIL-seq: porównanie szczepów Hfq-FLAG i ProQ-3XFLAG przy ekspresji drugiego białka z endogennego genu

W celu zbadania znaczenia kompetycji i wzajemnych oddziaływań pomiędzy białkiem ProQ i Hfq na skład puli cząsteczek RNA wiązanych przez te białka w warunkach *in vivo* przeprowadziłam eksperyment RIL-seq. Badanie to wykonałam podczas stażu w laboratorium prof. Giseli Storz. Doświadczenie zaprojektowałam w taki sposób, aby rozróżnić efekty nadekspresji badanego białka, braku ekspresji z chromosomu oraz różnego stanu fizjologicznego komórek w momencie jego indukcji. Eksperyment był przeprowadzony w warunkach, w których jedno z białek ulegało nadekspresji z plazmidu przy jednoczesnej endogennej ekspresji obu białek, jak i warunkach, w których gen chromosomalny jednego z białek był usunięty, dzięki czemu za poziom danego białka odpowiedzialny był wyłącznie konstrukt plazmidowy. Wszystkie eksperymenty przeprowadzono w szczepie *E. coli* MG1655.

Do nadekspresji wykorzystano plazmid pNM46 oraz otrzymane konstrukty plazmidowe - pNM46-ProQ lub pNM46-Hfq. Próby kontrolne zawierały „pusty” wektor pNM46. Indukcję wykonano poprzez dodanie 0,1 mM IPTG, a moment indukcji wybrano tak, aby porównać wczesną ($OD_{600} = 0,05$) i późniejszą ($OD_{600} = 0,5$) fazę wzrostu komórek bakteryjnych. Białka docelowe posiadały znacznik FLAG, co umożliwiło specyficzną immunoprecypitację kompleksów RNA-białko za pomocą przeciwciał anti-FLAG zgodnie z protokołem RIL-seq opisanym w podrozdziale 4.6.4. Walidacja poziomów nadekspresji i potwierdzenie, że nadekspresja jednego białka nie ma znaczenia dla poziomu drugiego, została przeprowadzona przy pomocy techniki western blot (rys. 29).

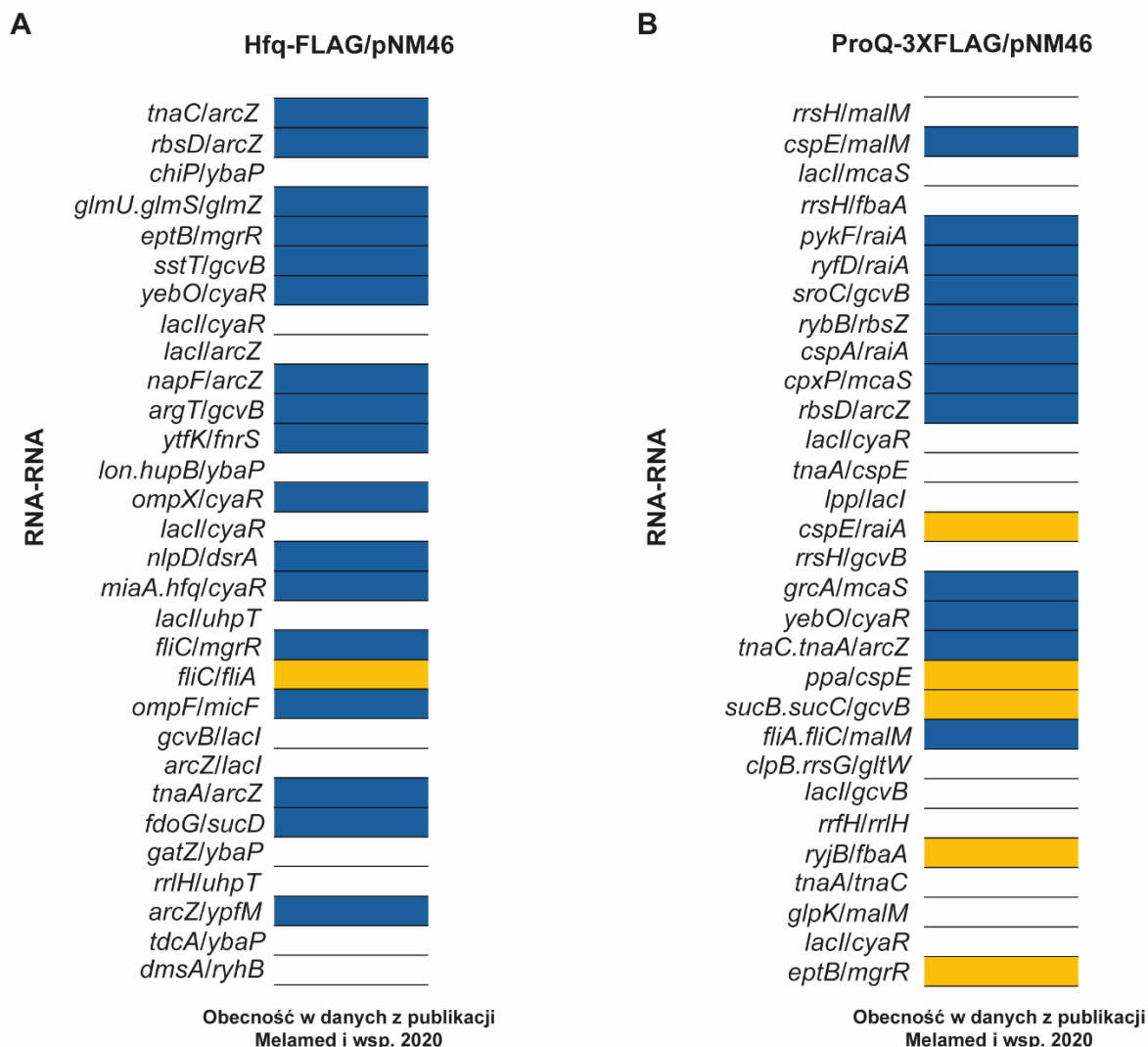
Do eksperymentu RIL-seq wybrałam dwanaście kombinacji warunków, każdą wykonano w dwóch powtórzeniach biologicznych, dzięki czemu otrzymałam 24 biblioteki RIL-seq. Kolejność i oznaczenie prób uwzględnia typ szczepu, obecność konstruktów ekspresyjnych oraz moment indukcji nadekspresji:

- | | |
|--|--|
| 1) Hfq-FLAG + pusty pNM46, | indukcja przy OD ₆₀₀ = 0,05 |
| 2) Hfq-FLAG + pNM46-ProQ, | indukcja przy OD ₆₀₀ = 0,05 |
| 3) Hfq-FLAG + pNM46-ProQ, | indukcja przy OD ₆₀₀ = 0,5 |
| 4) Hfq-FLAG Δ <i>proQ::kan</i> + pusty pNM46, | indukcja przy OD ₆₀₀ = 0,05 |
| 5) Hfq-FLAG Δ <i>proQ::kan</i> + pNM46-ProQ, | indukcja przy OD ₆₀₀ = 0,05 |
| 6) Hfq-FLAG Δ <i>proQ::kan</i> + pNM46-ProQ, | indukcja przy OD ₆₀₀ = 0,5 |
| 7) ProQ-3XFLAG + pusty pNM46, | indukcja przy OD ₆₀₀ = 0,05 |
| 8) ProQ-3XFLAG + pNM46-Hfq, | indukcja przy OD ₆₀₀ = 0,05 |
| 9) ProQ-3XFLAG + pNM46-Hfq, | indukcja przy OD ₆₀₀ = 0,5 |
| 10) ProQ-3XFLAG Δ <i>hfq::cat-sacB</i> + pusty pNM46, | indukcja przy OD ₆₀₀ = 0,05 |
| 11) ProQ-3XFLAG Δ <i>hfq::cat-sacB</i> + pNM46-Hfq, | indukcja przy OD ₆₀₀ = 0,05 |
| 12) ProQ-3XFLAG Δ <i>hfq::cat-sacB</i> + pNM46-Hfq, | indukcja przy OD ₆₀₀ = 0,5 |

Symbol „ Δ ” oznacza szczepy z delecją genu chromosomalnego *proQ* lub *hfq*, co zapewniało, że w tych szczepach jedynym źródłem białka była ekspresja z plazmidu. Kontrolą negatywną dla każdego zestawu były próbki z „pustym” wektorem pNM46.

Pierwsze powtórzenie zostało przygotowane i przeprowadzone przeze mnie, natomiast drugie, obejmujące identyczny zestaw prób, wykonała dr Aixia Zhang z laboratorium prof. Giseli Storz. Oba powtórzenia zrealizowano zgodnie z protokołem RIL-seq opisanym w podrozdziale 4.6.4. Sekwencjonowanie przygotowanych bibliotek przeprowadzono w Centrum Sekwencjonowania DNA i Genomiki w Narodowym Instytucie Zdrowia w Stanach Zjednoczonych (NIH). Analizę bioinformatyczną, obejmującą wstępną obróbkę danych, mapowanie odczytów, ocenę jakości oraz przygotowanie tabel, wykonała dr Caroline Esnault z zespołu bioinformatycznego w Narodowych Instytutach Zdrowia w Stanach Zjednoczonych (NIH). Prawidłowa jakość otrzymanych bibliotek została potwierdzona, a otrzymane dane zostały przetworzone przez dr Caroline Esnault, która znormalizowała liczby odczytów oraz wzbogaciła interakcje RNA-RNA między próbkami. Umożliwiło to przeprowadzenie dalszych analiz i interpretacji oddziaływań w różnych warunkach przedstawione w niniejszej pracy doktorskiej.

W celu oceny spójności uzyskanych danych z wynikami wcześniejszych badań, porównałam wyniki eksperymentów RIL-seq przeprowadzonych w szczepach *Escherichia coli* Hfq-FLAG lub ProQ-3XFLAG z kontrolnym „pustym” plazmidem pNM46 z danymi opublikowanymi przez Melamed i współpracowników (Melamed i wsp. 2020). Analizowałam pary cząsteczek RNA związane z białkiem Hfq lub ProQ przy użyciu tej samej metody eksperymentalnej. Przeprowadzona przeze mnie analiza wykazała, że w zestawie Hfq-FLAG piętnaście z trzydziestu najczęściej wykrywanych interakcji RNA-RNA znajdowało się również wśród pierwszych trzydziestu par RNA-RNA z danych zamieszczonych w cytowanej publikacji (Melamed i wsp. 2020) (Rys. 31A). W przypadku ProQ-3XFLAG dwanaście z trzydziestu najczęściej wykrywanych interakcji RNA-RNA pokrywało się z listą trzydziestu pierwszych w danych otrzymanych przez Melamed i współpracowników (Melamed i wsp. 2020), a kolejne pięć par RNA znalazło się w pierwszych stu w tym zestawie (Rys. 31B). Wyniki te wskazują na zgodność i powtarzalność uzyskanych przeze mnie wyników z poprzednimi danymi literaturowymi.



Legenda

- Para RNA-RNA obecna w pierwszej 30 u Melamed i wsp. 2020
- Para RNA-RNA obecna w pierwszej 100 u Melamed i wsp. 2020

Rysunek 31. Porównanie najczęściej wykrywalnych oddziaływań RNA-RNA w eksperymentach RIL-seq przeprowadzonych w szczepach *E. coli* Hfq-FLAG (A) oraz ProQ-3XFLAG (B) zawierających „pusty” plazmid pNM46 z wcześniej opublikowanymi wynikami (Melamed i wsp. 2020). Na niebiesko zaznaczono pary RNA-RNA obecne w pierwszej trzydziestce w danych Melamed i wsp., a na żółto pary obecne w pierwszej setce. Oddziaływania niewystępujące w tym zestawie oznaczono kolorem białym.

