

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Wydział Biologii



Maciej Basczok

**Elementy sekwencji i struktury RNA rozpoznawane przez
białka z domeną FinO**

Rozprawa doktorska wykonana w Pracowni Biochemii RNA

Pod kierunkiem prof. dra hab. Mikołaja Olejniczaka

Poznań 2023

Chciałbym złożyć szczerze i serdeczne podziękowania:

*Mojemu promotorowi **prof. drowi hab. Mikołajowi Olejniczakowi** za umożliwienie mi realizacji pracy doktorskiej w Pracowni Biochemii RNA, za opiekę merytoryczną, cierpliwość i bezcenne sugestie podczas pisania rozprawy oraz wszelkie wsparcie.*

***Prof. Mikaelowi Skurnikowi** z Uniwersytetu w Helsinkach, bez którego pomocy i wiary w moje możliwości z pewnością nie podjąłbym studiów doktoranckich.*

*Niezastąpionym byłem i obecnym **doktorantom Pracowni Biochemii RNA** za pomoc, koleżeństwo i miłą atmosferę w laboratorium.*

*Ponadto **Rodzicom i Siostram**, za i wiarę we mnie i nieustające wsparcie w trudnych momentach.*

*I oczywiście mojej **Żonie Violetcie** za nieopisane zrozumienie, wielką cierpliwość i cenne uwagi podczas przygotowywania rozprawy doktorskiej.*

Finansowanie

Badania realizowane w ramach rozprawy doktorskiej były finansowane ze środków:

1. Narodowego Centrum Nauki – grant **OPUS: 2018/31/B/NZ1/02612** „Mechanizmy rozpoznawania RNA przez białko ProQ oraz rola tego białka w oddziaływaniach pomiędzy niekodującymi RNA a regulowanymi mRNA u bakterii *Escherichia coli*”, kierownik projektu – prof. dr hab. Mikołaj Olejniczak.
2. Narodowego Centrum Nauki – grant **Preludium 2021/41/N/NZ1/04133** „Podstawy molekularne różnic w rozpoznawaniu RNA przez białka z domeną FinO”, którego jestem kierownikiem.
3. Projekt **POWR.03.02.00-00-I022/16** „Interdyscyplinarne studia doktoranckie Wydziału Biologii UAM drogą do doskonałości naukowej”

Wykaz artykułów mojego współautorstwa powstałych w czasie realizacji pracy doktorskiej:

1. Olejniczak M., Jiang X., **Basczok, M.**, Storz G. (2022) KH domain proteins: Another family of bacterial RNA matchmakers? *Molecular Microbiology*, 117, 10–19. <https://doi.org/10.1111/mmi.14842>
2. Stein E., Kwiatkowska J., **Basczok M.**, Gravel C., Berry K., Olejniczak M. (2020). Determinants of RNA recognition by the FinO domain of the *Escherichia coli* ProQ protein. *Nucleic Acids Research*, 48(13), 7502–7519, doi.org/10.1093/nar/gkaa497
3. Zięba M., Chaber P., Duale K., Martinka Maksymiak M., **Basczok M.**, Kowalczyk M., Adamus G. (2020) Polymeric Carriers for Delivery Systems in the Treatment of Chronic Periodontal Disease. *Polymers.*; 12(7):1574. <https://doi.org/10.3390/polym12071574>

Spis treści

STRESZCZENIE	7
ABSTRACT	9
WYKAZ SKRÓTÓW I SYMBOLI	11
1. WSTĘP	13
1.1 WPROWADZENIE	13
1.2 REGULACJA EKSPRESJI GENÓW BAKTERII Z UDZIAŁEM MAŁYCH RNA (sRNA)	14
1.3 RODZAJE BAKTERYJNYCH CZĄSTECZEK sRNA	15
1.4 BAKTERYJNE BIAŁKA OPIEKUŃCZE WIĄŻĄCE RNA	16
1.4.1. Hfq	17
1.4.2 Białka z domeną FinO	19
1.4.2.1 <i>Historia badań i charakterystyka rodziny białek z domeną FinO</i>	19
1.4.2.2 <i>Procesy fizjologiczne regulowane z udziałem białek z domeną FinO</i>	22
1.4.2.3 <i>Białko ProQ z E. coli</i>	22
1.4.2.4 <i>Białko ProQ z N. meningitidis (NMB1681)</i>	25
1.4.3 Porównanie pul ligandów białek ProQ i Hfq	26
1.4.4 Inne bakteryjne białka opiekuńcze wiążące RNA	27
2. CELE PRACY	28
3. MATERIAŁY	29
3.1 DANE DO ANALIZ <i>IN SILCO</i>	29
3.2 SEKWENCJE GENOMOWE	29
3.3 SZCZEPY BAKTERYJNE	29
3.4 PLAZMIDY	29
3.5 OLIGONUKLEOTYDY	30
3.5.1 Oligodeoksyrybonukleotydy wykorzystane w procesie klonowania	30
3.5.2 Oligodeoksyrybonukleotydy wykorzystane w reakcji wydłużania starterów (z. ang. <i>primer extension</i>, PE)	30
3.5.3 Oligorybonukleotydy wykorzystane w eksperymentach wiązania RNA przez białko <i>N. meningitidis</i> ProQ	32
3.6 ENZYMY	32
3.7 ODCZYNNIKI	33
3.8 BUFORY	34
3.8.1 Bufory przygotowywane	34
3.8.2 Bufory komercyjne	34
3.8.3 Roztwory	35

4. METODY	35
4.1 ANALIZY IN SILICO	35
4.1.1 Analiza składu nukleotydowego sekwencji przylegającej po stronie 5' do struktury Rho-niezależnego terminatora transkrypcji dla danych z eksperymentów CLIP-seq i RIL-seq	35
4.1.2 Analiza składu nukleotydowego sekwencji przylegającej do struktury Rho-niezależnego terminatora transkrypcji dla danych z eksperymentu RIP-seq	36
4.1.3 Analiza składu nukleotydowego sekwencji przylegającej do struktury Rho-niezależnego terminatora transkrypcji z losowej próby genów <i>N. meningitidis</i>	37
4.2 PRZYGOTOWANIE PREPARATU BIAŁKA ProQ Z NEISSERIA MENINGITIDIS	37
4.2.1 Projektowanie i przygotowanie konstruktów ekspresyjnego	37
4.2.1.1 <i>Amplifikacja sekwencji kodującej w łańcuchowej reakcji polimerazy</i>	38
4.2.1.2 <i>Oczyszczanie produktu PCR po zakończeniu reakcji</i>	38
4.2.1.3 <i>Izolacja plazmidu pET-15b</i>	39
4.2.1.4 <i>Trawienie restrykcyjne</i>	39
4.2.1.5 <i>Defosforylacja plazmidu i sprawdzenie wielkości produktów</i>	39
4.2.1.6 <i>Ligacja</i>	40
4.2.2 Techniki mikrobiologiczne	40
4.2.2.1 <i>Transformacja bakteryjnych komórek chemicznie kompetentnych</i>	40
4.2.2.2 <i>Kolonijny PCR (z ang. colony PCR) – selekcja kolonii, które nabyły konstrukt z wstawionym insertem</i>	40
4.2.2.3 <i>Nadekspresja białka w hodowli bakteryjnej</i>	41
4.2.3 Procedura oczyszczania białka ProQ z <i>N. meningitidis</i>	42
4.2.3.1 <i>Liza osadu bakteryjnego</i>	42
4.2.3.2 <i>Chromatografia metalopowinowactwa – I etap na kolumnie HisTrap</i>	42
4.2.3.3 <i>Chromatografia powinowactwa – etap na kolumnie heparynowej</i>	43
4.2.3.4 <i>Usunięcie znacznika histydynowego - trawienie protezą TEV</i>	43
4.2.3.5 <i>Chromatografia metalopowinowactwa – II etap na kolumnie HisTrap</i>	44
4.2.3.6 <i>Sączenie molekularne</i>	44
4.2.4 Przygotowanie cząsteczek RNA	45
4.2.4.1 <i>Oczyszczanie oligonukleotydów</i>	45
4.2.4.2 <i>Reakcja primer extension (wydłużanie starterów)</i>	45
4.2.4.3 <i>Transkrypcja in vitro</i>	46
4.2.4.4 <i>Znakowanie RNA radioizotopem fosforu</i>	46
4.2.5 Wyznaczanie wartości stałej równowagi dysocjacji w eksperymencie wiązania RNA z białkiem <i>N. meningitidis</i> ProQ	47

5. WYNIKI	49
5.1 ANALIZA <i>IN SILICO</i> MOTYWÓW ZLOKALIZOWANYCH W sRNA ORAZ REGIONACH 3'UTR RNA ROZPOZNAWANYCH PRZEZ BIAŁKA ProQ I Hfq..	49
5.1.1 Region po stronie 5' spinki terminatorowej ligandów białek ProQ i Hfq.....	49
5.1.2 Analiza ligandów białka ProQ z <i>E. coli</i>	51
5.1.3 Analiza ligandów białka Hfq z <i>E. coli</i>	52
5.1.4 Analiza ligandów białek ProQ i Hfq z <i>S. enterica</i>	53
5.1.5 Analiza ligandów białka ProQ z <i>N. meningitidis</i>	54
5.1.6 Analiza ligandów białka Hfq z <i>N. meningitidis</i>	55
5.1.7 Porównanie sekwencji po stronie 5' Rho-niezależnych terminatorów transkrypcji w ligandach białek ProQ i Hfq u <i>E. coli</i> i <i>S. enterica</i>	56
5.1.8 Porównanie sekwencji po stronie 5' Rho-niezależnych terminatorów transkrypcji w ligandach białek ProQ i Hfq u <i>N. meningitidis</i>	58
5.1.9 Porównanie sekwencji aminokwasowej białek Hfq i ProQ z <i>E. coli</i> i <i>N. meningitidis</i>	60
5.1.10 Porównanie sekwencji aminokwasowej białek ProQ z <i>E. coli</i> i <i>N. meningitidis</i>	61
5.1.11 Podsumowanie pierwszej części badań – analiz <i>in silico</i>	62
5.2 OKREŚLENIE CECH CZĄSTECZEK RNA ROZPOZNAWANYCH PRZEZ BIAŁKO <i>N. MENINGITIDIS</i> ProQ	63
5.2.1 Oczyszczenie białka ProQ z <i>N. meningitidis</i>	63
5.2.2 Cząsteczki RNA wybrane do analizy oddziaływań z białkiem <i>N. meningitidis</i> ProQ w warunkach <i>in vitro</i>	64
5.2.3 Ustalenie warunków reakcji wiązania RNA przez <i>N. meningitidis</i> ProQ <i>in vitro</i>	66
5.2.4 Wpływ stężenia chlorku sodu w buforze do wiązania na powinowactwo białka <i>N. meningitidis</i> ProQ do RNA	68
5.2.5 Wyznaczenie siły oddziaływania pomiędzy wybranymi RNA a białkiem ProQ z <i>N. meningitidis</i>	69
5.2.6 Wyznaczenie siły oddziaływania pomiędzy kontrolnymi cząsteczkami RNA a białkiem ProQ z <i>N. meningitidis</i>	71
5.2.7 Znaczenie obecności Rho-niezależnego terminatora transkrypcji dla wiązania RNA z białkiem <i>N. meningitidis</i> ProQ.....	74
5.2.8. Znaczenie wydłużenia sekwencji 3'-terminalnej RNA dla oddziaływania z białkiem <i>N. meningitidis</i> ProQ.....	77
5.2.9 Znaczenie długości sekwencji 3'-terminalnej ogona oligo(U) dla oddziaływania RNA z białkiem <i>N. meningitidis</i> ProQ	80
5.2.10 Znaczenie obecności sekwencji po stronie 5' Rho-niezależnego terminatora transkrypcji dla wiązania RNA z białkiem <i>N. meningitidis</i> ProQ	86
5.2.11 Znaczenie długości regionu dwuniciowego Rho-niezależnego terminatora transkrypcji dla wiązania cząsteczki RNA z białkiem <i>N. meningitidis</i> ProQ	91

5.2.12 Znaczenie sparowanych z sekwencją ogona oligo(U) reszt adenozyiny po stronie 5' Rho-niezależnego terminatora transkrypcji dla powinowactwa RNA do ProQ z <i>N. meningitidis</i>	94
5.2.13 Znaczenie typu nukleotydów bezpośrednio sąsiadujących z pierwszą parą GC/CG struktury spinki terminatorowej dla wiązania RNA przez białko ProQ z <i>N. meningitidis</i>	98
5.2.14 Podsumowanie drugiej części badań – eksperymentów <i>in vitro</i>	100
6. DYSKUSJA	101
7. WNIOSKI	111
WYKAZ RYSUNKÓW	112
WYKAZ TABEL	114
BIBLIOGRAFIA	115

STRESZCZENIE

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

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

element konkurencji o ligandy między ProQ i Hfq. Z kolei u *N. meningitidis* pule RNA wiązane przez białka ProQ i Hfq wykazują jednakowe wzbogacenie w adenozyne w sekwencji po stronie 5' terminatora. Co ciekawe, wzbogacenie to jest cechą całego transkryptomu *N. meningitidis*. Zatem pytanie o przyczynę, dzięki której pule RNA wiązane przez białka ProQ i Hfq z *N. meningitidis* są zasadniczo odrębne, pozostaje otwarte.

W drugiej części pracy postanowiłem zbadać jak dotąd nieznaną szczegóły interakcji między białkiem ProQ z *N. meningitidis* a RNA. W eksperymentach *in vitro* wyznaczałem stałą równowagi dysocjacji podczas wiązania białka ProQ z *N. meningitidis* z szeregiem cząsteczek RNA, zarówno znanych jako jego ligandy oraz takich, które nie były notowane jako oddziałujące z ProQ. Wykazałem, że w warunkach *in vitro* białko ProQ z *N. meningitidis* specyficznie rozpoznaje i wiąże w RNA strukturę Rho-niezależnego terminatora transkrypcji, którego dostępność na końcu 3' ma krytyczne znaczenie dla siły wiązania. Pozbawienie cząsteczki RNA struktury terminatora prowadziło do zaniku oddziaływania z białkiem. Ponadto wydłużenie 3'-terminalnej sekwencji ogona oligo(U) skutkowało spadkiem powinowactwa do białka *N. meningitidis* ProQ. W samym oddziaływaniu uczestniczy również sekwencja po stronie 5' spinki terminatorowej, chociaż zakres jej wpływu na wiązanie może się różnić pomiędzy cząsteczkami RNA. W przypadku sRNA AniS skrócenie jej do 6 nukleotydów całkowicie uchyliło wiązanie, podczas gdy sekwencja o tej samej długości pozwalała na wciąż silne oddziaływanie *rpmG*-3'UTR z ProQ. Eksperymenty ze skróconym o górne pary nukleotydów regionem dwuniciowym spinki terminatorowej nie wykazały spadku siły wiązania RNA z białkiem *N. meningitidis* ProQ, co świadczy o tym, że interakcja zachodzi za pośrednictwem jej dolnej części. Ponadto udowodniłem kluczową rolę 3'-terminalnej sekwencji ogona oligo(U) w tym oddziaływaniu, ponieważ jego skrócenie poniżej sześciu reszt urydyny skutkowało osłabieniem powinowactwa RNA do białka ProQ.

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

ABSTRACT

Regulation of gene expression by small non-coding RNA (sRNA) molecules in bacteria is often dependent on RNA chaperones. This means that to properly and effectively interact with mRNAs, sRNAs cooperate with appropriate proteins. The best studied bacterial RNA-binding chaperone is Hfq. It interacts with hundreds of transcripts, whether sRNA, mRNA or tRNA, which makes it a central element of many molecular networks and regulatory or adaptive mechanisms. Recent discoveries have allowed for the recognition of a new, much more diverse family of bacterial RNA chaperones - proteins with the FinO domain. FinO domain proteins differ not only in their structure, but also in numbers of bound RNAs, some of them bind many, others only a few. Despite the significant progress that has been made in understanding the biology of FinO domain proteins, the details of their interaction with RNA remain largely unknown.

From transcriptome profiling techniques (CLIP-seq, RIL-seq and RIP-seq) data previously published by other teams, it is known that the only structural motif in RNA recognized by the ProQ proteins, belonging to the FinO domain proteins, is the Rho-independent transcription terminator. Interestingly, this motif is also the only known one in the RNA structure bound by the Hfq protein. However, the pools of RNAs bound by ProQ and Hfq remain mostly separate. This raises the question of a motif in the terminator structure that could determine which protein, ProQ or Hfq, a given RNA will interact with. In the ligand pools of the Hfq and ProQ proteins bound through the Rho-independent transcription terminator region, no motifs in its sequence or structure that are distinct have been found to date. Therefore, in the first part of the work, I decided to investigate the nucleotide composition of the 10-nucleotide sequence on the 5' side of the RNA terminator hairpins bound by ProQ and Hfq in three bacterial species: *E. coli*, *S. enterica* and *N. meningitidis*. Data on RNAs bound by Hfq and ProQ came from experiments performed by the teams of Prof. Gisela Storz and Prof. Jörg Vogel. I analyzed data from: RIL-seq and CLIP-seq for ProQ from *E. coli*, RIL-seq for Hfq from *E. coli*, CLIP-seq for ProQ and Hfq from *S. enterica*, CLIP-seq for ProQ from *N. meningitidis* and with RIP-seq for Hfq from *N. meningitidis*. I showed that RNAs containing the Rho-independent transcription terminator bound by the ProQ and Hfq proteins in *E. coli* and *S. enterica* show a statistically significant difference in the nucleotide composition of the sequence on the 5' side of the terminator hairpin. ProQ protein ligands were enriched in adenosine while those of Hfq ligands in uridine. The presence of adenosine in this region turned out to be a motive that weakens binding by Hfq, thus it is an element of competition for ligands between ProQ and Hfq. On the other hand, in *N.*

meningitidis, the RNA pools bound by the ProQ and Hfq proteins show the same enrichment in adenosine in the sequence on the 5' side of the terminator. Interestingly, this enrichment is a feature of the entire *N. meningitidis* transcriptome. The resulting question of why the ligand pools of *N. meningitidis* ProQ and Hfq proteins are mostly distinct remains open.

In the second part of the work, I decided to investigate the yet unknown details of the interaction between the ProQ protein from *N. meningitidis* and RNA. In *in vitro* experiments, I determined the equilibrium dissociation constant during the binding of the ProQ protein from *N. meningitidis* to a set of RNA molecules, either known as its ligands and those that were not known to interact with ProQ. I showed that *in vitro* the ProQ protein from *N. meningitidis* specifically recognizes and binds the structure of the Rho-independent transcription terminator in RNA, and that its availability at the 3' end is critical for the binding strength. Depriving the RNA molecule of the terminator structure led to the loss of interaction with the protein. In addition, the extension of the 3'-terminal sequence beyond the oligo(U) tail resulted in a decrease in affinity for the *N. meningitidis* ProQ protein. The sequence on the 5' side of the terminator hairpin also participates in the interaction, although the extent of its effect on binding may vary between ligands. In the case of AniS sRNA, shortening it to 6 nucleotides completely abrogated the binding, while the sequence of the same length allowed for still strong interaction of *rpmG*-3'UTR with ProQ. Experiments with the double-stranded region of the terminator hairpin truncated by the upper pairs of nucleotides did not show a decrease in the binding strength of the RNA to the *N. meningitidis* ProQ protein, which indicates that the interaction is mediated by its lower part. In addition, I proved the key role of the 3'-terminal sequence of the oligo(U) tail in this interaction, because its shortening below six uridine residues resulted in a decrease in the binding strength.

Overall, in the first part of the work, I showed that in *E. coli* and *S. enterica* RNAs bound by the ProQ protein are enriched in adenosine in the sequence on the 5' side of the terminator hairpin, while RNAs interacting with Hfq are enriched in uridine in the same region, which may be an element of the mechanism of competition for ligands bound in the Rho-independent transcription terminator region by both proteins. However, in *N. meningitidis* no such difference was observed. In the second part of the work, I proved that the lower part of the terminator hairpin together with the adjacent sequence on the 5' side and the 3'-terminal sequence of the oligo(U) tail participate in the interaction with the ProQ protein from *N. meningitidis*.

WYKAZ SKRÓTÓW I SYMBOLI

% (v/v)	stężenie procentowe objętościowe
% (w/v)	stężenie procentowe objętościowo-masowe
3'UTR	<i>3' untranslated region</i> ; region nieulegający transkrypcji po stronie 3' sekwencji kodującej genu
5'UTR	<i>5' untranslated region</i> ; region nieulegający transkrypcji po stronie 5' sekwencji kodującej genu
A	adenozyna
Amp^R	oporność na ampicylinę
APS	nadsiarczan amonu
ATP	adenozyno-5'-trifosforan
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , surowicza albumina bydłęca
C	cytozyna
CDS	<i>coding sequence</i> ; sekwencja kodująca
cis-sRNA	<i>cis-encoded small RNA</i> , małe RNA kodowane <i>in cis</i>
CLIP-seq	<i>cross-linking immunoprecipitation and RNA sequencing</i> , metoda immunoprecypitacji z sieciowaniem pod wpływem UV i sekwencjonowaniem RNA
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i> , system obrony bakterii przed obcymi elementami genetycznymi
crosslinking	sieciowanie, reakcja między RNA i białkiem zachodząca pod wpływem ekspozycji na światło UV polegająca na utworzeniu wiązań kowalencyjnych między nimi
CTP	cytydino-5'-trifosforan
cV	<i>column volume</i> , objętość kolumny
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy
DTT	ditiotreitól
EDTA	kwas etylenodiaminotetraoctowy
EMSA	<i>electromobility shift assay</i> , różnicowa migracja w żelu poliakrylamidowym; technika badawcza służąca m.in. do testów wiązania RNA i białek
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i> ; szybka chromatografia białek, odmiana chromatografii cieczowej służąca do uzyskiwania oczyszczonych białek
G	guanozyna
GradSeq	<i>gradient profiling by sequencing</i> , metoda profilowania transkryptomu z zastosowaniem frakcjonowania kompleksów RNA-białko w gradiencie glicerolu
h	<i>hour</i> , godzina
IgA	<i>immunoglobulin A</i> , immunoglobulina A/przeciwciało klasy A
kanR	oporność na kanamycynę
K_d	<i>equilibrium dissociation constant</i> , stała równowagi dysocjacji
kDa	kilodalton, jednostka masy białek
log₂FC	<i>base 2 logarithm from the fold change</i> ; logarytm o podstawie dwa ze zmiany krotności w stosunku do kontroli
M	mol

min	minuta
mRNA	<i>messenger RNA</i> , informacyjny RNA
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> , jądrowy rezonans magnetyczny
NTD	<i>N-terminal domain</i> , domena N-końcowa/domena FinO białka ProQ z <i>E. coli</i>
oligo(U)	ogon oligourydynowy, część Rho-niezależnego terminatora transkrypcji znajdująca się na jego końcu 3', składająca się z kilku następujących po sobie reszt urydyny
ORF	<i>open reading frame</i> , otwarta ramka odczytu
PNK	<i>polynucleotide kinase</i> , kinaza polinukleotydowa
RBP	<i>RNA binding protein</i> , białko wiążące RNA
RBS	<i>ribosome binding site</i> , miejsce wiązania rybosomu
RIL-seq	<i>RNA interaction by ligation and sequencing</i> ; technika wysokoprzepustowego sekwencjonowania służąca do badań interakcji białek i cząsteczek RNA z wykorzystaniem etapu ligacji
RIP-seq	<i>RNA immunoprecipitation and sequencing</i> ; technika immunoprecypitacji i sekwencjonowania RNA wchodzącego z interakcje z docelowym białkiem
rmp	<i>revolutions per minute</i> , obroty na minutę
RNA	kwas rybonukleinowy
rRNA	<i>ribosomal RNA</i> , rybosomalny RNA
RT	<i>room temperature</i> , temperatura pokojowa
s	sekunda
SD	sekwencja Shine-Dalgarno
sRNA	small RNA; małe, niekodujące/regulatorowe cząsteczki RNA
T	tymidyna
TBE	<i>Tris-Borate-EDTA</i> , bufor TBE
TEMED	N, N, N', N'-tetrametyloetylenodiamina
trans-sRNA	<i>Trans-encoded small RNA</i> , mały RNA kodowany <i>in trans</i>
TRIS	2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
tRNA	<i>transfer RNA</i> , transferowy/transportujący RNA
U	urydyna
u	unit, jednostka enzymatyczna
UTR	<i>untranslated region</i> , region mRNA niepodlegający translacji
UV	światło ultrafioletowe
V	wolt, jednostka napięcia elektrycznego
W	wat, jednostka mocy elektrycznej

1. WSTĘP

1.1 WPROWADZENIE

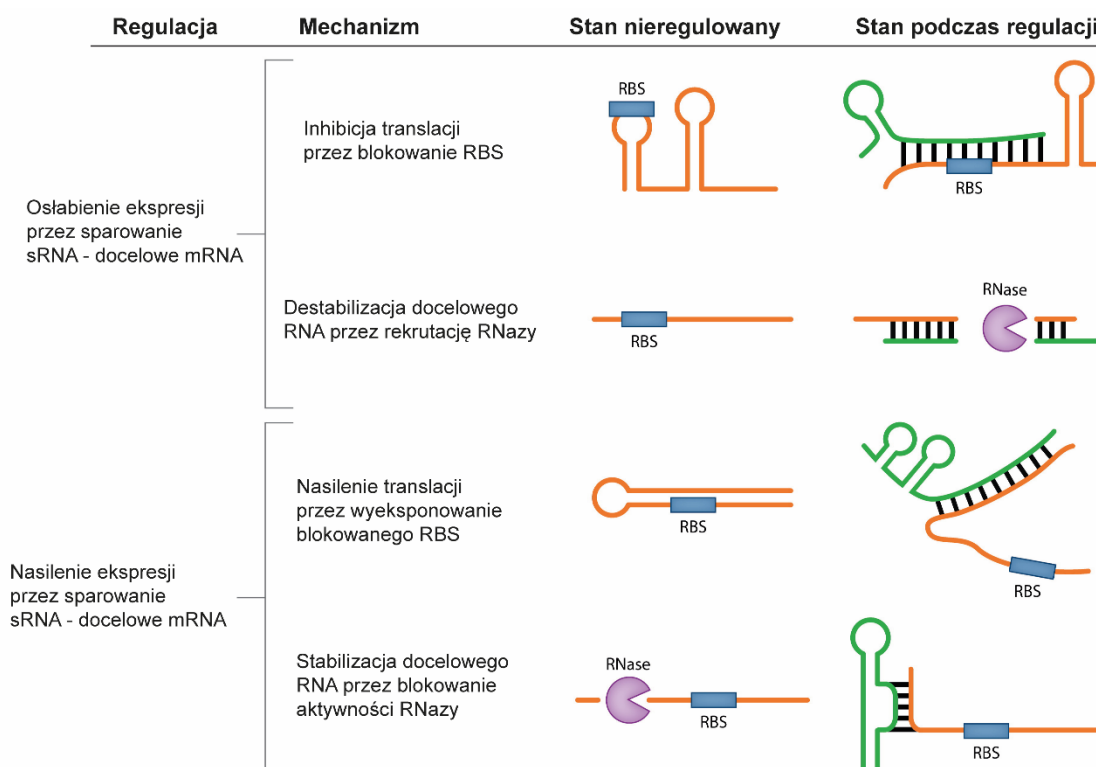
Wszystkie informacje o budowie, rozwoju i funkcjach dowolnego organizmu są zapisane w sekwencji nukleotydów jego DNA. Dotyczy to w równym stopniu organizmów jednokomórkowych jakimi są bakterie, jak i nas samych. Jednakże proces odczytu tej informacji i późniejsze przełożenie jej na język aminokwasów (białek) jest niezwykle skomplikowany i może przebiegać bardzo odmiennie u różnych organizmów. Sam odczyt sekwencji z matrycy jaką jest DNA i późniejsze losy odczytanej informacji nazywamy ekspresją genów. Geny zawierają w sobie schemat budowy białek lub RNA, które później zostaną wykorzystane w procesach regulacyjnych. Geny nie ulegają ekspresji na tym samym poziomie, niektóre są eksprymowane intensywnie i często, inne rzadziej, a jeszcze inne tylko w określonych warunkach. Za to kiedy i w jakim natężeniu dany gen będzie aktywowany lub wyciszany odpowiada wyjątkowo złożona sieć mechanizmów molekularnych zbiorczo określana jako regulacja ekspresji genów.

W najprostszym ujęciu sekwencja DNA jest przepisywana najpierw na RNA – pokrewny DNA kwas nukleinowy o nieco odmiennej strukturze – w procesie zwanym transkrypcją, która zachodzi pod wpływem określonych sygnałów stymulujących przy udziale enzymu polimerazy RNA. Już sama kaskada molekularna prowadząca do indukcji ekspresji genu niejednokrotnie składa się z wielu czynników. Powstały RNA może być modyfikowany, oddziaływać z białkami wzmacniającymi jego stabilność bądź kierującymi go na drogę degradacji, wiązać inne ligandy a nawet podlegać autoregulacji, gdy uformowana struktura drugorzędowa uniemożliwia dalsze procesowanie. Wszystkie te procesy określane są mianem potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów i to od nich zależy, czy finalny produkt białkowy powstanie czy też nie. Zatem sama indukcja ekspresji i synteza transkryptu nie oznacza, że mRNA ulegnie translacji, czyli procesowi, w którym zawarta w sekwencji nukleotydów informacja przekładana jest na sekwencję aminokwasów białka.

W niniejszej pracy badam szczegóły oddziaływania dwóch bakteryjnych białek opiekuńczych - ProQ i Hfq - z *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* i *Neisseria meningitidis* z cząsteczkami RNA. Celem było dokładniejsze zrozumienie mechanizmów odpowiedzialnych za selekcję ich ligandów RNA, jak również poznanie mechanistycznych szczegółów tych interakcji w przypadku *N. meningitidis* ProQ, co pozwoliłoby na pogłębienie wiedzy na temat potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów, a co za tym idzie, procesów adaptacyjnych bakterii.

1.2 REGULACJA EKSPRESJI GENÓW BAKTERII Z UDZIAŁEM MAŁYCH RNA (sRNA)

Regulacja ekspresji genów z udziałem małych niekodujących RNA (z ang. *small non-coding RNA*, sRNA) stanowi jeden z głównych mechanizmów potranskrypcyjnej kontroli aktywności genów u bakterii. sRNA zawdzięczają swą nazwę relatywnie niewielkiej długości, przeciętnie ~ 50 – 300 nukleotydów, chociaż sporadycznie zdarzają się również dłuższe, bo sięgające nawet 500 nukleotydów sRNA (Novick i Geisinger, 2008; Storz i wsp., 2011). Dzięki częściowej lub całkowitej komplementarności zasad sRNA wiążą się z docelowym mRNA (z ang. *messenger RNA*, informacyjny RNA). Efektem takiego oddziaływania jest zazwyczaj modulacja natężenia translacji, np. poprzez sekwestrację RBS (z ang. *ribosome binding site*, miejsce wiązania rybosomu), lub zmiana stabilności mRNA. Zachodzi ona poprzez ochronę przed aktywnością RNaz lub wręcz przeciwnie, poprzez kierowanie transkryptu na drogę degradacji (rys. 1) (Papenfort i Vanderpool, 2015; Waters i Storz, 2009). Pojedynczy sRNA może wpływać na ekspresję nawet kilkudziesięciu genów, dzięki czemu sRNA często zajmują centralne miejsce w genowych sieciach regulatorowych u bakterii (Papenfort i Melamed, 2023).



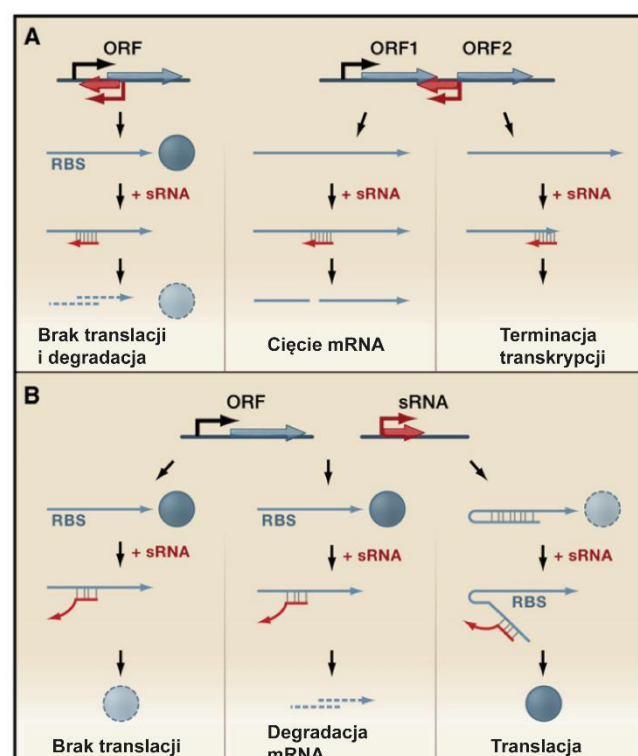
Rysunek 1. Potranskrypcyjna regulacja ekspresji genów bakterii z udziałem sRNA.

Opis w tekście głównym. Na podstawie (Nitzan i wsp., 2017) (zmodyfikowano).

1.3 RODZAJE BAKTERYJNYCH CZĄSTECZEK sRNA

Ze względu na sposób, w jaki bakteryjne sRNA realizują swoją fizjologiczną funkcję, można wyodrębnić pięć ich podstawowych klas. Pierwsze dwie stanowią sRNA wchodzące w interakcję z białkami opiekuńczymi Hfq i ProQ. Działają one poprzez tworzenie lokalnych oddziaływań z komplementarnymi sekwencjami docelowego transkryptu. Trzecia klasa obejmuje sRNA podobne do CsrB, tj. blokujące aktywność CsrA, globalnego represora translacji występującego w większości genomów znanych bakterii. Szacuje się, iż wymienione klasy mogą modulować ekspresję nawet połowy genów *Salmonella enterica*. Pozostałe dwie składają się z 6S RNA regulujących działanie polimerazy RNA, oraz CRISPR RNA budujących odporność nabytą bakterii i powszechnie stosowanych w technikach inżynierii genetycznej ze względu na swój udział w procesach edycji genomu (Hor i wsp., 2018).

Inny podział bierze za kryterium pochodzenie danego sRNA w odniesieniu do genu docelowego. Wyróżnia się tu dwie grupy: sRNA kodowane *in cis* oraz sRNA kodowane *in trans*. Pierwszą z nich stanowią sRNA kodowane w tym samym *locus* co wiązane mRNA, jednak z drugiej, antysensownej nici DNA, w efekcie czego są komplementarne z mRNA na całej swej długości. Druga grupa obejmuje sRNA kodowane w regionach oddalonych od *locus* regulowanego genu, a ich komplementarność względem docelowego mRNA ograniczona jest do znacznie krótszych regionów (rys. 2) (Carrier i wsp., 2020; Hor i wsp., 2018; Waters i Storz, 2009).



Rysunek 2. Ułożenie w genomie i regulacja ekspresji genów z udziałem sRNA.

Opis w tekście głównym. (A) *cis*-sRNA, (B) *trans*-sRNA; ORF – otwarta ramka odczytu (z ang. *open reading frame*), RBS – miejsce wiązania rybosomu. Na podstawie (Waters i Storz, 2009) (zmodyfikowano).