5.3.3. Globalna analiza zmian w oddziaływaniach RNA-RNA związanych z Hfq-FLAG metodą RIL-seq w warunkach nadekspresji białka ProQ

W celu oceny znaczenia stężenia białka ProQ na pulę RNA wiązanych przez białko Hfq, przeanalizowałam wyniki eksperymentów RIL-seq przeprowadzonych w szczepach Hfq-FLAG w sześciu warunkach doświadczalnych:

- | | |
|--|--|
| 1) Hfq-FLAG + pusty pNM46, | indukcja przy OD ₆₀₀ = 0,05 |
| 2) Hfq-FLAG + pNM46-ProQ, | indukcja przy OD ₆₀₀ = 0,05 |
| 3) Hfq-FLAG + pNM46-ProQ, | indukcja przy OD ₆₀₀ = 0,5 |
| 4) Hfq-FLAG Δ <i>proQ::kan</i> + pusty pNM46, | indukcja przy OD ₆₀₀ = 0,05 |
| 5) Hfq-FLAG Δ <i>proQ::kan</i> + pNM46-ProQ, | indukcja przy OD ₆₀₀ = 0,05 |
| 6) Hfq-FLAG Δ <i>proQ::kan</i> + pNM46-ProQ, | indukcja przy OD ₆₀₀ = 0,5 |

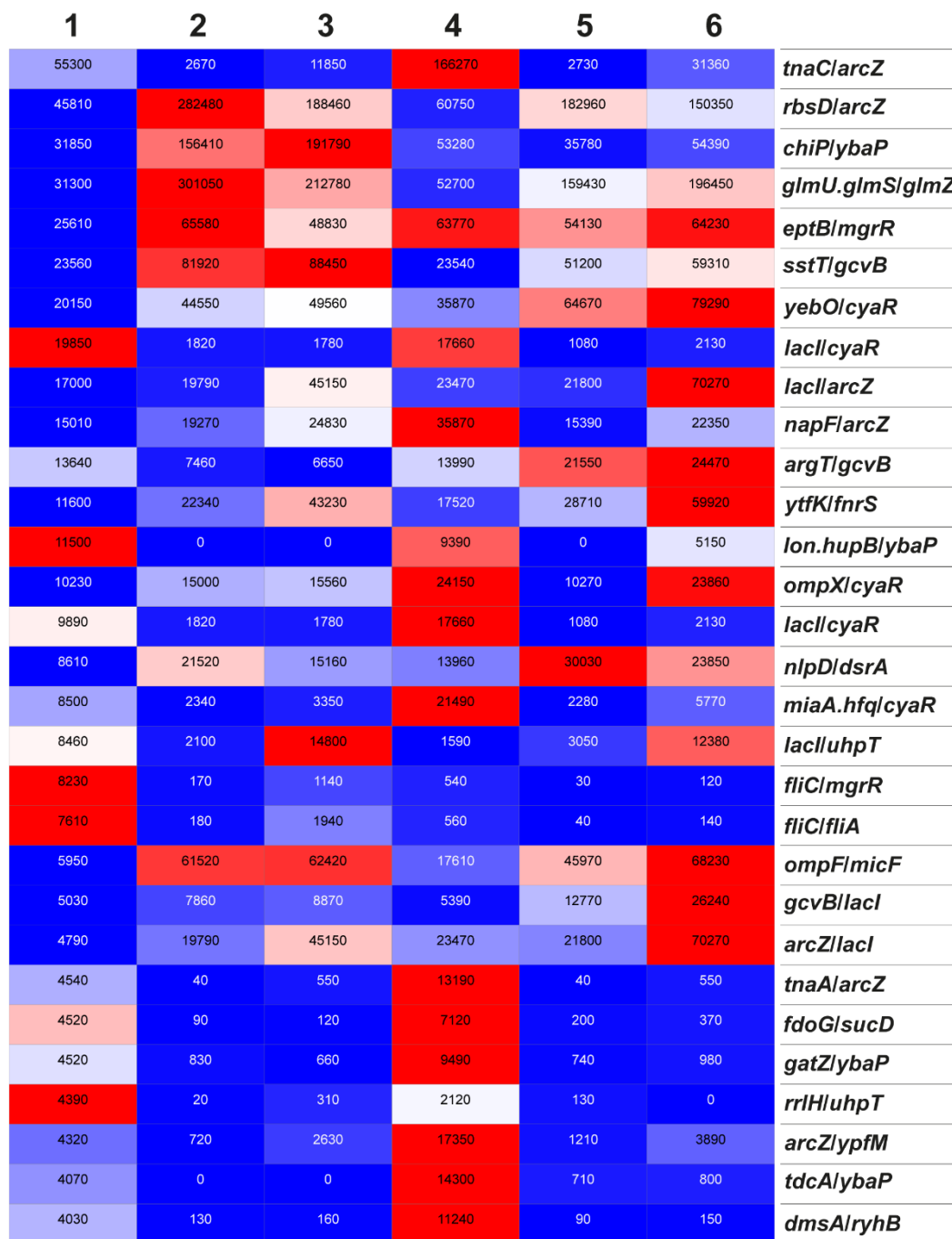
Dane obejmują warunki kontrolne czyli próby z „pustym” plazmidem pNM46, nadekspresję ProQ w dwóch punktach wzrostu oraz szczepy Δ *proQ::kan*, w których białko ProQ było generowane wyłącznie z plazmidu. Szczegółową analizę przeprowadziłam na 30 najliczniej reprezentowanych parach RNA-RNA w próbie kontrolnej Hfq-FLAG z „pustym” plazmidem pNM46 (Rys. 32).

Porównanie liczby odczytów odpowiadających poszczególnym chimerycznym parom RNA ujawniło heterogeniczną odpowiedź na zwiększenie poziomu białka ProQ. Zaobserwowałam dwa główne efekty nadekspresji białka ProQ na pulę wiązanych cząsteczek RNA-RNA przez białko Hfq. Pierwszy efekt dotyczył par RNA-RNA, dla których wzrost poziomu ProQ spowodował spadek liczby odczytów dla białka Hfq. Zmiany były szczególnie wyraźne dla pary *tnaC/arcZ*, gdzie liczba odczytów spadła około 20-krotnie (z 55 tys. do 2,6 tys. przy wczesnej indukcji ProQ), *fdoG/sucD*, z około 50-krotną redukcją sygnału (z 4,5 tys. do 86 we wczesnej fazie indukcji ProQ) oraz *lacI/cyaR*, gdzie liczba odczytów spadła 10-krotnie (z 20 tys. do około 2 tys.). Efekt ten sugeruje konkurencję pomiędzy białkiem ProQ i Hfq o dostęp do niektórych RNA lub może świadczyć o tym, że białko ProQ zmienia dostępność tych RNA, ograniczając tym samym ich wiązanie przez Hfq.

Drugi zaobserwowany efekt dotyczył par RNA, w których nadekspresja ProQ prowadziła do wzrostu liczby odczytów w kompleksach z białkiem Hfq. Przykładem takich par jest *rbsD/arcZ*, gdzie sygnał wzrósł około 6-krotnie (z 46 tys. do 282 tys. we wczesnej indukcji ProQ) oraz *ompF/micF*, z około 10-krotnym wzrostem (z 6 tys. do 61 tys. we wczesnej fazie indukcji). Wynik ten może wskazywać, że ProQ pośrednio ma znaczenie dla dostępności RNA,

stabilizując cząsteczki RNA lub ułatwiając tworzenie par zasad pomiędzy nimi, co zwiększa efektywność ich związania przez Hfq.

Co więcej, zauważyłam również, że czas indukcji ProQ miał znaczenie dla ilości RNA związanych z Hfq. W przypadku pary *arcZ/lacI* wczesna indukcja spowodowała wzrost z około 5 tys. do 20 tys., natomiast późniejsza indukcja doprowadziła do dalszego wzrostu do 45 tys. odczytów. Podobną tendencję zauważyłam dla pary *ytfK/fnrS*. Zmiany te sugerują, że wczesna obecność ProQ ogranicza dostępność RNA dla Hfq, natomiast późniejsza indukcja pozwala na większe gromadzenie się RNA w kompleksach Hfq-RNA. Dodatkowo, wynik ten może świadczyć o istnieniu mechanizmów neutralizujących nadmiar ProQ w komórce, natomiast przy późniejszej indukcji systemy te nie zdążyły zadziałać, co pozwoliło na pełniejszy efekt zwiększonego związania RNA z Hfq.



Legenda

1. Hfq-FLAG/pNM46	ind OD ₆₀₀ = 0,05
2. Hfq-FLAG/pNM46-ProQ	ind OD ₆₀₀ = 0,05
3. Hfq-FLAG/pNM46-ProQ	ind OD ₆₀₀ = 0,5
4. Hfq-FLAG Δ <i>proQ</i> :: <i>kan</i> /pNM46	ind OD ₆₀₀ = 0,05
5. Hfq-FLAG Δ <i>proQ</i> :: <i>kan</i> /pNM46-ProQ	ind OD ₆₀₀ = 0,05
6. Hfq-FLAG Δ <i>proQ</i> :: <i>kan</i> /pNM46-ProQ	ind OD ₆₀₀ = 0,5



Rysunek 32. Analiza zmian w oddziaływaniach RNA-RNA związanych z Hfq-FLAG metodą RIL-seq w warunkach nadekspresji białka ProQ. Heatmapa przedstawia 30 najliczniej reprezentowanych par RNA-RNA w próbce kontrolnej Hfq-FLAG/pNM46 oraz ich sygnały w sześciu warunkach doświadczalnych. Kolory oznaczają wartości znormalizowane w obrębie wiersza (niebieski – minimum, czerwony – maksimum).

5.3.4. Globalna analiza zmian w oddziaływaniach RNA-RNA związanych z ProQ-3XFLAG metodą RIL-seq w warunkach nadekspresji Hfq

W celu zbadania znaczenia obecności i poziomu białka Hfq na pulę cząsteczek RNA związanych z białkiem ProQ, przeanalizowałam wyniki eksperymentu RIL-seq, który został przeprowadzony w szczepach ProQ-3XFLAG w sześciu warunkach doświadczalnych:

1. ProQ-3XFLAG + pusty pNM46, indukcja przy $OD_{600} = 0,05$
2. ProQ-3XFLAG + pNM46-Hfq, indukcja przy $OD_{600} = 0,05$
3. ProQ-3XFLAG + pNM46-Hfq, indukcja przy $OD_{600} = 0,5$
4. ProQ-3XFLAG $\Delta hfq::cat-sacB$ + pusty pNM46, indukcja przy $OD_{600} = 0,05$
5. ProQ-3XFLAG $\Delta hfq::cat-sacB$ + pNM46-Hfq, indukcja przy $OD_{600} = 0,05$
6. ProQ-3XFLAG $\Delta hfq::cat-sacB$ + pNM46-Hfq, indukcja przy $OD_{600} = 0,5$

Dane obejmują warunki kontrolne czyli próby z „pustym” plazmidem pNM46, nadekspresję Hfq w dwóch punktach wzrostu oraz szczepy $\Delta hfq::cat-sacB$, w których białko Hfq pochodziło wyłącznie z transkrypcji plazmidu. Szczegółową analizę przeprowadziłam na 30 najliczniej reprezentowanych parach RNA-RNA w próbie kontrolnej ProQ-3XFLAG z „pustym” plazmidem pNM46 (Rys. 33).

Porównanie liczby odczytów odpowiadających poszczególnym chimerycznym parom RNA ujawniło wyraźną zależność wykrywalności większości par RNA-RNA od obecności białka Hfq. W kontrolnym szczepie ProQ-3XFLAG $\Delta hfq::cat-sacB$ z „pustym” plazmidem pNM46 dla znaczącej liczby par obserwowany jest drastyczny spadek liczby odczytów w porównaniu z warunkami, w których Hfq jest obecne. Przywrócenie ekspresji białka Hfq z plazmidu w szczepach ProQ-3XFLAG $\Delta hfq::cat-sacB$ w większości przypadków skutkuje odtworzeniem, a w niektórych podniesieniem liczby odczytów obserwowanych w warunkach z chromosomalnym genem *hfq*.