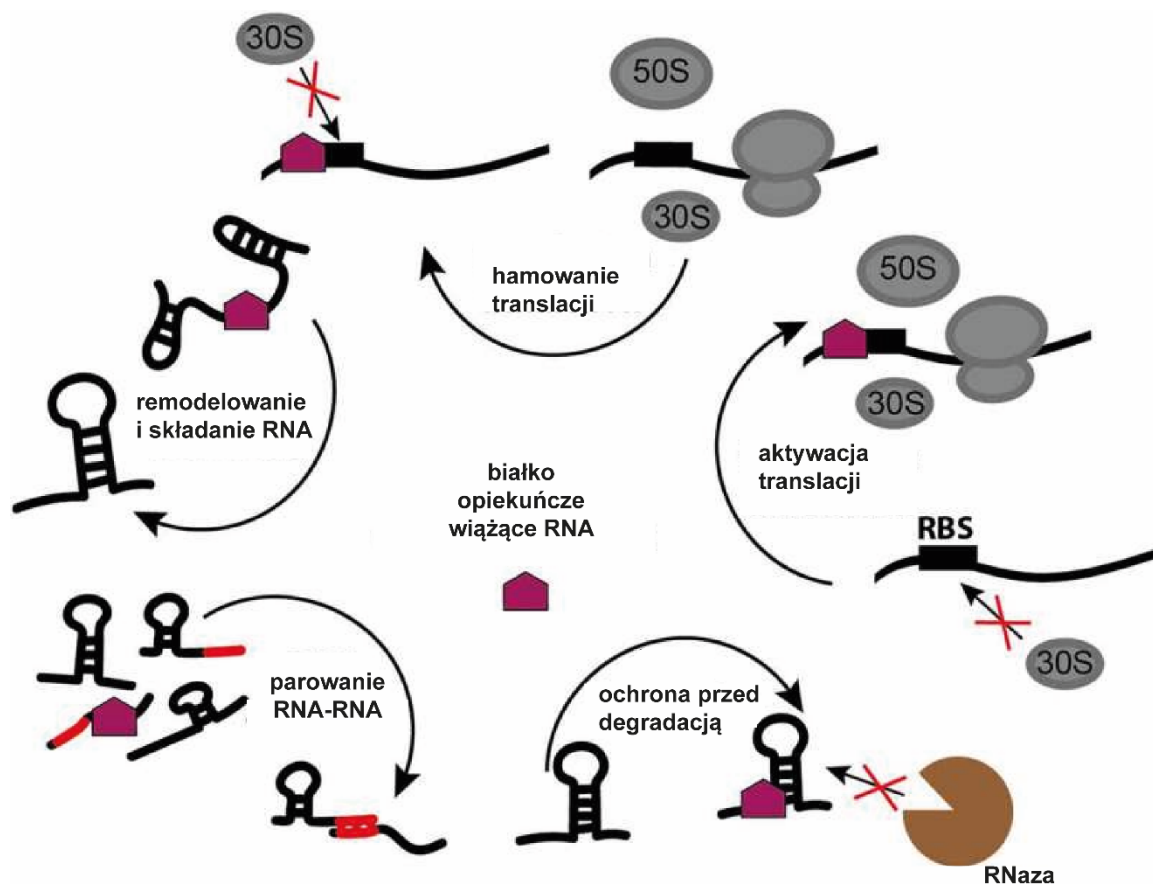
sRNAs mogą posiadać swój własny promotor, dzięki czemu powstają niezależnie od innych genów. Warto tu zaznaczyć, że takie sRNAs z niezależnym promotorem kodowane są przez odrębny gen (*trans*-sRNA), lub współdzielą z docelowym mRNA (*cis*-sRNA) (Svensson i Sharma, 2021). Z drugiej strony wysokoprzepustowe technologie profilowania transkryptomu pozwoliły na zidentyfikowanie wielu sRNA powstających z enzymatycznej obróbki mRNA lub w wyniku przedwczesnej terminacji transkrypcji (Adams i wsp., 2021). Procesowane sRNA mogą pochodzić z różnych regionów macierzystego transkryptu - z 3'UTR (Miyakoshi i wsp., 2015; Ponath i wsp., 2022) oraz 5'UTR (Thomason i wsp., 2019).

1.4 BAKTERYJNE BIAŁKA OPIEKUŃCZE WIĄŻĄCE RNA

Dwie spośród pięciu głównych klas sRNA zależą od RBP (z ang. *RNA-binding proteins*, białka wiążące RNA), jakimi są Hfq i ProQ (Hor i wsp., 2018). W świetle najnowszych badań wydaje się jednak, iż zamiast wyłącznie o ProQ, należałoby mówić o całej rodzinie białek z domeną FinO (Arthur i wsp., 2011; Arthur i wsp., 2003; Attaiech i wsp., 2016; Bauriedl i wsp., 2020; Chaulk i wsp., 2010; El Mouali i wsp., 2021; Gerovac i wsp., 2020; Ghetu i wsp., 2000; Ghetu i wsp., 1999; Holmqvist i wsp., 2018; Melamed i wsp., 2020; Olejniczak i Storz, 2017; Smirnov i wsp., 2016). Podczas gdy białka ProQ z enterobakterii czy meningokoków wydają się najistotniejsze z uwagi na globalny charakter swego udziału w ramach potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów, tj. są zdolne do oddziaływania z licznymi RNA przez co wpływają na wiele genów (Bauriedl i wsp., 2020; Holmqvist i wsp., 2018; Melamed i wsp., 2020; Smirnov i wsp., 2016), inne, bardziej specyficzne, bo wiążące tylko kilka ligandów, takie jak FinO (Arthur i wsp., 2011; Arthur i wsp., 2003; El Mouali i wsp., 2021) czy RocC (Attaiech i wsp., 2016; Kim i wsp., 2022) także mogą pełnić istotne funkcje w komórce bakteryjnej.

RBP nie oddziałują wyłącznie z sRNA, ale także z mRNA, a sama interakcja ma charakter przejściowy i może mieć zróżnicowane efekty (rys. 3) (Holmqvist i wsp., 2018; Melamed i wsp., 2020; Quendera i wsp., 2020). Najprostszym skutkiem związania RNA przez białko opiekuńcze jest zwiększenie stabilności RNA poprzez blokowanie aktywności rybonukleaz (Arthur i wsp., 2011; Attaiech i wsp., 2016; Woodson i wsp., 2018). Często po przyłączeniu się białka struktura RNA ulega remodelowaniu lub składa się do swej prawidłowej konformacji (Katsuya-Gaviria i wsp., 2022; Peng i wsp., 2014; Williamson, 2000). Kolejną możliwością jest ułatwianie parowania sRNA z mRNA (Chaulk i wsp., 2010; Malecka i wsp.,

2021; Santiago-Frangos i Woodson, 2018). Powszechny efekt stanowi również modulowanie translacji poprzez blokowanie lub eksponowanie RBS dla podjednostek rybosomu (Azam i Vanderpool, 2018; Katsuya-Gaviria i wsp., 2022; Timmermans i Van Melderen, 2010; Yakhnin i wsp., 2007).



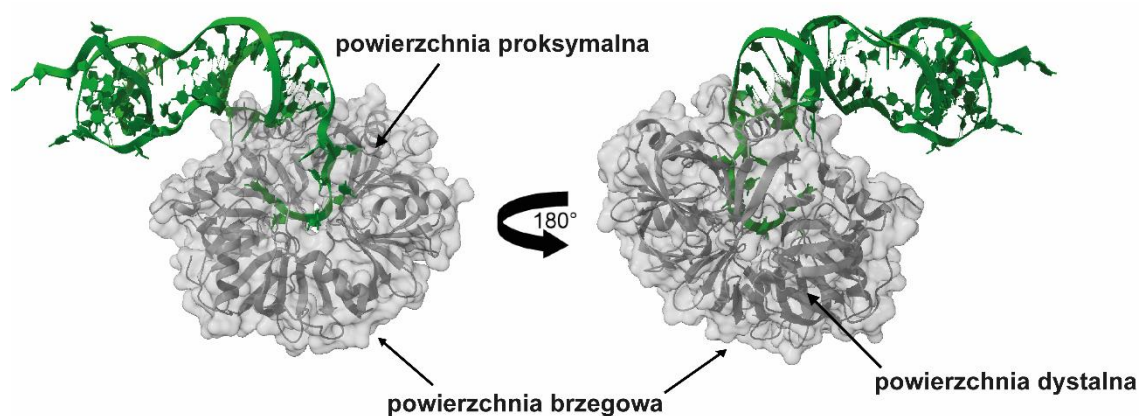
Rysunek 3. Funkcje białek opiekuńczych wiążących RNA.

Opis w tekście głównym. ORF – otwarta ramka odczytu, RBS – miejsce wiązania rybosomu. Na podstawie (Katsuya-Gaviria i wsp., 2022) (zmodyfikowano).

1.4.1. Hfq

Jednym z najlepiej poznanych białek opiekuńczych jest powszechnie występujące u bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich białko Hfq (z ang. *host factor for bacteriophage Qβ*). W 1968 roku odkryto je jako czynnik gospodarza (*E. coli*) konieczny w replikacji RNA faga Qβ, a funkcje opiekuńcze względem RNA zostały zaobserwowane znacznie później, bo dopiero w roku 1993 (Barrera i wsp., 1993; Dos Santos i wsp., 2019). Pod względem struktury Hfq przypomina białka Sm, jednakże w odróżnieniu od przedstawicieli tej rodziny przyjmuje formę heksameryczną, nie heptameryczną (Schumacher i wsp., 2002; Wilusz i Wilusz, 2013).

Hfq ma zazwyczaj masę ok. 11.2 kDa, jednakże w swej aktywnej postaci formuje heksamer zdolny do wiązania RNA (rys. 4).



Rysunek 4. Kompleks heksameru Hfq i sRNA RydC. (PDB 4V2S (Dimastrogiovanni i wsp., 2014)).
Kompleks Hfq-RNA zwizualizowano w programie ChimeraX (Pettersen i wsp., 2021)

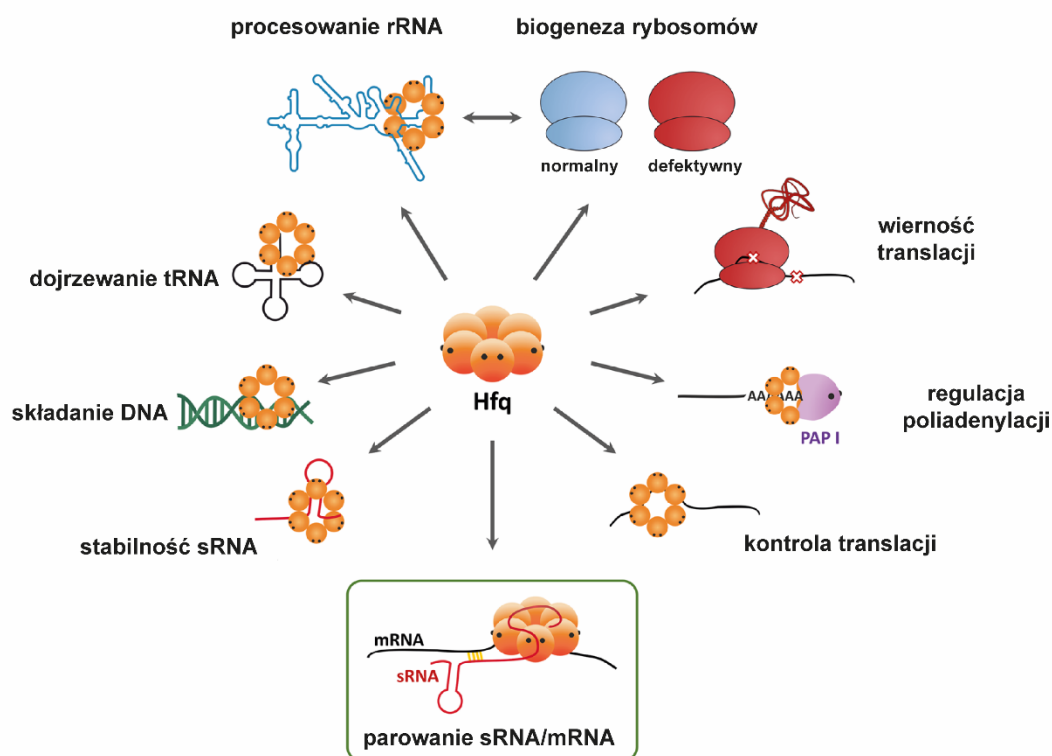
Zasadniczo można wyróżnić trzy główne powierzchnie białka Hfq zaangażowane w interakcje z RNA. Pierwsza, proksymalna, posiada wyeksponowaną α -helisę. Z drugiej strony znajduje się tzw. powierzchnia dystalna. Natomiast powierzchnię brzegową występującą pomiędzy powierzchnią proksymalną i dystalną określa się mianem krawędzi (z ang. *rim*) (rys. 4). Czasami wyodrębnia się jeszcze część C-końcową, która również może tworzyć kontakty z RNA i brać udział w uwalnianiu wcześniej związanych transkryptów (Santiago-Frangos i wsp., 2016; Updegrove i wsp., 2016; Vogel i Luisi, 2011).

Powierzchnia proksymalna wykazuje powinowactwo względem sekwencji jednoniciowych bogatych w urydynę, takich jak ogon oligo(U) Rho-niezależnego terminatora transkrypcji. Po drugiej stronie heksameru powierzchnia dystalna wiąże preferencyjnie jednoniciowe regiony bogate w motywy (ARN)_n, gdzie A to adenozyne, R puryna, a N dowolny nukleotyd (Link i wsp., 2009; Sauer i Weichenrieder, 2011; Schumacher i wsp., 2002). Ostatnią główną powierzchnią wiążącą białka Hfq stanowi krawędź, którą cechuje silne wiązanie sekwencji bogatych w adenozyne i urydynę jednocześnie (Holmqvist i wsp., 2016; Sauer i wsp., 2012).

Hfq może wiązać różne regiony transkryptów - 3'UTR, CDS, 5'UTR, sRNA i tRNA (z ang. *transfer RNA*, transferowy RNA), jednakże jedynym motywem strukturalnym jaki regularnie pojawiał się w ligandach był Rho-niezależny terminator transkrypcji, przy czym zanotowano to zarówno wśród wiązanych sRNA jak i w 3'UTR mRNA (Holmqvist i wsp., 2016; Melamed i wsp., 2020). Obserwacja ta jest zgodna z wcześniejszymi badaniami wskazującymi kluczową rolę Rho-niezależnego terminatora transkrypcji w interakcjach sRNA z

białkiem Hfq, przy czym kluczowe okazały się bogata w urydynę sekwencja poprzedzająca terminator oraz 3'-terminalna sekwencja ogona oligo(U), a sama struktura spinki terminatorowej mogła być zastąpiona przez inną bez większego wpływu na wiązanie białka (Ishikawa i wsp., 2012; Otake i wsp., 2011).

Chociaż Hfq znane jest przede wszystkim ze swojego udziału w promowaniu parowania sRNA i mRNA (Updegrave i wsp., 2016), jego rola wykracza daleko poza tę funkcję. Hfq wpływa m. in., na dojrzewanie tRNA (Lee i Feig, 2008), biogenezę rybosomów czy wierność translacji (Andrade i wsp., 2018). Efekty aktywności białka Hfq podsumowuje rysunek 5.



Rysunek 5. Rola białka Hfq w procesach molekularnych.

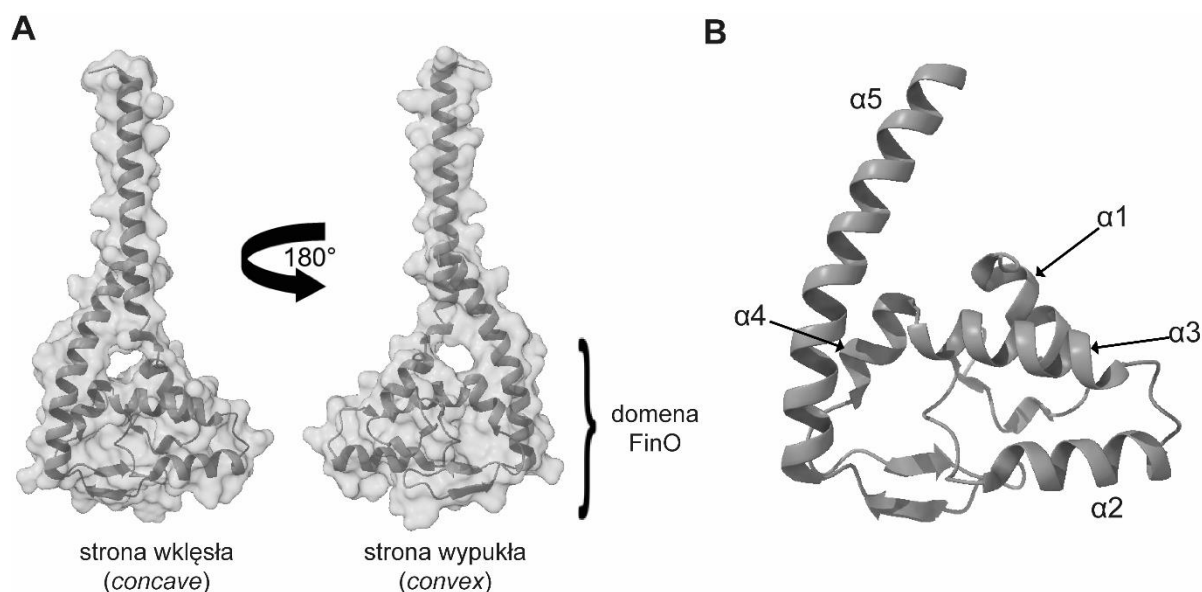
Na podstawie (Dos Santos i wsp., 2019) (zmodyfikowano).

1.4.2 Białka z domeną FinO

1.4.2.1 Historia badań i charakterystyka rodziny białek z domeną FinO

Chociaż białko FinO (21.2 kDa) było już wcześniej znane jako składnik dwugenowego systemu *finO-finP* regulującego transfer plazmidu F (z ang. *fertility inhibition*, „hamowanie płodności”) (Cheah i Skurray, 1986), jego zdolność do wiązania RNA została odkryta w roku 1994 (van Biesen i Frost, 1994). Po kolejnych sześciu latach badania krystalograficzne po raz pierwszy dostarczyły informacji o strukturze zwiniętej domeny białka FinO (Ghetu i wsp., 2000), którą wraz z odkrywaniem kolejnych przedstawicieli zaczęto określać mianem domeny ProQ/FinO lub FinO. Sama domena kształtem przypomina zwiniętą pięść i wyróżniono w niej

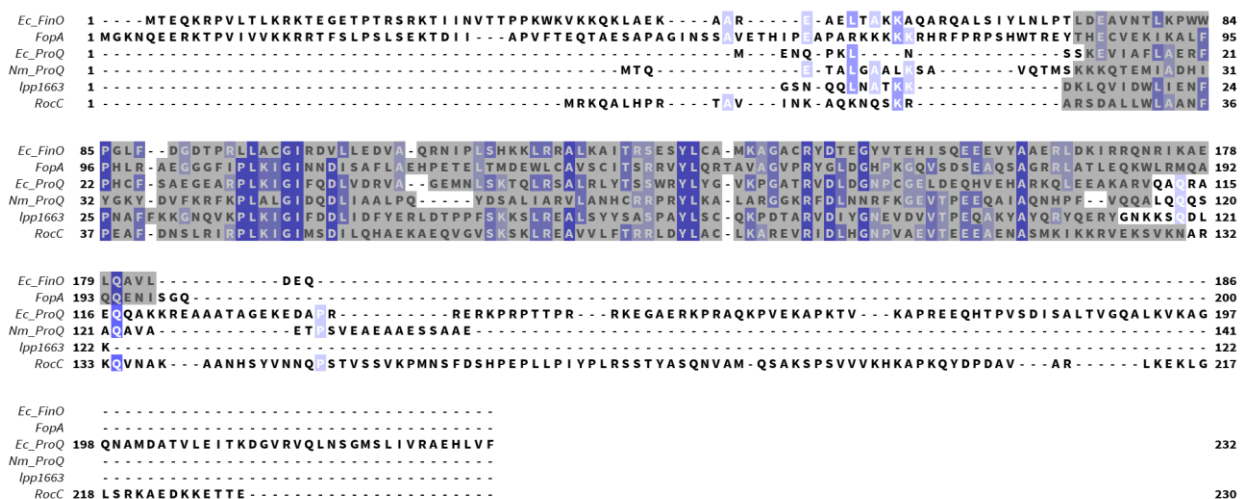
dwie powierzchnie - wypukłą (z ang. *convex*) i posiadającą liczne dodatnio naładowane reszty aminokwasowe powierzchnię wklęsłą (z ang. *concave*) (rys. 6) (Olejniczak i Storz, 2017). Kilka lat po opublikowaniu struktury białka FinO, autorzy udowodnili, iż białko to pełni funkcję białka opiekuńczego ułatwiającego parowanie między FinP (sRNA) i jego docelowym mRNA *traJ* (Arthur i wsp., 2003). Z niedawnych badań typu RIP-seq wiadomo, że FinO wiąże jeszcze kilka innych transkryptów, przy czym tylko jeden, RepX, z wysoką częstotliwością (El Mouali i wsp., 2021).



Rysunek 6. Struktura białka FinO oraz domeny FinO (PDB 1DVO (Ghetu i wsp., 2000).

(A) Struktura białka FinO (26-186), domena FinO zajmuje część C-końcową, (B) domena FinO składa się z 5 α -helis o charakterystycznym przestrzennym ułożeniu, widoczna w dolnej części antyrównoległa struktura β nie jest zakonserwowana między wszystkimi przedstawicielami białek z domoną FinO i u części może nie występować. Zwizualizowano w programie ChimeraX (Pettersen i wsp., 2021).

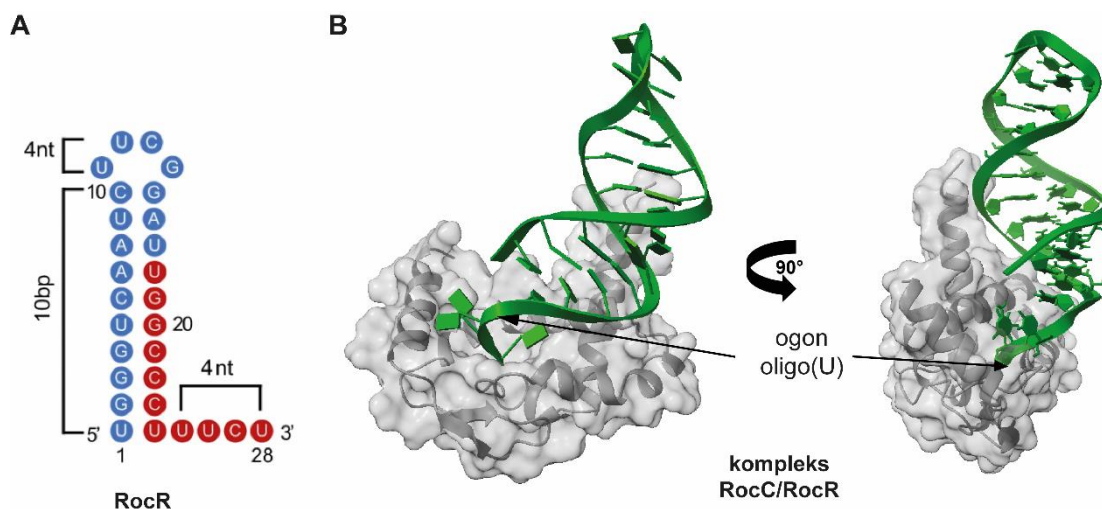
Białka z domoną FinO stanowią relatywnie zróżnicowaną grupę. W ich architekturze często znajdują się dodatkowe domeny lub regiony nieuporządkowane (Attaiech i wsp., 2017), a sama domena FinO, będąca modułem odpowiedzialnym za rozpoznanie i wiązanie RNA (Ghetu i wsp., 2002; Kim i wsp., 2022; Pandey i wsp., 2020; Stein i wsp., 2020), wykazuje zaledwie kilka całkowicie zakonserwowanych pozycji aminokwasowych (rys. 7). Z tego względu rozpoznanie białek z domoną FinO jako większej rodziny białek opiekuńczych było możliwe dopiero po uzyskaniu wglądu w ich strukturę, czy to w drodze eksperymentów strukturalnych czy dzięki predykcjom algorytmów bioinformatycznych.



Rysunek 7. Sekwencja białek z domeną FinO jest ewolucyjnie słabo zakonserwowana.

Przyrównanie sekwencji aminokwasowych wybranych przedstawicieli rodziny białek z domeną FinO. Ciemniejszy kolor niebieski wskazuje na wyższe zakonserwowanie pozycji aminokwasu; szarym kolorem zaznaczono granice domen FinO za początek przyjmując pierwszy aminokwas helisy $\alpha 1$, a za koniec ostatni aminokwas helisy $\alpha 5$ w oparciu o opublikowane dane strukturalne lub predykcje z wykorzystaniem AlphaFold (Jumper i wsp., 2021; Mirdita i wsp., 2022).

Jak dotąd poza białkiem FinO bliżej poznano jedynie kilka białek z tej rodziny. Trzy z nich, białka ProQ z *E. coli*, *N. meningitidis* (NMB1681) oraz *Pasteurella multocida* oddziałują z wieloma transkryptami, których liczba może sięgać nawet setek (Bauriedl i wsp., 2020; Gulliver i wsp., 2022; Holmqvist i wsp., 2018; Melamed i wsp., 2020; Smirnov i wsp., 2016), a struktura dwóch pierwszych została poznana w badaniach strukturalnych (Chaulk i wsp., 2010; Gonzalez i wsp., 2017). Przykładami białek z domeną FinO wiążącymi tylko kilka ligandów są RocC z *L. pneumophila* i FopA z *S. enterica*. Wiążą one z wysoką częstotliwością po jednym sRNA, RocC oddziałuje z RocR, natomiast FopA z Inc. Ponadto oba mogą wchodzić w interakcje z kilkoma innymi RNA (Attaiech i wsp., 2016; Gerovac i wsp., 2020). O ile struktura białka FopA pozostaje nieznana, to w przypadku RocC, jako jedyne białko z domeną FinO, nie tylko poznano strukturę, ale również strukturę kompleksu białka i RNA (Kim i wsp., 2022). Pozwoliło to na lepsze zrozumienie sposobu, w jaki RNA jest zorientowany na powierzchni domeny FinO (rys. 8).



Rysunek 8. Struktura białka RocC w kompleksie z RocR.

(A) fragment RocR (sRNA) wykorzystany w krystalografii, (B) kompleks RocC/RocR, RNA tworzy przede wszystkim kontakty z proksymalną częścią helisy $\alpha 1$, oraz kieszonką utworzoną z proksymalnej części helisy $\alpha 1$, $\alpha 4$, niewielką antyrównoległą strukturą β znajdującą się między helisami $\alpha 4$ i $\alpha 5$ oraz proksymalną częścią helisy $\alpha 5$. Na podstawie (Kim i wsp., 2022) (zmodyfikowano).

Lpp1663 z *L. pneumophila* stanowi ostatnie białko z domeną FinO o zbadanej strukturze, i chociaż ogólna zdolność do wiązania RNA została udowodniona, do tej pory nie poznano jego natywnych ligandów RNA (Immer i wsp., 2020).

1.4.2.2 Procesy fizjologiczne regulowane z udziałem białek z domeną FinO

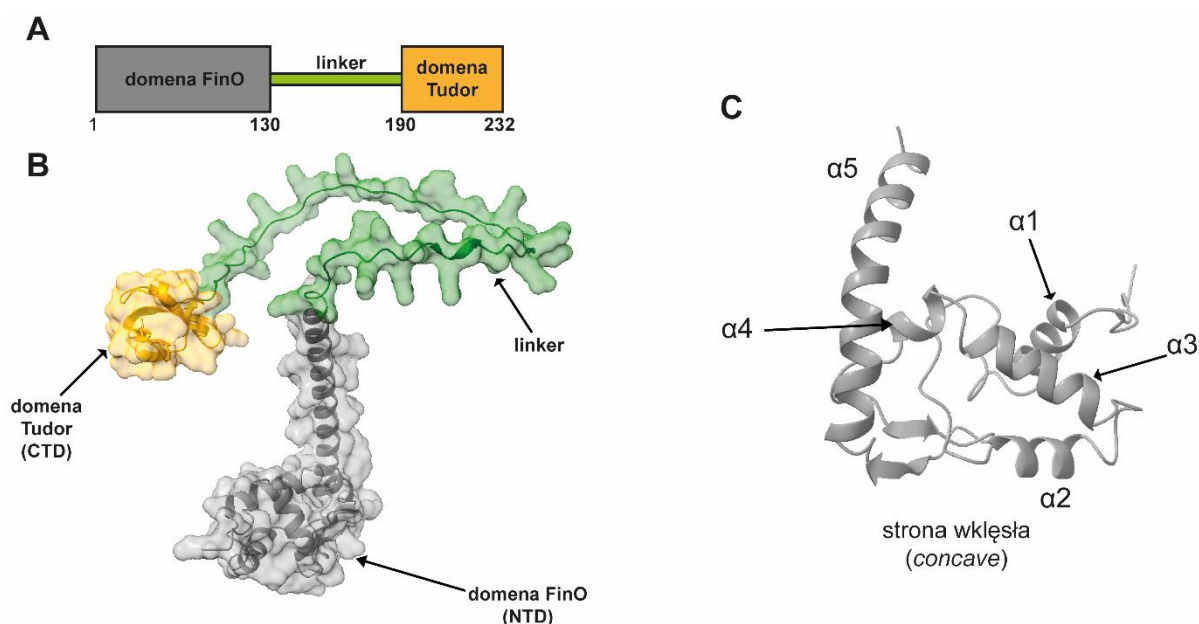
Białka z domeną FinO są zaangażowane w regulację wielu często niepowiązanych procesów komórkowych i szlaków metabolicznych. Białko FinO z plazmidu F' uczestniczy w hamowaniu transferu plazmidu podczas koniugacji i kontroli liczby plazmidów w komórce (El Mouali i wsp., 2021). FopA reguluje proces replikacji plazmidu (Gerovac i wsp., 2020). RocC kontroluje stan kompetencji, czyli zdolności bakterii do pobierania obcego materiału genetycznego (Attaiech i wsp., 2016). ProQ z *E. coli*, poprzez interakcję z wieloma RNA, wpływa na wiele procesów fizjologicznych takich jak metabolizm energetyczny, osmoregulacja czy translacja (Holmqvist i wsp., 2018; Liao i Smirnov, 2023; Melamed i wsp., 2020). Z kolei ProQ z *N. meningitidis*, podobnie do swego homologu z *E. coli* wiążąc wiele docelowych RNA, uczestniczy w metabolizmie aminokwasów, przemianie materii i energii jak również w ochronie przed stresem oksydacyjnym (Bauriedl i wsp., 2020; Liao i Smirnov, 2023). Najnowsze doniesienia z badań nad innymi organizmami bakteryjnymi (ludzkiego patogenu *S. enterica* oraz patogenów roślin *Dickeya dadantii* i *Erwinia amylovora*) potwierdzają istotną rolę białek ProQ w różnych procesach związanych z wirulencją (Leonard i wsp., 2021; Westermann i wsp., 2019; Yuan i wsp., 2022).

1.4.2.3 Białko ProQ z *E. coli*

Zwiększone zainteresowanie białkami z domeną FinO nastąpiło po publikacji w 2016, gdy okazało się jasne, że białko ProQ z *S. enterica* wiąże setki transkryptów *in vivo*, co czyni je globalnym czynnikiem potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów (Smirnov i wsp., 2016). Białko ProQ (z ang. *proline uptake regulator Q*, regulator poboru proliny Q) z bardzo blisko spokrewnionej bakterii *E. coli* było już wcześniej znane jako białko opiekuńcze biorące udział w transbłonowym transporcie proliny regulującym ciśnienie osmotyczne (Chaulk i wsp., 2011; Milner i Wood, 1989; Sheidy i Zielke, 2013), a jego zdolność do interakcji

z licznymi RNA wkrótce także została potwierdzona (Holmqvist i wsp., 2018; Melamed i wsp., 2020).

W architekturze białka ProQ z *E. coli* o masie 26 kDa można wyróżnić trzy regiony: N-terminalną domenę FinO (NTD, z ang. *N-terminal domain*), nieustrukturyzowaną sekwencję linkerową i domenę C-końcową, wykazującą podobieństwo do eukariotycznej domeny Tudor (Gonzalez i wsp., 2017) (rys. 9).



Rysunek 9. Struktura białka ProQ z *E. coli*.

(A) schemat architektury białka ProQ, (B) Struktura białka ProQ z *E. coli* (1-232, pełnej długości, predykcja AlphaFold (Jumper i wsp., 2021)), szara domena N-końcowa (NTD, FinO) i pomarańczowa domena C-końcowa (CTD, Tudor) połączona nieustrukturyzowanym linkerem, (C) charakterystyczny układ pięciu α -helis w strukturze domeny FinO (NTD) białka ProQ z *E. coli*.

Wiedza na temat mechanistycznych podstaw funkcjonowania białka ProQ mimo postępu uczynionego w ostatnich kilku latach wciąż jest ograniczona (Holmqvist i wsp., 2020). Najlepiej udokumentowano rolę domeny FinO (NTD) jako modułu odpowiedzialnego za specyficzne rozpoznanie i wiązanie RNA (Gonzalez i wsp., 2017). Oprócz tego monitorowano także jej udział w wymianie nici w ligandach białka FinO - *traJ/FinP* (Chaulk i wsp., 2011). Rola regionu linkerowego nie jest do końca jasna, chociaż zaobserwowano jego zdolność do oddziaływania z sRNA SraB (Gonzalez i wsp., 2017). Natomiast domena CTD (Tudor) wykazuje aktywność w wymianie nici i dupleksowaniu RNA, jak również może być zaangażowana w jego niespecyficzne wiązanie (Chaulk i wsp., 2011; Pandey i wsp., 2020; Stein i wsp., 2020). Proponowanym modelem działania białka ProQ z *E. coli* jest związanie ligandu RNA z domeną NTD prowadzące do zbliżenia linkera i domeny CTD, które dzięki dodatkowym kontaktom z

RNA wspólnie z NTD uczestniczą w oddziaływaniach sRNA z mRNA (Stein i wsp., 2020) albo uczestniczą w ochronie końców 3' mRNA przed aktywnością RNaz (Holmqvist i wsp., 2018).

Dzięki technikom GRAD-seq (Smirnov i wsp., 2016), CLIP-seq (Holmqvist i wsp., 2018) oraz RIL-seq (Melamed i wsp., 2020) możliwe było dokładne poznanie RNA, które oddziałują z białkiem *E. coli* ProQ *in vivo*. Wiąże ono różne klasy transkryptów – sRNA, 5'UTR, 3'UTR, CDS, tRNA, przy czym nie wykazuje wyraźnej preferencji względem jakiejś określonej sekwencji, za to wiąże zazwyczaj RNA posiadające regiony wysoce ustrukturyzowane, a jedynym powtarzalnym motywem wiązanim przez ProQ z *E. coli* wydaje się być Rho-niezależny terminator transkrypcji. Ponadto dzięki danym z RIL-seq wiadomo, iż z białkiem związane były m. in. fragmenty RNA pochodzące z dwóch genomowych *loci*. Miały one charakter sRNA-mRNA, co potwierdza rolę opiekuńczą białka ProQ.

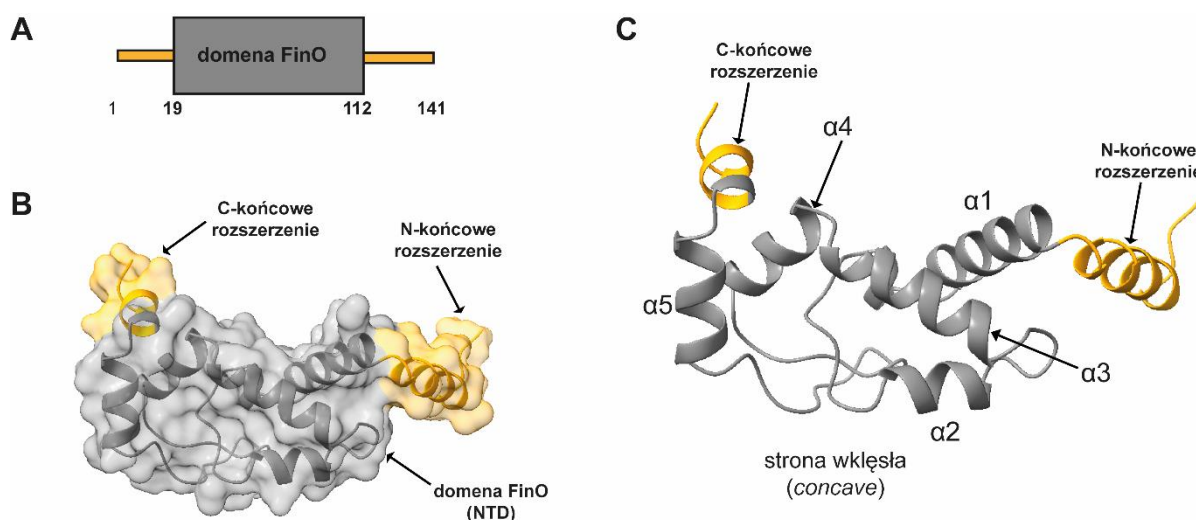
Sama interakcja RNA z białkiem *E. coli* ProQ nie gwarantuje, że oddziaływanie będzie funkcjonalne, tzn. że będzie prowadzić do jakiegoś biologicznego efektu. Ponadto w przytłaczającej większości odnotowanych interakcji ich szczegóły pozostają nieznanne (Holmqvist i wsp., 2020). Ze znanych efektów można wymienić większą stabilność transkryptów w obecności białka, gdyż w szczepach z delecją genu *proQ* cechował je krótszy okres półtrwania, co było rezultatem ochrony przed degradacją ze strony RNAaz (Holmqvist i wsp., 2018). Przykładami takich chronionych RNA są RybB (sRNA) (Melamed i wsp., 2020) czy *cspE* (mRNA) (Holmqvist i wsp., 2018). Wspomniany wcześniej udział w formowaniu dupletu *in vitro* pary ligandów białka FinO, FinP/*traJ*, także dostarcza informacji o prawdopodobnej roli białka ProQ. Z kolei u pokrewnego gatunku bakterii, *S. enterica*, udowodniono udział białka ProQ w hamowaniu translacji, gdyż stabilizowało ono duplet RaiZ/*hupA* (sRNA/mRNA). RaiZ wiąże się do *hupA* w RBS, przez co ogranicza jego dostępność dla kompleksu inicjacji translacji (Smirnov i wsp., 2017).