Na przykład, odczyt odpowiadający interakcji *rrsH/malM* zmniejszył się ponad 5-krotnie, *cspE/malM* zmniejszył się około 14-krotnie, a dla *lacI/mcaS* aż 25-krotnie w warunkach bez Hfq w porównaniu do kontroli w szczepie ProQ-3XFLAG z „pustym” plazmidem pNM46. Podobnie silne redukcje sygnału zaobserwowałam dla *cspA/raiA* (7-krotny spadek), *lacI/cyaR* (11-krotny spadek) czy *tnaC.tnaA/arcZ* (16-krotny spadek). W przypadku par RNA-RNA: *cspE/raiA*, *rrsH/gcvB*, *grcA/mcaS*, *fliA.fliC/malM*, *clpB.rrsG/gltW*, *lacI/gcvB* oraz *glpK/malM* odnotowałam całkowity zanik sygnału, co wskazuje, że obecność białka Hfq jest niezbędna do wykrycia tych par w kompleksach z białkiem ProQ.

Natomiast po przywróceniu ekspresji białka Hfq z plazmidu wiele z tych oddziaływań powróciło z bardzo dużym wzrostem. Dla przykładu, sygnał odpowiadający parze *cspA/raiA* wzrósł ponad 59-krotnie względem Δhfq , dla *ryfD/raiA* około 13-krotnie, dla *tnaC.tnaA/arcZ* około 6-krotnie, a dla *lacI/cyaR* około 23-krotnie. W przypadkach par, dla których sygnał wcześniej zanikł całkowicie ponowna obecność Hfq umożliwiła ponowne wykrycie oddziaływania. Wyniki te sugerują, że białko ProQ i Hfq współdziałają przy formowaniu wielu kompleksów RNA-RNA, a brak Hfq mocno ogranicza funkcjonalność ProQ w tym zakresie.

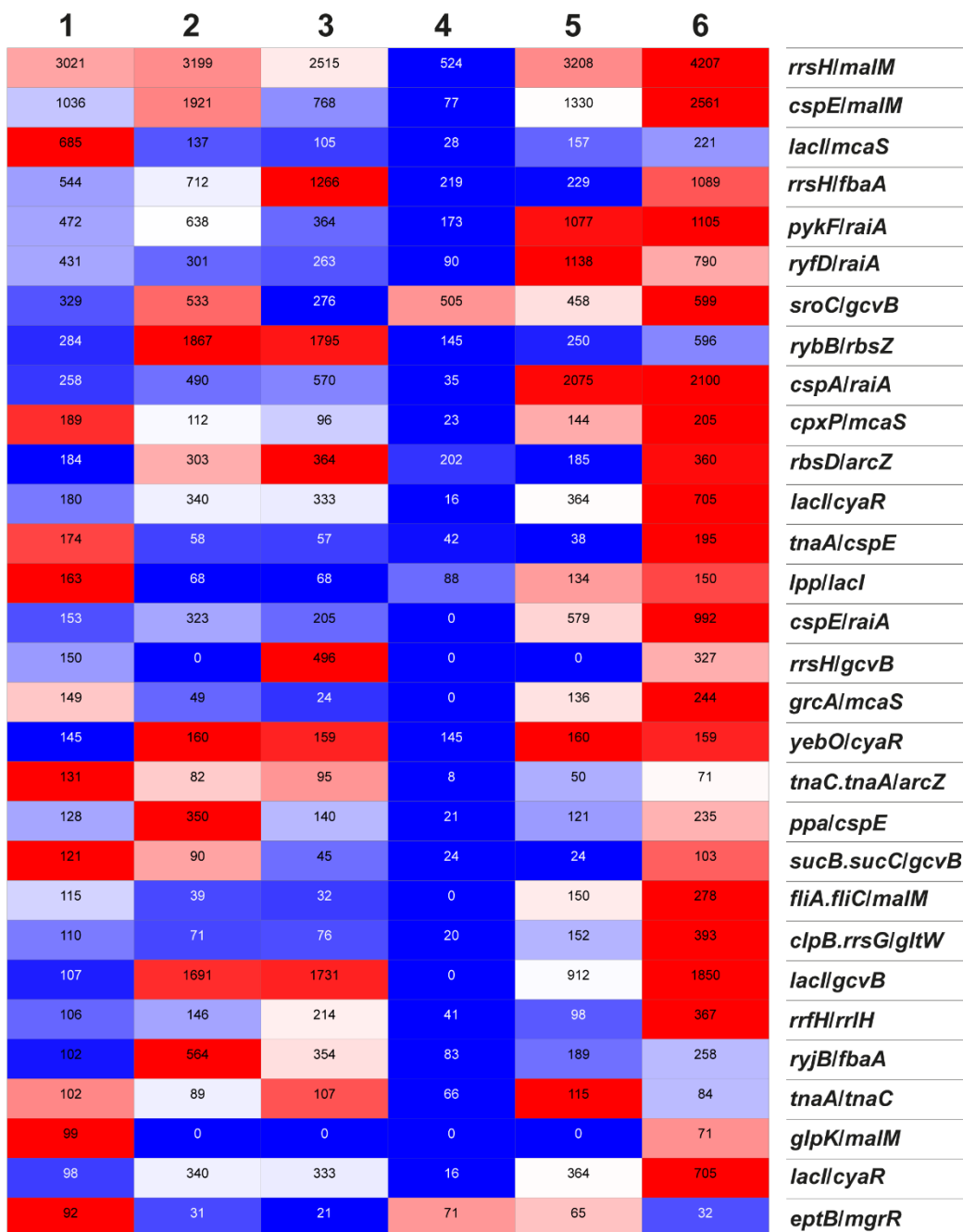
Co więcej, w przypadku niektórych par takich jak *cspA/raiA*, *ryfD/raiA* dostarczenie białka Hfq generowanego z plazmidu w warunkach Δhfq skutkowało silniejszymi sygnałami, niż w warunkach z chromosomalnym genem *hfq*. Przykładowo, *cspA/raiA* w warunkach z chromosomalnym *hfq* oraz ekspresją Hfq z plazmidu zarówno przy wczesnej, jak i późnej indukcji sygnał pozostaje na umiarkowanym poziomie (próba 2: 490, próba 3: 570). Natomiast w warunkach Δhfq oraz ekspresją Hfq z plazmidu (próba 5: 2075, próba 6: 2100) obserwujemy około 4-4,3-krotny wzrost sygnału w stosunku do odpowiednich warunków z chromosomalnym *hfq*. Sugeruje to, że poziom i sposób ekspresji Hfq istotnie modulują pulę RNA obecnych w immunoprecypitatach ProQ-3XFLAG w przypadku niektórych par RNA-RNA.

Z kolei, porównanie wyników uzyskanych przy wczesnej ($OD_{600} = 0,05$) i późniejszej ($OD_{600} = 0,5$) indukcji białka Hfq ujawniło, że czas ekspresji tego białka modyfikuje liczbę wykrywanych oddziaływań RNA-RNA związanych z białkiem ProQ.

W wielu przypadkach późniejsza indukcja prowadziła do wzrostu liczby odczytów w porównaniu z wczesną indukcją. Na przykład, dla pary *rrsH/fbaA* sygnał wzrósł około 1,8-krotnie dla szczepu ProQ-3XFLAG i około 4,8-krotnie dla szczepu ProQ-3XFLAG $\Delta hfq::cat-sacB$. Podobny efekt zaobserwowałam dla *rrfH/rrlH*, gdzie późna indukcja zwiększyła liczbę odczytów 1,5-krotnie dla szczepu ProQ-3XFLAG i około 3,7-krotnie dla szczepu z delecją genu *hfq*.

Natomiast dla innych par RNA-RNA efekt był odwrotny, czyli późniejsza indukcja obniżała liczbę odczytów w porównaniu do wcześniejszej. Przykładem jest para *ryfF/raiA*, dla której sygnał zmniejszył się około 1,2-krotnie dla szczepu z chromosomalnym genem *hfq* oraz 1,4-krotnie dla szczepu z delecją *hfq*. Z kolei, w przypadku niektórych par, jak *yebO/cyaR*, liczba odczytów pozostawała relatywnie stabilna niezależnie od momentu indukcji.

Podsumowując, obecność oraz zwiększenie ilości białka Hfq istotnie ma znaczenie dla większości par RNA-RNA. Dla większości, Hfq jest niezbędny lub silnie ułatwiający powstawanie par RNA wiążących się z białkiem ProQ, co sugeruje bliską współzależność funkcjonalną obu białek w regulacji potranskrypcyjnej. Dodatkowo, analiza pokazuje, że moment indukcji białka Hfq różnie wpływa na oddziaływanie RNA-RNA z białkiem ProQ. Dla niektórych par późniejsza indukcja prowadzi do istotnego wzrostu lub spadku liczby odczytów, natomiast inne są niewrażliwe na czas ekspresji białka Hfq. Sugeruje to, że nie wszystkie cząsteczki RNA reagują jednakowo, a dynamika oddziaływań zależy od konkretnej pary RNA-RNA.



Legenda

1. ProQ-3XFLAG/pNM46	ind OD ₆₀₀ = 0,05
2. ProQ-3XFLAG/pNM46-Hfq	ind OD ₆₀₀ = 0,05
3. ProQ-3XFLAG/pNM46-Hfq	ind OD ₆₀₀ = 0,5
4. ProQ-3XFLAG $\Delta hfq::cat-sacB$ /pNM46	ind OD ₆₀₀ = 0,05
5. ProQ-3XFLAG $\Delta hfq::cat-sacB$ /pNM46-Hfq	ind OD ₆₀₀ = 0,05
6. ProQ-3XFLAG $\Delta hfq::cat-sacB$ /pNM46-Hfq	ind OD ₆₀₀ = 0,5



Rysunek 33. Analiza zmian w oddziaływaniach RNA-RNA związanych z ProQ-3XFLAG metodą RIL-seq w warunkach nadekspresji białka Hfq. Heatmapa przedstawia trzydzieści najliczniej reprezentowanych par RNA-RNA w próbce kontrolnej ProQ-3XFLAG/pNM46 oraz odpowiadające im sygnały w sześciu warunkach doświadczalnych. Kolory oznaczają wartości znormalizowane w obrębie wiersza (niebieski – minimum, czerwony – maksimum).

6. DYSKUSJA

Celem niniejszej pracy doktorskiej było zbadanie mechanizmów kompetycji pomiędzy białkami wiążącymi cząsteczki RNA u *Escherichia coli*, ze szczególnym uwzględnieniem białek ProQ, FinO oraz Hfq. Białka te należą do kluczowych białek bakteryjnych oddziałujących z RNA, mając znaczenie między innymi dla stabilności, dostępności, funkcji RNA oraz w konsekwencji dla licznych procesów fizjologicznych komórki. Pomimo licznych badań wskazujących, że zakresy oddziaływań tych białek z RNA częściowo się pokrywają, molekularne mechanizmy odpowiedzialne za selektywność rozpoznawania docelowych cząsteczek RNA oraz kompetycję pomiędzy tymi białkami nie zostały w pełni poznane.

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy pozwalają na omówienie tego zagadnienia na trzech poziomach. Po pierwsze, pozwalają na analizę cech sekwencyjnych i strukturalnych cząsteczek RNA, w szczególności regionów otaczających spinki terminatorowe, które determinują ich rozpoznawanie przez białka ProQ oraz FinO, zawierające domenę FinO. Po drugie, dostarczają informacji na temat znaczenia wybranych reszt aminokwasowych w domenie FinO białka ProQ dla rozróżniania wiązania docelowych cząsteczek RNA w warunkach *in vivo*. Po trzecie, umożliwiają ocenę znaczenia kompetycji i wzajemnych oddziaływań pomiędzy białkiem ProQ i Hfq dla wiązania RNA przez te białka w warunkach *in vivo*.

W tym rozdziale wyniki te zostały omówione w odniesieniu do dostępnych danych literaturowych, opisujących oddziaływanie cząsteczek RNA z białkami w komórce bakteryjnej. Analiza ta obejmuje różne, uzupełniające się aspekty regulacji, które razem tworzą szerszy obraz mechanizmów regulujących selektywność i zakres oddziaływań białek ProQ, FinO oraz Hfq z cząsteczkami RNA w komórce *Escherichia coli*.

6.1. Sekwencja nukleotydowa otaczająca podstawę spinki terminatorowej decyduje o selektywnym rozpoznawaniu cząsteczek RNA przez białko ProQ i FinO

Białka z rodziny FinO wiążące RNA odgrywają kluczową rolę w regulacji ekspresji genów u organizmów bakteryjnych. Zgodnie z obecnymi danymi, to domena FinO odpowiada głównie za specyficzne rozpoznawanie docelowych cząsteczek RNA, a regiony N- i C-końcowe tych białek pełnią w większości funkcje wspomagające (Gonzalez i wsp. 2017; Stein i wsp. 2020). Struktura krystalograficzna domeny FinO białka RocC z *Legionella pneumophila* w kompleksie z RocR RNA ujawniła mechanizm oddziaływania dolnej części spinki oraz ogona 3' z resztami aminokwasowymi na wklęsłej powierzchni domeny FinO białka RocC (Kim i wsp. 2022). Co więcej, liczne badania wysokoprzepustowe oraz badania *in vitro* wykazały, że ProQ i FinO wiążą RNA zawierające stabilne terminatory transkrypcji z regionami jednoniciowymi (Jerome i Frost 1999; Arthur i wsp. 2011; Holmqvist i wsp. 2018; Melamed i wsp. 2020; Stein i wsp. 2020)

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy doktorskiej pokazują jednak, że znaczenie tych struktur wykracza poza samą obecność spinki terminatorowej. Przeprowadzone przeze mnie eksperymenty, polegające na transplantacji sekwencji nukleotydowej zlokalizowanej u podstawy spinki terminatorowej wykazały, że region ten decyduje nie tylko o sile wiązania białka ProQ i FinO z RNA, lecz również o specyficzności ich rozpoznawania przez badane białka. Wprowadzenie elementów pochodzących z FinP lub RepX zwiększyło powinowactwo do białka FinO, natomiast sekwencja z *malM-3'* oraz *cspE81-3'* sprzyjała wiązaniu przez białko ProQ (Rys. 10-14, Tabela 1). Wykazałam również, że nawet niewielkie różnice nukleotydowe zlokalizowane bezpośrednio przy podstawie spinki terminatorowej zmieniają preferencje wiązania z badanymi białkami. Obecność pary A-G u podstawy terminatora powodowała rozpoznawanie RNA przez białko FinO, natomiast para U-U zwiększyła powinowactwo do białka ProQ (Rys. 15-17, Tabela 2). Dodatkowo, wyniki reakcji kompetycji pokazały, że efekt ten jest widoczny również w reakcjach z udziałem obu białek jednocześnie (Rys. 18-19). W rezultacie, uzyskane dane te poszerzają rozumienie funkcji tego regionu RNA, wskazując, że sekwencja u podstawy spinki terminatorowej ma kluczowe znaczenie dla wiązania oraz rozróżniania docelowych cząsteczek RNA przez białka ProQ i FinO u *Escherichia coli*.

Na podstawie powyższych obserwacji można zaproponować możliwe wyjaśnienie, dlaczego białko ProQ nie rozpoznaje naturalnych cząsteczek RNA wiązanych przez białko FinO, takich jak FinP oraz RepX sRNA. Cechą charakterystyczną tych cząsteczek jest obecność pary puryna-puryna bezpośrednio poniżej zamykającej pary zasad G-C spinki terminatorowej w tych

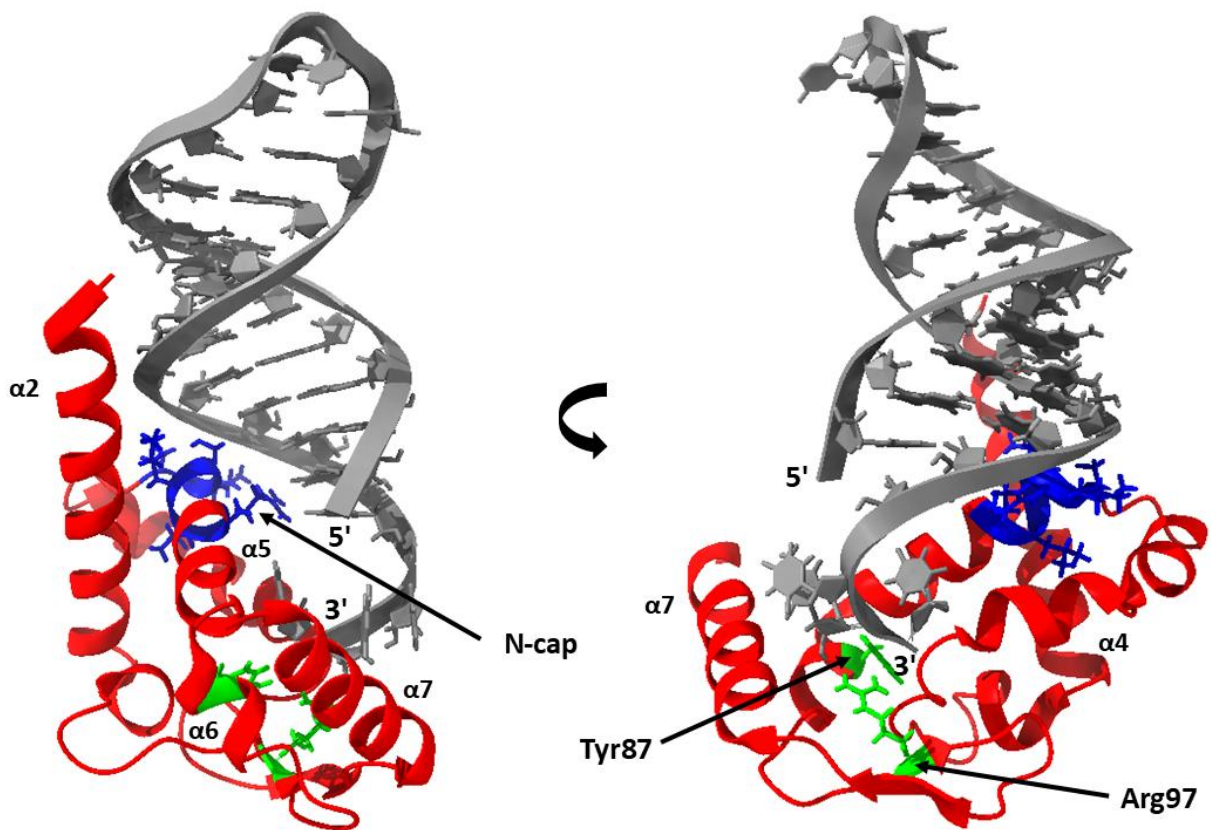
cząsteczkach. Takie niedopasowanie może destabilizować lokalną strukturę RNA i przez to osłabiać wiązanie przez białko ProQ. Z kolei, cząsteczki specyficzne dla białka ProQ posiadają w tym miejscu pary A-U lub niedopasowania typu pirymidyna-pirymidyna, które są tolerowane przez to białko, o ile zachowana jest lokalna struktura helisy terminatora. Zatem, osłabione wiązanie FinP i RepX sRNA przez białko ProQ może być spowodowane przez obecność niedopasowania puryna-puryna oraz sąsiadujących sekwencji, które destabilizują lokalną strukturę helisy, uniemożliwiając rozpoznanie przez domenę FinO białka ProQ. Dodatkowo, białko ProQ wiąże zdecydowanie znacznie więcej cząsteczek RNA w porównaniu z białkiem FinO (Olejniczak i Storz 2017), co może sugerować, że konkurencja pomiędzy cząsteczkami RNA stanowi dodatkowy mechanizm zapobiegający wiązaniu RNA specyficznych dla FinO przez ProQ w komórce bakteryjnej.

Zauważyłam także, że wprowadzenie elementów sekwencji nukleotydowych pochodzących z FinP lub RepX do cząsteczek *malM-3'* lub *cspE81-3'* skutkowało wzmocnieniem wiązania tych RNA przez białko FinO (Rys. 10-11, 13, Tabela 1). Świadczy to o tym, że sekwencje u podstawy spinki terminatorowej FinP i RepX wprowadzają cechy rozpoznawane przez białko FinO. Natomiast, wprowadzenie odpowiadających sekwencji z *malM-3'* do cząsteczek FinP i RepX sRNA miało jedynie umiarkowanie niekorzystne znaczenie dla wiązania przez FinO (Rys. 10, 13, Tabela 1). Zgodnie z hipotezą przedstawioną przez Arthur i wsp. (2011) nici RNA otaczające spinkę terminatorową FinP sRNA mogą być rozdzielone w kompleksie z białkiem FinO. Możliwe, że naturalnie występujące niedopasowanie puryna-puryna w cząsteczkach FinP i RepX sprzyja takiemu rozdzieleniu nici. Mechanizm ten mógłby wyjaśniać, dlaczego wprowadzenie tej sekwencji do cząsteczki *malM-3'* oraz *cspE81-3'* prowadzi do wzmocnienia ich wiązania z białkiem FinO. Natomiast, umiarkowanie niekorzystny efekt zastąpienia naturalnej sekwencji u podstawy terminatora transkrypcji u FinP lub RepX sekwencją z cząsteczki *malM-3'* sugeruje, że albo nici RNA pozostają wystarczająco rozdzielone, albo że inne elementy struktury FinP i RepX również wspomagają to oddziaływanie. Niemniej jednak, uzyskane dane wskazują, że różnice w sekwencjach otaczających spinki terminatorowe mają istotne znaczenie dla lokalnej struktury RNA i determinują rozróżnianie RNA przez białko ProQ i FinO.

W kontynuacji powyższych badań interesujące byłoby zbadanie, czy mutacje innych regionów białka ProQ, poza domeną FinO, mają znaczenie dla rozróżniania zróżnicowanych struktur RNA. W szczególności, zbadanie, czy regiony N- oraz C-końcowe białka ProQ mają znaczenie dla rozróżniania wiązania w zależności od sekwencji oraz struktury cząsteczki RNA.

Drugą kwestią, która może tłumaczyć różnice w rozpoznawaniu tych samych RNA przez ProQ i FinO, mogą być właściwości samych białek. Struktura krystalograficzna kompleksu białka RocC z RocR RNA z *Legionella pneumophila* (Rys. 34) wykazała, że dolna część trzonu spinki terminatorowej oraz koniec 3' cząsteczki RocR RNA są rozpoznawane przez dwa odrębne regiony domeny FinO białka RocC (Kim i wsp. 2022). Koniec 3' oddziałuje z konserwowanymi resztami tyrozyny (Tyr87) i argininy (Arg97), których odpowiedniki również występują w białku ProQ i FinO. W związku z tym, jest mało prawdopodobne, aby różnice w rozpoznawaniu RNA wynikały bezpośrednio z tego regionu badanych białek. Natomiast dolna część trzonu spinki terminatorowej cząsteczki RocR RNA oddziałuje z resztami aminokwasowymi znajdującymi się w N-końcowej części piątej α -helisy białka RocC, który został określony jako motyw N-cap. Interesujące jest to, że sekwencje aminokwasowe białka ProQ i FinO, które tworzą odpowiadającą α -helisę różnią się pomiędzy sobą, co sugeruje, że mogą być odpowiedzialne za różnice w rozpoznawaniu cząsteczek RNA przez te obydwie białka.