Z perspektywy niniejszej pracy ostatnim aspektem oddziaływania białka ProQ z *E. coli*, jaki należy omówić, jest charakterystyka Rho-niezależnego terminatora transkrypcji stanowiącego jedyny poznany dotychczas motyw struktury RNA, który wiąże białko ProQ (Holmqvist i wsp., 2018; Melamed i wsp., 2020). Doktorantka z naszej pracowni, mgr Ewa Stein, zbadała cechy Rho-niezależnego terminatora transkrypcji, które są konieczne, aby efektywnie wiązał się on z domeną FinO (NTD) białka ProQ z *E. coli*. Kluczowym regionem RNA dla silnej interakcji jest dolna część spinki terminatorowej. W oddziaływaniu bierze udział również sekwencja po jej stronie 5' oraz 3'-terminalna sekwencja ogona oligo(U),

którego skrócenie poniżej czterech reszt urydyny znacznie osłabiało wiązanie (Stein i wsp., 2020; Stein i wsp., 2023).

1.4.2.4 Białko ProQ z *N. meningitidis* (NMB1681)

Białko ProQ z *N. meningitidis* (NMB1681) zostało scharakteryzowane dopiero w 2010 roku. Z wykorzystaniem technik krystalografii poznano jego strukturę, w której można wyodrębnić jedną centralną domenę przyjmującą konformację domeny FinO z rozległą powierzchnią o ładunku dodatnim, oraz N- i C-końcowe elastyczne rozszerzenia (rys. 10) (Chaulk i wsp., 2010).



Rysunek 10. Struktura białka ProQ z *N. meningitidis*.

(A) Schemat architektury białka *N. meningitidis* ProQ, (B) struktura białka ProQ z *N. meningitidis* (3-118, PDB 3MW6 (Chaulk i wsp., 2010)), szarym kolorem oznaczono centralną domenę FinO, pomarańczowym elastyczne rozszerzenia, (C) charakterystyczny układ pięciu α -helis w strukturze domeny FinO białka ProQ z *N. meningitidis*. Elastyczne rozszerzenia (kolor pomarańczowy) zależnie od roztworu mogą przybierać postać α helis lub pozostawać nieuporządkowane.

Obok lpp1663 z *L. pneumophila* (Immer i wsp., 2020), *N. meningitidis* ProQ jest przykładem minimalnego wariantu białka z domeną FinO, niemal w całości złożonym z pojedynczej domeny FinO.

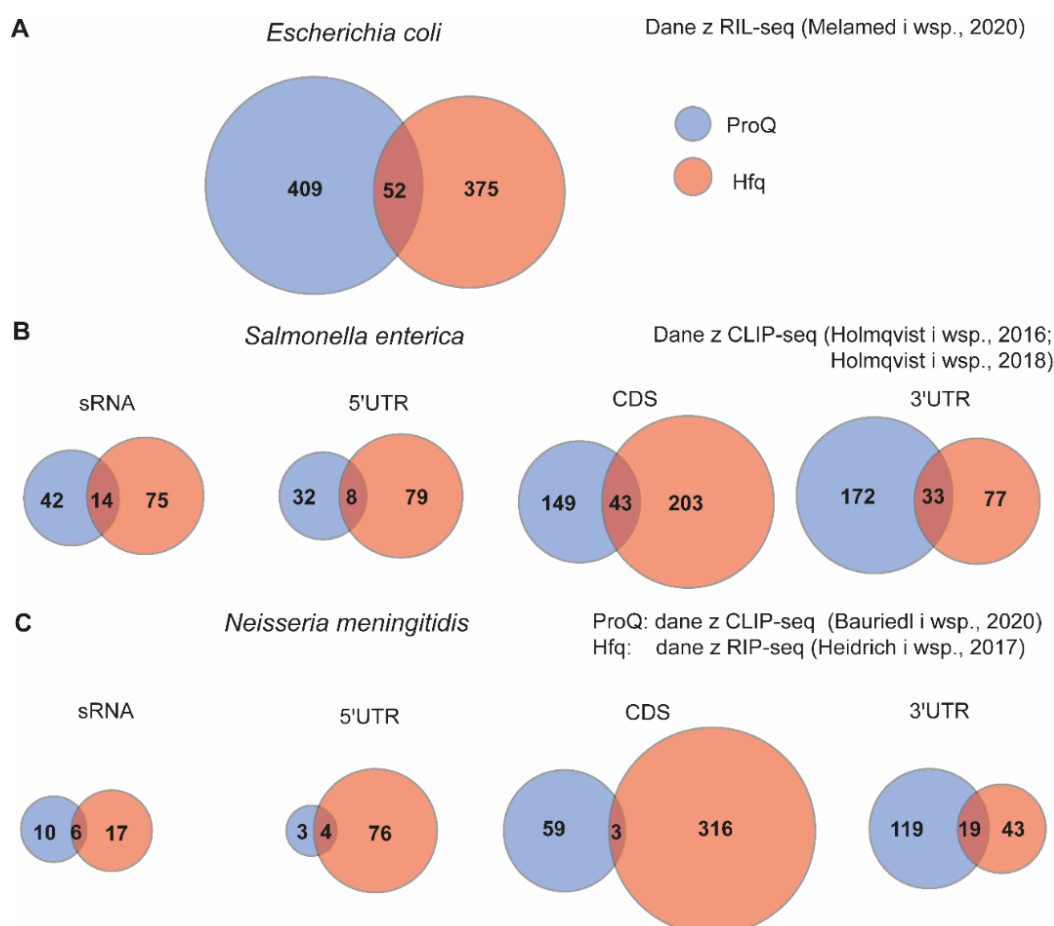
Wiedza na temat funkcjonowania białka ProQ z *N. meningitidis* jest jeszcze skromniejsza niż wiedza na temat jego homologu z *E. coli*. Tym niemniej, dzięki technice CLIP-seq poznano ponad 200 różnych RNA, z którymi oddziałuje ono *in vivo*. Regiony o najwyższym pokryciu w eksperymencie były mapowane do sRNA, 5'UTR, 3'UTR, CDS oraz tRNA i, podobnie jak w przypadku ProQ z *E. coli*, obserwowano wyraźną preferencję względem wysoko ustrukturyzowanych transkryptów, przede wszystkim struktur Rho-niezależnego terminatora. Wykryte RNA były związane z różnymi procesami fizjologicznymi, m. in. metabolizmem

energetycznym i metabolizmem aminokwasów, translacją czy ochroną przed stresem oksydacyjnym (Bauriedl i wsp., 2020).

Funkcja biologiczna białka ProQ z *N. meningitidis* nie jest jeszcze w pełni poznana. Dotychczas potwierdzono wydłużony okres półtrwania RNA w komórkach bakteryjnych w obecności ProQ (funkcja ochronna), aktywność w procesie wymiany nici RNA oraz uczestnictwo w oddziaływaniach sRNA z mRNA (Bauriedl i wsp., 2020; Chaulk i wsp., 2010).

1.4.3 Porównanie pul ligandów białek ProQ i Hfq

Interesującą obserwacją poczynioną dla białek ProQ i Hfq z *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* i *Neisseria meningitidis* jest fakt, że oba białka u każdego z wymienionych gatunków wiążą zasadniczo odrębne pule RNA i dotyczy to wszystkich ich klas (rys. 11) (Bauriedl i wsp., 2020; Holmqvist i wsp., 2018; Melamed i wsp., 2020). Odrębność pul ligandów RNA ProQ i Hfq będzie punktem wyjścia dla pierwszej części badawczej niniejszej pracy.



Rysunek 11. Białka ProQ i Hfq wiążą w większości odrębne pule RNA.

(A) RNA wiązane przez ProQ i Hfq w *E. coli*, na podstawie (Melamed i wsp., 2020) (zmodyfikowano), (B) RNA wiązane przez ProQ i Hfq w *S. enterica*, na podstawie (Holmqvist i wsp., 2018; Holmqvist i wsp., 2016) (zmodyfikowano), (C) RNA wiązane przez ProQ i Hfq w *N. meningitidis*, na podstawie (Bauriedl i wsp., 2020; Heidrich i wsp., 2017) (zmodyfikowano).

1.4.4 Inne bakteryjne białka opiekuńcze wiążące RNA

Do tej pory scharakteryzowałem jedynie białko Hfq oraz bardziej zróżnicowaną rodzinę białek z domeną FinO, jednakże znane są również inne białka opiekuńcze, jak chociażby wspomniane przy opisie klas sRNA białko CsrA oraz jego homologi. Ma ono masę ok. 7 kDa, a jego aktywna forma przybiera postać homodimeru. Rozpoznawanym motywem jest krótka sekwencja AUGGA, a związanie CsrA z mRNA występuje zazwyczaj w regionie RBS, co skutkuje hamowaniem translacji (Holmqvist i wsp., 2016; Quendera i wsp., 2020). Ponadto obserwowano udział CsrA w remodelowaniu struktury i modulowaniu stabilności RNA czy Rho-zależnej terminacji transkrypcji. Regulowanymi przez CsrA procesami są przede wszystkim metabolizm węglowy, formowanie biofilmu, *quorum sensing* i reakcje na stres (Romeo i Babitzke, 2018). Ciekawym aspektem biologii tego białka jest z kolei regulacja jego aktywności przez CsrB i CsrC. Te dwa sRNA mogą wiązać się do CsrA, przez co prowadzą do sekwestracji i spadku dostępności białka dla procesów komórkowych (Katsuya-Gaviria i wsp., 2022).

Inną dość dobrze poznaną grupą białek opiekuńczych stanowią powszechnie występujące u prokariotów białka szoku zimna Csp (z ang. *cold shock proteins*). Są to niewielkich rozmiarów białka zdolne do pasywnego rozplatania i remodelowania RNA. Przy spadku temperatury RNA mocno się zwija i może tworzyć konformacje z rozległymi strukturami drugorzędowymi niedostępnymi dla molekularnej maszyny przeprowadzającej transkrypcję czy translację. W takich sytuacjach Csp przyłączają się do RNA i destabilizują regiony dwuniciowe przywracając jego aktywną biologicznie konformację (Katsuya-Gaviria i wsp., 2022; Quendera i wsp., 2020).

Stosunkowo niedawno postulowaną jako potencjalne białka opiekuńcze grupą są białka z domeną KH (z ang. *K-homology*) (Olejniczak i wsp., 2022). Podobnie jak miało to miejsce w przypadku białek z domeną FinO, domenie KH mogą towarzyszyć także inne domeny. Białka te występują bardzo powszechnie we wszystkich królestwach organizmów żywych, a ich zdolność do interakcji z RNA jest dobrze udokumentowana. Występujące u bakterii Gram-dodatnich KhpA i KhpB biorą udział m. in. w procesie elongacji komórki, a niedawne badania dowiodły ich oddziaływania z sRNA, co sugeruje, że mogą pełnić rolę białek opiekuńczych w potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów (Lamm-Schmidt i wsp., 2021; Zheng i wsp., 2017). Jednakże potwierdzenie tego przypuszczenia wymaga dalszych badań.

Dzięki pracy wielu naukowców uzyskano znaczny wgląd w mechanizmy funkcjonowania bakteryjnych białek opiekuńczych, jednak najnowsze doniesienia ukazują również, jak wiele jeszcze pozostaje do odkrycia i zrozumienia, a dalsze wysiłki z pewnością zaowocują ciekawymi odkryciami i spostrzeżeniami, a dalsze wysiłki z pewnością zaowocują ciekawymi odkryciami i spostrzeżeniami.

2. CELE PRACY

Badania profilowania transkryptomu technikami CLIP-seq i RIL-seq wykazały, iż u *E. coli*, *S. enterica* i *N. meningitidis* białka opiekuńcze ProQ i Hfq wiążą w większości inne cząsteczki RNA. Biorąc pod uwagę, że oba mogą wiązać specyficznym Rho-niezależnym terminatorami transkrypcji, powstaje pytanie o czynniki decydujące o tym, z którym białkiem dany RNA będzie oddziaływać za pośrednictwem struktury terminatora.

I. Pierwszym celem pracy jest porównanie pul ligandów RNA białek ProQ i Hfq z *E. coli*, *S. enterica* i *N. meningitidis* w celu weryfikacji, czy cechami wiązanych RNA można wytłumaczyć obserwowane różnice w preferencjach białek. W szczególności postanowiłem zbadać skład sekwencji po stronie 5' struktury spinki terminatorowej w tych cząsteczkach RNA.

II. Drugim celem jest scharakteryzowanie cech RNA zapewniających specyficzną i silną interakcję z białkiem ProQ z *N. meningitidis*. W tej części pracy sprecyzowałem następujące cele szczegółowe:

1. Określenie warunków, w jakich będę prowadzić eksperymenty wiązania RNA z białkiem *N. meningitidis* ProQ
2. Porównanie siły wiązania wybranych cząsteczek RNA z białkiem ProQ z *N. meningitidis*
3. Określenie cech Rho-niezależnego terminatora transkrypcji koniecznych dla silnego oddziaływania RNA z białkiem *N. meningitidis* ProQ. Postanowiłem:
 - a) zbadać zależność między długością 3'-terminalnej sekwencji ogona oligo(U) a powinowactwem RNA do białka ProQ
 - b) sprawdzić znaczenie sekwencji znajdującej się po stronie 5' terminatora dla siły wiązania RNA przez ProQ
 - c) wyznaczyć region struktury spinki terminatorowej ważny w oddziaływaniach z *N. meningitidis* ProQ
 - d) wyjaśnić rolę dodatkowych elementów sekwencji dla wiązania RNA przez ProQ z *N. meningitidis*.

3. MATERIAŁY

3.1 DANE DO ANALIZ *IN SILCO*

Zestaw danych	Źródło
CLIP-seq dla Hfq z <i>S. enterica</i>	(Holmqvist i wsp., 2016)
CLIP-seq dla ProQ z <i>E. coli</i>	(Holmqvist i wsp., 2018)
CLIP-seq dla ProQ z <i>N. meningitidis</i>	(Bauriedl i wsp., 2020)
CLIP-seq dla ProQ z <i>S. enterica</i>	(Holmqvist i wsp., 2018)
RIL-seq dla Hfq <i>E. coli</i>	(Melamed i wsp., 2020)
RIL-seq dla ProQ <i>E. coli</i>	(Melamed i wsp., 2020)
RIP-seq dla Hfq z <i>N. meningitidis</i>	(Heidrich i wsp., 2017)

3.2 SEKWENCJE GENOMOWE

genom	Źródło
Sekwencja genomu <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> K12 MG1655 (NCBI RefSeq accession number NC_000913.3)
Sekwencja genomu <i>N. meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> 8013 (NCBI RefSeq accession number: NC_017501.1)
Sekwencja genomu <i>S. enterica</i>	<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium strain SL1344 (NCBI RefSeq accession number NC_016810.1)

3.3 SZCZEPY BAKTERYJNE

nazwa szczepu bakteryjnego	charakterystyka
<i>E. coli</i> DH5 α	szczep wykorzystywany jako gospodarz podczas klonowania (komórki chemicznie kompetentne)
<i>E. coli</i> BL21 Δ Hfq	szczep w którym prowadzono nadekspresję białka z delecją genu Hfq, Km ^R

3.4 PLAZMIDY

plazmid	charakterystyka
pET-15b	Plazmid ekspresyjny, Amp ^R , promotor T7, His ₆ -tag (Novagen)
pTYB11-ProQMeningo	Źródło sekwencji kodującej białka ProQ z <i>N. meningitidis</i> , otrzymany dzięki uprzejmości prof. Jörga Vogela (Uniwersytet w Würzburgu, Niemcy)

3.5 OLIGONUKLEOTYDY

3.5.1 Oligodeoksyrybonukleotydy wykorzystane w procesie klonowania

starter	sekwencja 3' → 5'
Nm-ProQ-F	cggcggatccg gaaaatctttatttccaatcc ATGACACAAGAAACCGCTT TGGGTGC
Nm-ProQ-R	cggcggatccTTATTCTGCTGCGGAAGATTCGGCTGC

Wyłuszczone sekwencję rozpoznawaną i trawioną przez enzym BamHI; kolor czerwony – sekwencja rozpoznawana przez proteazę TEV

3.5.2 Oligodeoksyrybonukleotydy wykorzystane w reakcji wydłużania starterów (z. ang. *primer extension*, PE)

Na początku sekwencji każdego startera F (z ang. *forward*) dodano sekwencję promotora polimerazy T7 (**TAATACGACTCACTATA**, wyłuszczone czcionką)

starter	sekwencja 3' → 5'
AniS-2U-R	AAGGGGTGGCGGCAGCCACACCCAAACACACACAC
AniS-4U-R	AAAAGGGGTGGCGGCAGCCACACCCAAACACACACAC
AniS-6U-R	AAAAAAGGGGTGGCGGCAGCCACACCCAAACACACACAC
AniS-F	TAATACGACTCACTATAG TTTCCTCTTGATGTGTGTGTGTTGGGT GTGG
AniS-noU-R	GGGGTGGCGGCAGCCACACCCAAACACACACAC
AniS-R	AAAAAAAAGGGGTGGCGGCAGCCACACCCAAACACACACAC
AniS-toA-F	TAATACGACTCACTATAG TTTCCTCTTGATGTGTGTGTGAAAGG GTGTGGCTGC
AniS-toA-R	AAAAAAAAGGGGTGGCGGCAGCCACACCCTTTCACAC
<i>carA</i> -5'UTR-F	TAATACGACTCACTATAG GGTATAGGCACTTGTCCGAAAAGCAC GTTACG
<i>carA</i> -5'UTR-R	AAAAAAAACACGCCGCGCAAGATAGACGCGTAACGTGCTTTTCG GGCA
<i>iga</i> -3'UTR-F	TAATACGACTCACTATAG AAAATACTAAATTCATAGCAAAATAAA ATGCCGTCTGA
<i>iga</i> -3'UTR-R	ATAAAAATGCCGTCTGAAGCCTGAGTTCAGACGGCATTTTATTTTG
<i>iga</i> -92-F	TAATACGACTCACTATAG GACAAATTAATAACAGATTTCGTTTCT AAAATACTAAATTCATAGCAA
<i>iga</i> -92-R	ATAAAAATGCCGTCTGAAGCCTGAGTTCAGACGGCATTTTATTTTG CTATGAATTTAGTATTT
<i>iga</i> -NS-F	TAATACGACTCACTATAG GACAAATTAATAACAGATTTCGTTTCT AAAATACTAA
<i>iga</i> -NS-R	TTTTATTTTGCTATGAATTTAGTATTTTAGAAACGAAT
<i>inter</i> -F	TAATACGACTCACTATAG GATATGCCGAAAGGGGTTTGACGATG CCGCCGTGCGCTGTC
<i>inter</i> -R	AGAAAAAGGGTTTGACAGCGCACGGCGGCATCG
NMnc0006-F	TAATACGACTCACTATAG GCTACTACACAAAGCACCTGAAATTAT

NMnc0006-R	AGACAAAAGCACCCAATAATTTTCAGGTGCTTTGTG
<i>NMV_1189</i> -3'UTR-F	TAATACGACTCACTATAGGTTGAAACAATGCCGTCTGAAGCCTC
<i>NMV_1189</i> -3'UTR-R	AATAATGCCGTCTGAAGAGGCTTCAGACGGCATTGT
<i>NMV_RS07325</i> -3'UTR-F	TAATACGACTCACTATAGGGCATATCAAACAACCGATGCCGTCCG A
<i>NMV_RS07325</i> -3'UTR-R	AAAAGCCGTCCGAAGTCTTCGGACGGCATCGGTTGTTT
NrFF-3'-F	TAATACGACTCACTATAGG CATATACGAGACATACATTCCCTTTTT ATATATCAGATACTCAAACCGAAAC
NrFF-3'-R	ATAAACGCCAAACCCACCGCAAGGTGGGTTTGGCGTTTCGGTTT TGAGTATCTG
<i>pnp</i> -3'ext-F	TAATACGACTCACTATAGTTTACAACCTGCCGCACGGTCTGAAACC CTAACTATGCACATTTCGGATTTTA
<i>pnp</i> -3'ext-R	TATTGTTCTTTCAAATACCGCACTGCTAAAACACTAATAATGCA CACTAAAATCCGAATGTGCATAG
<i>pnp</i> -5'UTR-F	TAATACGACTCACTATAGTTTACAACCTGCCGCACGGTCTGAAACC CTAACTATG
<i>pnp</i> -5'UTR-R	AATAATGCACACTAAAATCCGAATGTGCATAGTTAGGGTTTCAGAC C
RcoF1-F	TAATACGACTCACTATAGGCC GTTAGCTGGTTTCGAGTAGTCAGTT AATAGTTTCTCCTCTATTTCTCC
RcoF1-R	AAAAATGCACACATCCAGTTGAATGTGTGCCAAGTCTACAAAGGA GAAATAGAGGAGAACT
RcoF1-toAU-R	AAAAAAGCACACATCCAGTTGAATGTGTGCTAAGTCTACAAAGGA GAAATAGAGGAGAACT
RcoF1-toUU-R	AAAAAAGCACACATCCAGTTGAATGTGTGCAAAGTCTACAAAGGA GAAATAGAGGAGAACT
<i>rpmG</i> -1UtoA-R	AAAAATGCCTCCGAACAGTCGGAGGCTTTGCTTTC
<i>rpmG</i> -2U-R	AAGCCTCCGAACAGTCGGAGGCTTTGCTTTCAA
<i>rpmG</i> -2UtoA-R	AAAATAGCCTCCGAACAGTCGGAGGCTTTGCTTTC
<i>rpmG</i> -31-F	TAATACGACTCACTATAGCAAAGCCTCCGACTGTTC
<i>rpmG</i> -31-R	AAAAAAGCCTCCGAACAGTCGGAGGCTTTGC
<i>rpmG</i> -33-F	TAATACGACTCACTATAGAG CAAAGCCTCCGACTGTTC
<i>rpmG</i> -35/33-R	AAAAAAGCCTCCGAACAGTCGGAGGCTTTGCTT
<i>rpmG</i> -35-F	TAATACGACTCACTATAGAAAGCAAAGCCTCCGACTGTTC
<i>rpmG</i> -36_tetra-F	TAATACGACTCACTATAGGG ATTTTCAGTTTGAAAGCAAAGCGAAA G
<i>rpmG</i> -36_tetra-R	AAAAAAGCTTTCGCTTTGCTTTCAAAC
<i>rpmG</i> -3UtoA-R	AAATAAGCCTCCGAACAGTCGGAGGCTTTGC
<i>rpmG</i> -3'UTR_długie-R	ATAAAAATAAAAAAGCCTCCGAACAGTCGGAGGCTTTGCTTTCAA A
<i>rpmG</i> -3'UTR-F	TAATACGACTCACTATAGGG ATTTTCAGTTTGAAAGCAAAGCCTCC GA
<i>rpmG</i> -3'UTR-R	AAAAAAGCCTCCGAACAGTCGGAGGCTTTGCTTTCAA

<i>rpmG-40_tetra-F</i>	TAATACGACTCACTATAGGGATTT CAGTTTGAAAGCAAAGCCTGA AAAGG
<i>rpmG-40_tetra-R</i>	AAAAAAGCCTTTTCAGGCTTTGCTTTC
<i>rpmG-44_tetra-F</i>	TAATACGACTCACTATAGGGATTT CAGTTTGAAAGCAAAGCCTC
<i>rpmG-44_tetra-R</i>	AAAAAAGCCTCCTTTCGGAGGCTTTGCTTCAAAGT
<i>rpmG-4U-R</i>	AAAAGCCTCCGAACAGTCGGAGGCTTTGCTTTCAAA
<i>rpmG-7U-R</i>	TAAAAAAGCCTCCGAACAGTCGGAGGCTTTGCTTTCAAA
<i>rpmG-8U-R</i>	ATAAAAAAGCCTCCGAACAGTCGGAGGCTTTGCTTTCAAA
<i>rpmG-95</i>	TAATACGACTCACTATAGATCCG GTTGCCCGCAAACACGTAGTGT ACAAAGAAACCAAAGTAAATAATTT
<i>rpmG-9U-R</i>	AATAAAAAAGCCTCCGAACAGTCGGAGGCTTTGCTTTCAAA
<i>rpmG-noU-R</i>	GCCTCCGAACAGTCGGAGGCTTTGCTTTCAAA
<i>rpmG-NS-F</i>	TAATACGACTCACTATAGATCCGTTGCCCGCAAACACGTAGTGT ACAAAGAAACCA
<i>rpmG-NS-R</i>	TTTCAAAGTAAATAATTTAGTTTGTTTCTTTGTACTACTACG

3.5.3 Oligorybonukleotydy wykorzystane w eksperymentach wiązania RNA przez białko *N. meningitidis* ProQ

RNA	sekwencja 3' → 5'
AniS-31	UUGGGUGUGGCUGCCGCCACCCUUUUUUUUU
AniS-33	GUUUGGGUGUGGCUGCCGCCACCCUUUUUUUUU
AniS-35	GUGUUUGGGUGUGGCUGCCGCCACCCUUUUUUUUU
AniS-37	GUGUGUUUGGGUGUGGCUGCCGCCACCCUUUUUUUUU
AniS-5'blunt	GGGUGUGGCUGCCGCCACCCUUUUUUUUU
<i>rpmG-45</i>	AUUUCAGUUUGAAAGCAAAGCCUCCGACUGUUCGGAGGCUUU UUU
<i>rpmG-5'blunt</i>	AAAGCCUCCGACUGUUCGGAGGCUUUUUUU
<i>rpmG-5'blunt-noA</i>	GCCUCCGACUGUUCGGAGGCUUUUUUU

3.6 ENZYMY

enzym	źródło
BamHI-HF	New England Biolabs
DNaza I	Thermo Fisher Scientific
Ligaza DNA faga T4	Thermo Fisher Scientific
PNK (Kinaza polinukleotydomowa faga T4)	Thermo Fisher Scientific
Polimeraza DNA DreamTag	Thermo Fisher Scientific
Polimeraza DNA Phusion High-Fidelity	Thermo Fisher Scientific
Polimeraza RNA faga T7	Pracownia Biochemii RNA, UAM
proteaza TEV	dr Michał Taube, Zakład Ekspresji Genów, UAM

3.7 ODCZYNNIKI

odczynnik	producent
2-butanol	Chempur
2-βmerkaptioetanol	Sigma Aldrich
Agaroza	Prona
Akrylamid:Bisakrylamid (29:1,19:1)	BioShop
Alkohol etylowy 96 % (etanol 96 %)	Stanlab
Alkohol metylowy 99,9 % (metanol)	Stanlab
APS (nadsiarczan amonu)	BioShop
ATP (adenozyno-5'-trifosforan)	EURx
Błękit bromofenolowy	LAB EMPIRE
Błękit brylantowy (Comassie Brilliant Blue R250)	Sigma Aldrich
BSA (surowicza albumina bydłęca)	BioShop
Chlorek magnezu (MgCl ₂)	Sigma Aldrich
Chlorek sodu (NaCl ₂)	Sigma Aldrich
CTP (Cytidyno-5'-trifosforan)	EURx
deoksyrybonukleotydy (mix)	Thermo Fisher Scientific
Ditiotreitol (DTT)	Sigma Aldrich
EDTA (Kwas etylenodiaminotetraoctowy)	Sigma Aldrich
Fenol:Chloroform:Alkohol izoamylowy (25:24:1)	BioShop
Gene Ruler 1 kb (marker masy DNA)	Thermo Fisher Scientific
Glicerol/Gliceryna	BioShop/Stanlab
GTP (Guanozyno-5'-trifosforan)	EURx
Imidazol	Sigma Aldrich
IPTG (izopropylo-β-D-tiogalaktopiranozyd)	BioShop
Ksylencjanol	Sigma Aldrich
Kwas borowy	BioShop
Kwas octowy lodowaty (99.5 %)	Chempur
Kwas solny 37 %	Stanlab
Midori Green	Nippon Genetics
Mocznik	BioShop
Octan sodu (C ₂ H ₃ NaO ₂)	Sigma Aldrich
Page Ruler Plus (marker masy białek)	Thermo Fisher Scientific
Pożywka płynna/stała LB (LB Broth Miller/LB Agar Miller)	BioShop
SDS (laurylosiarczan sodu)	Sigma Aldrich
Siarczan kanamycyny	Sigma Aldrich
Sól sodowa ampicyliny	Sigma Aldrich
Spermidyna (C ₇ H ₁₉ N ₃)	Sigma Aldrich
Sześciowodny siarczan niklu (II) (NiSO ₄ * 6H ₂ O)	Sigma Aldrich
TEMED (N,N,N',N'-Tetrametyloetylenodiamina)	BioShop

TRIS (2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol)	BioShop
UTP (urydyno-5'-trifosforan)	EURx
γ -32P-ATP (222TBq (6000Ci)/mmol 370MBq (10mCi)/ml)	Hartmann Analytics

3.8 BUFORY

3.8.1 Bufory przygotowywane

Bufor	Skład chemiczny
2x stężony bufor bez soli	100 mM Tris pH 7.5, 20 % glicerol (v/v)
2x stężony bufor do lizy	100 mM Tris pH 7.5, 1 M NaCl, 20 % glicerol (v/v)
2x stężony bufor Laemmli	0,125 M Tris HCl pH 6.8, 4% SDS (w/v), 10% 2-merkaptioetanol (v/v), 20% glicerol (v/v), 0.004% błękit bromofenolowy (w/v)
4x stężony bufor do żelu zagęszczającego (bufor "górny")	1,5 M Tris pH 6.8, 0.4 % SDS (w/v)
4x stężony bufor do żelu rozdzielającego (bufor "dolny")	1,5 M Tris pH 8.8, 0.4 % SDS (w/v)
Bufor A	2x stężony bufor do lizy, 25 mM imidazol
Bufor B	2x stężony bufor do lizy, 600 mM imidazol
Bufor BSA do opłaszczania płytek 96-dołkowych	10 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.0025% BSA (v/v)
Bufor C	2x stężony bufor bez soli, 100 mM M NaCl, 25 mM imidazol
Bufor D	2x stężony bufor bez soli, 2 M NaCl, 25 mM imidazol
Bufor do sączenia (molekularnego)	50 mM Tris pH 7.5, 100 mM EDTA, 300 mM NaCl, 10 % glicerol (v/v)
Bufor TBE (Tris:Kwas Borowy:EDTA)	89 mM Tris pH 8.2, 89 mM kwas borowy, 2 mM EDTA

3.8.2 Bufory komercyjne

Bufor	Producent
10x stężony bufor SDS	Bioshop
6 x Loading buffer (bufor obciążający do elektroforezy agarozowej)	Thermo Fisher Scientific
CutSmart buffer (10 x stężony bufor dla BamHI-HF)	New England Biolabs

DreamTaq buffer (10 x stężony bufor dla polimerazy DNA)	Thermo Fisher Scientific
Phusion High-Fidelity buffer (5 x stężony bufor dla polimerazy DNA)	Thermo Fisher Scientific
PNK buffer A (10 x stężony bufor dla kinazy polinukleotydowej)	Thermo Fisher Scientific

3.8.3 Roztwory

roztwór	skład chemiczny
Roztwór żelu agarozowego	1 % agaroz (w/v), 1 x TBE
Roztwór denaturującego żelu poliakrylamidowego	1x TBE, 8M mocznik, 10% roztworu akrylamid:bisakrylamid 29:1 (v/v)
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")
Roztwór natywnego żelu poliakrylamidowego	1x TBE, 6% roztwór akrylamid:bisakrylamid 19:1 (v/v)
Roztwór barwiący do żeli po SDS-PAGE	0.1 % Comassie błękit brylantowy R250 (w/v), 50% metanol (v/v), 10% kwas octowy (v/v)
Roztwór odbarwiający po SDS-PAGE	40% metanol (v/v), 10% kwas octowy (v/v)

4. METODY

4.1 ANALIZY *IN SILICO*

4.1.1 Analiza składu nukleotydowego sekwencji przylegającej po stronie 5' do struktury Rho-niezależnego terminatora transkrypcji dla danych z eksperymentów CLIP-seq i RIL-seq

Aby przeanalizować skład nukleotydowy sekwencji przylegających do spinek terminatorowych po ich stronie 5' u ligandów białek ProQ z *E. coli*, *S. enterica* i *N. meningitidis* oraz Hfq z *E. coli* i *S. enterica* wykorzystałem dane o miejscach wiązania transkryptomu zgromadzone przez inne zespoły badawcze z wykorzystaniem technologii CLIP-seq i RIL-seq (Holmqvist i wsp., 2018; Holmqvist i wsp., 2016; Melamed i wsp., 2020). Z posortowanych zgodnie z malejącą wartością \log_2FC (logarytmu o podstawie dwa ze zmiany krotności w stosunku do kontroli) list ligandów wybrałem pierwszych 50 RNA, w których pik (sekwencja o najwyższym pokryciu) pokrywała strukturę Rho-niezależnego terminatora transkrypcji lub znajdowała się nie dalej niż 10 nukleotydów w kierunku 5'

od niego. Aby to określić, sekwencja pików została zmapowana do genomu, następnie rozszerzona o 10 pozycji w kierunku 5' oraz 30 w kierunku 3'. Następnie wykonano predykcje struktury drugorzędowej w programie RNAStructure (Reuter i Mathews, 2010) lub w pakiecie ViennaRNA (Lorenz i wsp., 2011). W uzyskanych predykcjach struktury RNA analizowana była 10-nukleotydowa sekwencja przylegająca do spinki terminatorowej. Koniec 3' tej sekwencji zdefiniowałem jako pierwszy nukleotyd znajdujący się naprzeciw (po drugiej stronie struktury spinki) pierwszej reszty urydyny sekwencji ogona oligo(U). Natomiast koniec 5' znajdował się 9 pozycji powyżej końca 3', w konsekwencji dając sekwencję o długości 10 nukleotydów. Wyekstrahowane sekwencje wykorzystano do wygenerowania loga sekwencji przy użyciu programu WebLogo (Crooks i wsp., 2004) dla sześciu zbiorów danych z: RIL-seq dla ProQ i Hfq z *E. coli* (Melamed i wsp., 2020), CLIP-seq dla ProQ z *E. coli* (Holmqvist i wsp., 2018), CLIP-seq dla ProQ i Hfq z *S. enterica* (Holmqvist i wsp., 2018; Holmqvist i wsp., 2016) oraz CLIP-seq dla *N. meningitidis* ProQ (Bauriedl i wsp., 2020). Frekwencja nukleotydów w badanych sekwencjach została zliczona dla każdego zbioru danych i porównana z dystrybucją nukleotydów w całym transkryptomie w teście zgodności χ^2 w środowisku R. W następnym kroku obliczono istotność statystyczną frekwencji nukleotydów dla każdej pozycji w 10-nukleotydowej sekwencji po stronie 5' struktury terminatora w puli ligandów białka ProQ w stosunku do tego samego regionu w puli ligandów Hfq przy użyciu testu dwumianowego w programie pLogo (O'Shea i wsp., 2013). Test dwumianowy „ligandy ProQ vs. ligandy Hfq” dla *E. coli* wykonano na zbiorze danych z RIL-seq (Melamed i wsp., 2020), dla *S. enterica* na zbiorze z CLIP-seq (Holmqvist i wsp., 2018; Holmqvist i wsp., 2016), natomiast dla *N. meningitidis* na danych z CLIP-seq w przypadku ProQ (Bauriedl i wsp., 2020) oraz RIP-seq w przypadku Hfq (Heidrich i wsp., 2017).

4.1.2 Analiza składu nukleotydowego sekwencji przylegającej do struktury Rho-niezależnego terminatora transkrypcji dla danych z eksperymentu RIP-seq

Aby przeanalizować skład nukleotydowy sekwencji przylegających do spinek terminatorowych po ich stronie 5' w ligandach białka Hfq z *N. meningitidis* wykorzystano dane z eksperymentu RIP-seq (Heidrich i wsp., 2017). Listę RNA posortowano zgodnie z malejącą wartością \log_2FC , a następnie, ze względu na brak precyzyjnej informacji o miejscu przyłączenia się białka, przefiltrowano tak, aby zawierała wyłącznie dane o *loci* transkryptów wiązanych przez 3'UTR i sRNA. Są to regiony, gdzie zazwyczaj znajdują się Rho-niezależne terminatory transkrypcji. Następnie sekwencje sRNA pobierano z genomu w całości, natomiast z ligandów wiązanych za pośrednictwem 3'UTR wybrano 10 ostatnich

nukleotydów sekwencji kodującej oraz 50 nukleotydów sekwencji niekodującej znajdującej się w kierunku 3'. Predykcje struktury drugorzędowej wykonano w pakiecie ViennaRNA (Lorenz i wsp., 2011). Wyselekcjonowano 40 pierwszych ligandów posiadających Rho-niezależny terminator transkrypcji i wyekstrahowano 10-nukleotydy sekwencje przylegające do spinki terminatorowej. Tak jako uprzednio, końcem 3' tej sekwencji był pierwszy nukleotyd znajdujący się naprzeciw (po drugiej stronie stronie struktury spinki) pierwszej reszty urydyny ogona oligo(U). Dalsza część analiz tego zbioru danych przebiegała analogicznie do analiz sekwencji uzyskanych w CLIP-seq i RIL-seq (sekcja 4.1.1).