W celu weryfikacji tej hipotezy, dr Maciej Basczok z naszego laboratorium, stworzył modele strukturalne poprzez nałożenie struktury białka ProQ lub FinO, uzyskane eksperymentalnie oraz wygenerowane przez oprogramowanie ColabFold, na strukturę kompleksu RocC z RocR (Kim i wsp. 2022). Analiza ta wykazała, że motyw N-cap w trzeciej α -helisie białka ProQ jest podobny do motywu w białku RocC i obejmuje cztery reszty aminokwasowe (S53, K54, R58 oraz R62) zdolne do oddziaływania z cząsteczkami RNA. Co więcej, istotność tych reszt aminokwasowych dla wiązania z cząsteczkami RNA została wcześniej potwierdzona poprzez badania *in vitro* oraz *in vivo* (Pandey i wsp. 2020; Stein i wsp. 2023). Natomiast analiza białka FinO wykazała, że jego czwarta α -helisa odpowiada motywowi N-cap w białku RocC i tworzy większą powierzchnię oddziaływań niż w przypadku białka ProQ. Obejmuje ona aż siedem reszt aminokwasowych (H117, K118, R121, R122, K125 i R129) mogących oddziaływać z docelową cząsteczką RNA. Co więcej, analiza wykazała, że białko FinO oddziałuje z podstawą spinki terminatorowej za pomocą C-końcowej części czwartej α -helisy białka FinO, w której znajdują się reszty K125 oraz R129. Co ciekawe, resztą homologiczną do K125 białka FinO jest R62, a do R129 jest S66. Z tego względu możliwe jest, że różnice w rozmieszczeniu reszt mogą być przyczyną odmiennych oddziaływań w tych białkach (Mamonska i wsp. 2025)



Rysunek 34. Struktura krystalograficzna kompleksu białka RocC z RocR RNA (Kim i wsp. 2022, zmodyfikowano). Kolorem czerwonym zaznaczone jest białko RocC, a kolorem szarym RocR RNA. Na białku RocC na niebiesko zaznaczono motyw N-cap na piątej helisie α oddziałujący z trzonem spinki terminatorowej, a na zielono reszty aminokwasowe oddziałujące z końcem 3' RocR RNA.

6.2. Znaczenie reszt aminokwasowych domeny FinO białka ProQ dla wiązania cząsteczek RNA *in vivo* u *Escherichia coli*

Zgodnie z wynikami wcześniejszych badań białko ProQ oddziałuje z licznymi cząsteczkami sRNA oraz mRNA, mając znaczenie dla licznych procesów fizjologicznych komórki bakteryjnej, takich jak między innymi, utrzymywanie homeostazy, ruchliwość czy odpowiedź na stres (Olejniczak i Storz 2017; Quendera i wsp. 2020; Bergman i wsp. 2025).

Wykazano, że to domena FinO białka ProQ głównie odpowiada za wiązanie docelowych RNA. Wyniki uzyskane w naszym laboratorium pokazały, że kluczowe dla tego oddziaływania są konserwatywne reszty aminokwasowe R58, Y70 oraz R80, których mutacje prowadzą do silnego osłabienia lub całkowitej utraty wiązania RNA w warunkach *in vitro*. Natomiast, reszty K54, R62, K35 oraz R69 wykazują zróżnicowane znaczenie dla wiązania poszczególnych cząsteczek RNA oraz dla rozpoznawania elementów strukturalnych, w tym spinki terminatorowej (Stein i wsp. 2023).

Wyniki uzyskane w pierwszej części niniejszej pracy doktorskiej wykazały, że ProQ wiąże cząsteczki RNA w regionie terminatora transkrypcji, a sekwencja nukleotydowa u podstawy spinki jest kluczowa dla rozpoznawania RNA. Obserwacje te sugerują, że selektywność wiązania RNA może wynikać nie tylko z cech strukturalnych cząsteczek RNA, lecz również z udziału określonych reszt aminokwasowych domeny FinO białka ProQ. W związku z tym, w kolejnym etapie pracy postanowiłam skupić się na zbadaniu znaczenia wybranych reszt aminokwasowych domeny FinO białka ProQ dla wiązania cząsteczek RNA w warunkach *in vivo* u *Escherichia coli*.

W tym celu wykonałam eksperyment RIP-seq na pięciu szczepach z poszczególnymi mutacjami białka ProQ: K35A, K54A, R62A, R69A oraz R80K. Uzyskane wyniki pokazały, że mutacja R80K miała najsilniejsze negatywne znaczenie dla wiązania cząsteczek RNA (Rys. 23). Jest to zgodne z wcześniejszymi badaniami, które wykazały, że mutacja ta jest kluczowa dla oddziaływania RNA z domeną FinO białka ProQ (Pandey 2020, El Mouali 2021).

Dodatkowo zaobserwowałam, że cząsteczki RNA, które wykazywały znaczne pogorszenie wiązania z mutantem R80K, to w znacznej większości antysensowe RNA oraz cząsteczki należące do systemów toksyna-antytoksyna. Wśród nich znalazły się między innymi trzy cząsteczki z rodziny Sib RNA, które regulują mRNA toksyn *ibs*. Dodatkowo, znacznie obniżone wiązanie wykazywało sRNA RyfA, które koduje małe toksyczne białko TimB, oraz mRNA toksyny *tisB*, które jest regulowane przez IstR1. Co więcej, w tej grupie znalazły się

również dwie cząsteczki mRNA *ldr*, które kodują toksyczne białka oraz antysensowe RNA RyeA. Wyniki te pokazują, że tego typu RNA należą do istotnych cząsteczek RNA oddziałujących z białkiem ProQ, a domena FinO odgrywa kluczową rolę w ich rozpoznawaniu i wiązaniu w komórkach *Escherichia coli*.

Co ważne, część cząsteczek RNA, których wiązanie do białka ProQ było najsilniej osłabione w wyniku mutacji R80K, została wcześniej zidentyfikowana jako docelowe RNA dla tego białka w badaniach z użyciem odrębnych metod eksperymentalnych. W celu identyfikacji RNA związanych z ProQ u *E. coli* oraz *S. enterica* używano metod takich jak między innymi GRAD-seq oraz SEC-seq, które pozwalają na wykrywanie RNA współwystępujących z kompleksami RNA-białko o określonej masie cząsteczkowej (Smirnov i wsp. 2016; Chihara i wsp. 2022). Dodatkowo, wykorzystywano metodę CLIP-seq, umożliwiającą identyfikację RNA bezpośrednio wiążących się z białkiem (Holmqvist i wsp. 2018), oraz RIL-seq, która pozwala wykrywać RNA, zarówno oddziałujące bezpośrednio z białkiem, jak i tworzące pary z innymi cząsteczkami RNA (Melamed i wsp. 2020). Porównałam dane uzyskane w eksperymencie RIP-seq w niniejszej pracy doktorskiej z wcześniejszymi danymi literaturowymi. Łącznie, spośród piętnastu cząsteczek, których wiązanie z ProQ było najsilniej zaburzone przez mutację R80K w niniejszej pracy doktorskiej, dziewięć cząsteczek RNA (*SibA*, *SibE*, *SibB*, *RyfA*, *RyeA*, *tisB*, *bolA*, *AcrZ*, *atpC*) zostało wcześniej zidentyfikowanych jako cząsteczki wiążące białko ProQ przez co najmniej jedną, inną metodę badawczą (Smirnov i wsp. 2016; Holmqvist i wsp. 2018; Melamed i wsp. 2020; Chihara i wsp. 2022). Wyniki te potwierdzają istotne znaczenie zidentyfikowanych RNA jako docelowych RNA białka ProQ.

Analiza znaczenia mutacji K35A, K54A, R62A, R69A oraz silnie niekorzystnej R80K na wiązanie RNA z białkiem ProQ wykazała, że wprowadzone zmiany mają zróżnicowane znaczenie dla wiązania poszczególnych cząsteczek RNA (Rys. 23). Wynik ten jest zgodny z wcześniejszymi badaniami oddziaływań ProQ z sRNA *SibA*, *SibB* i *RybB* oraz fragmentami mRNA *cspE-3'*, *gapA-3'* i *malM-3'*, które wykazały że reszta R80 jest kluczowa dla wiązania badanych RNA. Pozostałe reszty aminokwasowe, takie jak K54 i R62, powodowały umiarkowane defekty wiązania, natomiast mutacje K35 i R69 wykazywały zróżnicowane znaczenie dla wiązania badanych RNA (Stein i wsp. 2023).

Wyniki otrzymane podczas realizacji niniejszej pracy ujawniły, że nie wszystkie RNA związane z ProQ były jednakowo dotknięte badanymi mutacjami, co może sugerować udział innych regionów domeny FinO lub białka ProQ w utrzymywaniu oddziaływań. Możliwe jest również, że w przypadku części RNA, różnice we wzbogaceniu mogą być konsekwencją efektów

pośrednich, jak na przykład konkurencji RNA o dostęp do badanego białka. Jednocześnie, dane wskazują, że dla wielu RNA domena FinO odgrywa kluczową rolę w wiązaniu, natomiast wpływ konkretnych mutacji jest zróżnicowany.

W kontynuacji tego nurtu badań warto byłoby przeprowadzić analizę RIP-seq na mutantach białka ProQ zawierających mutacje w innych regionach, na przykład w domenie C-końcowej lub linkerze. Dodatkowo, warto byłoby sprawdzić znaczenie mutacji wielokrotnych, co pozwoliłoby na wyjaśnienie współdziałania poszczególnych reszt aminokwasowych w wiązaniu RNA *in vivo*.

Analiza wyników eksperymentu RIP-seq wykazała, że szczególnie silną zależność od tej domeny wykazywały cząsteczki z rodziny Sib RNA. Wynik ten sugeruje, że domena FinO białka ProQ może pełnić szczególnie istotną funkcję w kontroli systemów toksyna-antytoksyna, które są kluczowe do adaptacji komórek do warunków stresowych oraz regulacji przeżywalności populacji bakteryjnych.

Zgodnie z danymi literaturowymi, cząsteczki Sib występują w dwóch formach w komórce: długiej oraz krótkiej, pozbawionej struktury terminatora transkrypcji (Fozo i wsp. 2008; Adams i wsp. 2021). Wyniki niniejszej pracy doktorskiej wykazały, że domena FinO rozpoznaje przede wszystkim dłuższe formy cząsteczek Sib, które posiadają strukturę terminatora transkrypcji (Rys. 25). Natomiast, pełnej długości białko ProQ wiąże zarówno długie, jak i krótkie formy SibA i SibC z podobnym powinowactwem, co sugeruje udział dodatkowych regionów białka w stabilizacji kompleksu RNA-białko.

W niniejszej pracy, porównanie cząsteczek SibA (Rys. 26) oraz SibC (Rys. 27) pozwoliło na identyfikację cech strukturalnych powodujących różnice w powinowactwie do domeny FinO. Pomimo wysokiego podobieństwa struktury drugorzędowej tych cząsteczek, mapowanie strukturalne wykazało istotne różnice w dynamice czteroramiennej spinki po stronie 5'. Co więcej, struktura cząsteczki SibC okazała się bardziej elastyczna oraz mniej stabilna w porównaniu do SibA.

Eksperymenty mapowania interakcji RNA-białko metodą footprintingu (ang. *RNA footprinting*) cząsteczek SibA i SibC potwierdziły, że wiązanie ProQ oraz wyizolowanej domeny FinO białka ProQ następuje w rejonie podstawy spinki terminatorowej oraz w sąsiadujących elementach spinki 5' (Rys. 28-29). Zaobserwowane zmiany dostępności tych regionów po związaniu białka ProQ wskazują na zmianę struktury RNA, co może mieć

znaczenie dla między innymi stabilności tych regionów, dostępności dla rybonukleaz lub zdolności do oddziaływania z docelowymi cząsteczkami mRNA.

W dalszych badaniach interesujące byłoby określenie, czy różnice w dynamice strukturalnej cząsteczek RNA, takich jak SibA i SibC sRNA, mają znaczenie dla kinetyki wiązania i dysocjacji kompleksów z białkiem ProQ. Badania te mogłyby dostarczyć informacji na temat selektywności wiązania cząsteczek RNA przez białko ProQ.

Podsumowując, niniejsza praca wykazała, że domena FinO białka ProQ pełni kluczową rolę w rozpoznawaniu antysensowych sRNA oraz cząsteczek należących do systemów toksyna-antytoksyna poprzez wiązanie struktur terminatorowych i sąsiadujących elementów drugorzędowych RNA. Dane te uzupełniają wcześniejsze obserwacje dotyczące znaczenia sekwencji u podstawy spinki terminatorowej i podkreślają, że rozpoznawanie RNA przez białko ProQ jest procesem wielopoziomowym, zależnym zarówno od struktury, jak i dynamiki wiązanej cząsteczki RNA.

6.3. Kompetycja oraz wzajemne oddziaływania pomiędzy białkami ProQ i Hfq jako mechanizm regulujący pulę RNA *in vivo* u *Escherichia coli*

W trzeciej części niniejszej pracy zbadano kompetycję i wzajemne oddziaływania białek ProQ i Hfq. Analizę przeprowadzono metodą RIL-seq w warunkach kontrolowanej nadekspresji białka ProQ lub Hfq oraz w obecności lub braku drugiego białka na chromosomie. Uzyskane wyniki wskazują, że ProQ i Hfq nie funkcjonują w komórce jako niezależne czynniki białkowe wiążące RNA, lecz tworzą dynamiczny i wzajemnie powiązany system regulacyjny. Jest to zgodne z wcześniejszymi danymi literaturowymi, które wskazują na częściowe nakładanie się zbiorów docelowych cząsteczek RNA dla obu badanych białek (Holmqvist i wsp. 2016; Smirnov i wsp. 2016; Melamed i wsp. 2020).

W pierwszym etapie potwierdziłam, że nadekspresja jednego białka nie zmienia poziomu drugiego (Rys. 30), co umożliwia interpretację zmian w eksperymencie RIL-seq przede wszystkim jako konkurencję lub modulację oddziaływań na poziomie wiązania cząsteczek RNA, a nie jako efekt zmiany ekspresji drugiego białka.

Analiza danych RIL-seq wykazała, że nadekspresja ProQ w szczepach Hfq-FLAG wpływała na liczbę odczytów wśród najczęściej wykrywanych par RNA-RNA (Rys. 32). Dla pewnej grupy par RNA-RNA zaobserwowałam istotne zmniejszenie liczby odczytów. Do takich przykładów należą między innymi para *tnaC/arcZ*, która wykazywała około dwudziestokrotny spadek, *fdoG/sucD* z około pięćdziesięciokrotną redukcją oraz para *lacI/cyaR* z

dziesięciokrotnym zmniejszeniem liczby odczytów. Wyniki te mogą wskazywać na bezpośrednią konkurencję pomiędzy białkami ProQ i Hfq. Wynik ten można tłumaczyć efektem „przechwycenia” RNA przez ProQ i zmniejszeniu jego dostępności dla białka Hfq. Obserwacja ta jest szczególnie przekonująca w przypadku par zawierających *arcZ*, które jest opisane jako cząsteczka sRNA specyficzna dla białka Hfq (Holmqvist i wsp. 2018; Melamed i wsp. 2020).

Równocześnie, w przypadku innych par RNA-RNA zaobserwowałam wzrost liczby odczytów przy nadekspresji białka ProQ (Rys. 32). Wynik ten sugeruje selektywną redystrybucję docelowych cząsteczek RNA. Może ona być efektem konkurencji o te same miejsca wiązania czy zmiany dostępności strukturalnej RNA poprzez, na przykład stabilizację lub zmianę jego konformacji przez białko ProQ. Rozważania na temat możliwej zróżnicowanej funkcji białka ProQ oraz jego interakcji z RNA specyficznymi dla Hfq były prowadzone w publikacji Melamed i wsp. (2020) i nasze wyniki je potwierdzają.

Analiza wyników RIL-seq w szczepach Hfq-FLAG pokazuje, że zwiększenie poziomu białka ProQ nie prowadzi do wyraźnej jednokierunkowej zmiany w wiązaniu par RNA-RNA przez białko Hfq, lecz selektywnie modyfikuje skład tych kompleksów. Otrzymane wyniki sugerują konkurencję i/lub wzajemne modulowanie specyficznych transkryptów przez ProQ i Hfq. Świadczy to o złożonej sieci regulacyjnej, w której obydwa białka konkurują i/lub współpracują w zależności od konkretnych cząsteczek RNA.

Z drugiej strony, analiza wyników uzyskanych w szczepach ProQ-3XFLAG ujawniła silną zależność ProQ od obecności białka Hfq (Rys. 33). Delecja genu *hfq* spowodowała drastyczny spadek wykrywanych par RNA-RNA, a przywrócenie ekspresji białka Hfq z plazmidu odtwarzało te oddziaływania, często ze zwiększeniem liczby odczytów. Wynik ten sugeruje, że białko Hfq pełni decydującą rolę w regulacji cząsteczek RNA, podczas gdy ProQ moduluje wybrane oddziaływania. Wynik ten jest zgodny z poprzednimi danymi literaturowymi opisującymi Hfq jako główne białko wiążące cząsteczki RNA (Vogel i Luisi 2011).

Czas indukcji nadekspresji białka okazał się kolejnym ważnym czynnikiem modulującym wynik konkurencji lub wzajemnego oddziaływania. Wczesna indukcja białka ProQ częściej prowadziła do ograniczenia dostępności par RNA dla białka Hfq, natomiast późniejsza skutkowała często zwiększeniem akumulacji kompleksów Hfq-RNA. Takie wyniki mogą wynikać z fazy wzrostu komórki, przewagi mechanizmów degradacyjnych lub istnienia mechanizmów kompensacyjnych usuwających nadmiar białek wiążących cząsteczki RNA. W

rezultacie może to oznaczać, że efekt kompetycji jest zależny od stanu fizjologicznego komórki i czasu ekspresji, co jest istotne w interpretacji danych.

W rezultacie, otrzymane wyniki mogą sugerować, że sekwencja nukleotydowa oraz struktura cząsteczek RNA determinują preferencje wiązania, a stężenia ProQ i Hfq decydują o ostatecznym rozkładzie docelowych par RNA-RNA. Co więcej, efekty pośrednie, takie jak stabilizacja RNA czy ułatwienie parowania, dodatkowo mogą modulować wykrywalność par RNA-RNA w kompleksach z białkiem ProQ i Hfq.

Istotnym ograniczeniem badania jest to, że nadekspresja z plazmidu nie odzwierciedla warunków naturalnych, a badanie RIL-seq wykrywa pary RNA-RNA koimmunoprecypitowane z danym białkiem, co nie zawsze pozwala na rozróżnienie bezpośredniego wiązania od efektów pośrednich. Jednakże, uzyskane dane są spójne z wcześniejszymi informacjami literaturowymi (Rys. 30), co potwierdza istotność otrzymanych wyników.

Przedstawione wyniki pokazują, że kompetycja oraz wzajemne oddziaływania pomiędzy białkiem ProQ i Hfq stanowią zależny mechanizm kształtowania puli RNA w komórkach *Escherichia coli*. W konsekwencji, taka sprzężona regulacja potranskrypcyjna umożliwia komórce efektywną adaptację do zmieniających się warunków środowiskowych.

Interesującym kierunkiem dalszych analiz byłoby określenie, czy obserwowana kompetycja i wzajemne oddziaływania pomiędzy białkami ProQ i Hfq dotyczy RNA o częściowo nakładających się cechach strukturalnych. Istotne byłoby zidentyfikowanie wspólnych motywów sekwencyjnych lub strukturalnych RNA, które mają znaczenie dla wiązania przez ProQ lub Hfq. Takie podejście umożliwiłoby zrozumienie selektywnej redystrybucji puli RNA pomiędzy różnymi białkami RNA w komórce bakteryjnej.

Podsumowując, w niniejszej pracy doktorskiej wykazałam, że selektywność oraz zakres oddziaływań białek z rodziny FinO, czyli ProQ i FinO, jak również białka Hfq z ich docelowymi cząsteczkami RNA, są określone wielopoziomowo. Nawet niewielkie różnice w sekwencji nukleotydowej u podstawy spinki terminatorowej w sRNA i mRNA mogą decydować o selektywności rozpoznawania RNA przez białka ProQ i FinO. Co więcej, mutacje w kluczowych resztach domeny FinO białka ProQ selektywnie osłabiają wiązanie określonych sRNA i mRNA *in vivo*, wskazując na istotną rolę pojedynczych aminokwasów w tym białku. Jednocześnie wykazałam, że ProQ i Hfq funkcjonują jako elementy wspólnej sieci regulacyjnej, a ich stężenia i czas ekspresji w komórce prowadzą do selektywnej redystrybucji par RNA-RNA. Wyniki te pokazują, że selektywność wiązania oraz kompetycja i wzajemne

oddziaływanie pomiędzy białkami wiążącymi RNA stanowią istotny mechanizm kształtowania puli docelowych cząsteczek RNA u *Escherichia coli*. W konsekwencji, umożliwia to komórkom bakteryjnym regulację procesów potranskrypcyjnych i skuteczną adaptację do zmieniających się warunków środowiskowych.

7. WNIOSKI

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów oraz analiz sformułowałam następujące wnioski końcowe:

- Rozpoznawanie cząsteczek RNA przez białka ProQ i FinO u *Escherichia coli* jest determinowane przez sekwencję i lokalną strukturę RNA, przy czym kluczową rolę odgrywa region u podstawy spinki terminatorowej.
- Niewielkie zmiany nukleotydowe w obrębie podstawy struktury terminatora transkrypcji w cząsteczce RNA są wystarczające aby zmienić preferencje wiązania RNA przez białko ProQ i FinO, co świadczy o istotnym znaczeniu tego regionu w potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów.
- Domena FinO białka ProQ oddziałuje z antysensowymi RNA oraz cząsteczkami należącymi do systemów toksyna-antytoksyna, a jej wiązanie prowadzi do lokalnych zmian struktury RNA.
- Mutacje w domenie FinO białka ProQ prowadzą do zróżnicowanych zmian w wiązaniu RNA *in vivo*, w zależności od konkretnej cząsteczki RNA. Sugeruje to zróżnicowany mechanizm rozpoznawania RNA oraz możliwy udział innych domen białka ProQ w tym procesie.
- Białko ProQ wiąże cząsteczki sRNA z rodziny Sib w sposób zależny od obecności struktury terminatora transkrypcji, a miejsce wiązania zlokalizowane jest w obrębie spinki terminatorowej i jej bezpośredniego sąsiedztwa.
- Oddziaływanie białka ProQ z cząsteczkami Sib RNA prowadzi do lokalnych zmian w ich strukturze drugorzędowej, co może mieć znaczenie dla ich stabilności oraz zdolności do wiązania ich docelowych mRNA.
- Białka ProQ i Hfq tworzą funkcjonalnie powiązany system regulacyjny, w którym kompetycja oraz wzajemne oddziaływania prowadzą do selektywnej redystrybucji cząsteczek RNA pomiędzy tymi białkami w komórce.
- Oddziaływania pomiędzy białkami wiążącymi RNA umożliwiają komórkom *Escherichia coli* precyzyjne kształtowanie puli wiązanych RNA i stanowią istotny mechanizm adaptacyjny do zmieniających się warunków środowiskowych.

Finansowanie

Badania przedstawione w niniejszej pracy doktorskiej zostały sfinansowane ze środków:

1. Narodowego Centrum Nauki – grant Preludium Bis: 2020/39/O/NZ1/02448 „Kompetycja pomiędzy białkami ProQ, Hfq i FinO wiążącymi RNA u *Escherichia coli*.”, kierownik projektu – prof. dr hab. Mikołaj Olejniczak
2. Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej (NAWA) – Stypendium „Zagraniczne staże doktorskie NAWA Preludium Bis 2” (BPN/PRE/2022/1/00026). Sfinansowano 3-miesięczny staż badawczy mgr Marii Mamońskiej w laboratorium prof. Giseli Storz w Narodowych Instytutach Zdrowia w USA

Wykaz artykułów mojego współautorstwa powstałych w czasie realizacji pracy doktorskiej

Mamońska Maria D., Basczok MM, Stein EM, Kurzawska J, Olejniczak M. (2025) Different RNA recognition by ProQ and FinO depends on the sequence surrounding intrinsic terminator hairpins. *RNA*, 31(5), 692-708, doi: 10.1261/rna.080206.124.