4.1.3 Analiza składu nukleotydowego sekwencji przylegającej do struktury Rho-niezależnego terminatora transkrypcji z losowej próby genów *N. meningitidis*

Z listy loci genomowych *N. meningitidis* wybrano losową próbę ponad 200 genów, a następnie wykonano predykcje struktur drugorzędowych w pakiecie ViennaRNA (Lorenz i wsp., 2011) dla 10 ostatnich nukleotydów sekwencji kodującej oraz kolejnych 50 znajdujących się w kierunku 3'. Następnie wyselekcjonowano 98 pierwszych genów, których transkrypt kończył się Rho-niezależnym terminatorem. Dla wyekstrahowanych 10-nukleotydy sekwencji wykonano taką samą analizę, jak dla danych eksperymentalnych (sekcje 4.1.1 i 4.1.2).

4.2 PRZYGOTOWANIE PREPARATU BIAŁKA ProQ Z *NEISSERIA MENINGITIDIS*

4.2.1 Projektowanie i przygotowanie konstruktów ekspresyjnych

Seqwencję kodującą białka ProQ z *N. meningitidis* wklonowano do plazmidu pET-15b (plazmid ekspresyjny, Novagen) przy wykorzystaniu pojedynczego miejsca restrykcyjnego dla enzymu BamHI. Koniec 5' sekwencji kodującej białka ProQ rozszerzono o sekwencję kodującą ciąg aminokwasów rozpoznawany i trawiony przez proteazę TEV (ENLYFQ↓S). Wykorzystanie tego motywu pozwoliło na usunięcie z sekwencji białka kodowanego w plazmidzie i znajdującego się w fazie odczytu znacznika histydynowego (His₆-tagu) – elementu koniecznego wyłącznie w procesie oczyszczania białka – z pozostawieniem na N-końcu zaledwie jednej dodatkowej reszty seryny. Schemat uzyskanego konstruktów ekspresyjnych przedstawia rysunek 12.



Rysunek 12. Schemat regionu kodującego białko *N. meningitidis* ProQ w konstrukcie ekspresyjnym. SD – sekwencja Shine-Dalgarno, TEV – sekwencja rozpoznawana przez proteazę TEV (ENLYFQ↓S).

4.2.1.1 Amplifikacja sekwencji kodującej w łańcuchowej reakcji polimerazy

Sekwencję kodującą białka ProQ namnożono w łańcuchowej reakcji polimerazy (z ang. *polymerase chain reaction*, PCR) na bazie matrycy pTYB11-ProQMeningo, plazmidu otrzymanego dzięki uprzejmości prof. Jörga Vogela (Uniwersytet w Würzburgu, Niemcy). Na starterze przednim (z ang. *forward*, F) do sekwencji białka ProQ wprowadzono sekwencję kodującą miejsce rozpoznawane i cięte przez proteazę TEV, co umożliwiło późniejsze odcięcie sekwencji His₆-tagu, która ze względu na swój dodatni ładunek elektryczny mogłaby modyfikować wiązanie RNA z białkiem. Do sekwencji obu starterów dodano także sekwencję nukleolitycznie ciętą przez enzym BamHI, co pozwoliło na wklonowanie uzyskanego amplikonu do plazmidu ekspresyjnego pET-15b. Prawidłową ramkę odczytu zachowano dzięki wstawieniu dodatkowej reszty guanozyny. Składniki użyte w reakcji ujęto w tabeli:

Składnik	Stężenie końcowe/ilość/objętość
Bufor stężony 5x (Phusion HF buffer)	1x
Mix deoksyrybonukleotydów (dNTP)	0.2 nM
Starter F (z. ang. <i>forward</i>)	0.5 μM
Starter R (z. ang. <i>reverse</i>)	0.5 μM
Polimeraza Phusion	1 U
pTYB11-MennigoProQ (matryca)	10 ng
Woda miliQ	uzupełniono do 50 μl

Reakcję PCR przeprowadzono w termocyklerze advanced Primus 25 (Peqlab) z programem:

Denaturacja wstępna	98 °C - 30 s	
Denaturacja	98°C - 20 s) x 30
Przyłączanie starterów	63°C - 30 s	
Wydłużanie starterów	72°C - 30 s	
Końcowe wydłużanie produktu	72°C – 10 min	

4.2.1.2 Oczyszczanie produktu PCR po zakończeniu reakcji

Amplikon po zakończeniu reakcji został oczyszczony z wykorzystaniem zestawu PCR Clean-up (Macharey-Nagel) zgodnie z zaleceniami producenta. Mieszaninę reakcyjną wymieszano z 100 μl buforu NTI i zwirowano na kolumnie krzemionkowej (11000 rpm, 1 min). Na złożę nałożono 700 μl buforu NT3 i ponownie zwirowano (11000 rpm, 30 s). Płukanie buforem NT3 powtórzono jeszcze 2 razy. Następnie kolumnę zwirowano przez 2 min przy 11000 rpm aby pozbyć się resztek buforu, a na koniec przeprowadzono elucję 20 μl wody miliQ. Stężenie i czystość produktu PCR zweryfikowano spektrofotometrycznie w aparacie DS-11+ Spectrophotometer (DeNovix). Uzyskany preparat przechowywano w -20°C.

4.2.1.3 Izolacja plazmidu pET-15b

Izolację plazmidu przeprowadzono z użyciem zestawu NucleoSpin Pasmid (Macharey-Nagel) zgodnie z zaleceniami producenta dla plazmidów o niskiej kopijności. 10 ml całonocnej hodowli bakteryjnej szczepu *E. coli* DH5 α /pET-15b w pożywce LB (16 h w 37 °C, 200 rpm) zwirowano przez 5 min przy 5000 obrotów/minutę, po czym usunięto supernatant. Osad bakteryjny zawieszono w 500 μ l buforu A1 i poddano lizie w 500 μ l buforu A2 przez 5 min. Następnie przeprowadzono neutralizację przez dodanie 600 μ l buforu A3. Lizat przeniesiono na kolumnę krzemionkową i zwirowano (1 min, 11000 rpm). Złoże przepłukano 500 μ l buforu AW oraz dwukrotnie 700 μ l buforu A4. Kolumnę zwirowano przez 2 min przy 11000 rpm, aby pozbyć się resztek buforu, a na koniec plazmid eluowano 20 μ l wody miliQ. Uzyskany preparat przechowywano w -20°C.

4.2.1.4 Trawienie restrykcyjne

Produkt PCR oraz plazmid pET-15b poddano trawieniu restrykcyjnemu przy użyciu enzymu BamHI. Składniki użyte w reakcji ujęto w tabeli:

Składnik	Stężenie końcowe/iłość/objętość
Bufor stężony 10x CutSmart	1x
BamHI-HF	5 μ l
DNA	3 μ g
Woda miliQ	uzupełniono do 50 μ l

Probówkę z mieszaniną reakcyjną umieszczono w termobloku (Eppendorf ThermoMixer® C) w 37°C na 3 h. Mieszaninę następnie oczyszczono przy użyciu zestawu PCR Clean-up (Macharey-Nagel) zgodnie z zaleceniami producenta, a strawione DNA zawieszono w 20 μ l wody miliQ. Czystość uzyskanych strawionych preparatów produktu PCR oraz plazmidu pET-15b sprawdzono spektrofotometrycznie. Produkty trawienia przechowywano w -20°C. Ze względu na trawienie pojedynczym enzymem restrykcyjnym pominięto etap oczyszczania strawionego plazmidu z żelu agarozowego.

4.2.1.5 Defosforylacja plazmidu i sprawdzenie wielkości produktów

Strawiony plazmid pET-15b, ze względu na lepkie kompatybilne końce, poddano defosforylacji przy użyciu alkaicznej fosfatazy. 500 ng plazmidu defosforylowano w 37°C przez 1 h, po czym enzym inaktywowano przez 5 min w 75°C. Przed przystąpieniem do ligacji wielkość strawionego amplikonu oraz zlinearyzowanego i defosforylowanego plazmidu potwierdzono nakładając po 5 μ l próbek i markeru masy na 1 % żel agarozowy z dodatkiem barwnika midori green. Elektroforezę prowadzono w temperaturze pokojowej przy napięciu 80 V przez 40 min i wizualizowano w aparacie Gbox (Syngene).

4.2.1.6 Ligacja

Strawiony plazmid i produkt PCR (insert) poddano ligacji. Skład mieszaniny reakcyjnej ujęto w tabeli:

Składnik	Stężenie końcowe/iłość/objętość
Bufor stężony 10x (T4 DNA ligase buffer)	1x
Strawiony i defosforylowany pET-15b	100 ng
Insert (produkt PCR)	w stosunku molarnym 5:1 (wobec plazmidu)
Ligaza T4 DNA ligase	2.5 U
Woda miliQ	uzupełniono do 20 μ l

Reakcję ligacji prowadzono w 22°C przez 3 h, po czym inaktywowano enzym w 70°C przez 5 min.

4.2.2 Techniki mikrobiologiczne

4.2.2.1 Transformacja bakteryjnych komórek chemicznie kompetentnych

Do 50 μ l komórek chemicznie kompetentnych szczepu *E. coli* DH5 α dodano 5 μ l mieszaniny ligacyjnej po inaktywacji fosfatazy i inkubowano na lodzie przez 30 min. Następnie przeprowadzono transformację poprzez szok cieplny – próbkę z bakteriami inkubowano w termobloku w 42°C przez 1 min, po czym umieszczono ponownie na lodzie na 5 min. Do próbki dodano wcześniej podgrzanej do 37°C płynnej pożywki LB i wytrząsano przez 1 h w 37°C przy 300 rpm. Zawiesinę bakteryjną zwirowano przez 30 s przy 11000 rpm, po czym odlano większość supernatantu. W pozostałej części pożywki zawieszono osad, który w kolejnym kroku został przeniesiony na płytkę z agarem LB suplementowanym ampicyliną o stężeniu końcowym 100 μ g/ml. Plazmid pET-15b ma w swej sekwencji gen warunkujący oporność na ten antybiotyk, dzięki czemu na podłożu wyrosną jedynie kolonie powstałe z komórek, które nabyły plazmid podczas transformacji. Zawiesinę bakteryjną równomiernie rozprowadzono po całej powierzchni podłoża i inkubowano przez noc w 37°C.

4.2.2.2 Kolonijny PCR (z ang. colony PCR) – selekcja kolonii, które nabyły konstrukt z wstawionym insertem

Biorąc pod uwagę, że samo pojawianie się kolonii nie gwarantuje, iż bakterie nabyły plazmid z insertem, konieczne było przeprowadzenie selekcji kolonii przez PCR kolonijny (z ang. colony PCR). W takiej reakcji jako matrycy dodaje się odrobiny masy bakteryjnej z kolonii, która ulega lizie podczas wstępnej denaturacji uwalniając tym samym plazmidy. Jako kontrolę negatywną zastosowano pusty (pozbawiony insertu) plazmid pET-15b. Wykorzystane startery były specyficzne wobec sekwencji plazmidu odpowiednio powyżej (starter F) i poniżej (starter R) wklonowanego insertu. Skład mieszaniny reakcyjnej podano w tabeli:

Składnik	Stężenie końcowe/ilość/objętość
Bufor stężony 10x (DreamTaq buffer)	1x
Mix deoksyrybonukleotydów	0.2 nM
Starter F (z. ang. <i>forward</i>)	0.5 μ M
Starter R (z. ang. <i>reverse</i>)	0.5 μ M
Polimeraza DreamTaq	0.5 U
kolonia bakteryjna/pusty plazmid	odrobina masy bakteryjnej/0.1 μ l plazmidu
Woda miliQ	uzupełniono do 50 μ l

Reakcję przeprowadzono w termocyklerze z programem:

Denaturacja wstępna	95 °C – 5min	
Denaturacja	95°C - 30 s	x 30
Przyłączanie starterów	55°C - 30 s	
Wydłużanie starterów	72°C – 90 s	
Końcowe wydłużanie produktu	72°C – 10 min	

Następnie przeprowadzono elektroforezę mieszanin PCR nakładając po 5 μ l próbek i markeru masy na 1 % żel agarozowy z dodanym barwnikiem midori green. Elektroforezę prowadzono w temperaturze pokojowej przy napięciu 80 V przez 40 min i wizualizowano w aparacie Gbox (Syngene). Kolonie z pustym plazmidem dawały produkty identyczne z kontrolą negatywną - o długości 245 zasad, natomiast z kolonii z plazmidem zawierającym insert amplifikowany był produkt o długości 713 zasad. Z kolonii pozytywnych przy użyciu zestawu do izolacji plazmidów NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel) wyizolowano plazmidy, które złożono w Wydziałowej Pracowni Techniki Biologii Molekularnej do zsekwencjonowania metodą Sangera. Poza sprawdzeniem konstruktu pod kątem potencjalnych mutacji pozwoliło to także na weryfikację, czy insert jest w prawidłowej orientacji. Ze względu na zastosowanie pojedynczego miejsca restrykcyjnego podczas klonowania szanse na odpowiednią orientację wynosiły 50 %.

4.2.2.3 Nadekspresja białka w hodowli bakteryjnej

Po potwierdzeniu prawidłowości konstruktów ekspresyjnych, transformowano nim szczep *E. coli* BL21 Δ Hfq (otrzymany dzięki uprzejmości prof. Agnieszki Szalewskiej-Pałasz z Uniwersytetu Gdańskiego) zgodnie z procedurą opisaną w sekcji 4.2.2.1. Szczep ten posiada delecję genu białka Hfq – w jego miejsce ma wstawiony gen warunkujący oporność na kanamycynę. Samo Hfq wykazuje tendencję do oczyszczania się wraz z białkiem docelowym i podobnie jak *N. meningitidis* ProQ jest białkiem silnie wiążącym RNA. Zatem nawet jeśli będzie obecne w śladowej ilości w finalnym preparacie, może interferować podczas eksperymentów wiązania RNA, fałszując tym samym wyniki.

Aby sprawdzić, czy ekspresja białka zachodzi prawidłowo przeprowadzono nadekspresję próbną. 10 ml pożywki LB z dodatkiem antybiotyków (100 μ g/ml ampicyliny

i 50 µg/ml kanamycyny) zaszczerpiono pojedynczą kolonią transformanta *E. coli* BL21ΔHfq zawierającego konstrukt ekspresyjny i inkubowano przez noc (37°C, 180 rpm). 1 ml hodowli nocnej przeniesiono do kolbki z 100 ml pożywki LB z dodatkiem antybiotyków. Hodowlę prowadzono w 37°C przy 180 rpm aż do uzyskania OD₆₀₀ ~ 0.6. Pobrano próbkę zawiesiny bakterii, zwirowano (1 min, 11000 rpm), a osad zachowano do późniejszego porównania. Zaindukowano nadekspresję białka przez dodanie roztworu IPTG do końcowego stężenia 1 µM. Temperaturę obniżono do 30°C. Po 3 h nadekspresji ponownie zmierzono OD₆₀₀, pobrano próbkę zawiesiny odpowiadającą gęstością próbce pobranej przed indukcją nadekspresji i zwirowano. Oba osady denaturowano w 90°C przez 10 min, po czym poddano rozdzielni elektroforetycznemu w 30% żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE). Rozdział prowadzono w temperaturze pokojowej przy napięciu 120 V aż do całkowitego rozwinięcia. Żel barwiono barwinkiem Laemmli przez noc, a następnie odbarwiono roztworem odbarwiającym (10 % kwas octowy i 40 % metanol). Prążek białka o masie ok. 19 kDa odpowiadający białku ProQ z *N. meningitidis* zawierającym His₆-tag był obecny wyłącznie w próbce po nadekspresji.

Nadekspresję na większą skalę służącą do właściwej procedury oczyszczania białka przeprowadzono analogicznie do nadekspresji testowej po przeliczeniu wszystkich objętości na 3 L hodowli. Po 3 h od dodania IPTG kulturę bakteryjną schłodzono na lodzie i zwirowano (4°C 5500 rpm, 10min). Odlano supernatant, osad bakteryjny zawieszono w buforze do lizy 1x (100 mM Tris 7.5, 1 M NaCl, 20 % glicerol) i przeniesiono do 50 ml falkonu. Falkon z osadem zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C.

4.2.3 Procedura oczyszczania białka ProQ z *N. meningitidis*

4.2.3.1 Liza osadu bakteryjnego

Osad bakteryjny rozmrożono w zlewce zawierającej wodę z lodem od czasu do czasu mieszając. Do płynnego osadu dodano 1 ml inhibitorów proteaz (Roche), aby uchronić białko przed degradacją ze strony enzymów proteolitycznych. Osad poddano sonikacji w pokoju chłodniczym, przez całą procedurę trzymając falkon na lodzie. Sonikację (w aparacie Vibra Cell, Sonics) prowadzono przez 8 30-sekundowych cykli, co 2 cykle mieszając lizat przez inwersję falkonu. Lizat bakteryjny zwirowano w 4°C przy 26000 rpm (wirówka Avanti J-30, Beckman Coulter).

4.2.3.2 Chromatografia metalopowinowactwa – I etap na kolumnie HisTrap

Dzięki zawartemu w N-terminalnej części białka znacznikowi histydynowemu możliwe było wykorzystanie jego powinowactwa do wzbogaconego w nikiel złoża kolumny HisTrap ff

crude 5 ml (Cytiva), co pozwoliło na oczyszczanie białka w systemie ÄKTA Pure (GE Healthcare).

Supernatant po sonikacji i wirowaniu nałożono manualnie na kolumnę HisTrap ff crude 5 ml. Przesącz zachowano. Kolumnę podłączono do systemu ÄKTA Pure w 4°C i przemywano buforem A w 5 cV (objętości kolumny, z ang. *column volume*) przy przepływie 1ml/min, a następnie przeprowadzono płukanie w gradiencie imidazolu (25 mM do 600 mM, z buforu A do buforu B). Wiążąc nikiel imidazol wypłukuje wcześniej związane z niklem za pośrednictwem His₆-tagu białko. Na koniec kolumnę kalibrowano 5 cV buforu A do późniejszego użytku. W trakcie procesu płukania zbierano wszystkie frakcje. Dzięki pomiarowi absorbancji przy 280 nm w czasie rzeczywistym z frakcji odpowiadających pikowi absorbancji pobrano próbki do późniejszego sprawdzenia na żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE).

4.2.3.3 Chromatografia powinowactwa – etap na kolumnie heparynowej

Aby z preparatu białka usunąć pozostałości kwasów nukleinowych wykorzystano kolumnę heparynową HiTrap heparin 1 ml (Cytiva). Posiada ona złożę wzbogacone w ujemnie naładowaną heparynę wiążącą dodatnio naładowane białka, pozwalając jednocześnie na swobodny przepływ kwasów nukleinowych podczas chromatografii w systemie ÄKTA Pure. Elucja białka następuje poprzez zastosowanie gradientu roztworu o wysokiej sile jonowej, w tym wypadku NaCl.

Po pierwszym etapie na kolumnie HisTrap białko znajdowało się w roztworze o 500 mM NaCl, dlatego najpierw rozcieńczono je 1x stężonym buforem bez soli (50 mM Tris 7.5, 10 % glicerol) do końcowego stężenia 100 nM. Roztwór zagęszczono na filtrze Amicon 10000 MWCO (Sigma Aldrich) (6000 rpm, RT) i manualnie nałożono na kolumnę HiTrap heparin. Kolumnę podłączono do systemu ÄKTA Pure i przeprowadzono wstępne płukanie buforem C w 5 cV (0.5 ml/min). Następnie przeprowadzono elucję w gradiencie NaCl (100 mM do 2000 mM NaCl, z buforu C do buforu D) w 20 cV (0.5 ml/min). Na koniec kolumnę kalibrowano 5 cV buforu C. Frakcje z całego procesu zbierano. Dzięki pomiarowi absorbancji przy 280 nm i 254 nm w czasie rzeczywistym z frakcji odpowiadających pikowi absorbancji do kolejnego etapu wybrano wyłącznie te o niskiej zawartości kwasów nukleinowych. Pobrano również próbki do późniejszego sprawdzenia na żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE).

4.2.3.4 Usunięcie znacznika histydynowego - trawienie proteazą TEV

Na tym etapie procesu oczyszczania białko ProQ zawierało już niepotrzebny His₆-tag, za którym znajdowała się sekwencja rozpoznawana i cięta przez proteazę TEV (ENLYFQ↓S).

Aby go usunąć, przeprowadzono trawienie proteazą TEV (otrzymaną dzięki uprzejmości dra Michała Taube z Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza) – dodano enzymu w stosunku $OD_{280} = 1$ (TEV) do $OD_{280} = 50$ (ProQ) oraz DTT do końcowego stężenia 1mM, po czym inkubowano przez noc w 4°C.

4.2.3.5 Chromatografia metalopowinowactwa – II etap na kolumnie HisTrap

Zastosowana w poprzednim etapie proteaza TEV także posiadała His₆-tag w swej sekwencji, co pozwoliło na jej usunięcie z preparatu wraz z wytrawionym His₆-tagiem z oczyszczanego białka poprzez ponowne wykorzystanie wykalibrowanej kolumny HisTrap ff crude 5 ml. Roztwór po trawieniu manualnie nałożono na kolumnę HisTrap i przepłukano 8 cV buforu A. Przesącz zawierający pozbawione His₆-tagu białko ProQ frakcjonowano po 2 ml. Następnie przeprowadzono elucję związanej proteazy TEV oraz odciętego His₆-tagu 4 cV buforu B (z wysoką zawartością imidazolu). Przesącz zachowano. Wielkość białek w pobranych próbkach sprawdzono na żelu poliakrylamidowym, a frakcje zawierające prążki odpowiadające masie białka *N. meningitidis* ProQ (15.614 kDa) połączono i zachowano do dalszych etapów oczyszczania.

4.2.3.6 Sączenie molekularne

Ostatnim etapem oczyszczania białka było sączenie molekularne (ang. *size exclusion chromatography*) na kolumnie HiLoad 16/600 Superdex 200 pg w systemie ÄKTA Pure. Roztwór białka nałożono na zainstalowaną kolumnę Superloop. W przepływie buforu do sączenia (0.2 ml/min) białko z Superloop nałożono na kolumnę Superdex. Procedurę przeprowadzono w 1.2 cV buforu do sączenia (0.5 ml/min, 4°C). W tym czasie większe białka, nie wchodząc w strukturę złoża, przepływały szybciej, a małe wolniej, co pozwoliło na ich rozdzielenie. Frakcje odpowiadające pikowi absorbancji (A_{280}) z sączenia zebrano i sprawdzono na żelu poliakrylamidowym pod kątem oczekiwanej wielkości.

Frakcje połączono i zmierzono absorbancję preparatu w kuwecie kwarcowej przy 280 nm. Z wyznaczonego teoretycznie na podstawie sekwencji aminokwasów współczynnika ekstynkcji obliczono stężenie białka przy użyciu przekształconego równania Beera- Lamberta: $c = A/\epsilon b$, gdzie c to stężenie białka, A – absorbancja, ϵ – współczynnik ekstynkcji i b – długość ścieżki. Aby uchronić preparat przed spadkiem aktywności przez wielokrotne rozmrażanie i zamrażanie, roztwór białka rozdzielono na 10 μ l porcje do probówek PCR, zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C.

4.2.4 Przygotowanie cząsteczek RNA

4.2.4.1 Oczyszczanie oligonukleotydów

Syntetyczne oligonukleotydy RNA oraz służące w reakcji PE (z ang. *primer extension*, wydłużanie starterów) oligonukleotydy DNA były oczyszczane z pozostałości po syntezie w ten sam sposób – w denaturującym żelu akrylamidowym (z dodatkiem mocznika). Liofilizat (Sigma-Aldrich/Metabion) rozpuszczano w wodzie miliQ do końcowego stężenia 500 μM . 12 μl rozpuszczonych oligonukleotydów dodawano do 8 μl mocznika 8 M i denaturowano w termobloku w 90°C przez 2 min. Rozdział prób i markera masy prowadzono w 10 % żelu poliakrylamidowym przy mocy 17 W w buforze 1x TBE aż do pełnego rozwinięcia. Obraz elektroforezy wizualizowano na płycie kwarcowej TLC przy naświetlaniu UV o długości fali 254 nm. Prążki z oligonukleotydami wycinano z żelu i przenoszono do 500 μl buforu do elucji. Probówki wytrząsano przez noc (4°C, 300 rpm). Następnie eluent przenoszono do probówek z 1.5 ml 96 % etanolu i inkubowano przez 1h w -80°C. Wytrącone oligonukleotydy wirowano przez 40 min (4°C, 14000 rpm). Osad suszono, zawieszano w 50 μl wody miliQ i przechowywano w -80°C.

4.2.4.2 Reakcja *primer extension* (wydłużanie starterów)

Reakcja *primer extension* (PE, wydłużanie starterów) jest modyfikacją standardowej reakcji PCR, w której funkcję matrycy pełnią częściowo komplementarne startery (a dokładnie ich ok. 20-nukleotydowa sekwencja 3'-terminalna). Dzięki temu oligonukleotydy są wydłużane w obu kierunkach dając końcowy produkt reakcji. W tym wypadku końcowym produktem były matryce do transkrypcji *in vitro* przy użyciu polimerazy T7, dlatego też przed sekwencją pożądanego RNA wprowadzono sekwencję promotora T7. Składniki reakcji PE ujęto w tabeli:

Składnik	Stężenie końcowe/objętość
Bufor stężony 10x (DreamTaq buffer)	1x
Mix deoksyrybonukleotydów	0.2 nM
Starter F (z. ang. <i>forward</i>)	1.5 μM
Starter R (z. ang. <i>reverse</i>)	1.5 μM
Polimeraza DreamTaq	0.05 U
Woda miliQ	uzupełniono do 200 μl

Reakcję PCR prowadzono w termocyklerze z następującym programem:

Denaturacja wstępna	94 °C – 2 min	
Denaturacja	94°C - 75 s) x 7
Przyłączanie starterów	55°C – 2 min	
Wydłużanie starterów	72°C – 2 min	
Końcowe wydłużanie starterów	72°C – 10 min	

Mieszaninę reakcyjną poddano ekstrakcji z użyciem roztworu fenol:chloroform:alkohol izoamylowy (25:24:1) w stosunku 1:1. Fazę wodną (górną) poddano precypitacji w roztworze z 3 objętościami 96 % etanolu i 0.1 objętości 3 M octanu sodu w temperaturze -80°C przez 1 h. Wytrącone DNA zwirowano (40 min, 4°C , 14000 rpm), a osuszony osad zawieszono w 50 μl wody miliQ.

4.2.4.3 *Transkrypcja in vitro*

Na matrycy z produktu reakcji wydłużania starterów przeprowadzano transkrypcję *in vitro*. Matrycę denaturowano przez 5 min w 90°C , po czym renaturowano w takim samym czasie w temperaturze pokojowej. Następnie dodano pozostałych reagentów. Pełny skład mieszaniny reakcyjnej ujęto w tabeli:

Składnik	Ilość/stężenie końcowe/objętość
Bufor stężony 10x Txn	1x
Matryca (produkt reakcji PE)	10 μl
Guanozyna	2 mM
CTP	4 mM
UTP	4 mM
GTP	4 mM
ATP	4 mM
MgCl ₂	18 mM
Polimeraza T7	9 μg
DTT	25 mM
Woda miliQ	Uzupełniono do 100 μl

Transkrypcję prowadzono przez 3 h (37°C , 300 rpm). Do próbówki z mieszaniną reakcyjną dodano 3 objętości etanolu 96 %, 10 μl 3 M octanu sodu oraz 33.3 μl 100 mM EDTA i strącano przez 1 h w -80°C . Wytrącone RNA zwirowano (40 min, 4°C , 14000 rpm). Osuszony osad zawieszono w 30 μl 8M mocznika, po czym poddano denaturacji w 90°C przez 2 min. Następnie oczyszczono z wykorzystaniem denaturującego żelu poliakrylamidowego w sposób analogiczny do oczyszczania oligonukleotydów (sekcja 4.2.4.1). Stężenie i czystość uzyskanego w procesie transkrypcji *in vitro* RNA mierzono spektrofotometrycznie.

4.2.4.4 *Znakowanie RNA radioizotopem fosforu*

Na potrzeby eksperymentu EMSA (z ang. *electromobility shift assay*) wykonano znakowanie cząsteczek RNA radioaktywnym izotopem fosforu ^{32}P , co pozwoliło na późniejszą wizualizację wyników doświadczenia. Radioznakowanie polega na wykorzystaniu kinazy do przeniesienia radioaktywnej grupy fosforanowej z ATP na wolną grupę hydroksylową na końcu 5' RNA. Składniki reakcji ujęto w tabeli:

Składnik	Ilość/stężenie końcowe
Bufor stężony 10x A buffer	1x
RNA	1000 ng
^{32}P - γ -ATP	1 μl
Kinaza T4 PNK	1 U
Woda miliQ	uzupełniono do 20 μl

Mieszaninę reakcyjną inkubowano w termobloku w 37°C przez 1 h. Na ostatnie 15 min do próbki dodano 3 µl DNazy I (U/µl), aby pozbyć się resztek DNA. W kolejnym kroku dodano 20 µl wody miliQ, a następnie przeprowadzono ekstrakcję użyciem 40 µl roztworu fenol:chloroform:alkohol izoamylowy (25:24:1). Fazę wodną przeniesiono do 20 µl 8 M mocznika, zmieszano i oczyszczono z wykorzystaniem denaturującego żelu poliakrylamidowego w sposób analogiczny do oczyszczania oligonukleotydów (sekcja 4.2.4.1).

4.2.5 Wyznaczanie wartości stałej równowagi dysocjacji w eksperymencie wiązania RNA z białkiem *N. meningitidis* ProQ

Wartość stałej równowagi dysocjacji (z ang. *dissociation constant*, K_d) wyznaczano podczas wiązania RNA z białkiem ProQ z *N. meningitidis* przy użyciu techniki EMSA (z ang. *electromobility shift assay*, różnicowa migracja kompleksów w żelu poliakrylamidowym). Stałą równowagi dysocjacji to liczbowy wskaźnik reakcji chemicznej w stanie równowagi (tu tworzenia kompleksów RNA z białkiem ProQ), a jej wartość wyraża stosunek stężeń produktów reakcji do stężeń substratów w punkcie równowagi. W niniejszej pracy wyrażana jest w nM i odpowiada stężeniu białka ProQ, jakie w eksperymencie wiązało połowę dostępnego RNA. Im K_d ma niższą wartość, tym silniejsze wiązanie opisuje. Stałą równowagi dysocjacji w dalszej części pracy określam jako stałą dysocjacji lub K_d .

Przygotowano roztwór znakowanego radioizotopem fosforu RNA w 1x stężonym buforze do wiązania (stężenia końcowe RNA 2 nM, 25 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 5% glicerol) podobnie jak szereg dwukrotnych rozcieńczeń białka. W kolejnym kroku na 96-dołkowej płytce niewiążącej białek (Eppendorf *non-binding*, dodatkowo opłaszczonej 0.0025% BSA) zmieszano po 10 µl roztworów RNA i białka i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 30 min. 5 µl mieszaniny reakcyjnej nakładano na natywny 6% żel poliakrylamidowy (akrylamid:bisakrylamid 19:1) i prowadzono rozdział elektroforetyczny w buforze 0.5 x TBE przy mocy 8 W przez 1 h. Następnie żele przenoszono na bibułę Whatman i pokrywano folią stretch. Tak zabezpieczone żele umieszczano w suszarce Gel Dryer 583 (Bio-Rad) podłączonej do pompy próżniowej (LabPort N840) aż do całkowitego wysuszenia. Wysuszone na bibule żele przenoszono do hiperkasy (Fuji) i nakrywano ekranem fosforowym (Fuji). Ekspozycję prowadzono przynajmniej przez 1 noc, a następnie czytywano przy użyciu skanera Amersham Typhoon (GE Healthcare). Wyniki eksperymentu zliczano w programie MultiGauge 3.0 (Fuji). Po wykonaniu koniecznych obliczeń dane dopasowywano w programie GraphPad do równania kwadratowego w celu wyznaczenia wartości K_d :

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

Y - frakcja związana, Δ - różnica między górnym a dolnym plateau, Y_0 - dolne plateau, $[E]_0$ – stężenie RNA, $[S]_0$ stężenie białka ProQ, K_d – stała równowagi dysocjacji

Każdy eksperyment wykonywano w trzech niezależnych powtórzeniach.

5. WYNIKI

Pracę podzieliłem na dwie części. W pierwszej (część 5.1) postanowiłem przeanalizować sekwencje RNA zidentyfikowanych w eksperymentach profilowania transkryptomu, w których wykryto naturalne ligandy białek ProQ i Hfq. Dane dla *E. coli* pochodzą z eksperymentów typu CLIP-seq i RIL-seq przeprowadzonych odpowiednio w laboratoriach prof. Jörga Vogela (Uniwersytet w Würzburgu, Niemcy) (Holmqvist i wsp., 2018; Holmqvist i wsp., 2016) oraz prof. Giseli Storz (National Institutes of Health, Bethesda, USA) (Melamed i wsp., 2020). Dane z CLIP-seq u *S. enterica* uzyskane zostały przez zespół prof. Vogela (Holmqvist i wsp., 2018; Holmqvist i wsp., 2016). Natomiast dane dla *N. meningitidis* pochodzą z CLIP-seq w przypadku ProQ (Bauriedl i wsp., 2020) i RIP-seq dla Hfq (Heidrich i wsp., 2017), które również przeprowadzono w laboratorium prof. Vogla w Würzburgu. Fakt, że oba białka mogą wiązać swoje ligandy za pośrednictwem Rho-niezależnego terminatora transkrypcji przy zachowaniu w większości odrębnych pul wiązanych RNA pozwala zadać pytanie w jaki sposób ProQ i Hfq je rozróżniają. Odpowiedzi postanowiłem poszukać w potencjalnych różnicach w charakterystyce struktur terminatorowych z regionów 3'UTR i sRNA w pulach RNA wiązanych przez oba białka.

W drugiej części pracy (5.2) zbadalem właściwości, dzięki którym Rho-niezależny terminator transkrypcji, wiąże się specyficznie i z wysokim powinowactwem z białkiem *N. meningitidis* ProQ. Badania Ewy Stein z naszej pracowni pozwoliły na poznanie cech terminatora koniecznych dla wiązania białka ProQ z *E. coli*. Białka ProQ z tych bakterii różnią się zarówno ogólną architekturą jak i sekwencją aminokwasową domeny FinO, jednocześnie jednak oba mogą wiązać liczne RNA w komórce, a struktura terminatora wydaje się być głównym rozpoznawanym motywem. Bliższe poznanie podstaw interakcji białka ProQ ze strukturą spinki terminatorowej i sekwencji przyległych będzie krokiem w stronę zrozumienia mechanizmów jego działania. ProQ z *E. coli* (oraz blisko spokrewnionej *S. enterica*) i *N. meningitidis* są jedynymi poznanymi globalnymi regulatorami (tj. wiążącymi liczne RNA) z rodziny FinO, a zbadanie cech wiązania między RNA i *N. meningitidis* ProQ pozwoli także na bezpośrednie porównanie motywów rozpoznawanych przez te białka.

5.1 ANALIZA *IN SILICO* MOTYWÓW ZLOKALIZOWANYCH W sRNA ORAZ REGIONACH 3'UTR RNA ROZPOZNAWANYCH PRZEZ BIAŁKA ProQ I Hfq

5.1.1 Region po stronie 5' spinki terminatorowej ligandów białek ProQ i Hfq

Na potrzeby analizy zdefiniuję w tym miejscu kilka przydatnych terminów, które ułatwią opisanie wyników:

pik – z eksperymentów typu RIL-seq i CLIP-seq to region RNA o najwyższym pokryciu w danych, odpowiada sekwencji liganda który najczęściej był związany z białkiem po naświetlaniu światłem UV, w pewnym uproszczeniu odpowiada regionowi przyłączenia białka.

najlepsze ligandy – RNA z górnej części listy ligandów posortowanej zgodnie z malejącym wzbogaceniem w stosunku do kontroli (malejącą wartością \log_2FC - logarytmu o podstawie dwa ze zmiany krotności w stosunku do kontroli).

para bazalna – pierwsza para zasad u podstawy spinki terminatorowej, w której nie uczestniczą reszty urydyny 3'-terminalnej sekwencji ogona oligo(U); przeważnie pary GC/CG, rzadziej UA.

O białkach ProQ i Hfq wiadomo, iż jednym z motywów jakie rozpoznają i wiążą są Rho-niezależne terminatory transkrypcji powszechnie występujące w cząsteczkach sRNA oraz regionach 3'UTR (Holmqvist i wsp., 2018; Holmqvist i wsp., 2016; Melamed i wsp., 2020; Melamed i wsp., 2016). Co ciekawe, pomimo powszechności i zbliżonego ogólnego planu budowy Rho-niezależnych terminatorów, oba białka zarówno w przypadku *Escherichia coli* jak i *Neisseria meningitidis* wiążą zasadniczo odrębne pule cząsteczek RNA pochodzących z tych regionów (Bauriedl i wsp., 2020; Heidrich i wsp., 2017; Melamed i wsp., 2020). Wskazuje to, że w samych terminatorach lub sekwencjach sąsiadujących znajdują się pewne cechy pozwalające na preferencyjne wiązanie z któryś z białek. Białko Hfq wykazuje wysokie powinowactwo do sekwencji bogatych w reszty urydyny, a więc m.in. do ogonów oligo(U) Rho-niezależnych terminatorów transkrypcji (Schu i wsp., 2015). Jak dotąd nie znaleziono żadnych motywów w sekwencji RNA specyficznie rozpoznawanych przez białko ProQ, może za wyjątkiem 3'-terminalnej sekwencji ogona oligo(U), który jednak podczas wiązania przez ProQ praktycznie zawsze występuje w sąsiedztwie struktury drugorzędowej, jaką jest struktura typu spinki terminatora transkrypcji (Melamed i wsp., 2020). Badania *in vitro* wykazały, że zarówno obecność ogona oligo(U) jak i poprzedzającej go stabilnej struktury spinki terminatorowej są kluczowe dla oddziaływania cząsteczki RNA z białkiem ProQ u *E. coli* (Stein i wsp., 2020). Ponadto zaobserwowano, iż RNA, które rozpoznaje ProQ przez inne motywy niż Rho-niezależne terminatory są również bogate w regiony o stabilnej strukturze drugorzędowej (Smirnov i wsp., 2016). Z tego względu można skłaniać się ku stwierdzeniu, że motywy rozpoznawane przez białko ProQ są związane bardziej ze strukturą RNA niż jego sekwencją (Holmqvist i wsp., 2018).

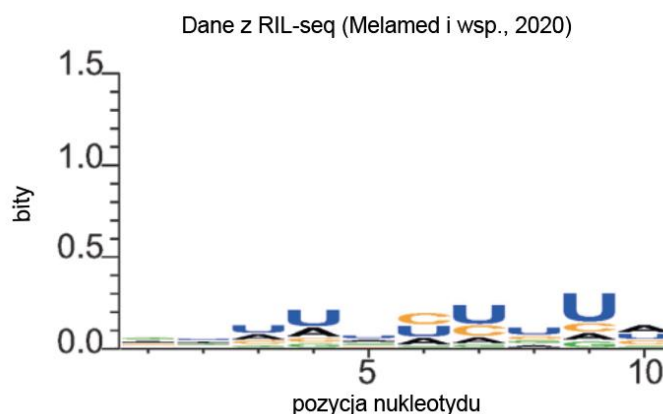
W pracy zdecydowałem przyjrzeć się wcześniej niebadanym sekwencjom po stronie 5' struktur typu spinki Rho-niezależnych terminatorów transkrypcji u ligandów wiązanych przez białka ProQ i Hfq z bakterii *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* i *Neisseria meningitidis*.

Rysunek 13. Sekwencja po stronie 5' struktury spinki terminatorowej najlepszych ligandów RNA wiązanych przez białko *E. coli* ProQ jest wzbogacona w reszty adenozyiny. (A) Analizowana sekwencja – zielona wytłuszczona czcionka, błękitna ramka – para bazalna, (B) logo sekwencji dziesięciu nukleotydów przystających do strony 5' struktury spinki terminatorowej przy założeniu niesparowanych reszt ogona oligo(U) wygenerowane dla 50 ligandów o najwyższej wartości \log_2FC zawierających w swej strukturze Rho-niezależny terminator transkrypcji na końcu 3', $p < 2.2 \times 10^{-16}$. Na podstawie danych otrzymanych przez Melameda i współpracowników w eksperymencie RIL-seq u *Escherichia coli* (Melamed i wsp., 2020). (C) Na podstawie danych otrzymanych przez Holmqvista i współpracowników w eksperymencie CLIP-seq u *Escherichia coli* (Holmqvist i wsp., 2018). Pozycja numer 10 odpowiada pozycji bezpośrednio przylegającej do bazalnej pary struktury typu spinki Rho-niezależnego terminatora transkrypcji z niesparowanym ogonem oligo(U). Loga wygenerowane przy użyciu WebLogo (Crooks i wsp., 2004). Na podstawie Stein i wsp., 2020 (zmodyfikowano).

Podsumowując, uzyskane wyniki dla zbiorów danych pochodzących z dwóch różnych eksperymentów profilowania transkryptomu cechują się wysoką zgodnością wskazując wyższą frekwencję reszt adenozyiny w sekwencji po stronie 5' spinki terminatorowej w RNA wiązanych przez białko ProQ z *E. coli*.

5.1.3 Analiza ligandów białka Hfq z *E. coli*

Aby sprawdzić, czy między ligandami białek ProQ i Hfq występują różnice potencjalnie będące wyjaśnieniem, dlaczego oba białka wiążą w większości odrębne pule RNA, przeanalizowałem dane z RIL-seq (Melamed i wsp., 2020) dla regionów po stronie 5' spinki terminatorowej dla pięćdziesięciu ligandów białka *E. coli* Hfq o najwyższej wartości \log_2FC zawierających w swej strukturze Rho-niezależny terminator transkrypcji. Analiza wykazała zwiększoną frekwencję reszt urydyny (uwzględniono wyłącznie ligandy, w których pik nie znajdował się dalej niż 10 nukleotydów w kierunku 5' od terminatora transkrypcji, $p = 6.5 \times 10^{-12}$). Jednakże ich stosunek do innych nukleotydów nie jest aż tak wyraźny, jak przewaga reszt adenozyiny na pozycjach najbliższych podstawie struktury spinki terminatorowej wśród ligandów białka *E. coli* ProQ (rys. 14) (Stein i wsp., 2020).

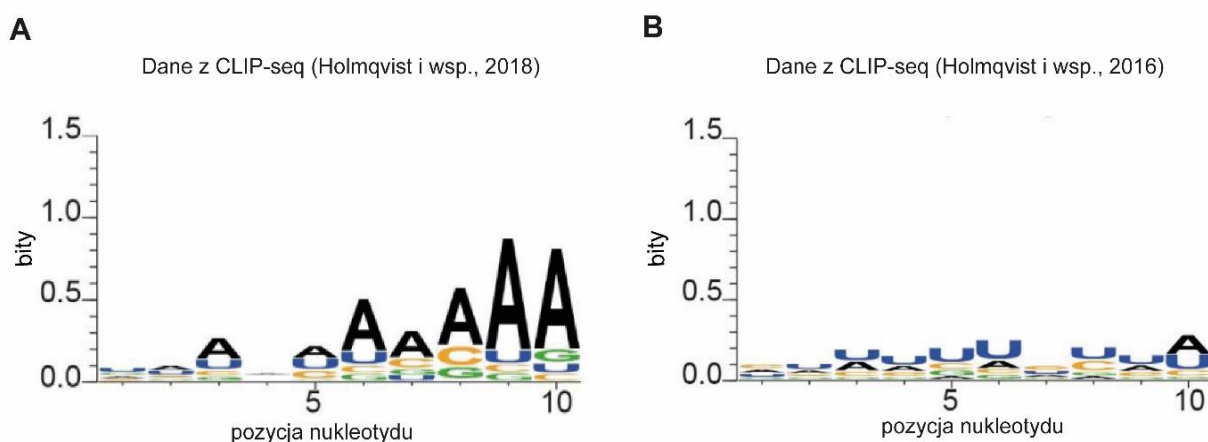


Rysunek 14. Sekwencja po stronie 5' struktury spinki terminatorowej najlepszych ligandów RNA wiązanych przez białko *E. coli* Hfq jest wzbogacona w reszty urydyny. Logo sekwencji dziesięciu nukleotydów przystających do strony 5' struktury typu spinki wygenerowane dla 50 ligandów o najwyższej wartości \log_2FC zawierających w swej strukturze Rho-niezależny terminator transkrypcji na końcu 3', $p < 6.5 \times 10^{-12}$. Dane otrzymane przez Melameda i współpracowników w eksperymencie RIL-seq u *Escherichia coli* (Melamed i wsp., 2020). Pozycja numer 10 odpowiada pozycji bezpośrednio przylegającej do bazalnej pary struktury typu spinki Rho-niezależnego terminatora transkrypcji z niesparowanym ogonem oligo(U). Logo wygenerowane przy użyciu WebLogo (Crooks i wsp., 2004). Na podstawie Stein i wsp., 2020 (zmodyfikowano).

Podsumowując, frekwencja nukleotydów w sekwencjach przyległych do spinki terminatorowej po jej stronie 5' dla najlepszych ligandów białka *E. coli* Hfq, w odróżnieniu od wzbogaconych w adenozyne ligandów ProQ, wskazuje niewielką, jednak statystycznie istotną przewagę urydyny w omawianym regionie.

5.1.4 Analiza ligandów białek ProQ i Hfq z *S. enterica*

W celu zbadania, czy obserwowana u *E. coli* różnica w kompozycji sekwencji bezpośrednio poprzedzających strukturę Rho-niezależnego terminatora transkrypcji wśród ligandów białek ProQ i Hfq występuje także u blisko spokrewnionej bakterii *S. enterica*, wykonałem identyczną analizę danych zebranych w dwóch eksperymentach CLIP-seq przez Holmqvist i współpracowników (Holmqvist i wsp., 2018; Holmqvist i wsp., 2016). Uzyskane wyniki wyraźnie wskazują na wzbogacenie w adenozyne regionów przylegających do Rho-niezależnego terminatora po stronie 5' wśród RNA oddziałujących z ProQ, przy czym wzbogacenie to wydaje się jeszcze bardziej wyraźne niż w przypadku *E. coli* (Stein i wsp., 2020). Podobnie do ligandów białka Hfq z *E. coli*, RNA wiązane przez Hfq z *S. enterica* cechują się w tym regionie wzbogaceniem w urydynie (rys. 15).



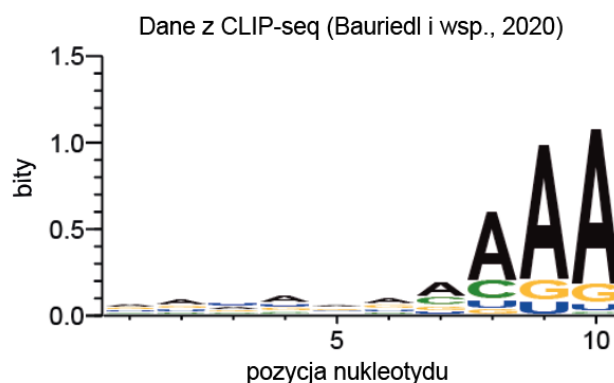
Rysunek 15. Sekwencja po stronie 5' struktury spinki terminatorowej najlepszych ligandów RNA wiązanych przez białko *S. enterica* ProQ jest wzbogacona w reszty adenozyiny, podczas gdy ligandy białka Hfq wykazują wzbogacenie w reszty urydyny. (A) Logo sekwencji dziesięciu nukleotydów przystających do strony 5' struktury spinki terminatorowej wygenerowane dla 50 ligandów białka ProQ o najwyższej wartości \log_2FC zawierających w swej strukturze Rho-niezależny terminator transkrypcji na końcu 3', $p < 6.5 \times 10^{-12}$. Dane otrzymane przez Holmqvista i współpracowników w eksperymencie CLIP-seq u *Salmonella enterica* (Holmqvist i wsp., 2018), (B) Logo sekwencji dziesięciu nukleotydów przystających do strony 5' struktury spinki terminatorowej wygenerowane dla 50 ligandów białka Hfq o najwyższej wartości \log_2FC zawierających w swej strukturze Rho-niezależny terminator transkrypcji na końcu 3', $p = 4.98 \times 10^{-16}$. Dane otrzymane przez Holmqvista i współpracowników w eksperymencie CLIP-seq u *Salmonella enterica* (Holmqvist i wsp., 2016). Pozycja numer 10 odpowiada pozycji bezpośrednio przylegającej do bazalnej pary struktury typu spinki Rho-niezależnego terminatora transkrypcji z niesparowanym ogonem oligo(U). Logo wygenerowane przy użyciu WebLogo (Crooks i wsp., 2004). Na podstawie Stein i wsp., 2020 (zmodyfikowano).

Podsumowując, otrzymane wyniki dla *E. coli* i *S. enterica* charakteryzują się wysoką zgodnością. U obu organizmów sekwencje po stronie 5' spinki terminatorowej ligandów białka ProQ cechują się wyższą frekwencją reszt adenozyiny, a ligandów Hfq urydyny.

5.1.5 Analiza ligandów białka ProQ z *N. meningitidis*

Białko ProQ z *N. meningitidis* znacznie się różni od *E. coli* ProQ zarówno pod względem sekwencji jak i ogólnej architektury. Jednocześnie jednak, podobnie jak ma to miejsce u *E. coli* i *S. enterica*, wiąże zasadniczo odmienne RNA niż białko Hfq mimo, że oba specyficznie wiążą się do struktury Rho-niezależnego terminatora transkrypcji (Bauriedl i wsp., 2020; Heidrich i wsp., 2017). Postanowiłem sprawdzić, czy obserwowane różnice w sekwencji po stronie 5' spinki terminatorowej wśród ligandów białek ProQ i Hfq u enterobakterii występują również u *N. meningitidis*, zwłaszcza w kontekście wyraźnie odmiennej struktury białka ProQ.

Analiza danych z eksperymentu typu UV-CLIP-seq (*UV-crosslinking coupled with RNA-seq*) (Bauriedl i wsp., 2020) dla regionów po stronie 5' struktury spinki terminatorowej dla pięćdziesięciu ligandów białka ProQ z *Neisseria meningitidis* (β -proteobakterie) o najwyższej wartości \log_2FC zawierających w swej strukturze Rho-niezależny terminator transkrypcji dostarczyła zbliżonych informacji do tych zgromadzonych dla białka ProQ pochodzącego z relatywnie oddalonych filogenetycznie bakterii jakimi są *E. coli* i *S. enterica* (γ -proteobakterie). Wzbogacenie w reszty adenozyiny jest najwyższe na pozycjach bezpośrednio przylegających do bazalnej pary spinki terminatorowej. Uwzględniono wyłącznie ligandy, w których pik z CLIP-seq nie znajdował się dalej niż 10 nukleotydów w kierunku 5' od Rho-niezależnego terminatora, ($p < 2.2 \times 10^{-16}$) (rys. 16).



Rysunek 16. Sekwencja po stronie 5' struktury spinki terminatorowej najlepszych ligandów RNA wiązanych przez białko *N. meningitidis* ProQ jest wzbogacona w reszty adenozyne. Logo sekwencji dziesięciu nukleotydów przystających do strony 5' struktury typu spinki wygenerowane dla 50 ligandów o najwyższej wartości \log_2FC zawierających w swej strukturze Rho-niezależny terminator transkrypcji na końcu 3', $p < 2.2 \times 10^{-16}$. Dane otrzymane przez Bauriedl i współpracowników w eksperymencie CLIP-seq u *Neisseria meningitidis* (Bauriedl i wsp., 2020). Pozycja numer 10 odpowiada pozycji bezpośrednio przylegającej do bazalnej pary struktury spinki terminatorowej. Logo wygenerowane przy użyciu WebLogo (Crooks i wsp., 2004).

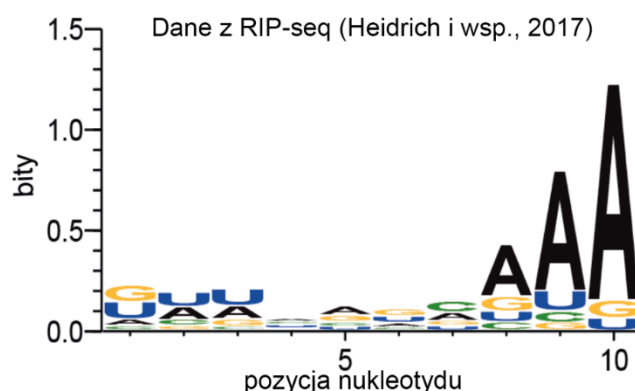
Podsumowując, wykonana analiza składu nukleotydowego sekwencji przyległej po stronie 5' do Rho-niezależnego terminatora transkrypcji RNA wiązanych przez *N. meningitidis* ProQ wykazała, że mimo różnic strukturalnych w stosunku do białek ProQ pochodzących z enterobakterii, *N. meningitidis* ProQ również wiąże ligandy wzbogacone w adenozyne w badanym regionie.

5.1.6 Analiza ligandów białka Hfq z *N. meningitidis*

W odróżnieniu od danych zebranych w eksperymentach RIL-seq i CLIP-seq odpowiednio dla białek ProQ i Hfq z *E. coli* i *S. enterica* oraz ProQ z *N. meningitidis*, dane ligandów białka Hfq z *N. meningitidis* pochodzą z eksperymentu RIP-seq (*RNA immunoprecipitation i sequencing*) (Heidrich i wsp., 2017). W tego typu eksperymencie z powodu braku etapu naświetlania UV, brakuje informacji o nukleotydach związanych z białkiem, a więc tych, które znajdują się w najbliższej odległości od jego powierzchni. W konsekwencji nie jest możliwe precyzyjne określenie regionu transkryptu związanego przez białko, a autorzy mogli jedynie wskazać, czy dany ligand jest wiązany przez 5'-UTR, CDS lub 3'-UTR. W analizie wykorzystałem dane ligandów wiązanych za pośrednictwem regionu 3'-UTR lub należących do klasy sRNA, w których zazwyczaj znajdują się Rho-niezależne terminatory transkrypcji. Trzeba jednak zaznaczyć, iż wyniki analizy są obarczone większym błędem w porównaniu z danymi pozostałych białek, gdyż oddziaływanie za pośrednictwem 3'-UTR niekoniecznie oznacza, że wiązanie przebiegało z udziałem Rho-niezależnego terminatora transkrypcji. Tym niemniej, sytuacje, w których dany ligand RNA był wiązany przez 3'-UTR, a

pik z CLIP-seq bądź RIL-seq nie pokrywał lub nie znajdował się w bliskim sąsiedztwie struktury spinki terminatorowej, zdarzały się bardzo sporadycznie.

W przeciwieństwie do ligandów białka Hfq pochodzącego z *Escherichia coli*, ligandy białka Hfq z *Neisseria meningitidis* w regionie po stronie 5' struktury spinki Rho-niezależnego terminatora transkrypcji są wzbogacone w adenozyne, nie urydynie. Pod tym względem czyni je to bardziej podobnymi do ligandów białek ProQ, niż Hfq z *E. coli* czy *S. enterica*. ($p < 1.3 \times 10^{-15}$) (rys. 17).

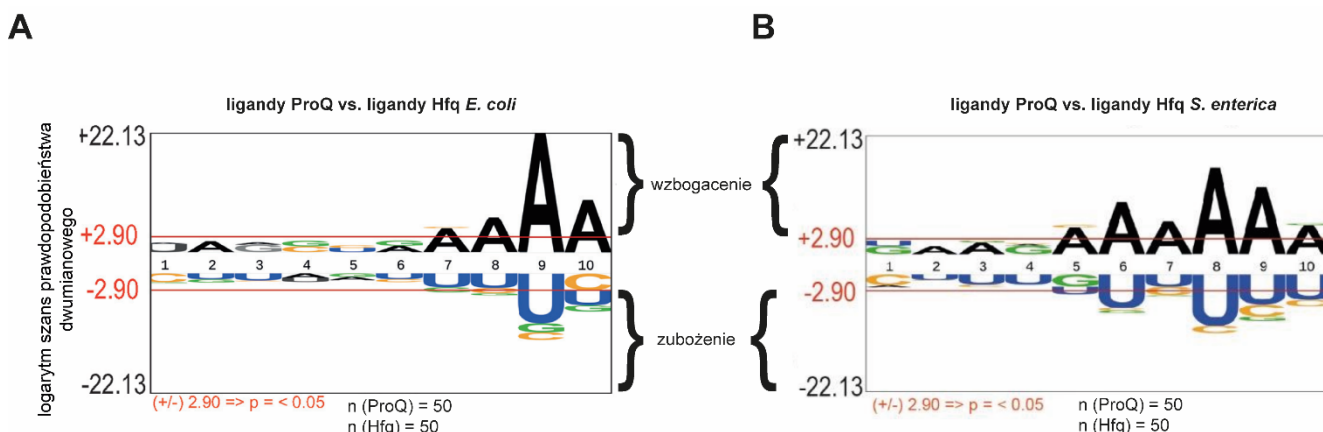


Rysunek 17. Sekwencja po stronie 5' struktury spinki terminatorowej najlepszych ligandów RNA wiązanych przez białko *N. meningitidis* Hfq jest wzbogacona w reszty adenozyyny. Logo sekwencji dziesięciu nukleotydów przystających do strony 5' struktury spinki terminatorowej wygenerowane dla 40 ligandów o najwyższej wartości log₂FC zawierających w swej strukturze Rho-niezależny terminator transkrypcji na końcu 3', $p < 1.3 \times 10^{-15}$. Dane otrzymane przez Heidrich i współpracowników w eksperymencie RIP-seq u *Neisseria meningitidis* (Heidrich i wsp., 2017). Pozycja numer 10 odpowiada pozycji bezpośrednio przylegającej do bazalnej pary spinki terminatorowej z niesparowanymi resztami ogona oligo(U). Logo wygenerowane przy użyciu WebLogo (Crooks i wsp., 2004).

Podsumowując, przeprowadziłem analizę frekwencji nukleotydów w sekwencji przyległej po stronie 5' do Rho-niezależnego terminatora transkrypcji w RNA wiązanych przez *N. meningitidis* Hfq. Wyniki wskazują na wzbogacenie w adenozyne, co stoi w wyraźnym kontraście z kompozycją analogicznych regionów u ligandów białek Hfq z *E. coli* i *S. enterica*, które cechowały się przewagą reszt urydyny.

5.1.7 Porównanie sekwencji po stronie 5' Rho-niezależnych terminatorów transkrypcji w ligandach białek ProQ i Hfq u *E. coli* i *S. enterica*

Aby zweryfikować, czy obserwowane wzbogacenie w reszty adenozyyny wśród ligandów białka ProQ w stosunku do ligandów białka Hfq u *E. coli* i *S. enterica* jest istotne statystycznie, wykonałem test z wykorzystaniem programu pLogo (O'Shea i wsp., 2013) (rys. 18) (Stein i wsp., 2020).



Rysunek 18. Wzbogacenie w adenozynej sekwencji po stronie 5' struktury spinki terminatorowej najlepszych ligandów RNA białka ProQ w stosunku do ligandów białka Hfq u *E. coli* i *S. enterica* jest statystycznie istotne. pLogo sekwencji dziesięciu nukleotydów przystających do strony 5' struktury typu spinki terminatorowej wygenerowane dla 50 ligandów białek ProQ (górną) i Hfq (dół) o najwyższej wartości log₂FC zawierających w swej strukturze Rho-niezależny terminator transkrypcji na końcu 3'; pozycje powyżej lub poniżej czerwonej linii wykazują istotne statystycznie różnice w teście dwumianowym przy poziomie istotności 0.05; (A) pLogo dla białek *E. coli*, statystycznie istotne wartości p: A na pozycji 7, $p = 0.002$; A na pozycji 8, $p = 1.08 \times 10^{-5}$; A na pozycji 9, $p = 2.99 \times 10^{-21}$; A na pozycji 10, $p = 9.78 \times 10^{-9}$; (B) pLogo dla białek *S. enterica*, statystycznie istotne wartości p: A na pozycji 5, $p = 4.15 \times 10^{-4}$; A na pozycji 6, $p = 8.82 \times 10^{-9}$; A na pozycji 7, $p = 3.24 \times 10^{-5}$; A na pozycji 8, $p = 3.32 \times 10^{-15}$; A na pozycji 9, $p = 1.24 \times 10^{-11}$; A na pozycji 10, $p = 1.7 \times 10^{-4}$. Pozycja numer 10 odpowiada pozycji bezpośrednio przylegającej do bazalnej pary spinki terminatorowej przy niesparowanych resztach ogona oligo(U). Na podstawie Stein i wsp., 2020 (zmodyfikowano).

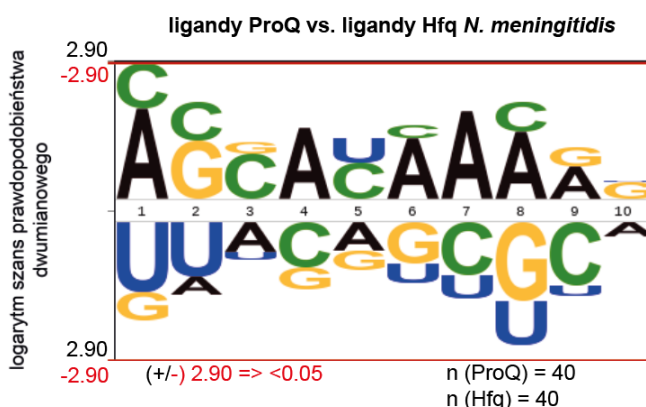
Z testu dwumianowego wynika, iż cztery pozycje u *E. coli* oraz sześć pozycji u *S. enterica* najbliższych bazalnej parze zasad struktury spinki terminatora transkrypcji (tj. pierwszej parze, w której nie uczestniczą reszty urydyny ogona oligo(U)) w pulach ligandów białek ProQ obu bakterii jest istotnie wzbogaconych w reszty adenozynej. Późniejsze badania *in vitro* u *E. coli* przeprowadzone przez Ewę Stein i Joannę Kwiatkowską oraz eksperymenty *in vivo* w bakteryjnym systemie trójhybrydowym wykonane przez zespół prof. Katherine Berry dowiodły, że o ile substytucje tych reszt adenozynej na reszty urydyny miały co najwyżej niewielki wpływ na wiązanie RNA przez ProQ, o tyle wyraźnie zwiększały siłę wiązania cząsteczek do białka Hfq u *E. coli* (Stein i wsp., 2020). W świetle zebranych danych, wzbogacenie w adenozyne regionu po stronie 5' Rho-niezależnego terminatora transkrypcji wśród ligandów białka ProQ stanowi przynajmniej jeden z czynników pozwalających na rozróżnienie w większości odrębnych pul RNA, o które konkurują białka ProQ i Hfq u *E. coli*. Obecność tego motywu nie tyle zwiększa powinowactwo RNA do białka ProQ, co osłabia jego interakcję z białkiem Hfq (Stein i wsp., 2020). Ze względu na bliskie pokrewieństwo filogenetyczne można się spodziewać, iż obserwowany efekt mógłby mieć miejsce także u *S. enterica*.

Podsumowując, przeprowadzona analiza porównawcza regionów po stronie 5' Rho-niezależnego terminatora transkrypcji między ligandami białek ProQ i Hfq z *E. coli* oraz

S. enterica wykazała istotne statystycznie różnice w frekwencji nukleotydów na pozycjach najbliższych bazalnej parze zasad spinki terminatorowej. Dalsze badania *in vitro* przeprowadzone przez Ewę Stein i Joannę Kwiatkowską w naszej pracowni, a także *in vivo* w laboratorium prof. Katherine Berry udowodniły, iż wzbogacenie omawianego regionu w reszty adenozyliny nie tyle zwiększa siłę wiązania z białkiem ProQ, ile osłabia powinowactwo do białka Hfq u *E. coli*.

5.1.8 Porównanie sekwencji po stronie 5' Rho-niezależnych terminatorów transkrypcji w ligandach białek ProQ i Hfq u *N. meningitidis*

W celu potwierdzenia, że obserwowany brak różnic w składzie nukleotydowym sekwencji po stronie 5' struktury Rho-niezależnego terminatora transkrypcji w ligandach białek ProQ i Hfq z *N. meningitidis* faktycznie nie wykazuje istotności statystycznej, przeprowadziłem test dwumianowy porównujący frekwencje nukleotydów. Zgodnie z oczekiwaniami wynik testu nie wykazał żadnych istotnych różnic w badanych regionach RNA (rys. 19).

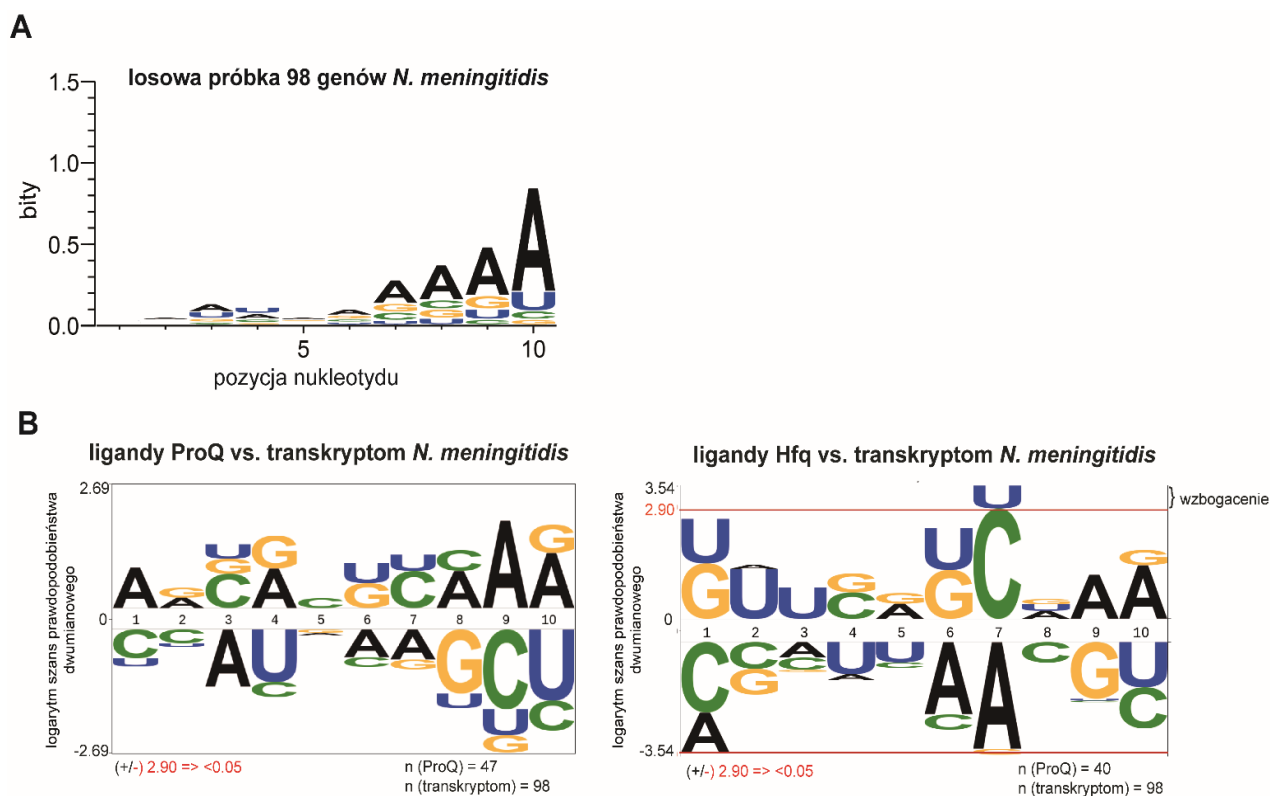


Rysunek 19. U *Neisseria meningitidis* pule ligandów białek ProQ i Hfq nie wykazują różnic istotnych statystycznie w sekwencji po stronie 5' struktury spinki terminatorowej. pLogo sekwencji dziesięciu nukleotydów przystających do strony 5' struktury typu spinki wygenerowane dla 40 ligandów białek ProQ (górną) (Bauriedl i wsp., 2020) i Hfq (dół) (Heidrich i wsp., 2017) o najwyższej wartości \log_2FC zawierających w swej strukturze Rho-niezależny terminator transkrypcji na końcu 3'. Pozycja numer 10 odpowiada pozycji bezpośrednio przylegającej do bazalnej pary struktury spinki terminatorowej. Na żadnej pozycji nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie, tj. o wartości $P < 0.05$.

Stojący w wyraźnym kontraście do sytuacji obserwowanej u *E. coli* i *S. enterica* brak różnic w badanych regionach pomiędzy ligandami białek ProQ i Hfq u *N. meningitidis* może sugerować, iż region ten może nie odgrywać roli czynnika wpływającego na to, z którym białkiem dany transkrypt będzie oddziaływać. Należy jednak pamiętać, iż z danych eksperymentalnych (Bauriedl i wsp., 2020; Heidrich i wsp., 2017) wiadomo, że białka ProQ i Hfq z *Neisseria meningitidis* mają w większości odrębne od siebie pule wiązanych RNA.

Sugeruje to, że wyjaśnienie tej odmiennej specyficzności może być inne, niż odmienna rola w wiązaniu sekwencji po stronie 5' Rho-niezależnego terminatora transkrypcji.

W celu sprawdzenia, czy obserwowane wzbogacenie w adenozyne może być cechą całego transkryptomu *N. meningitidis*, a nie jedynie ligandów białek ProQ i Hfq, zbadałem losową próbkę 98 genów bakterii oraz wykonałem logo ich sekwencji po stronie 5' Rho-niezależnych terminatorów transkrypcji (rys. 20).



Rysunek 20. Wzbogacenie w reszty adenozyne sekwencji po stronie 5' struktury spinki terminatorowej RNA jest cechą całego transkryptomu *N. meningitidis*. (A) Logo sekwencji dziesięciu nukleotydów przystających do strony 5' struktury typu spinki wygenerowane dla losowej próbki 98 genów *N. meningitidis*, $p < 2.2 \times 10^{-16}$, (B) pLogo sekwencji dziesięciu nukleotydów przystających do strony 5' struktury typu spinki wygenerowane dla co najmniej 40 ligandów białek ProQ (lewa strona) i Hfq (prawa strona) o najwyższej wartości $\log_2 FC$ zawierających w swej strukturze Rho-niezależny terminator transkrypcji na końcu 3' w odniesieniu do analogicznych regionów próbki 98 losowo wybranych genów *N. meningitidis*. Pozycja numer 10 odpowiada pozycji bezpośrednio przylegającej do bazalnej pary struktury spinki terminatorowej. Na żadnej pozycji nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie w frekwencji adenozyne, tj. o wartości $P < 0.05$.

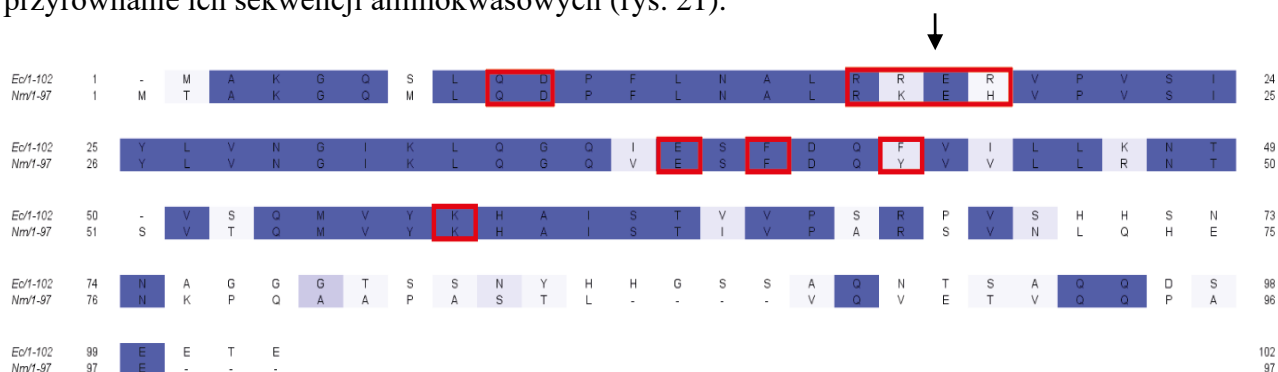
Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, iż wzbogacenie w reszty adenozyne badanego regionu jest cechą całego transkryptomu ($p < 1.3 \times 10^{-15}$). Być może zaobserwowana wysoka frekwencja adenozyne w sekwencji poprzedzającej bazalną parę spinki terminatorowej wśród ligandów białka *N. meningitidis* Hfq nie tyle świadczy o jego odmiennej specyficzności względem Hfq z *E. coli*, ile wynika z niewielkiej dostępności ligandów

wzbogaconych w urydynę. Należy zaznaczyć, iż dane z RIP-seq nie informują, jak silne było oddziaływanie RNA z białkiem, a więc zanotowane ligandy bogate w adenozyne teoretycznie mogłyby oddziaływać z Hfq ze znacznie mniejszą siłą, niż potencjalne ligandy bogate urydynę.

Odpowiedź na pytanie o przyczynę różnic specyficzności między białkami Hfq z *E. coli* i *N. meningitidis* może jednak leżeć w odmiennej charakterystyce powierzchni wiążących RNA obu białek. Z tego względu w kolejnym podrozdziale porównano ich sekwencje aminokwasowe, ze szczególnym uwzględnieniem powierzchni zaangażowanych w interakcję z RNA.

5.1.9 Porównanie sekwencji aminokwasowej białek Hfq i ProQ z *E. coli* i *N. meningitidis*

Aby sprawdzić, czy wiązanie RNA o odmiennym składzie nukleotydowym w regionie po stronie 5' spinki terminatorowej przez białka Hfq z *E. coli* i *N. meningitidis* (ligandy pierwszego są w tym regionie wzbogacone w urydynę, podczas gdy drugiego w adenozyne) mogą wynikać z różnic w ich powierzchniach wiążących RNA, wykonałem przyrównanie ich sekwencji aminokwasowych (rys. 21).