Wykaz wystąpień konferencyjnych związanych z realizacją pracy doktorskiej

Maria Mamońska, Mikołaj Olejniczak „The importance of the sequence context of intrinsic transcription terminator for the RNA binding by the *Escherichia coli* ProQ protein”, konferencja „Annual Meeting of the RNA Society 2021”, 25.05 - 05.06.2021

Maria Mamońska, Mikołaj Olejniczak „Different RNA recognition by the FinO domain proteins ProQ and FinO depends on RNA sequence surrounding transcription terminator hairpins”, konferencja „Microbes & RNA 2023” Saint Petersburg, USA, 05-08.09.2023

Maria Mamońska, Shuwen Shen, Aixia Zhang, Anna Bryant, Gisela Storz, Mikołaj Olejniczak „The *in vivo* binding of Sib RNAs to *Escherichia coli* ProQ is sensitive to mutations in the FinO domain”, konferencja „2nd Polish RNA Biology Meeting” Poznań, 24-27.06.2025

Maria Mamońska, Shuwen Shen, Aixia Zhang, Anna Bryant, Gisela Storz, Mikołaj Olejniczak „Varied RNA binding to the FinO domain of *Escherichia coli* ProQ”, konferencja „Microbes & RNA 2025” Strasburg, Francja, 01-04.09.2025

SPIS STOSOWANYCH SKRÓTÓW I SYMBOLI

% (v/v)	stężenie procentowe objętościowe
% (w/v)	stężenie procentowe objętościowo-masowe
°C	stopień Celsjusza
μl	mikrolitry
3'UTR	niekodujący region zlokalizowany na 3' końcu matrycowego RNA
5'UTR	niekodujący region zlokalizowany na 5' końcu matrycowego RNA
A	adenozyna
APS	nadsiarczan amonu
ATP	adenozyno-5'-trifosforan
BSA	białko albuminy bydlęcej
C	cytozyna
Cas9	endonukleaza DNA związana z systemem CRISPR/Cas9
cDNA	komplementarne DNA (ang. <i>complementary DNA</i>)
CLIP-seq	Sekwencjonowanie po krzyżowym wiązaniu i immunoprecypitacji (ang. <i>Cross-Linking Immunoprecipitation Sequencing</i>)
Co-IP	koimmunoprecypitacja
CRISPR	Skupione, Regularnie Rozdzielone, Krótkie Powtórzenia Palindromowe (ang. <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>)
crRNA	RNA CRISPR
CTD	domena C-końcowa białka
CTP	cytydino-5'-trifosforan
Da	Dalton
DEPC	pirokarbonian dietylu
DNA	kwasy deoksyrybonukleinowe
DTT	ditiotreitol
EDTA	kwasy etylenodiaminotetraoctowe
EMSA	technika różnicowej migracji kompleksów w żelu poliakrylamidowym
g	przyspieszenie grawitacyjne
G	guanozyna
GradSeq	metoda frakcjonowania kompleksów RNA-białko w gradiencie glicerolu

GTP	guanozyno-5'-trifosforan
K_d	stała równowagi dysocjacji
LB	pożywka Lurii-Bertaniego
M	mol
Mili-Q	ultra czysta woda podwójnie filtrowana
ml	mililitry
mRNA	matrycowy RNA
N	dowolny nukleotyd
ng	nanogram
nM	nanomol
NTD	domena N-końcowa białka
OD	gęstość optyczna
PAPI	polimeraza poli(A) I
PBS	bufor solny z fosforanem
PBST	bufor solny z fosforanem i dodatkiem Tween 20
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy
PEG 8000	glikol polietylenowy 8000
pH	potencjał wodorowy
PNK	kinaza polinukleotydomowa
R	puryna
RBS	miejsce wiązania rybosomu
RIL-seq	oddziaływanie RNA przez ligację i sekwencjonowanie
RIP-seq	immunoprecypitacja RNA w warunkach natywnych i RNA-seq
RNA	kwasy rybonukleinowe
RNAP	polimeraza RNA
RNA-seq	sekwencjonowanie RNA
rpm	obroty na minutę (ang. <i>revolutions per minute</i>)
rRNA	rybosomalne RNA
SDS	dodecylosiarczan sodu
SDS-PAGE	elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym z dodecylosiarczanem sodu

sgRNA	jednoniciowy RNA kierujący (ang. <i>single-guide RNA</i>)
sRNA	małe niekodujące cząsteczki RNA
ssDNA	jednoniciowe DNA
TBE	bufor Tris-kwas borowy-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina
Tris	tris(hydroksymetylko)aminometan
tys.	tysiąc
U	jednostka enzymatyczna (ang. <i>unit</i>)
U	urydyna
UTP	urydino-5'-trifosforan
UTR	region RNA niepodlegający translacji (ang. <i>untranslated region</i>)
UV	światło ultrafioletowe
V	wolt
W	wat
wt	typ dziki (ang. <i>wild-type</i>)
μCi	mikrocurie

BIBLIOGRAFIA

- Adams, P. P., Baniulyte, G., Esnault, C., Chegireddy, K., Singh, N., Monge, M., Dale, R. K., Storz, G., & Wade, J. T. (2021). Regulatory roles of Escherichia coli 5' UTR and ORF-internal RNAs detected by 3' end mapping. *Elife*, 10. <https://doi.org/10.7554/eLife.62438>
- Alberts, B., Johnson, A., & Lewis, J. R., M.; Roberts, K. and Walter, P. (2003). Molecular biology of the cell. 4th edn. *Annals of Botany*, 91(3). <https://doi.org/10.1093/aob/mcg023>
- Arthur, D. C., Ghetu, A. F., Gubbins, M. J., Edwards, R. A., Frost, L. S., & Glover, J. N. (2003). FinO is an RNA chaperone that facilitates sense-antisense RNA interactions. *EMBO J*, 22(23), 6346-6355. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg607>
- Arthur, D. C., Edwards, R. A., Tsutakawa, S., Tainer, J. A., Frost, L. S., & Glover, J. N. (2011). Mapping interactions between the RNA chaperone FinO and its RNA targets. *Nucleic Acids Res*, 39(10), 4450-4463. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr025>
- Attaiech, L., Boughammoura, A., Brochier-Armanet, C., Allatif, O., Peillard-Fiorente, F., Edwards, R. A., Omar, A. R., MacMillan, A. M., Glover, M., & Charpentier, X. (2016). Silencing of natural transformation by an RNA chaperone and a multitarget small RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(31), 8813-8818. <https://doi.org/10.1073/pnas.1601626113>
- Attaiech, L., Glover, J. N. M., & Charpentier, X. (2017). RNA Chaperones Step Out of Hfq's Shadow. *Trends Microbiol*, 25(4), 247-249. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.01.006>
- Basczok, M., & Olejniczak, M. (2025). RNA recognition by minimal ProQ from Neisseria meningitidis. *RNA*, 31(4). <https://doi.org/10.1261/rna.080207.124>
- Bauriedl, S., Gerovac, M., Heidrich, N., Bischler, T., Barquist, L., Vogel, J., & Schoen, C. (2020). The minimal meningococcal ProQ protein has an intrinsic capacity for structure-based global RNA recognition. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16650-6>
- Bergman, S., Birk, C., & Holmqvist, E. (2025). ProQ prevents mRNA degradation through inhibition of poly(A) polymerase. *Nucleic Acids Research*, 53(5). <https://doi.org/10.1093/nar/gkaf103>
- Brosse, A., & Guillier, M. (2018). Bacterial Small RNAs in Mixed Regulatory Networks. *Microbiology Spectrum*, 6(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.rwr-0014-2017>
- Cech, G. M., Szalewska-Pałasz, A., Kubiak, K., Malabirade, A., Grange, W., Arluison, V., & Węgrzyn, G. (2016). Frontiers | The Escherichia Coli Hfq Protein: An Unattended DNA-Transactions Regulator. *Frontiers in molecular biosciences*, 3. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2016.00036>
- Chaulk, S. G., Smith Friedday, M. N., Arthur, D. C., Culham, D. E., Edwards, R. A., Soo, P., Frost, L. S., Keates, R. A., Glover, J. N., & Wood, J. M. (2011). ProQ is an RNA chaperone that controls ProP levels in Escherichia coli. *Biochemistry*, 50(15), 3095-3106. <https://doi.org/10.1021/bi101683a>
- Chiang, M.-K., Lu, M.-C., Liu, L.-C., Lin, C.-T., & Lai, Y.-C. (2011). Impact of Hfq on Global Gene Expression and Virulence in Klebsiella pneumoniae. *PLoS One*, 6(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022248>
- Chihara, K., Gerovac, M., Hörb, J., & Vogel, J. (2022). Global profiling of the RNA and protein complexes of Escherichia coli by size exclusion chromatography followed by RNA sequencing and mass spectrometry (SEC-seq). *RNA (New York, N.Y.)*, 29(1). <https://doi.org/10.1261/rna.079439.122>
- Cui, M., Wang, T., Xu, J., Ke, Y., Du, X., Yuan, X., Wang, Z., Gong, C., Zhuang, Y., Lei, S., Su, X., Wang, X., Huang, L., Zhong, Z., Peng, G., Yuan, J., Chen, Z., & Wang, Y. (2013).

- Impact of Hfq on Global Gene Expression and Intracellular Survival in *Brucella melitensis*. *PLoS One*, 8(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071933>
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213). <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
- El Mouali, Y., Gerovac, M., Mineikaite, R., & Vogel, J. (2021). In vivo targets of Salmonella FinO include a FinP-like small RNA controlling copy number of a cohabitating plasmid. *Nucleic Acids Res*, 49(9), 5319-5335. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab281>
- Fernandez-Lopez, R., de Toro, M., Moncalian, G., Garcillan-Barcia, M. P., & de la Cruz, F. (2016). Frontiers | Comparative Genomics of the Conjugation Region of F-like Plasmids: Five Shades of F. *Frontiers in molecular biosciences*, 3. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2016.00071>
- Fozo, E. M., Kawano, M., Fontaine, F., Kaya, Y., Mendieta, K. S., Jones, K. L., Ocampo, A., Rudd, K. E., & Storz, G. (2008). Repression of small toxic protein synthesis by the Sib and OhsC small RNAs. *Molecular microbiology*, 70(5). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06394.x>
- Franze de Fernandez, M. T., Eoyang, L. A., J. T., Franze de Fernandez, M. T., & Eoyang, L. A., J. T. (1968). Factor Fraction required for the Synthesis of Bacteriophage Q β -RNA. *Nature* 1968 219:5154, 219(5154). <https://doi.org/10.1038/219588a0>
- Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O., Toussaint, A., Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O., & Toussaint, A. (2005). Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature Reviews Microbiology* 2005 3:9, 3(9). <https://doi.org/10.1038/nrmicro1235>
- Ghetu, A. F., Gubbins, M. J., Oikawa, K., Kay, C. M., Frost, L. S., & Glover, J. N. (1999). The FinO repressor of bacterial conjugation contains two RNA binding regions. *Biochemistry*, 38(42), 14036-14044. <https://doi.org/10.1021/bi9911482>
- Ghetu, A. F., Gubbins, M. J., Frost, L. S., & Glover, J. N. (2000). Crystal structure of the bacterial conjugation repressor finO. *Nat Struct Biol*, 7(7), 565-569. <https://doi.org/10.1038/76790>
- Ghetu, A. F., Arthur, D. C., Kerppola, T. K., & Glover, J. N. (2002). Probing FinO-FinP RNA interactions by site-directed protein-RNA crosslinking and gelFRET. *RNA*, 8(6), 816-823. <https://doi.org/10.1017/s1355838202026730>
- Glover, J. N. M., Chaulk, S. G., Edwards, R. A., Arthur, D., Lu, J., & Frost, L. S. (2015). The FinO family of bacterial RNA chaperones. *Plasmid*, 78. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2014.07.003>
- Gonzalez, G. M., Hardwick, S. W., Maslen, S. L., Skehel, J. M., Holmqvist, E., Vogel, J., Bateman, A., Luisi, B. F., & Broadhurst, R. W. (2017). Structure of the Escherichia coli ProQ RNA-binding protein. *RNA*, 23(5), 696-711. <https://doi.org/10.1261/rna.060343.116>
- Holmqvist, E., Wright, P. R., Li, L., Bischler, T., Barquist, L., Reinhardt, R., Backofen, R., & Vogel, J. (2016). Global RNA recognition patterns of post-transcriptional regulators Hfq and CsrA revealed by UV crosslinking in vivo. *EMBO J*, 35(9), 991-1011. <https://doi.org/10.15252/emj.201593360>
- Holmqvist, E., Li, L., Bischler, T., Barquist, L., & Vogel, J. (2018). Global Maps of ProQ Binding In Vivo Reveal Target Recognition via RNA Structure and Stability Control at mRNA 3' Ends. *Mol Cell*, 70(5), 971-982 e976. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.04.017>
- Holmqvist, E., & Vogel, J. (2018). RNA-binding proteins in bacteria. *Nat Rev Microbiol*, 16(10), 601-615. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0049-5>