Rysunek 21. Białka Hfq z *E. coli* oraz *N. meningitidis* wykazują niewielką zmienność w regionach wiążących RNA. Przyrównanie sekwencji aminokwasowej białek Hfq z *E. coli* (górny rząd, Ec) oraz *N. meningitidis* (dolny rząd, Nm); ciemniejszy kolor niebieski wskazuje wyższe zakonserwowanie reszt aminokwasowych, czerwonymi ramkami zaznaczono miejsca wiążące RNA. Strzałka wskazuje tzw. sekwencję argininową (*arginine patch*) (Updegrave i wsp., 2016; Zheng i wsp., 2016). Przyrównanie wykonane w programie Jalview (Waterhouse i wsp., 2009) przy 40 % stopniu zakonserwowania.

Z przyrównania sekwencji wynika, iż większość reszt aminokwasowych znanych z udziału w interakcjach z cząsteczkami RNA jest zakonserwowana między białkami Hfq z *E. coli* i *N. meningitidis*. Na szczególną uwagę zasługuje jednak region wskazany strzałką na rysunku 21, tzw. sekwencja argininowa (z ang. *arginine patch*). Zheng i współpracownicy wykazali, iż warianty białek Hfq różniące się składem aminokwasowym tego motywu, odpowiadającym występującym naturalnie u innych bakterii, wykazują znaczne różnice

Rysunek 22. Białka ProQ z *E. coli* oraz *N. meningitidis* wykazują wysoką zmienność w regionach wiążących RNA. Przyrównanie sekwencji aminokwasowej białek ProQ z *E. coli* (górny rząd, Ec) oraz *N. meningitidis* (dolny rząd, Nm); ciemniejszy kolor niebieski wskazuje wyższe zakonserwowanie reszt aminokwasowych, czerwonymi ramkami zaznaczono miejsca wiążące RNA odpowiadające resztom aminokwasowym tworzącym wiązania wodorowe w kompleksie RocC/RocR (PDB 7RGU) (Kim i wsp., 2022) po przyrównaniu do niego struktur białek ProQ (PDB: 5NB9, *E. coli*, 3MW6, *N. meningitidis*) w programie ChimeraX (Pettersen i wsp., 2021).

Jak widać z rysunku 22, sekwencje aminokwasowe białek ProQ z *E. coli* oraz *N. meningitidis* wyraźnie się różnią, także w obszarze domeny FinO będącej modulem odpowiedzialnym za wiązanie cząsteczek RNA. Trzeba jednak zaznaczyć, iż miejsca wiążące zaznaczone czerwonymi ramkami zostały wybrane na podstawie strukturalnego przyrównania do kompleksu RocC/RocR (PDB 7RGU) i jego reszt aminokwasowych tworzących wiązania wodorowe z RNA, i niewykluczone, że w miejscach o słabym zakonserwowaniu reszty te w rzeczywistości nie biorą udziału w oddziaływaniu. Z drugiej strony, prawdopodobne jest wykorzystywanie przez te białka innych miejsc kontaktu, zwłaszcza w świetle braku sekwencji po stronie 5' struktury spinki terminatorowej RocR w zdefiniowanym kompleksie RocC/RocR (rys. 8). Z badań nad ProQ z *E. coli* (Stein i wsp., 2023) oraz *N. meningitidis* (niniejsza praca, sekcja 5.2.10) wiadomo, iż obecność sekwencji po stronie 5' struktury spinki terminatorowej jest konieczna dla silnego wiązania cząsteczek przez białka ProQ obu bakterii. Można się zatem spodziewać, że RocR natywnie posiadający taką sekwencję wiąże się z białkiem RocC również z jej udziałem tworząc dodatkowe kontakty, których nie widać w kompleksie. Tym niemniej oczywiście istnieje możliwość, że białko RocC nie tworzy takich kontaktów z sekwencją 5'-terminalną.

Biorąc pod uwagę wyżej opisaną zmienność sekwencji białek ProQ, także w kontekście powierzchni potencjalnie zaangażowanej w wiązanie cząsteczek RNA, interesujący wydaje się fakt, że pomimo tych oczywistych różnic, oba białka w toku ewolucji zachowały zdolność do oddziaływania z ogólnie zbliżonymi motywami RNA o planie budowy Rho-niezależnego terminatora transkrypcji z sekwencją bogatą w adenozyne występującą po jego stronie 5'.

5.1.11 Podsumowanie pierwszej części badań – analiz *in silico*

W pierwszej części pracy udowodniłem, iż najlepsze ligandy białek ProQ i Hfq z *E. coli* i *S. enterica* zawierające Rho-niezależny terminator transkrypcji (rozumiane jako RNA ze szczytu list ligandów z eksperymentów CLIP-seq, RIL-seq i RIP-seq (Bauriedl i wsp., 2020; Heidrich i wsp., 2017; Holmqvist i wsp., 2018; Holmqvist i wsp., 2016; Melamed i wsp., 2020) posortowanych zgodnie za malejącą wartością \log_2FC) wykazują istotną

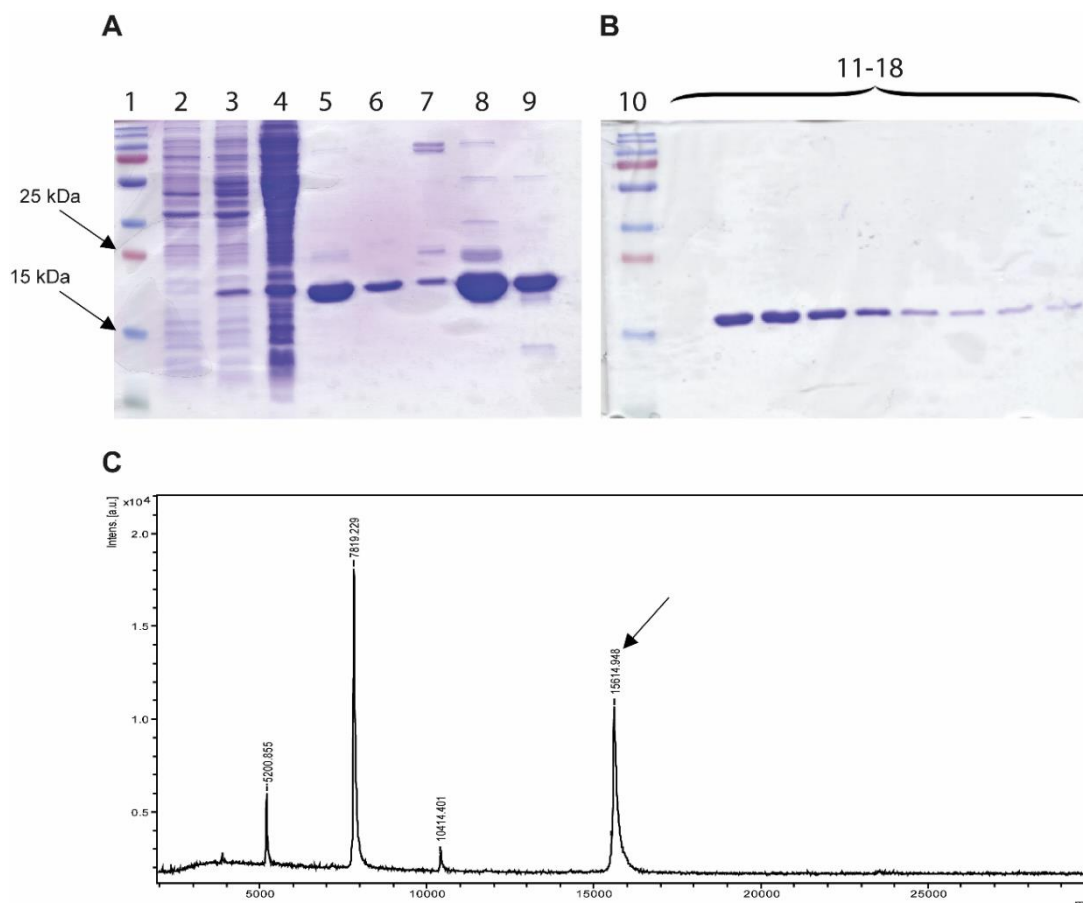
statystycznie różnicę w składzie nukleotydowym sekwencji po stronie 5' spinki terminatorowej. Ligandy białka ProQ cechowały się wzbogaceniem w reszty adenozyne, podczas gdy ligandy Hfq wzbogaceniem w reszty urydyny. Dane eksperymentalne *in vitro*, zebrane przez Ewę Stein i Joannę Kwiatkowską, a także *in vivo* zgromadzone w laboratorium prof. Katherine Berry wykazały, iż wzbogacenie w adenozyne może działać jako motyw osłabiający wiązanie RNA przez Hfq (Stein i wsp., 2020). Z tego względu możliwe jest, że stanowi ono przynajmniej jeden z czynników odpowiadających za fakt, że konkurujące o ligandy białka ProQ i Hfq u obu badanych enterobakterii wiążą zasadniczo odrębne pule RNA. Natomiast u ligandów RNA białek ProQ i Hfq z *N. meningitidis*, które również wiążą w większości niezachodzące na siebie pule RNA, takiej różnicy nie zaobserwowałem. Zarówno ligandy ProQ jak i Hfq z *N. meningitidis* posiadały przewagę reszt adenozyne w sekwencji po stronie 5' spinki terminatorowej. Co ciekawe, wzbogacenie w adenozyne okazało się cechą całego transkryptomu *N. meningitidis*. Powstaje zatem pytanie o przyczynę, dzięki której pule ligandów białek ProQ i Hfq z *N. meningitidis* pozostają zasadniczo odrębne.

5.2 OKREŚLENIE CECH CZĄSTECZEK RNA ROZPOZNAWANYCH PRZEZ BIAŁKO *N. MENINGITIDIS* ProQ

Celem drugiej części pracy jest zbadanie, czy białko ProQ z *N. meningitidis* mimo wyraźnych różnic strukturalnych względem białka ProQ z *E. coli* podobnie do niego specyficznie rozpoznaje i wiąże strukturę spinki terminatorowej i sekwencje do niej przyległe. Przeprowadziłem eksperymenty wiązania *in vitro* *N. meningitidis* ProQ do zestawu zarówno natywnych ligandów, tj. RNA wiązanych naturalnie w komórce, jak i cząsteczek RNA nienotowanych do tej pory jako wchodzące w interakcje z tym białkiem. Ponadto zaprojektowałem i zbałem oddziaływanie z *N. meningitidis* ProQ szeregu zmodyfikowanych wariantów cząsteczek, co pozwoliło na poznanie szczegółów interakcji białka ze strukturą Rho-niezależnego terminatora transkrypcji.

5.2.1 Oczyszczenie białka ProQ z *N. meningitidis*

Gen białka *N. meningitidis* ProQ sklonowałem do plazmidu ekspresyjnego pET-15, a następnie białko (15.614 kDa) oczyściłem z wykorzystaniem techniki FPLC (*fast protein liquid chromatography*). Analiza procesu oczyszczania została przedstawiona za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE, *sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) (rys. 23).



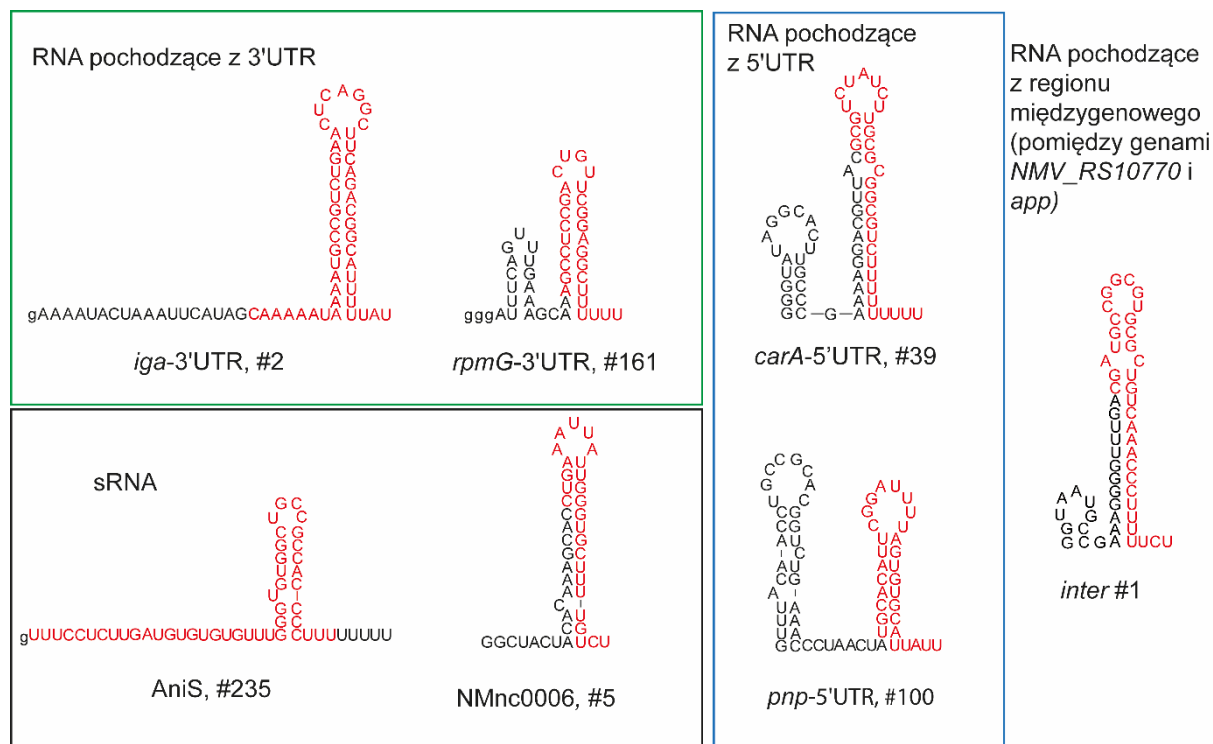
Rysunek 23. Białko ProQ z *N. meningitidis* zostało oczyszczone techniką FPLC z wykorzystaniem znacznika histydynowego (His₆-tag). (A, B) żele z elektroforezy poliakrylamidowej: 1 – marker masy, 2 -kultura bakteryjna przed indukcją nadekspresji białka, 3 - kultura bakteryjna po 3h nadekspresji białka, 4 – osad bakteryjny po sonikacji, 5-7 - piki z chromatografii metalopowinowactwa na kolumnie His-Trap, 8-9 - piki po etapie z użyciem kolumn heparynowych (chromatografia powinowactwa), 10 - marker masy, 11-18 – frakcje zebrane po drugim etapie z wykorzystaniem kolumny His-Trap. Ostatnim etapem było nieprzedstawione na rysunku sączenie molekularne (ang. *size exclusion chromatography*) zapewniające maksymalną czystość preparatu pod względem obecności białek o masie innej niż oczekiwana; (C) odczyt ze spektrometrii mas z pikem odpowiadającym masie białka *N. meningitidis* ProQ po usunięciu His₆-tagu przez proteazę TEV (15.614 kDa).

Wzrost stężenia białka posiadającego znacznik histydynowy (19.158 kDa) był widoczny już na etapie kultury bakteryjnej po indukcji nadekspresji białka. Spadek masy obserwowany po drugim etapie z wykorzystaniem kolumny HisTrap wynika z usunięcia His₆-tagu przez trawienie proteazą TEV. Odczyt ze spektrometrii mas 15.615 kDa zgadza się z masą obliczoną na podstawie sekwencji aminokwasowej równą 15.614 kDa.

5.2.2 Cząsteczki RNA wybrane do analizy oddziaływań z białkiem *N. meningitidis* ProQ w warunkach *in vitro*

Do eksperymentów wiązania z białkiem *N. meningitidis* ProQ wybrałem zestaw siedmiu cząsteczek o różnym pochodzeniu: region międzygenowy będący ligandem o najwyższej wartości log₂FC (oznaczany dalej jako *inter* od ang. *intergenic*, pochodzący z regionu pomiędzy genami NMV_RS10770 i *app*), cząsteczki AniS i NMnc006 reprezentujące cząsteczki sRNA,

rpmG i *iga* z regionu 3'UTR oraz *carA* i *pnp* jako pochodne regionu 5'UTR. RNA pochodzą z listy natywnych ligandów białka *N. meningitidis* ProQ wykrytych za pomocą CLIP-seq (Bauriedl i wsp., 2020). Predykcje struktur drugorzędowych tych RNA przedstawiono na rysunku 24.



Rysunek 24. Częsteczki RNA wybrane do badań wyznaczających siłę ich wiązania z białkiem *N. meningitidis* ProQ. Czerwonym kolorem zaznaczono fragment cząsteczki odpowiadającą pikowi z CLIP-seq (Bauriedl i wsp., 2020), tj. nukleotynom ulegającym związaniu podczas naświetlania UV; małą literą „g” oznaczono reszty guanozyny na końcu 5' dodane do niektórych cząsteczek po to, aby zapewnić wyższą wydajność transkrypcji *in vitro*, w której otrzymano przedstawione RNA; liczby po „#” informują o pozycji na posortowanej zgodnie z malejącą wartością \log_2FC liście ligandów z CLIP-seq. Kryteria wyboru poszczególnych cząsteczek opisano w tekście głównym. Wybrane RNA pochodzą z genów: *iga* – autotransporter serynowej endopeptydazy specyficznej wobec IgA, *rpmG* – białko rybosomalne podjednostki 50S, *carA* – mała podjednostka syntetazy fosforanu karbamoilu, AniS – sRNA, NMnc0006 – sRNA o nienadanej nazwie, *pnp* – pnpaza, *inter* – nieznaną funkcją. Predykcje struktur drugorzędowych RNA wykonano w programie ViennaRNA (Lorenz i wsp., 2011).

Podczas selekcji cząsteczek, a także określania ich długości, kierowałem się przede wszystkim położeniem sekwencji o najwyższym pokryciu z CLIP-seq (Bauriedl i wsp., 2020), która przynajmniej częściowo pokrywała strukturę zbliżoną do Rho-niezależnego terminatora transkrypcji, pozycją na liście ligandów ułożoną zgodnie z malejącą wartością \log_2FC , jak również cechami budowy poszczególnych RNA. *iga*-3'UTR jest najlepszym ligandem pochodzącym z 3'UTR, a ponadto po stronie 5' struktury typu spinki terminatora transkrypcji posiada długi region jednoniciowy. To czyni go odmiennym od *rpmG*-3'UTR, który z kolei został wybrany, ponieważ tworzenie przez niego kompleksu w warunkach *in vitro* już wcześniej udowodnił zespół prof. Vogla (Bauriedl i wsp., 2020). Wybranymi sRNA są NMnc0006 stanowiący najlepszy pod względem wartości \log_2FC ligand sRNA, oraz AniS,

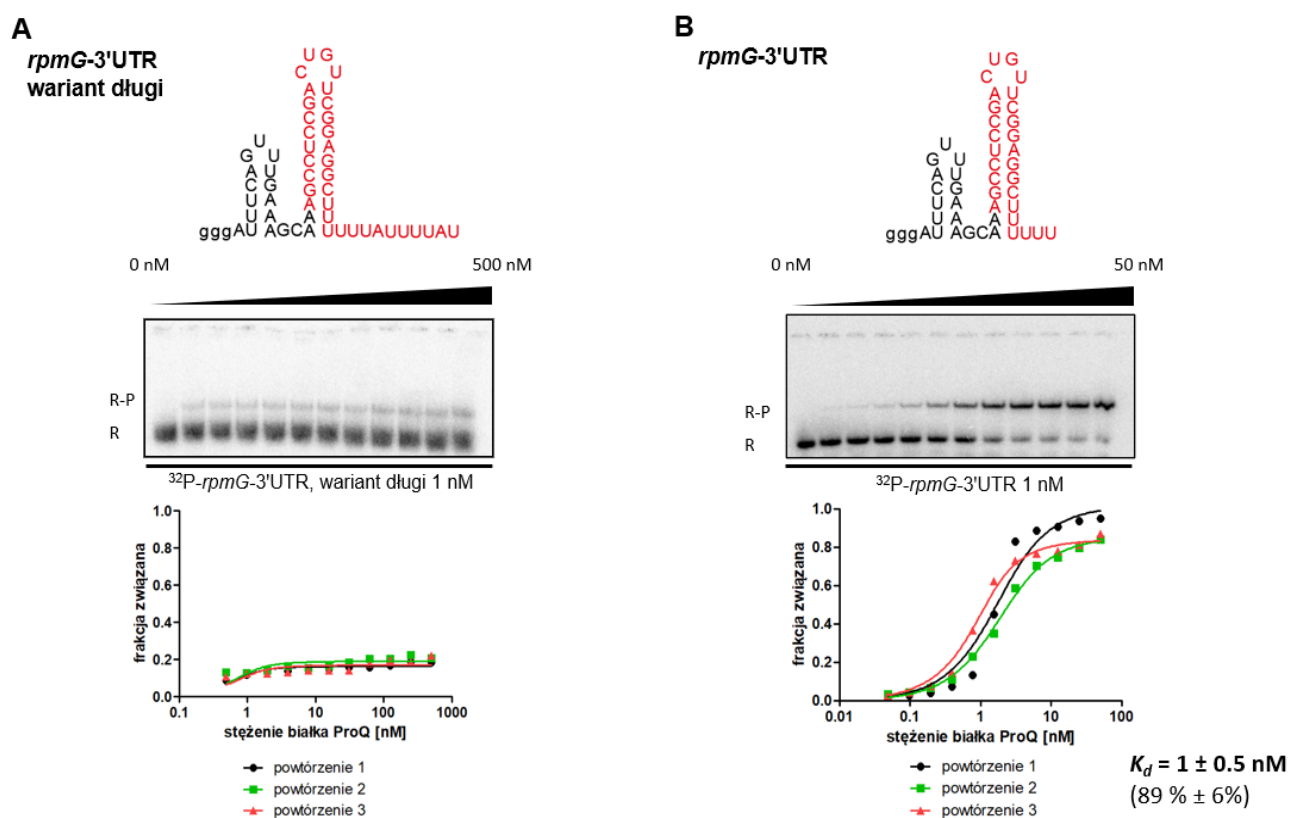
który będąc ostatnim ligandem na liście posiada nietypową dla ligandów białka ProQ kompozycję regionu po stronie 5' spinki terminatorowej, w której zamiast reszt adenozyiny znajdują się reszty urydyny. Ponadto jest znanym ligandem Hfq (Fantappie i wsp., 2011). RNA pochodzące z regionów 5'UTR wyselekcjonowano na tej samej zasadzie co cząsteczki 3'UTR: *carA*-5'UTR jako ligand o najwyższym \log_2FC , natomiast *pnp*-5'UTR ze względu na potwierdzone tworzenie kompleksu *in vitro* z białkiem *N. meningitidis* ProQ (Bauriedl i wsp., 2020). Ostatnia cząsteczka, *inter*, o niepoznanej jak dotąd funkcji, jest o tyle interesująca, że cechuje się najwyższą wartością \log_2FC oraz zawiera w sobie strukturę wyraźnie przypominającą Rho-niezależny terminator transkrypcji. Końce 3' wszystkich RNA za wyjątkiem *rpmG*-3'UTR określałem zgodnie z ostatnim nukleotydem pikę z CLIP-seq. W przypadku *rpmG*-3'UTR pik pokrywał długi ogon oligo(U), którego obecność znacznie osłabiała wiązanie do białka ProQ (rys. 25). Dlatego w tym jednym przypadku cząsteczkę użytą w eksperymentach skróciłem w taki sposób, aby ogon oligo(U) kończył się na ostatniej – szóstej – konsekwentnie występującej po sobie reszcie urydyny. Końce 5' wybrałem na bardziej arbitralnej zasadzie w zależności od cech regionu poprzedzającego Rho-niezależny terminator, jak również uwzględniając natywne reszty guanozyiny tam, gdzie było to możliwe, co pozwoliło na otrzymanie cząsteczki w procesie transkrypcji *in vitro* bez konieczności dodawania tych reszt na końcu 5'.

Zastanawiający jest fakt obecności struktur silnie przypominających Rho-niezależny terminator transkrypcji w regionie 5'-UTR. W eksperymencie CLIP-seq wykryto jedynie osiem ligandów pochodzących z 5'-UTR, z czego aż pięć posiadało tego typu struktury drugorzędowe. Z jednej strony podkreśla to ich znaczenie dla interakcji z białkiem ProQ niezależnie od pochodzenia RNA, z drugiej może być wskazówką, iż struktury te faktycznie pełnią rolę terminatorów transkrypcji zlokalizowanych w 5'-UTR. Przy takim scenariuszu musiałby zachodzić jakiś rodzaj zjawiska antyterminacji podczas ekspresji tych genów.

5.2.3 Ustalenie warunków reakcji wiązania RNA przez *N. meningitidis* ProQ *in vitro*

Aby ustalić warunki, w jakich eksperymenty wiązania będą przebiegać, jako pierwszą cząsteczkę zbadałem *rpmG*-3'UTR, ponieważ z poprzednich badań wiadomo, że może tworzyć kompleks w warunkach *in vitro* z białkiem ProQ (Bauriedl i wsp., 2020). Cząsteczka ta pochodzi z 3'UTR i zawiera Rho-niezależny terminator transkrypcji posiadający reszty adenozyiny po stronie 5' bazalnej pary spinki terminatorowej.

Długi wariant cząsteczki *rpmG*-3'UTR, czyli zawierający pełny pik (sekwencję o najwyższym pokryciu) z CLIP-seq, w przeprowadzonym eksperymencie oddziaływał bardzo słabo z białkiem *N. meningitidis* ProQ (rys. 25). Z badań nad białkiem ProQ z *E. coli* wiadomo, iż nadmierne wydłużenie końca 3' może negatywnie wpływać na siłę wiązania RNA do białka. Z tego względu cząsteczkę skróciłem tak, by na końcu zawierała jedynie nieprzerwany ciąg reszt urydyny (rys. 25).



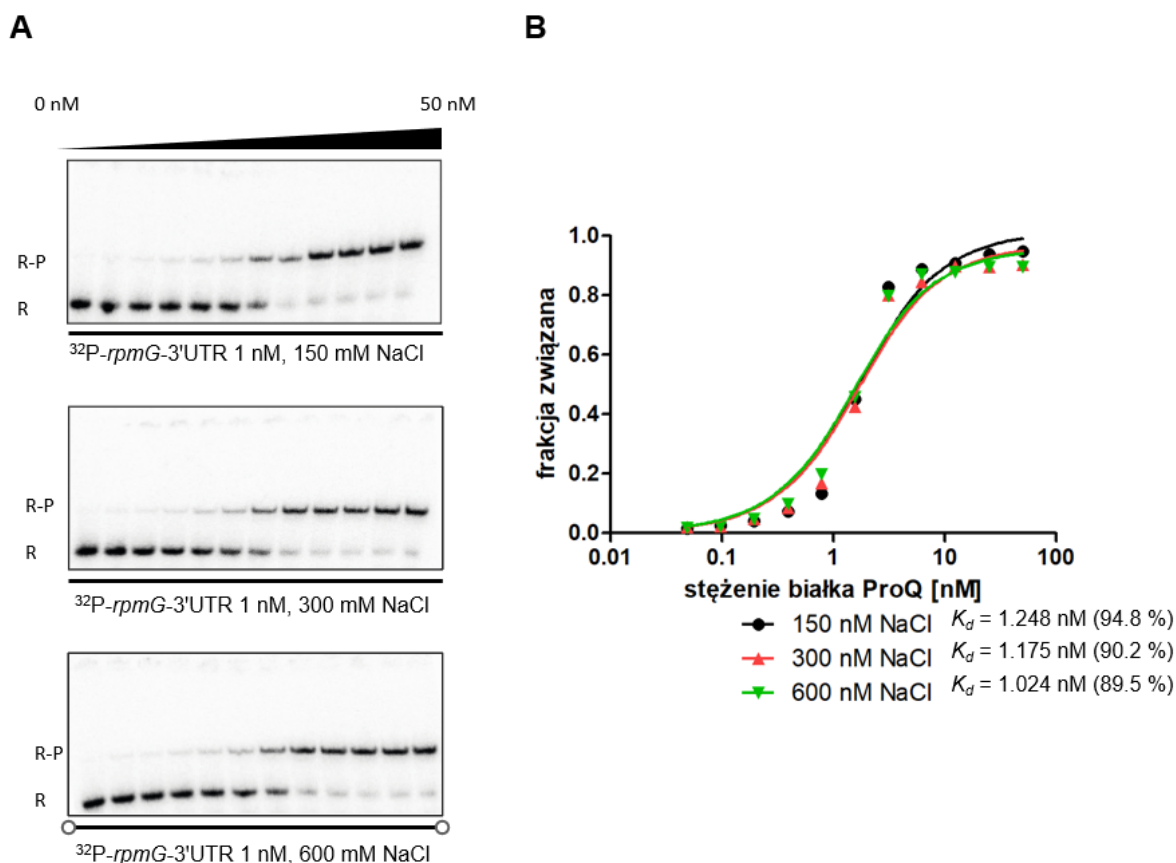
Rysunek 25. Wariant cząsteczki *rpmG*-3'UTR ze skróconym ogonem oligo(U) wiąże się do białka *N. meningitidis* ProQ w stężeniach nanomolarnych. Rzędami od góry: predykcje strukturalne RNA, żele z eksperymentu EMSA (*electromobility shift assay*) podczas którego monitorowano wiązanie białka ProQ z RNA (30 min w temperaturze pokojowej), dane zależności frakcji związanej RNA od stężenia białka dopasowane do równania kwadratowego w programie GraphPad, (A) dane dla wariantu ³²P-*rpmG*-3'UTR zawierającego pełną sekwencję odnotowaną w CLIP-seq, (B) dane dla wariantu ze skróconym ogonem oligo(U), R – niezwiązane RNA, R-P – kompleks RNA-białko ProQ, K_d – stała dysocjacji (*dissociation constant*), wartość w nawiasie przy K_d odpowiada średniemu maksymalnemu procentowi frakcji związanej. Predykcje struktur drugorzędowych RNA wykonano w programie ViennaRNA (Lorenz i wsp., 2011).

Z danych doświadczalnych wynika, iż wariant cząsteczki zawierający pełny pik z CLIP-seq, czyli z wyraźnie wydłużonym ogonem oligo(U), wiąże się z białkiem ProQ w śladowej proporcji. Z kolei wariant skrócony wiąże się silnie ze stałą równowagi K_d ok. 1 nM, a obserwowane przesunięcie prążka z wysokim procentem (ok. 89 %) frakcji związanej RNA widoczne jest pomimo użycia 10-krotnie mniejszego maksymalnego stężenia białka ProQ (50 nM vs. 500 nM dla wariantu wydłużonego). Z tego względu jako cząsteczkę modelową

wybrano krótszy wariant *rpmG*-3'UTR. Ponadto zastosowane warunki reakcji wiązania RNA przez ProQ – 30 minut w temperaturze pokojowej w wykorzystanym buforze (150 mM NaCl, 5 mM Tris pH 7.5, 1 mM MgCl₂, 5% glicerol) – pozwalają na zaobserwowanie wyraźnego przesunięcia prążka w żelu poliakrylamidowym. W tym miejscu warto także zaznaczyć, iż *rpmG*-3'UTR wiąże się z ProQ w stechiometrii 1:1, co na żelu widać w postaci tylko jednego prążka powyżej niezwiązanego RNA. Gdyby ProQ wiązało więcej niż jedną cząsteczkę jednocześnie, na żelu widać byłoby prążki znajdujące się jeszcze wyżej. Odpowiadałyby one kompleksom wyższego rzędu.

5.2.4 Wpływ stężenia chlorku sodu w buforze do wiązania na powinowactwo białka *N. meningitidis* ProQ do RNA

W celu sprawdzenia, czy obserwowana wartość stałej dysocjacji zmieni się pod wpływem wyższych niż 150 mM stężeń chlorku sodu, zmierzyłem siłę wiązania cząsteczki *rpmG*-3'UTR przez ProQ przy stężeniu 300 mM oraz 600 mM. W badanym zakresie stężeń chlorku sodu nie odnotowałem istotnych różnic w sile wiązania przez białko ProQ (rys. 26). Wynika z tego, że wiązanie zachodzi przede wszystkim za pośrednictwem innych oddziaływań niż oddziaływania elektrostatyczne, prawdopodobnie z udziałem wiązań wodorowych i warstwowych (z ang. *stacking*).



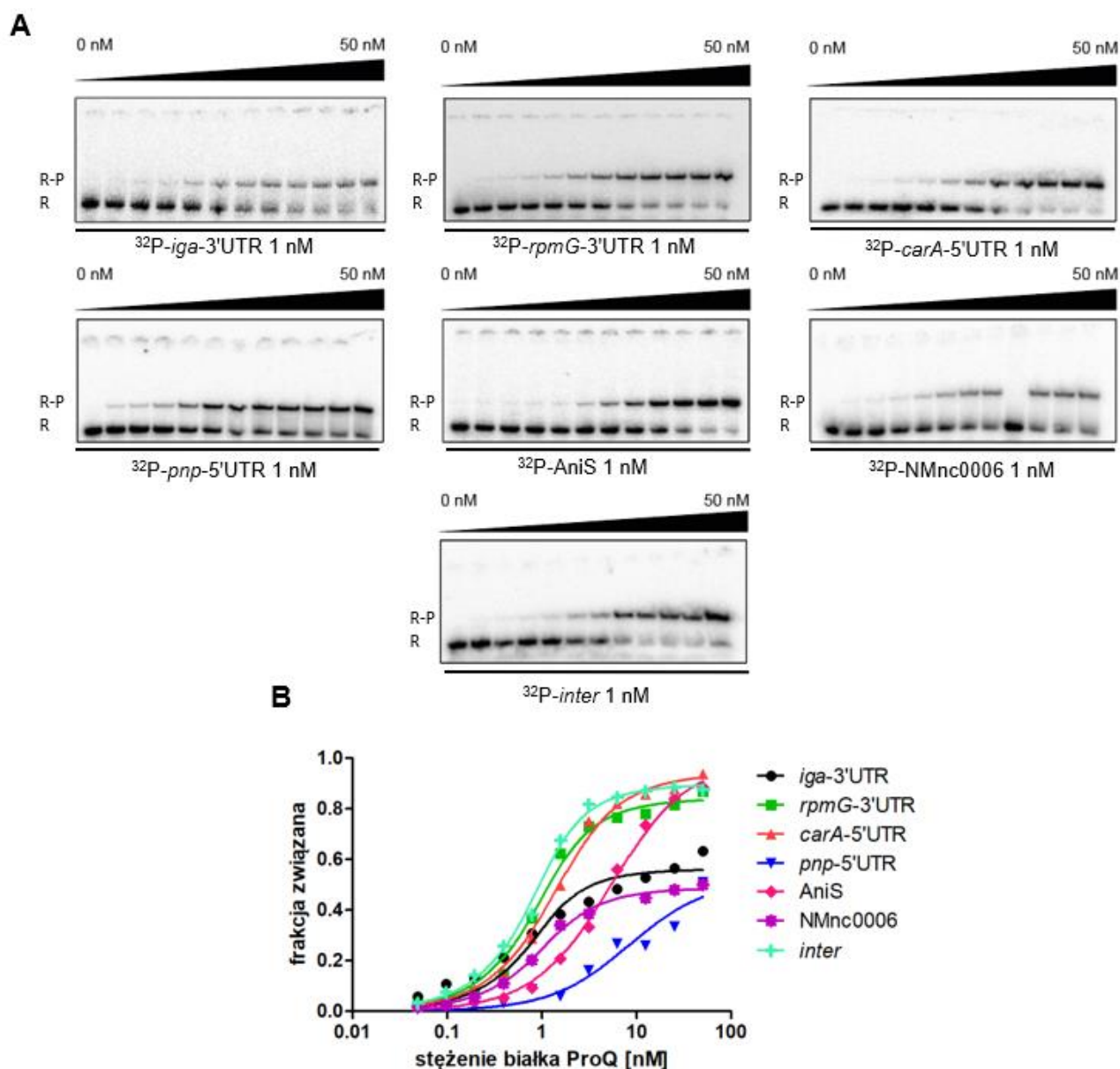
Rysunek 26. Wyższe stężenie NaCl nie wpływa na siłę wiązania *rpmG*-3'UTR przez białko *N. meningitidis* ProQ. (A) Wiązanie ^{32}P -*rpmG*-3'UTR przez białko ProQ monitorowano techniką EMSA, (B) dane zależności frakcji związanej RNA od stężenia białka dopasowane do równania kwadratowego w programie GraphPad; R – niezwiązane RNA, R-P – kompleks RNA-białko ProQ, K_d – stała dysocjacji, wartość w nawiasie przy K_d odpowiada maksymalnej frakcji związanej RNA. Dane stanowią reprezentatywny przykład z trzech niezależnych eksperymentów.

Z powodu braku wyraźnych różnic w wartościach stałych dysocjacji i maksymalnej frakcji związanej w badanym zakresie stężeń soli, w kolejnych eksperymentach zastosowano najniższe (150 nM) testowane stężenie NaCl w buforze reakcyjnym. W dalszych doświadczeniach wykorzystałem zatem bufor o składzie 150 mM NaCl, 5 mM Tris pH 7.5, 1 mM MgCl₂, 5% glicerol.

5.2.5 Wyznaczenie siły oddziaływania pomiędzy wybranymi RNA a białkiem ProQ z *N. meningitidis*

Po ustaleniu warunków reakcji, postanowiłem zbadać wiązanie wcześniej wybranych RNA (przedstawionych na rys. 24) do białka *N. meningitidis* ProQ. Zmierzyłem ich siłę oddziaływania z ProQ wyrażoną wartością stałej dysocjacji (K_d). Przebieg eksperymentu wiązania ilustruje rysunek 26, natomiast tabela 1 podsumowuje uzyskane średnie wartości K_d i średnią maksymalną frakcję związaną.

Wszystkie badane RNA wykazały wiązanie do *N. meningitidis* ProQ w przyjętych warunkach, chociaż zarówno wartości stałej dysocjacji jak i maksymalnej frakcji związanej znacznie się różniły (tabela 1). Średnie wartości K_d znajdowały się w zakresie od 0.31 nM dla *iga*-3'UTR do 7.8 nM dla *pnp*-5'UTR, co świadczy o silnym wiązaniu z białkiem. Najwyższą maksymalną frakcję związaną zanotowano dla AniS, z kolei najniższą dla *iga*-3'UTR. Niskie proporcje frakcji związanej są szczególnie zastanawiające w kontekście braku dodatkowych prążków w bliskim sąsiedztwie wolnego RNA, co mogłoby świadczyć o alternatywnych konformacjach cząsteczki, z których tylko część byłaby dostępna dla białka ProQ. Tym niemniej, niewykluczone, że takie konformacje faktycznie występują, przy czym cząsteczki migrują w żelu z tą samą szybkością. Z doświadczenia wynika również fakt, że wysoka wartość $\log_2\text{FC}$ w CLIP-seq niekoniecznie musi świadczyć o wyższym powinowactwie *in vitro* – *pnp*-5'UTR ($\log_2\text{FC} = 6.6$) wiąże się z białkiem ProQ słabiej niż ostatni z listy AniS ($\log_2\text{FC} = 3$).



Rysunek 27. Wiązanie badanych RNA do białka ProQ z *Neisseria meningitidis*.

(A) Wiązanie ^{32}P -*iga*-3'UTR, ^{32}P -*rpmG*-3'UTR, ^{32}P -*carA*-5'UTR, ^{32}P -*pnp*-5'UTR, ^{32}P -AniS, ^{32}P -NMnc0006 i ^{32}P -*inter* przez białko ProQ monitorowano techniką EMSA, (B) dane zależności frakcji związanej RNA od stężenia białka dopasowane do równania kwadratowego w programie GraphPad; R – niezwiązane RNA, R-P – kompleks RNA-białko ProQ. Dane stanowią reprezentatywny przykład z trzech niezależnych eksperymentów. Średnie wartości K_d i maksymalnej frakcji związanej ujęto w tabeli 1.

Podsumowując, testowane RNA wiążą się z białkiem ProQ z *N. meningitidis* w niskich stężeniach nanomolarnych. W pracy opisano dalsze analizy dwóch z nich – *rpmG*-3'UTR oraz AniS. Pierwsza z tych cząsteczek posiada dodatkową strukturę drugorzędową poprzedzającą właściwy terminator transkrypcji oraz posiada reszty adenozyne po stronie 5' bazalnej pary struktury spinki terminatorowej. Natomiast AniS reprezentuje grupę w ligandach *E. coli* ProQ o odmiennym pochodzeniu (sRNA), posiada długi region jednoniciowy po stronie 5', którego sekwencja bezpośrednio przylegająca do podstawy spinki nie posiada adenozyne, jak

również jest zakończona długim, bo składającym się z 8 reszt urydyny ogonem oligo(U). Z badań nad białkiem ProQ z *E. coli* wiadomo, iż regiony te mogą mieć bezpośrednie znaczenie dla oddziaływania z ProQ (Stein i wsp., 2020).

Tabela 1. Wiązanie badanych RNA do białka ProQ z *Neisseria meningitidis*.

³² P-RNA	K_d [nM] (maksymalna frakcja związana)
<i>iga-3'UTR</i>	0.3 ± 0.3 (51 %)
<i>rpmG-3'UTR</i>	1 ± 0.5 (89 %)
<i>carA-5'UTR</i>	1.2 ± 0.4 (88 %)
<i>pnp-5'UTR</i>	7.8 ± 0.8 (63 %)
AniS-3'UTR	5 ± 0.4 (91%)
NMNc0006	0.5 ± 0.2 (57 %)
<i>inter</i> (region międzygenowy, najlepszy ligand z CLIP-seq)	1.4 ± 1.0 (86 %)

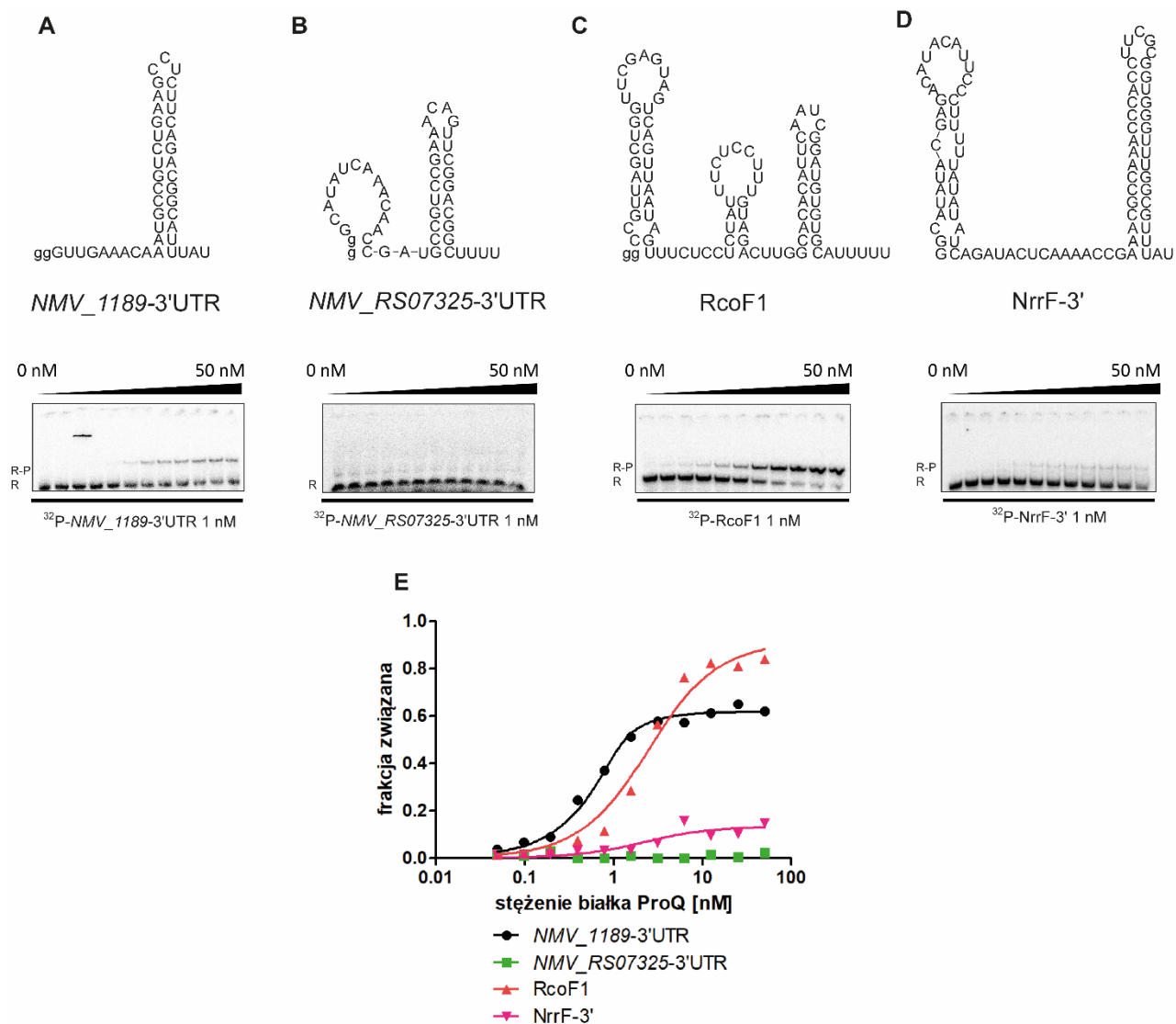
Wartości K_d uzyskano przez dopasowanie danych zależności frakcji związanej RNA od stężenia białka ProQ do równania kwadratowego w programie GraphPad. Średnie wartości K_d i procentu frakcji związanej obliczono na podstawie 3 niezależnych doświadczeń

* wynik niepewny z powodu słabego dopasowania krzywej regresji nieliniowej do danych

5.2.6 Wyznaczenie siły oddziaływania pomiędzy kontrolnymi cząsteczkami RNA a białkiem ProQ z *N. meningitidis*

W celu sprawdzenia w jaki sposób w reakcji wiązania z *N. meningitidis* ProQ zachowują się RNA niewykryte jako ligandy ProQ w CLIP-seq, wybrałem zestaw czterech cząsteczek: dwie pochodzące z 3'UTR (*NMV_1189-3'UTR*, *NMV_RS07325-3'UTR*) i dwie sRNA (*RcoF1*, *NrrF-3'*). W *NMV_1189-3'UTR* region po stronie 5' spinki terminatorowej jest wzbogacony w adenozyne, zatem przypomina w tym regionie natywnie wiązane ligandy ProQ, a w *NMV_RS07325-3'UTR* ten motyw nie występuje. Na podobnej zasadzie wybrałem cząsteczki sRNA - jedna z nich (*NrrF-3'*) posiada reszty adenozyiny poprzedzające bazalną parę struktury spinki terminatorowej, a druga (*RcoF1*) nie. Obie cząsteczki sRNA są ponadto znanymi ligandami białka Hfq z *N. meningitidis* (Heidrich i wsp., 2017). Za wyjątkiem pełnej długości *RcoF1* w cząsteczkach ograniczyłem się jedynie do ich regionów zawierających Rho-

niezależny terminator transkrypcji. Wyniki eksperymentów wiązania z białkiem ProQ przedstawiono na (rys. 28). Wartości stałej dysocjacji i maksymalnej frakcji związanej ujęto w tabeli 2.



Rysunek 28. Porównanie wiązania kontrolnych cząstek RNA do białka ProQ z *Neisseria meningitidis*.

Wiązanie: (A) ³²P-NMV_1189-3'UTR, (B) ³²P-NMV_RS07325-3'UTR, (C) RcoF1 i (D) NrrF-3' monitorowano techniką EMSA, (E) dane zależności frakcji związanej RNA od stężenia białka dopasowane do równania kwadratowego w programie GraphPad. Małą literą „g” oznaczono reszty guanozyny dodane na końcu 5' niektórych cząstek po to, aby zapewnić wyższą wydajność transkrypcji *in vitro*, R – niezwiązane RNA, R-P – kompleks RNA-białko ProQ. Dane stanowią reprezentatywny przykład z trzech niezależnych eksperymentów. Średnie wartości K_d i frakcji związanej ujęto w tabeli 2. Predykcje struktur drugorzędowych RNA wykonano w programie ViennaRNA (Lorenz i wsp., 2011). Dane stanowią reprezentatywny przykład z trzech niezależnych eksperymentów.

Badane RNA, wcześniej nienotowane jako ligandy *N. meningitidis* ProQ, różniły się siłą wiązania do tego białka. Cząsteczki NMV_1189-3'UTR oraz RcoF1 wiązały się silnie z niskimi wartościami stałych dysocjacji 0.24 nM i 1.23 nM, chociaż pierwsza z nich osiągała wyraźnie niższy procent maksymalnej frakcji związanej (ok. 60 %). NrrF-3' wykazało bardzo

słabe wiązanie, w którym frakcja związana nie przekroczyła 17 %, a uzyskanie wiarygodnej wartości K_d przez słabe dopasowanie krzywej regresji nieliniowej okazało się niemożliwe. *NMV_RS07325-3'UTR* nie wykazało żadnego dostrzegalnego wiązania z białkiem ProQ. Z doświadczenia wynika, iż niektóre cząsteczki RNA niewykryte jako ligandy w eksperymencie CLIP-seq (Bauriedl i wsp., 2020), mogą być wiązane przez ProQ *in vitro*. Ich nieobecność w danych z CLIPseq może wynikać albo z braku ekspresji w warunkach eksperymentu albo z faktu, że siła ich oddziaływania z ProQ w komórce bakteryjnej jest różna od tej, którą można zmierzyć *in vitro*. Fakt wiązania ligandów białka Hfq przez białko ProQ wskazuje, że może zachodzić kompetycja o ligandy między tymi białkami. Z drugiej strony każdy z badanych RNA posiadał Rho-niezależny terminator transkrypcji na swoim końcu 3', a dwie cząsteczki - *NMV_1189-3'UTR* oraz *NrrF-3'* - posiadały reszty adenozyiny po stronie 5' spinki terminatorowej, a więc motyw charakterystyczny dla ligandów białka ProQ. Bardzo słabe wiązanie *NrrF-3'* z ProQ lub jego całkowity brak w przypadku *NMV_RS07325-3'UTR* wskazują na istotność dodatkowych motywów strukturalnych lub elementów sekwencji terminatora transkrypcji rozpoznawanych i wiązanych przez białko ProQ z *N. meningitidis*.

Podsumowując, z przeprowadzonego eksperymentu wynika, iż część RNA nienotowanych jako ligandy białka *N. meningitidis* ProQ *in vivo*, może wykazywać wiązanie *in vitro*. Ponadto sama obecność Rho-niezależnego terminatora transkrypcji na końcu 3' RNA nie wystarcza, aby zapewnić silne wiązanie do białka ProQ.

Tabela 2. Wiązanie cząsteczek RNA nieoddziałujących *in vivo* do białka ProQ z *Neisseria meningitidis*.

³² P-RNA	K_d [nM] (maksymalna frakcja związana)
<i>NMV_1189-3'UTR</i>	0.2 ± 0.3 (60 %)
<i>NMV_RS07325-3'UTR</i>	n. o.
RcoF1	1.2 ± 0.4 (89 %)
NrrF-3'	n. o. (15 %)

Wartości K_d uzyskano przez dopasowanie danych zależności frakcji związanej RNA od stężenia białka ProQ do równania kwadratowego w programie GraphPad. Średnie wartości K_d i frakcji związanej obliczono na podstawie 3 niezależnych doświadczeń

n. o. – nie określono

5.2.7 Znaczenie obecności Rho-niezależnego terminatora transkrypcji dla wiązania RNA z białkiem *N. meningitidis* ProQ

Rola Rho-niezależnego terminatora transkrypcji jako pierwotnego motywu rozpoznawanego i specyficznie wiązanego przez domenę FinO (NTD) ProQ z *E. coli* jest znana z wcześniejszych badań (Stein i wsp., 2020). Chociaż z danych sekwencjonowania wysokoprzepustowego CLIP-seq (Holmqvist i wsp., 2018) i RIL-seq (Melamed i wsp., 2020) wiadomo, iż Rho-niezależny terminator z pewnością nie jest jedynym motywem strukturalnym w RNA mogącym oddziaływać z białkiem ProQ, dotychczas tylko on był notowany z względnie wysoką regularnością, podczas gdy pozostałe motywy nie wykazywały powtarzalności lub oczywistych cech wspólnych.

W celu sprawdzenia, czy struktura terminatora odgrywa podobnie krytyczną rolę w wiązaniu RNA za pośrednictwem końców 3' przez białko ProQ z *N. meningitidis*, co w przypadku ProQ z *E. coli*, zbadałem wpływ usunięcia terminatora na wiązanie cząsteczki *rpmG* do białka *N. meningitidis* ProQ. Ze względu na niewielką długość cząsteczki *rpmG*-3'UTR, jaka powstałaby po usunięciu terminatora począwszy od pierwszej pary GC struktury spinki terminatorowej (o długości zaledwie 22 nukleotydów), cząsteczkę najpierw wydłużyłem w kierunku 5' (*rpmG*-95) i potwierdziłem jej zbliżone powinowactwo do wykazywanego przez oryginalne *rpmG*-3'UTR. Następnie usunąłem z niej strukturę terminatora uzyskując cząsteczkę *rpmG*-NS (z ang. *no stem*, bez spinki). Wyniki pomiaru siły wiązania *rpmG*-95 i *rpmG*-NS do ProQ przedstawiono na rysunku 29 zawierającym także dane z wcześniejszego eksperymentu dla *rpmG*-3'UTR jako punktu odniesienia ułatwiającego porównanie.

niezależnego terminatora transkrypcji mający długi region jednoniciowy na końcu 3', *iga*-NS, nie wykazywał obserwowalnego wiązania z białkiem ProQ (rys. 30, tab. 3). W świetle powyższego należy uznać, że terminator transkrypcji jest kluczowym elementem strukturalnym rozpoznawanym i wiązany przez białko ProQ z *N. meningitidis*.

Podsumowując, potwierdziłem krytyczną rolę obecności Rho-niezależnego terminatora transkrypcji w silnym oddziaływaniu białka *N. meningitidis* ProQ z końcami 3' dwóch różnych RNA, *rpmG*-3'UTR i *iga*-3'UTR. Biorąc pod uwagę wysoką częstotliwość, z jaką piki z CLIP-seq (Bauriedl i wsp., 2020) pokrywają struktury terminatorów, można przyjąć, iż również w innych ligandach wiązanych za pośrednictwem 3'UTR Rho-niezależne terminatory transkrypcji stanowią motyw rozpoznawany i wiązany przez białko ProQ. W kolejnych podrozdziałach badałem wpływ różnych aspektów struktury Rho-niezależnego terminatora i sekwencji przylegającej do niego po stronie 5' na wiązanie przez białko ProQ z *N. meningitidis*.

Tabela 3. Wiązanie RNA posiadających Rho-niezależny terminator transkrypcji oraz RNA pozbawionych terminatora do białka ProQ z *Neisseria meningitidis*.

³² P-RNA	K_d [nM] (maksymalna frakcja związana)
<i>rpmG</i> -3'UTR	1 ± 0.5 (89 %)
<i>rpmG</i> -95	1.6 ± 1.7 (84 %)
<i>rpmG</i> -NS	n. o. (25 %)
<i>iga</i> -3'UTR	0.3 ± 0.3 (51 %) *
<i>iga</i> -92	2.5 ± 0.7 (79 %)
<i>iga</i> -NS	n. o. (0%)

Wartości K_d uzyskano przez dopasowanie danych zależności frakcji związanej RNA od stężenia białka ProQ do równania kwadratowego w programie GraphPad. Średnie wartości K_d i frakcji związanej obliczono na podstawie 3 niezależnych doświadczeń.

n. o. – nie określono

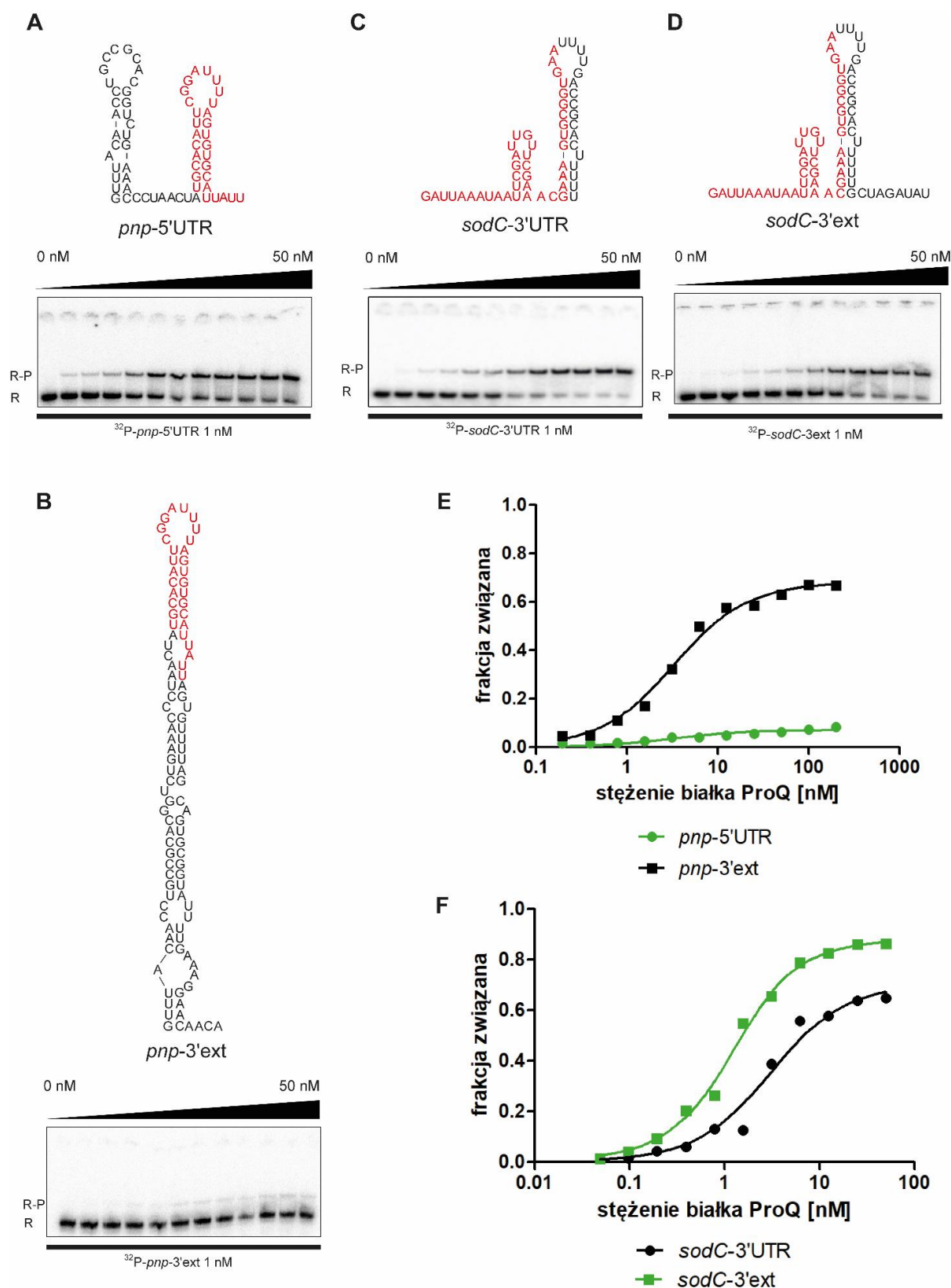
* wynik niepewny z powodu słabego dopasowania krzywej regresji nieliniowej do danych

5.2.8. Znaczenie wydłużenia sekwencji 3'-terminalnej RNA dla oddziaływania z białkiem *N. meningitidis* ProQ

Z badań nad *E. coli* ProQ (Stein i wsp., 2020), a także z pierwszego eksperymentu wiązania *rpmG*-3'UTR do białka ProQ z *N. meningitidis* (rys. 25) wiadomo, że nadmierne

wydłużenie sekwencji po stronie 3' struktury terminatora może znacząco osłabiać powinowactwo RNA do białka ProQ. Aby sprawdzić, czy w przypadku białka *N. meningitidis* ProQ nie jest to cecha specyficzna dla *rpmG*-3'UTR, do badań wybrałem dwie dodatkowe cząsteczki, które zgodnie z referencjami (Bauriedl i wsp., 2020) posiadają wydłużone końce 3'. Pierwsza z nich, *pnp*-5'UTR, w wersji skróconej już wcześniej została przedstawiona w tej pracy (rys. 24), natomiast *sodC*-3'UTR stanowi cząsteczkę dodatkową. Końce 3' *pnp*-3'ext i *sodC*-3'ext wybrałem zgodnie z tym, jak zostały przedstawione w referencjach (Bauriedl i wsp., 2020). *sodC*-3'UTR kończy się natomiast wraz z ostatnią konsekwentnie występującą resztą urydyny ogona oligo(U). Na rysunku 31 uwzględniono również dane z już przeprowadzonych eksperymentów dla *pnp*-5'UTR. Wartości stałej dysocjacji i maksymalnej frakcji związanej przedstawiono w tabeli 4.

Wydłużona wersja cząsteczki *sodC*, *sodC*-3'ext, wiązała się wyraźnie słabiej do białka ProQ z *N. meningitidis* od krótszej, *sodC*-3'UTR, zarówno pod względem wartości stałej dysocjacji (2.1 nM vs. 0.61 nM) jak i procentu maksymalnej frakcji związanej (65 % vs. 86 %). Podobny efekt zaobserwowano dla RNA *pnp*. Silnie wydłużony wariant, *pnp*-3'ext, wiązał się z ProQ bardzo słabo, osiągając zaledwie kilka procent maksymalnej frakcji związanej, podczas gdy procent ten dla krótszego wariantu, *pnp*-5'UTR, wynosił średnio 64 %, a K_d było równe 7.8 nM. Zanotowana różnica w sile efektu dla *sodC* i *pnp* najprawdopodobniej wynika z różnej długości końców 3' ich wydłużonych wariantów, gdzie długi i wysoce ustrukturyzowany region poniżej struktury spinki terminatorowej w *pnp*-3'ext znacząco zmniejszał jej dostępność dla białka ProQ. Z drugiej strony może wskazywać to na udział grupy 3' hydroksylowej urydyny w wiązaniu przez białko ProQ z *N. meningitidis*. Warto w tym miejscu zaznaczyć, że badany region transkryptu genu *pnp* pochodzi z 5'UTR, a więc jeżeli struktura, którą pokrywa pik z CLIP-seq (Bauriedl i wsp., 2020) rzeczywiście odgrywa rolę Rho-niezależnego terminatora transkrypcji, w warunkach ekspresji *pnp* jej formacja musi zostać zatrzymana. Być może zachodzi tu jakiś rodzaj zjawiska antyterminacji pozwalający na właściwą ekspresję genu *pnp*. Na podstawie wyników z przeprowadzonego eksperymentu możliwym jest, iż mRNA *pnp* oddziałuje z białkiem ProQ *N. meningitidis* przede wszystkim wówczas, gdy struktura przypominająca Rho-niezależny terminator transkrypcji jest dostępna na końcu 3' transkryptu. Tym niemniej niewykluczone, że struktura ta jest za słaba by pełnić funkcję Rho-niezależnego terminatora transkrypcji, ale jednocześnie wystarczająco do niego podobna, aby wiązać się do białka *N. meningitidis* ProQ *in vivo* np. po obróbce z udziałem nukleaz.



Rysunek 31. Wydłużenie końca 3' poza ogon oligo(U) zmniejsza powinowactwo RNA do białka *N. meningitidis* ProQ. Wiązanie (A) ³²P-*pnp-5'UTR*, (B) ³²P-*pnp-3'ext*, (C) ³²P-*sodC-3'UTR* i (D) ³²P-*sodC-3'ext* monitorowano techniką EMSA, (E,F) dane zależności frakcji związanej RNA od stężenia białka dopasowane do równania kwadratowego w programie GraphPad. Czerwonym kolorem zaznaczono nukleotydy odpowiadające pikowi z CLIP-seq, R –

niezwiązane RNA, R-P – kompleks RNA-białko ProQ. Średnie wartości K_d i frakcji związanej ujęto w tabeli 4. Predykcje struktur drugorzędowych RNA wykonano w programie ViennaRNA (Lorenz i wsp., 2011). Dane stanowią reprezentatywny przykład z trzech niezależnych eksperymentów.

Podsumowując, w przeprowadzonych eksperymentach wykazałem, iż dostępność struktury Rho-niezależnego terminatora transkrypcji na końcu 3' RNA zapewnia silne wiązanie przez białko ProQ z *N. meningitidis*. Efekt ten, wcześniej zaobserwowany dla *rpmG-3'UTR*, potwierdziłem dla cząsteczek *sodC-3'UTR* oraz *pnp-5'UTR*. Z kolei wydłużenie tego regionu poza ogon oligo(U) może skutkować osłabieniem tego oddziaływania.

Tabela 4. Wiązanie RNA z dostępnymi strukturami terminatorów i ich wariantów z wydłużonym końcem 3' do białka ProQ z *Neisseria meningitidis*.

³² P-RNA	K_d [nM] (maksymalna frakcja związana)
<i>sodC-3'UTR</i>	0.6 ± 0.1 (87 %)
<i>sodC-3'ext</i>	2.1 ± 1.3 (65 %)
<i>pnp-5'UTR</i>	7.8 ± 0.8 (63 %)
<i>pnp-3'ext</i>	n. o. (9 %)

Wartości K_d uzyskano przez dopasowanie danych zależności frakcji związanej RNA od stężenia białka ProQ do równania kwadratowego w programie GraphPad. Średnie wartości K_d i maksymalnej frakcji związanej obliczono na podstawie 3 niezależnych doświadczeń

n. o. – nie określono

5.2.9 Znaczenie długości sekwencji 3'-terminalnej ogona oligo(U) dla oddziaływania RNA z białkiem *N. meningitidis* ProQ

Z otrzymanych wyników można wnioskować, iż RNA wiązane przez białko ProQ z *N. meningitidis* poprzez strukturę Rho-niezależnego terminatora transkrypcji lub jemu podobną, wykazuje najwyższe powinowactwo, gdy struktura ta jest łatwo dostępna, tzn. gdy RNA nie zawiera sekwencji poniżej ogona oligo(U). To z kolei może sugerować udział ogona oligo(U) w tworzeniu kontaktów z białkiem ProQ. Rzeczywiście, kompleks RocC/RocR (PDB 7RGU), a więc białka z rodziny FinO, do której należy ProQ, potwierdza udział reszt ogona oligo(U) w oddziaływaniu ze stroną wklęsłą domeny FinO białka RocC (Kim i wsp., 2022). W badaniach przeprowadzonych uprzednio przez Ewę Stein została także potwierdzona kluczowa rola odpowiedniej długości ogona oligo(U) w wiązaniu RNA przez białko ProQ z *E. coli* (Stein i wsp., 2020).

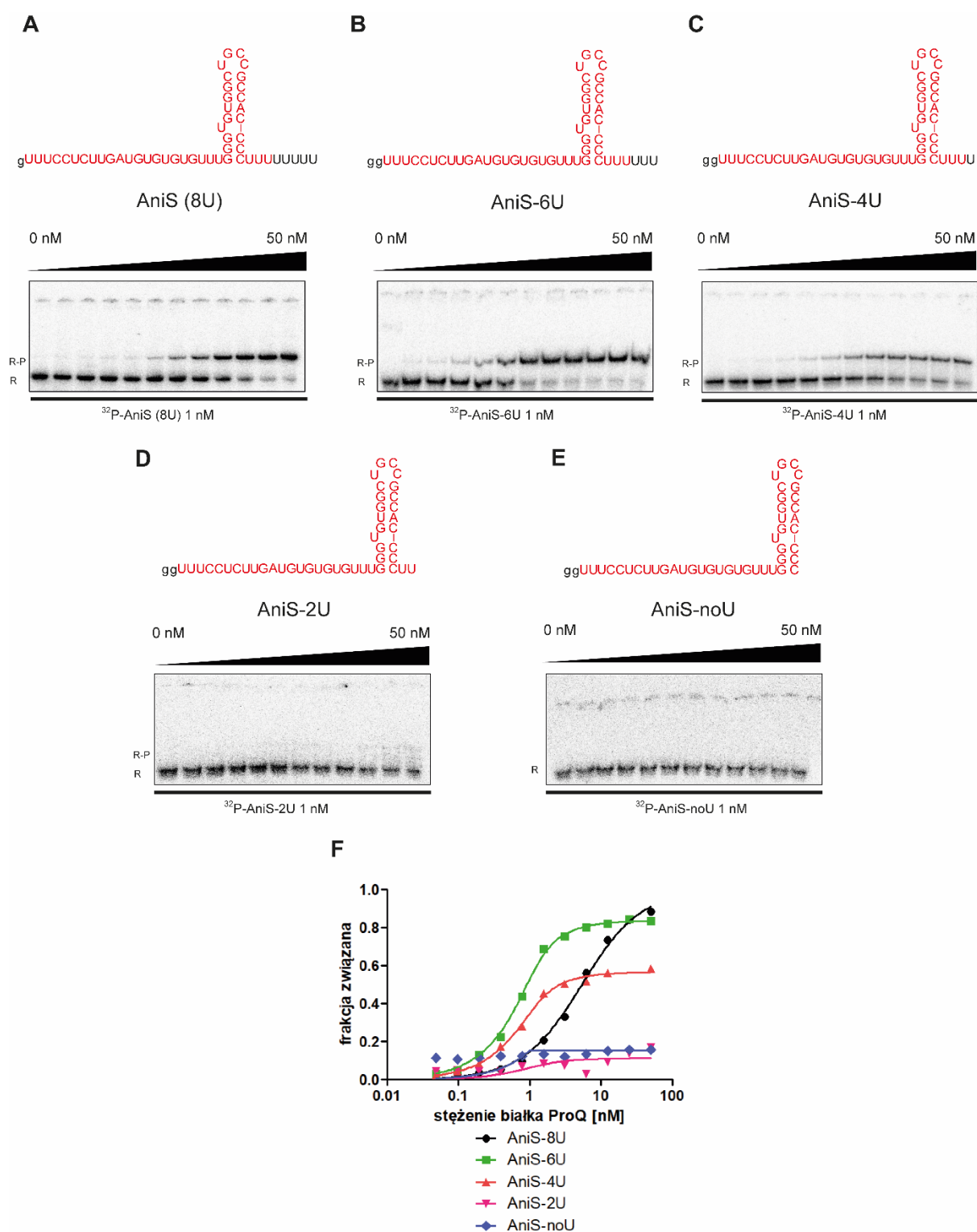
Zbadałem wpływ zarówno wydłużenia sekwencji ogona oligo(U) cząsteczki *rpmG*-3'UTR (zawierającej sześć reszt urydyny) jak i jego skrócenia. Ogon wydłużyłem aż do trzech natywnie występujących reszt, otrzymując cząsteczki *rpmG*-7U, *rpmG*-8U i *rpmG*-9U. Ogon oligo(U), czyli 3'-terminalna sekwencja Rho-niezależnego terminatora transkrypcji bogata w urydyny, pomimo nazwy może także zawierać inne nukleotydy, przy czym ich frekwencja jest zdecydowanie niższa. Dlatego też pierwszą resztą, o jaką zostało wydłużone *rpmG*-3'UTR była adenozyzna, ponieważ to ona występuje natywnie na tej pozycji. Z kolei skracanie sekwencji ogona oligo(U) odbywało się za każdym razem o dwie reszty urydyny, aż do ich całkowitego usunięcia, a wygenerowanymi cząsteczkami były *rpmG*-4U, *rpmG*-2U i *rpmG*-noU. Przebieg eksperymentów wiązania ilustruje rysunek 32, a wartości K_d i maksymalnej frakcji związanej przedstawiono w tabeli 5. W celu łatwiejszego porównania zarówno na rysunku jak i w tabeli ujęto wyniki z wcześniejszych doświadczeń z cząsteczką *rpmG*-3'UTR, będącą punktem odniesienia.

Rysunek 32. Skrócenie ogona oligo(U) poniżej sześciu reszt urydyny znacznie osłabia powinowactwo *rpmG*-3'UTR do białka *N. meningitidis* ProQ. Wiązanie (A) ³²P-*rpmG*-9U, (B) ³²P-*rpmG*-8U, (C) ³²P-*rpmG*-7U, (D) ³²P-*rpmG*-3'UTR (6U), (E) ³²P-*rpmG*-4U, (F) ³²P-*rpmG*-2U i (G) ³²P-*rpmG*-noU do białka ProQ z *N. meningitidis* monitorowano techniką EMSA, (H) dane zależności frakcji związanej RNA od stężenia białka ProQ dopasowane do równania kwadratowego w programie GraphPad. Czerwonym kolorem zaznaczono nukleotydy odpowiadające pikowi z CLIP-seq; małą literą „g” oznaczono dodane reszty guanozyny na końcu 5' cząsteczek po to, aby zapewnić wyższą wydajność transkrypcji *in vitro*, R – niezwiązane RNA, R-P – kompleks RNA-białko ProQ. Średnie wartości K_d i maksymalnej frakcji związanej ujęto w tabeli 5. Predykcje struktur drugorzędowych RNA wykonano w pakiecie ViennaRNA (Lorenz i wsp., 2011). Dane stanowią reprezentatywny przykład z trzech niezależnych eksperymentów.