- Hör, J., Matera, G., Vogel, J., Gottesman, S., & Storz, G. (2020). Trans-Acting Small RNAs and Their Effects on Gene Expression in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *EcoSal Plus*, 9(1). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0030-2019>
- Immer, C., Hacker, C., & Wohnert, J. (2020). Solution structure and RNA-binding of a minimal ProQ-homolog from *Legionella pneumophila* (Lpp1663). *RNA*, 26(12), 2031-2043. <https://doi.org/10.1261/rna.077354.120>
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, 169(12). <https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987>
- Jerome, & Frost. (1999). In vitro analysis of the interaction between the FinO protein and FinP antisense RNA of F-like conjugative plasmids. *The Journal of biological chemistry*, 274(15). <https://doi.org/10.1074/jbc.274.15.10356>
- Jerome, L. J., van Biesen, T., & Frost, L. S. (1999). Degradation of FinP antisense RNA from F-like plasmids: the RNA-binding protein, FinO, protects FinP from ribonuclease E. *J Mol Biol*, 285(4), 1457-1473. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2404>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Zidek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., . . . Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583-589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Kim, H. J., Black, M., Edwards, R. A., Peillard-Fiorente, F., Panigrahi, R., Klingler, D., Eidelpes, R., Zeindl, R., Peng, S., Su, J., Omar, A. R., MacMillan, A. M., Kreutz, C., Tollinger, M., Charpentier, X., Attaiech, L., & Glover, J. N. M. (2022). Structural basis for recognition of transcriptional terminator structures by ProQ/FinO domain RNA chaperones. *Nat Commun*, 13(1), 7076. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34875-5>
- Kim, H. M., Shin, J.-H., Cho, Y.-B., & Roe, J.-H. (2014). Inverse regulation of Fe- and Ni-containing SOD genes by a Fur family regulator Nur through small RNA processed from 3'UTR of the *sodF* mRNA. *Nucleic Acids Research*, 42(3). <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1071>
- Kim, S., Hwang, H., Kim, K.-P., Yoon, H., Kang, D.-H., & Ryu, S. (2015). hfq Plays Important Roles in Virulence and Stress Adaptation in *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544. *Infection and Immunity*, 83(5). <https://doi.org/10.1128/iai.03161-14>
- Koraimann, G. (2018). Spread and Persistence of Virulence and Antibiotic Resistance Genes: A Ride on the F Plasmid Conjugation Module. *EcoSal Plus*, 8(1). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0003-2018>
- Kormanec, J. (2022). Bacterial Regulatory Proteins. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(12). <https://doi.org/10.3390/ijms23126854>
- Kortmann, J., Narberhaus, F., Kortmann, J., & Narberhaus, F. (2012). Bacterial RNA thermometers: molecular zippers and switches. *Nature Reviews Microbiology* 2012 10:4, 10(4). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2730>
- Lay, N. D., Schu, D. J., & Gottesman, S. (2013). Bacterial Small RNA-based Negative Regulation: Hfq and Its Accomplices. *Journal of Biological Chemistry*, 288(12). <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.441386>
- Mahendran, G., Jayasinghe, O. T., Thavakumaran, D., Arachchilage, G. M., & Silva, G. N. (2022). Key players in regulatory RNA realm of bacteria. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 30. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2022.101276>
- Mamońska, M. D., Basczok, M. M., Stein, E. M., Kurzawska, J., & Olejniczak, M. (2025). Different RNA recognition by ProQ and FinO depends on the sequence surrounding intrinsic terminator hairpins. *RNA*, 31(5). <https://doi.org/10.1261/rna.080206.124>

- Massé, E., Gottesman, S., Massé, E., & Gottesman, S. (2002). A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(7). <https://doi.org/10.1073/pnas.032066599>
- Melamed, S., Peer, A., Faigenbaum-Romm, R., Gatt, Y. E., Reiss, N., Bar, A., Altuvia, Y., Argaman, L., & Margalit, H. (2016). Global Mapping of Small RNA-Target Interactions in Bacteria. *Mol Cell*, 63(5), 884-897. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.07.026>
- Melamed, S., Adams, P. P., Zhang, A., Zhang, H., & Storz, G. (2020). RNA-RNA Interactomes of ProQ and Hfq Reveal Overlapping and Competing Roles. *Mol Cell*, 77(2), 411-425 e417. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.10.022>
- Milner, J. L., & Wood, J. M. (1989). Insertion proQ220::Tn5 alters regulation of proline porter II, a transporter of proline and glycine betaine in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 171(2), 947-951. <https://doi.org/10.1128/jb.171.2.947-951.1989>
- Mu, Y., Zhang, C., Li, T., Jin, F.-J., Sung, Y.-J., Oh, H.-M., Lee, H.-G., Jin, L., Mu, Y., Zhang, C., Li, T., Jin, F.-J., Sung, Y.-J., Oh, H.-M., Lee, H.-G., & Jin, L. (2022). Development and Applications of CRISPR/Cas9-Based Genome Editing in *Lactobacillus*. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol. 23, Page 12852, 23(21). <https://doi.org/10.3390/ijms232112852>
- Nitzan, M., Rehani, R., & Margalit, H. (2017). Integration of Bacterial Small RNAs in Regulatory Networks. *Annu Rev Biophys*, 46, 131-148. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-070816-034058>
- Olejniczak, M., & Storz, G. (2017). ProQ/FinO-domain proteins: another ubiquitous family of RNA matchmakers? *Mol Microbiol*, 104(6), 905-915. <https://doi.org/10.1111/mmi.13679>
- Pandey, S., Gravel, C. M., Stockert, O. M., Wang, C. D., Hegner, C. L., LeBlanc, H., & Berry, K. E. (2020). Genetic identification of the functional surface for RNA binding by *Escherichia coli* ProQ. *Nucleic Acids Res*, 48(8), 4507-4520. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa144>
- Papenfert, K., & Melamed, S. (2023). Small RNAs, Large Networks: Posttranscriptional Regulons in Gram-Negative Bacteria. *Annu Rev Microbiol*. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-041320-025836>
- Papenfert, K., & Storz, G. (2024). Insights into bacterial metabolism from small RNAs. *Cell Chemical Biology*, 31(9). <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2024.07.002>
- Phadtare, S., Inouye, M., & Severinov, K. (2002). The Nucleic Acid Melting Activity of *Escherichia coli* CspE Is Critical for Transcription Antitermination and Cold Acclimation of Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 277(9). <https://doi.org/10.1074/jbc.M111496200>
- Quendera, A. P., Seixas, A. F., Dos Santos, R. F., Santos, I., Silva, J. P. N., Arraiano, C. M., & Andrade, J. M. (2020). RNA-Binding Proteins Driving the Regulatory Activity of Small Non-coding RNAs in Bacteria. *Front Mol Biosci*, 7, 78. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00078>
- Robinson, K. E., Orans, J., Kovach, A. R., Link, T. M., & Brennan, R. G. (2014). Mapping Hfq-RNA interaction surfaces using tryptophan fluorescence quenching. *Nucleic Acids Research*, 42(4). <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1171>
- Santiago-Frangos, A., & Woodson, S. A. (2018). Hfq chaperone brings speed dating to bacterial sRNA. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 9(4), e1475. <https://doi.org/10.1002/wrna.1475>
- Schu, D. J., Zhang, A., Gottesman, S., & Storz, G. (2015). Alternative Hfq-*sRNA* interaction modes dictate alternative *mRNA* recognition. *The EMBO Journal*, 34(20), 2557-2573. <https://doi.org/10.15252/emj.201591569>
- Schumacher, M. A., Pearson, R. F., Moller, T., Valentin-Hansen, P., & Brennan, R. G. (2002). Structures of the pleiotropic translational regulator Hfq and an Hfq-RNA complex: a

- bacterial Sm-like protein. *EMBO J*, 21(13), 3546-3556. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf322>
- Smirnov, A., Förstner, K. U., Holmqvist, E., Otto, A., Günster, R., Becher, D., Reinhardt, R., & Vogel, J. (2016). Grad-seq guides the discovery of ProQ as a major small RNA-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(41), 11591-11596. <https://doi.org/10.1073/pnas.1609981113>
- Sobrero, P., & Valverde, C. (2012). The bacterial protein Hfq: much more than a mere RNA-binding factor. *Critical Reviews in Microbiology*, 38(4). <https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.664540>
- Sorek, R., Kunin, V., Hugenholtz, P., Sorek, R., Kunin, V., & Hugenholtz, P. (2008). CRISPR — a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nature Reviews Microbiology* 2008 6:3, 6(3). <https://doi.org/10.1038/nrmicro1793>
- Stein, E. M., Kwiatkowska, J., Basczok, M. M., Gravel, C. M., Berry, K. E., & Olejniczak, M. (2020). Determinants of RNA recognition by the FinO domain of the Escherichia coli ProQ protein. *Nucleic Acids Res*, 48(13), 7502-7519. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa497>
- Stein, E. M., Wang, S., Dailey, K., Gravel, C. M., Wang, S., Olejniczak, M., & Berry, K. E. (2023). Biochemical and genetic dissection of the RNA-binding surface of the FinO domain of Escherichia coli ProQ. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2023.04.25.538249>
- Storz, G., Opdyke, J. A., & Zhang, A. (2004). Controlling mRNA stability and translation with small, noncoding RNAs. *Current Opinion in Microbiology*, 7(2). <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.02.015>
- Sun, X., Zhulin, I., & Wartell, R. M. (2002). Predicted structure and phyletic distribution of the RNA-binding protein Hfq. *Nucleic Acids Research*, 30(17). <https://doi.org/10.1093/nar/gkf508>
- Timmis, K. N., Andrés, I., Achtman, M., Timmis, K. N., Andrés, I., & Achtman, M. (1978). Fertility repression of F-like conjugative plasmids: Physical mapping of the R6-5 finO and finP cistrons and identification of the finO protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(12). <https://doi.org/10.1073/pnas.75.12.5836>
- Tollerson, R., & Ibba, M. (2020). Translational regulation of environmental adaptation in bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 295(30). <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.012742>
- Updegrave, T. B., Zhang, A., & Storz, G. (2016). Hfq: the flexible RNA matchmaker. *Curr Opin Microbiol*, 30, 133-138. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.02.003>
- van Biesen, T., & Frost, L. S. (1994). The FinO protein of IncF plasmids binds FinP antisense RNA and its target, traJ mRNA, and promotes duplex formation. *Mol Microbiol*, 14(3), 427-436. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb02177.x>
- Vogel, J., & Luisi, B. F. (2011). Hfq and its constellation of RNA. *Nat Rev Microbiol*, 9(8), 578-589. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2615>
- Wagner, E. G. H., & Romby, P. (2015). Small RNAs in Bacteria and Archaea: Who They Are, What They Do, and How They Do It. *Advances in Genetics*, 90. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2015.05.001>
- Waters, L. S., & Storz, G. (2009). Regulatory RNAs in bacteria. *Cell*, 136(4), 615-628. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.043>
- Watkins, D., & Arya, D. (2023). Models of Hfq interactions with small non-coding RNA in Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1282258>

- Wen, Y., Feng, J., & Sachs, G. (2012). *Helicobacter pylori* 5'ureB-sRNA, a cis-Encoded Antisense Small RNA, Negatively Regulates ureAB Expression by Transcription Termination. *Journal of Bacteriology*, 195(3). <https://doi.org/10.1128/jb.01022-12>
- Westermann, A. J., Venturini, E., Sellin, M. E., Forstner, K. U., Hardt, W. D., & Vogel, J. (2019). The Major RNA-Binding Protein ProQ Impacts Virulence Gene Expression in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *mBio*, 10(1). <https://doi.org/10.1128/mBio.02504-18>