Wiązanie wydłużonych w 3'-terminalnej sekwencji ogona oligo(U) RNA przebiegało w zbliżony sposób do *rpmG*-3'UTR. Wyjątkiem było *rpmG*-7U, gdzie pomimo podobnej wartości stałej dysocjacji, maksymalny procent frakcji związanej był wyraźnie niższy niż w pozostałych wariantach. Należy podkreślić, że dość nietypowy wynik uzyskany dla *rpmG*-7U może wynikać z odmiennej tożsamości 3'-terminalnej reszty, którą w tym wypadku była wspomniana już wcześniej adenozyzna. Zmierzonymi średnimi wartościami K_d i maksymalnej frakcji związanej dla *rpmG*-3'UTR, *rpmG*-7U, *rpmG*-8U i *rpmG*-9U były odpowiednio 0.22 nM (88.1 %), 0.21 nM (89 %), < 0.5 nM (68.6 %) i 1 nM (89 %).

W eksperymentach wiązania skróconych wariantów *rpmG*-3'UTR do białka ProQ usuwaniu reszt urydyny ogona oligo(U) towarzyszył proporcjonalny wzrost wartości stałej dysocjacji i spadek wartości maksymalnej frakcji związanej. Zmierzonymi wartościami K_d i procentu maksymalnej frakcji były: 2.6 nM (58 %) dla *rpmG*-4U i 16.5 nM (27 %) dla *rpmG*-2U. Z powodu słabego wiązania wariantu całkowicie pozbawionego ogona oligo(U), *rpmG*-noU, nie było możliwe prawidłowe dopasowanie danych do równania kwadratowego, a w konsekwencji obliczenie wartości K_d . Wartość maksymalnej frakcji związanej RNA wyniosła 5.6 %.

Aby zbadać, czy podobna zależność siły wiązania od długości ogona oligo(U) występuje także u innych RNA, analogiczny eksperyment wykonałem dla cząsteczki AniS. Pomiąłem wydłużanie sekwencji ogona oligo(U), ponieważ wykorzystane we wcześniejszym doświadczeniu AniS posiada osiem reszt urydyny, za którymi natywnie kolejne już nie występują. Przebieg eksperymentów wiązania ilustruje rysunek 33, a wartości K_d i maksymalnej frakcji związanej przedstawiono w tabeli 5.



Rysunek 33. AniS z ogonem oligo(U) złożonym z sześciu reszt urydyny wykazuje najwyższe powinowactwo do białka *N. meningitidis* ProQ. Wiązanie (A) ³²P-AniS (8U), (B) ³²P-AniS-6U, (C) ³²P-AniS-4U, (D) ³²P-AniS-2U i (E) ³²P-AniS-noU do białka ProQ z *N. meningitidis* monitorowano techniką EMSA, (F) dane zależności frakcji związanej RNA od stężenia białka ProQ dopasowane do równania kwadratowego w programie GraphPad. Czerwonym kolorem zaznaczono nukleotydy odpowiadające pikowi z CLIP-seq; małą literą „g” oznaczono reszty guanozyny dodane na końcu 5' niektórych cząsteczek po to, aby zapewnić wyższą wydajność transkrypcji *in vitro*; R – niezwiązane RNA, R-P – kompleks RNA-białko ProQ. Średnie wartości K_d i frakcji związanej ujęto w tabeli 5. Predykcje struktur drugorzędowych RNA wykonano w pakiecie ViennaRNA (Lorenz i wsp., 2011). Dane stanowią reprezentatywny przykład z trzech niezależnych eksperymentów.

Wiązanie AniS-6U, a więc cząsteczki posiadającej o dwie reszty urydyny mniej w ogonie oligo(U) od AniS, przez białko ProQ *N. meningitidis* przebiegało z niższą średnią maksymalną frakcją związaną (79.1 % vs. 91 %). Za to oddziaływanie to cechowało się wyraźnie niższą wartością stałej dysocjacji (0.7 nM vs. 5 nM). Wynik ten odróżnia AniS od *rmpG-3'UTR*, gdzie wariant o ośmiu (a także dziewięciu) resztach urydyny w ogonie oligo(U) wiązał się w zbliżony sposób do wariantu o sześciu resztach urydyny. Natomiast dalsze skrócenie ogona oligo(U), podobnie jak odnotowano dla *rmpG-3'UTR*, skutkowało znacznym spadkiem maksymalnej frakcji związanej. Co ciekawe, wartość K_d obliczona dla wariantu AniS-4U była zbliżona do tej zanotowanej dla AniS-6U (0.9 nM vs. 0.7 nM), jednak procent maksymalnej frakcji związanej był znacząco niższy (52.8 % vs. 79.1 %).

Podsumowując, skrócenie ogona oligo(U) poniżej sześciu reszt urydyny w większości wypadków skutkuje wzrostem wartości K_d i proporcjonalnym do liczby usuniętych reszt urydyny spadkiem maksymalnej frakcji związanej. Z drugiej strony RNA z większą niż sześć liczbą reszt urydyny mogą wiązać się z podobną siłą (*rmpG*) lub słabiej (AniS). Uzyskane wyniki wskazują na zaangażowanie ogona oligo(U) w oddziaływanie RNA z białkiem ProQ *N. meningitidis*.

Tabela 5. Wiązanie RNA z wydłużonymi i skróconymi sekwencjami ogona oligo(U) do białka ProQ z *Neisseria meningitidis*.

³² P-RNA	K_d [nM] (maksymalna frakcja związana)
<i>rmpG-9U</i>	0.2 ± 0.3 (88 %)
<i>rmpG-8U</i>	0.2 ± 0.2 (89 %)
<i>rmpG-7U</i>	< 0.5 (66 %)
<i>rmpG-3'UTR</i>	1 ± 0.5 (89 %)
<i>rmpG-4U</i>	2.6 ± 3.5 (58 %)
<i>rmpG-2U</i>	16.5 ± 26.5 (27 %)
<i>rmpG-noU</i>	n. o. (5.6 %)
AniS (8U)	5 ± 0.4 (91 %)
AniS-6U	0.7 ± 0.6 (79 ± 10)

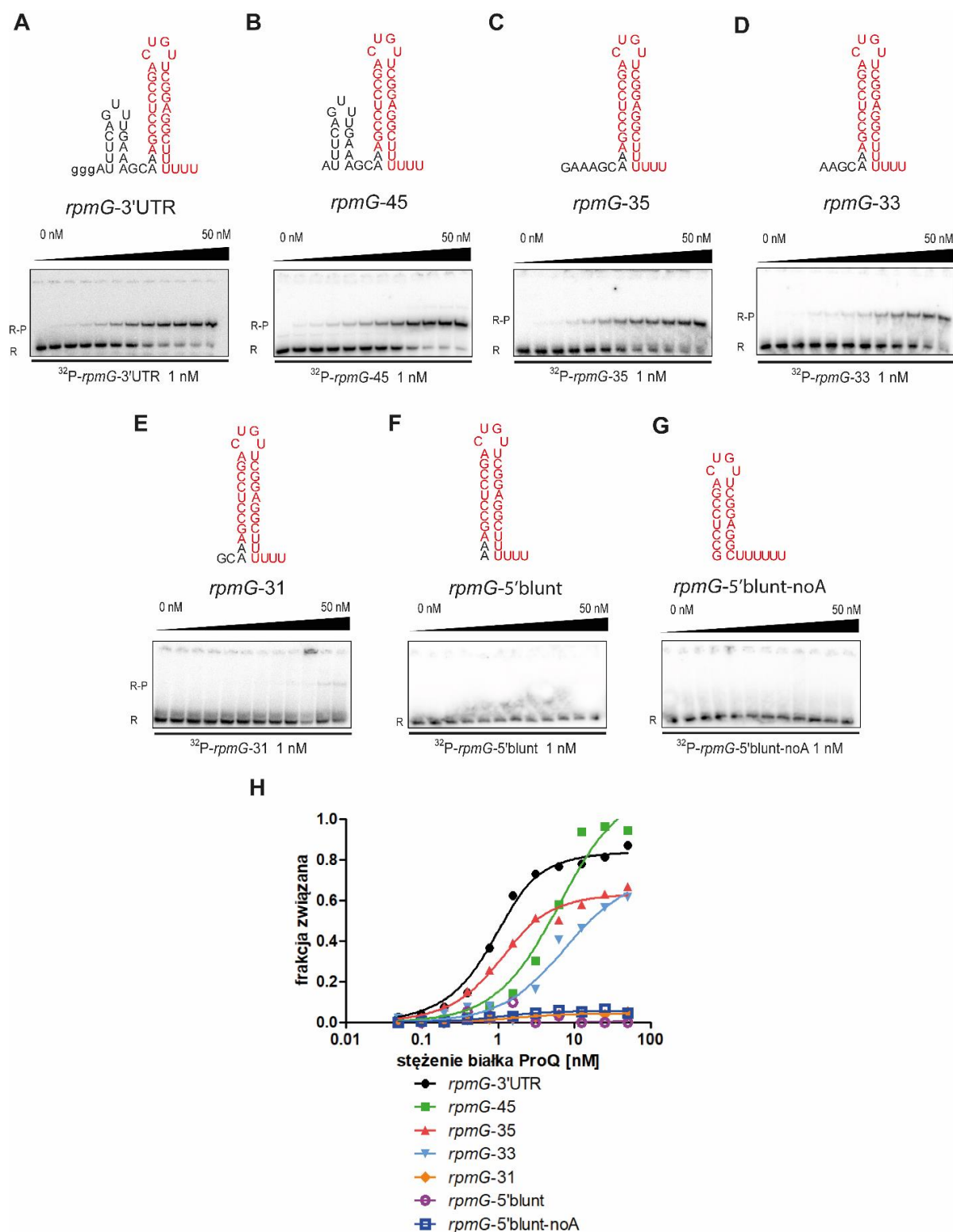
AniS-4U	0.9 ± 0.6 (53 %)
AniS-2U	n. o. (14 %)
AniS-noU	n. o. (0 %)

Wartości K_d uzyskano przez dopasowanie danych zależności frakcji związanej RNA od stężenia białka ProQ do równania kwadratowego w programie GraphPad. Średnie wartości K_d i frakcji związanej obliczono na podstawie 3 niezależnych doświadczeń.

n. o. – nie określono

5.2.10 Znaczenie obecności sekwencji po stronie 5' Rho-niezależnego terminatora transkrypcji dla wiązania RNA z białkiem *N. meningitidis* ProQ

W celu zbadania, czy sekwencja znajdująca się po stronie 5' struktury spinki terminatorowej jest zaangażowana w oddziaływanie z białkiem ProQ z *N. meningitidis*, i jeżeli tak, to czy białko ProQ wykazuje jakieś preferencje co do długości tego regionu, zaprojektowałem szereg skróconych wariantów cząsteczki *rpmG*-3'UTR. Pierwszym, uzyskanym przez syntezę chemiczną, był wariant cząsteczki *rpmG*-3'UTR, w którym usunięto trzy pierwsze reszty guanozyny (*rpmG*-45). W *rpmG*-3'UTR dodano je w celu zapewnienia wysokiej wydajności transkrypcji *in vitro*. Było to konieczne, ponieważ wydajność transkrypcji tego RNA z niższą liczbą wiodących reszt guanozyny była bardzo niska. Usunięcie tych reszt pozwoliło zweryfikować, czy potencjalny udział sekwencji po stronie 5' Rho-niezależnego terminatora w *rpmG*-3'UTR nie wynika z ich obecności. Punktem wyjścia w projektowaniu kolejnych wariantów był *rpmG*-35 zawierający 5'-terminalną sześci nukleotydową sekwencję jednoniciową. Następnie w cząsteczkach *rpmG*-33, *rpmG*-31 i *rpmG*-5'blunt usuwałem za każdym razem dwie wiodące reszty na końcu 5'. Z *rpmG*-5'blunt usunąłem również sparowane z resztami ogona oligo(U) reszty adenozyne, uzyskując wariant z całkowicie niesparowanym ogonem oligo(U) (*rpmG*-5'blunt-noA). Przebieg testów wiązania został przedstawiony na rysunku 34, a średnie wartości uzyskanych K_d i maksymalnej frakcji związanej zebrano w tabeli 6. Dla *rpmG*-3'UTR użyłem danych z wcześniejszych doświadczeń w celu umożliwienia bezpośredniego porównania wyników.



Rysunek 34. Sekwencja po stronie 5' struktury Rho-niezależnego terminatora transkrypcji bierze udział w wiązaniu *rpmG-3'UTR* do białka *N. meningitidis* ProQ. Wiązanie (A) ^{32}P -*rpmG-3'UTR*, (B) ^{32}P -*rpmG-45*, (C) ^{32}P -*rpmG-35*, (D) ^{32}P -*rpmG-33*, (E) ^{32}P -*rpmG-31*, (F) ^{32}P -*rpmG-5'blunt* i (G) ^{32}P -*rpmG-5'blunt-noA* do białka ProQ z *N. meningitidis* monitorowano techniką EMSA, (H) dane zależności frakcji związanej RNA od stężenia białka ProQ dopasowane do równania kwadratowego w programie GraphPad. Czerwonym kolorem zaznaczono nukleotydy odpowiadające pikowi z CLIP-seq; małą literą „g” oznaczono reszty guanozyny dodane na końcu 5' niektórych cząsteczek po to, aby zapewnić wyższą wydajność transkrypcji *in vitro*; R – niezwiązane RNA, R-P – kompleks RNA-białko ProQ. Średnie wartości K_d i frakcji związanej ujęto w tabeli 6. Predykcje struktur drugorzędowych RNA wykonano w programie ViennaRNA (Lorenz i wsp., 2011). Dane stanowią reprezentatywny przykład z trzech niezależnych eksperymentów.

Wariant *rpmG-45*, a więc pozbawiony wcześniej dodanych trzech reszt guanozyny na końcu 5', wykazywał nieco wyższą średnią stałą dysocjacji w porównaniu z *rpmG-3'UTR* (3.6 nM vs. 1 nM) jak i średnią maksymalną frakcją związaną (89 % vs. 94 %), jednak różnica ta znajdowała się w zakresie błędu pomiarowego. Kolejna cząsteczka zawierająca sześci nukleotydowy region jednoniciowy przed dwuniciowym regionem struktury spinki terminatorowej wiązała się z podobną do *rpmG-3'UTR* wartością K_d (0.7 nM vs. 1 nM), ale niższą maksymalną frakcją związaną (71 % vs. 89 %). Dalsze skrócenie sekwencji 5'-terminalnej (*rpmG-33*) skutkowało wzrostem wartości K_d (7.3 nM vs. 1 nM) i dalszym spadkiem maksymalnej frakcji związanej (63 %). Wariant z dwoma nukleotydami poprzedzającymi region dwuniciowy terminatora wiązał się bardzo słabo – maksymalna frakcja związana nie przekraczała 10 %, natomiast warianty *rpmG-5'blunt* oraz *rpmG-5'blunt-noA*, nieposiadające jednoniciowej sekwencji 5'-terminalnej, nie wykazywały obserwowalnego wiązania z białkiem ProQ z *N. meningitidis*. Dla tych RNA wyznaczenie wartości K_d nie było możliwe.

W celu zweryfikowania, czy odnotowany udział sekwencji po stronie 5' Rho-niezależnego terminatora transkrypcji w oddziaływaniu RNA z białkiem *N. meningitidis* ProQ nie jest specyficzny dla *rpmG-3'UTR*, zmierzyłem siłę wiązania zestawu skróconych od strony 5'-terminalnej wariantów AniS (rys. 35). Wartości K_d i maksymalnej frakcji związanej przedstawiono w tabeli 6.

Podobnie do sytuacji obserwowanej dla *rpmG*-3'UTR, skracanie sekwencji 5'-terminalnej AniS osłabiało powinowactwo tego RNA do białka ProQ z *N. meningitidis*, przy czym efekt ten był jeszcze wyraźniejszy. Wariant posiadający ośmionukleotydomową jednoniciową sekwencję na końcu 5', AniS-37, cechował się zbliżoną wartością stałej dysocjacji (4.03 nM vs 5 nM), aczkolwiek średnia maksymalna frakcja związana była już wyraźnie niższa (60 % vs. 91 %). Dalsze skrócenie regionu 5' o kolejne dwa wiodące nukleotydy (AniS-35) skutkowało ledwie dostrzegalnym wiązaniem RNA przez ProQ. Usuwanie kolejnych reszt z sekwencji 5'-terminalnej, pozostawiające cztery i dwa nukleotydy przed strukturą spinki terminatorowej (odpowiednio AniS-33 i AniS-31) lub niepozostawiające ich wcale (AniS-5'blunt), prowadziło do całkowitego uchylenia jakiegokolwiek obserwowalnego oddziaływania między RNA i białkiem ProQ z *N. meningitidis*.

Podsumowując, wykazałem udział sekwencji po stronie 5' Rho-niezależnego terminatora transkrypcji w wiązaniu RNA przez białko ProQ *N. meningitidis*. Jednakże długość tej sekwencji i zakres jej oddziaływania z ProQ może się różnić pomiędzy poszczególnymi ligandami RNA.

Tabela 6. Wiązanie RNA ze skróconą sekwencją 5'-terminalną przez ProQ z *Neisseria meningitidis*.

³² P-RNA	<i>K_d</i> [nM] (maksymalna frakcja związana)
<i>rpmG</i> -3'UTR	1 ± 0.5 (89 %)
<i>rpmG</i> -35	0.8 ± 0.2 (71 %)
<i>rpmG</i> -33	7.3 ± 2.5 (63 %)
<i>rpmG</i> -31	n. o. (8 %)
<i>rpmG</i> -5'blunt	n. o. (0 %)
<i>rpmG</i> -5'blunt-noA	n. o. (0 %)
AniS	5 ± 0.4 (91 %)
AniS-37	4.0 ± 1.2 (60 %)
AniS-35	n. o. (2 %)
AniS-33	n. o. (0 %)
AniS-31	n. o. (0 %)

AniS-5'blunt

n. o. (0 %)

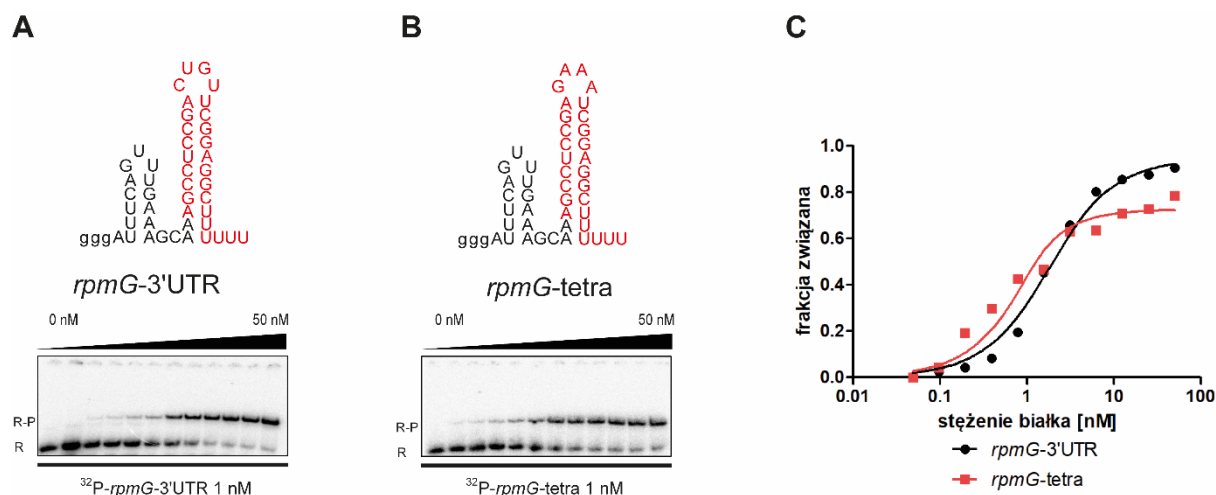
Wartości K_d uzyskano przez dopasowanie danych zależności frakcji związanej RNA od stężenia białka ProQ do równania kwadratowego w programie GraphPad. Średnie wartości K_d i frakcji związanej obliczono na podstawie 3 niezależnych doświadczeń.

n. o. – nie określono

5.2.11 Znaczenie długości regionu dwuniciowego Rho-niezależnego terminatora transkrypcji dla wiązania cząsteczki RNA z białkiem *N. meningitidis* ProQ

We wcześniejszych eksperymentach udowodniłem, iż obecność struktury spinki terminatorowej Rho-niezależnego terminatora transkrypcji, a także sekwencji znajdującej się po stronach 3' (ogon oligo(U)) oraz 5' są krytycznie ważne dla specyficznego i silnego wiązania RNA z białkiem ProQ z *N. meningitidis*. Następnym doświadczeniem, jakie postanowiłem wykonać, było określenie długości regionu dwuniciowego spinki terminatorowej zapewniającej silne wiązanie RNA z białkiem ProQ. Innymi słowy określenie, które regiony dwuniciowej struktury spinki terminatorowej są rozpoznawane i wiązane przez białko razem z otaczającymi po obu stronach strukturę spinki sekwencjami 3'- i 5'-terminalnymi. W tym celu zaprojektowałem kolejny zestaw wariantów *rpmG*-3'UTR.

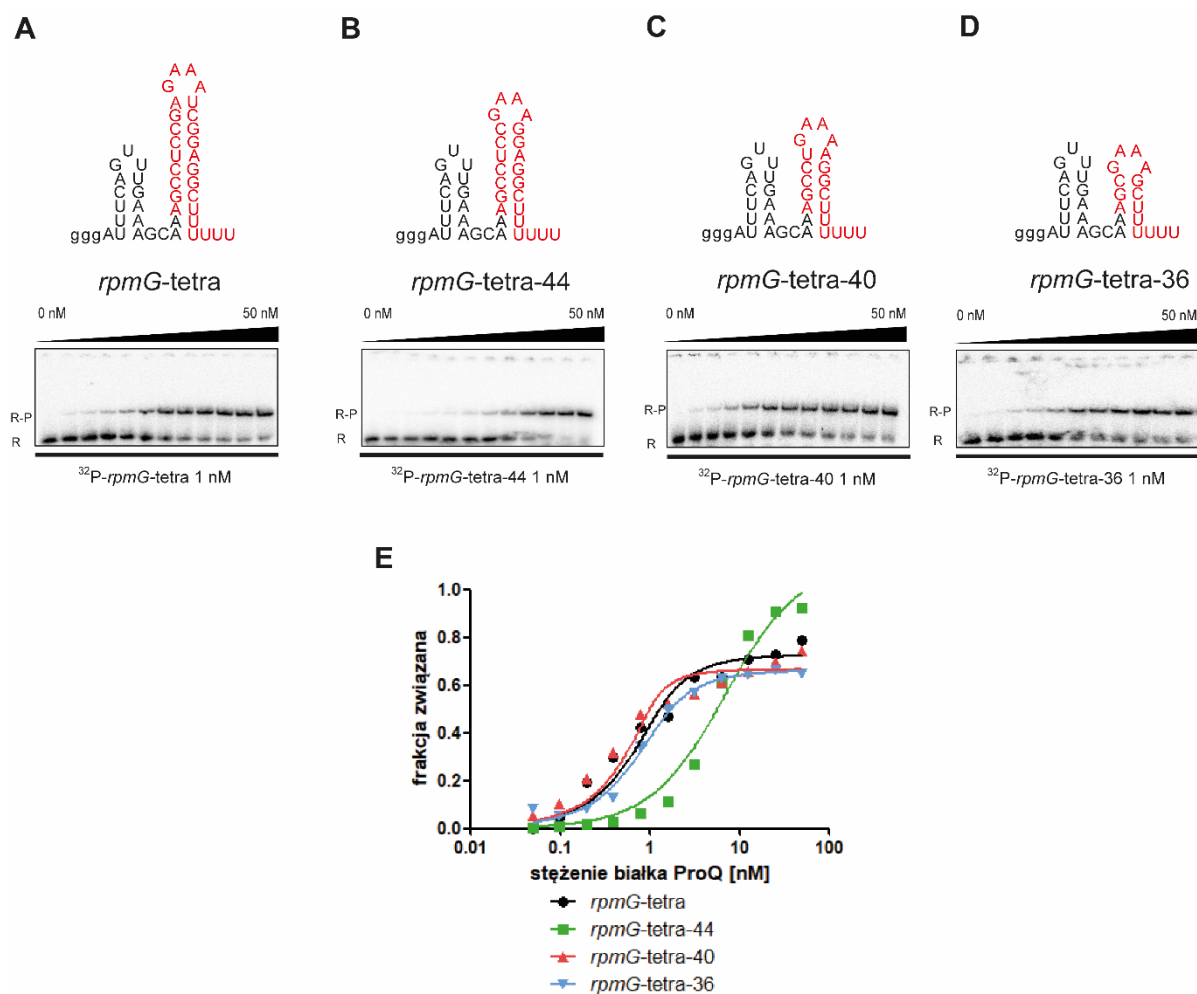
Stopniowe redukowanie długości regionów dwuniciowych nie jest tak prostym zadaniem, jak skracanie regionów jednoniciowych, gdyż nawet niewielkie zmiany mogą mocno zaburzać rzeczywistą strukturę drugorzędową RNA. Dzieje się tak, gdy po wprowadzeniu zmian możliwe jest uformowanie alternatywnej, bardziej korzystnej energetycznie konformacji danego RNA. Aby zminimalizować ryzyko takiego przearanżowania struktury drugorzędowej, natywnie występującą pętlę apikalną Rho-niezależnego terminatora *rpmG*-3'UTR o sekwencji CUGU zastąpiłem sekwencją GAAA (tzw. pętla czteronukleotydomowa, z ang. *tetra*loop). Pętla czteronukleotydomowa znana jest ze stabilizującego wpływu na strukturę na szczycie której się znajduje, ze względu na korzystne energetycznie ułożenie nukleotydów (Conn i Draper, 1998). Zmiana pętli apikalnej nie wpłynęła na ogólną konformację *rpmG*-3'UTR (predykcja w programie RNAStructure), w związku z czym zmierzyłem siłę wiązania wariantu z pętlą czteronukleotydomową (*rpmG*-tetra) do białka ProQ z *N. meningitidis*, i porównałem z wiązaniem *rpmG*-3'UTR w tym samym eksperymencie (rys. 36).



Rysunek 36. Zmiana pętli apikalnej *rpmG-3'UTR* na pętlę czteronukleotydomową nie zmienia drugorzędowej struktury RNA i nie wpływa na wiązanie do białka *N. meningitidis* ProQ. Wiązanie (A) ^{32}P -*rpmG-3'UTR* oraz (B) ^{32}P -*rpmG-tetra* do białka ProQ z *N. meningitidis* monitorowano techniką EMSA, (C) dane zależności frakcji związanej RNA od stężenia białka ProQ dopasowane do równania kwadratowego w programie GraphPad. Czerwonym kolorem zaznaczono nukleotydy odpowiadające pikowi z CLIP-seq; małą literą „g” oznaczono reszty guanozyny dodane na końcu 5' cząsteczek po to, aby zapewnić wyższą wydajność transkrypcji *in vitro*; R – niezwiązane RNA, R-P – kompleks RNA-białko ProQ. Średnie wartości K_d i frakcji związanej ujęto w tabeli 7. Predykcje struktur drugorzędowych RNA wykonałem w programie ViennaRNA (Lorenz i wsp., 2011). Dane stanowią reprezentatywny przykład z trzech niezależnych eksperymentów.

Zmierzona średnia wartość stałej dysocjacji *rpmG-tetra*, okazała się nieco niższa niż wariantu z oryginalną pętlą apikalną (0.5 nM vs. 1.67 nM). Średnia maksymalna frakcja związana także okazała się nieznacznie niższa (81 % vs. 89 %), aczkolwiek zakresy błędów pomiarowych obu eksperymentów zachodziły na siebie wzajemnie. Dlatego też uznałem, iż *rpmG-tetra* stanowi odpowiedni model cząsteczki do kolejnych doświadczeń – wiązanie przez białko *N. meningitidis* ProQ nie różni się znacząco od wiązania *rpmG-3'UTR*, a obecna pętla czteronukleotydomowa według predykcji komputerowej (Reuter i Mathews, 2010) dodatkowo stabilizuje strukturę spinki terminatorowej.

W następnym kroku zmierzyłem siłę oddziaływania zestawu wariantów *rpmG-3'UTR* z białkiem ProQ z *N. meningitidis*. W każdym kolejnym RNA usuwałem cztery nukleotydy tworzące dwie pary znajdujące się pod pętlą czteronukleotydomową. W ten sposób uzyskałem *rpmG-tetra-44*, *rpmG-tetra-40* i *rpmG-36* (rys. 37). Dalsze skracanie nie było możliwe, ponieważ prowadziłyby do usunięcia wszystkich par CG/GC spinki terminatorowej i skutkowałyby przearanżowaniem struktury spinki terminatorowej w alternatywną strukturę drugorzędową. Wyniki doświadczenia przedstawia rysunek 37, na którym umieściłem także dane z wiązania *rpmG-tetra* do białka ProQ jako punktu odniesienia. Średnie wartości stałej dysocjacji oraz maksymalnej frakcji związanej zebrano w tabeli 7.



Rysunek 37. Białko *N. meningitidis* ProQ rozpoznaje i wiąże podstawę Rho-niezależnego terminatora transkrypcji. Wiązanie (A) ³²P-*rpmG*-tetra, (B) ³²P-*rpmG*-tetra-44, (C) ³²P-*rpmG*-tetra-40 i (D) ³²P-*rpmG*-tetra-36 do białka ProQ z *N. meningitidis* monitorowano techniką EMSA, (E) dane zależności frakcji związanej RNA od stężenia białka ProQ dopasowane do równania kwadratowego w programie GraphPad. Czerwonym kolorem zaznaczono nukleotydy odpowiadające pikowi z CLIP-seq; małą literą „g” oznaczono reszty guanozyny dodane na końcu 5' cząsteczek po to, aby zapewnić wyższą wydajność transkrypcji *in vitro*; R – niezwiązane RNA, R-P – kompleks RNA-białko ProQ. Średnie wartości K_d i frakcji związanej ujęto w tabeli 7. Predykcje struktur drugorzędowych RNA wykonano w programie ViennaRNA (Lorenz i wsp., 2011). Dane stanowią reprezentatywny przykład z trzech niezależnych eksperymentów.

Test wiązania nie wykazał, aby usuwanie górnych par nukleotydów ze struktury spinki terminatorowej znacznie osłabiało powinowactwo RNA do białka *N. meningitidis* ProQ, chociaż w dwóch przypadkach, tj. *rpmG*-tetra-40 i *rpmG*-tetra-36, przy zachowaniu zbliżonej wartości stałej dysocjacji (0.8 nM i 0.3 nM vs. 1 nM), zmniejszyło maksymalną frakcję związaną o ok. 11 %. Nieco odmiennie przebiegało wiązanie *rpmG*-tetra-44, czyli wariantu *rpmG*-tetra, w którym usunięto jedynie dwie pierwsze pary zasad na samej górze struktury spinki terminatorowej. W tym wypadku zarówno średnia wartość K_d , jak również maksymalna frakcja związana były wyższe (odpowiednio 4 nM i 91 %). Może to świadczyć o przyjęciu odmienniej

niż przewidywana przez program RNAstructure (Reuter i Mathews, 2010) konformacji przez *rpmG*-tetra-44, w wyniku czego słabiej oddziałuje on z *N. meningitidis* ProQ.

Udowodniłem, iż skracanie regionu dwuniciowego począwszy od szczytu struktury Rho-niezależnego terminatora transkrypcji ma niewielki wpływ na powinowactwo RNA do białka ProQ z *N. meningitidis*. Minimalny testowany wariant struktury spinki terminatorowej składał się z dwóch par GC, poniżej których trzy reszty adenozyiny były sparowane z trzema resztami urydyny ogona oligo(U), a jego powinowactwo nie różniło się od wariantu *rpmG*-tetra, zawierającego spinkę terminatorową pierwotnej długości.

Podsumowując, rozpoznanie i wiązanie RNA za pośrednictwem struktury terminatora transkrypcji przebiega z wykorzystaniem jego dolnej części, a także, jak wiadomo z wcześniejszych eksperymentów, z udziałem ogona oligo(U) oraz sekwencji po stronie 5' regionu dwuniciowego spinki terminatorowej.

Tabela 7. Wiązanie RNA ze zredukowaną sekwencją dwuniciową Rho-niezależnego terminatora transkrypcji.

³² P-RNA	K_d [nM] (maksymalna frakcja związana)
<i>rpmG</i> -3'UTR	1 ± 0.5 (89 %)
<i>rpmG</i> -tetra	0.5 ± 0.3 (81 %)
<i>rpmG</i> -tetra-44	4 ± 2 (91 %)
<i>rpmG</i> -tetra-40	0.8 (69 %)
<i>rpmG</i> -tetra-36	0.3 (69 %)

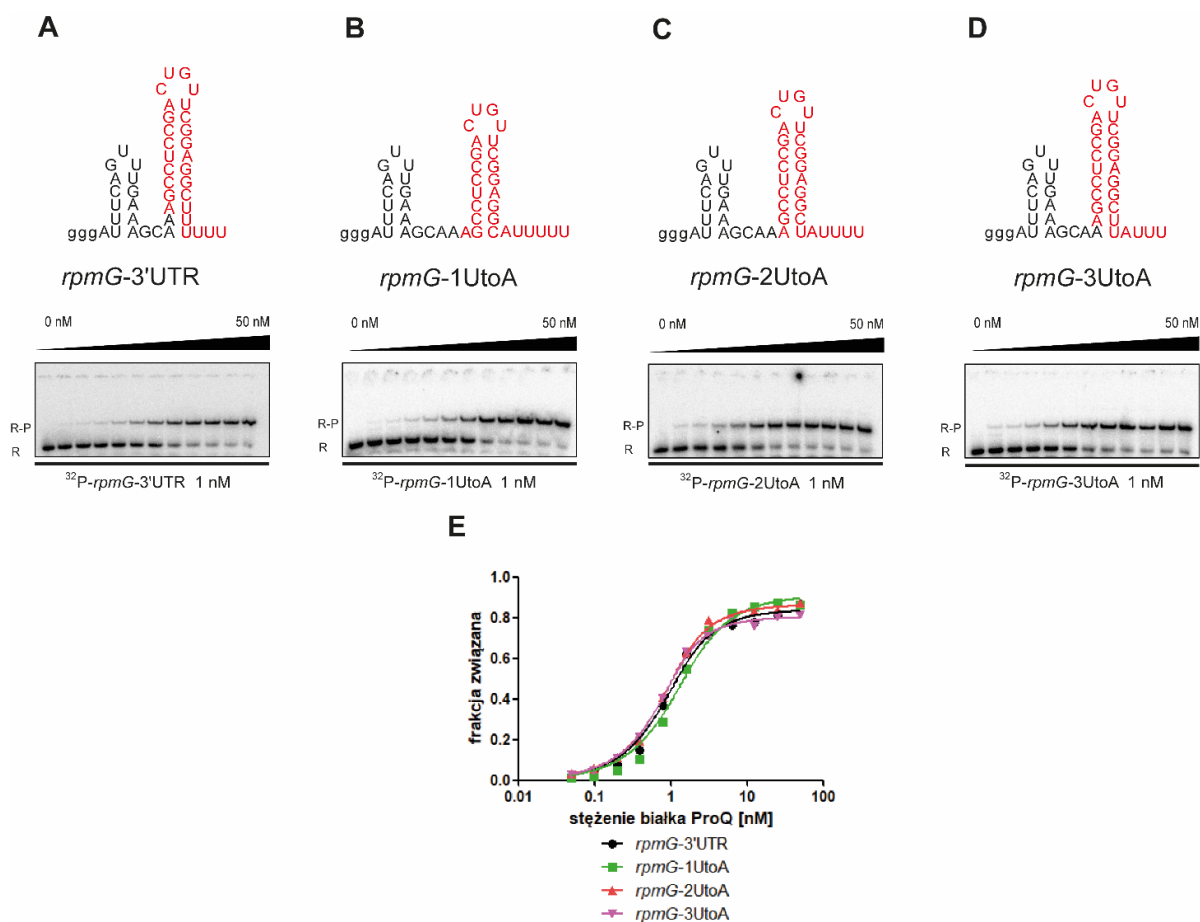
Wartości K_d uzyskano przez dopasowanie danych zależności frakcji związanej RNA od stężenia białka ProQ do równania kwadratowego w programie GraphPad. Średnie wartości K_d i frakcji związanej obliczono na podstawie 3 niezależnych doświadczeń.

5.2.12 Znaczenie sparowanych z sekwencją ogona oligo(U) reszt adenozyiny po stronie 5' Rho-niezależnego terminatora transkrypcji dla powinowactwa RNA do ProQ z *N. meningitidis*

Kolejnym badanym przeze mnie aspektem oddziaływania RNA z białkiem *N. meningitidis* ProQ było znaczenie obecności reszt adenozyiny sparowanych z resztami urydyny ogona oligo(U). Z badań przeprowadzonych na ProQ z *E. coli* (Stein i wsp., 2020) wiadomo, iż wzbogacenie w adenozyinę sekwencji 5'-terminalnej struktury terminatora nie tyle zwiększa powinowactwo RNA względem białka ProQ, ile działa jako motyw osłabiający wiązanie danego RNA przez inne, konkurujące o ligandy białko Hfq. Ligandy Hfq wykazują

wyższą frekwencję reszt urydyny w omawianym regionie, a pule ligandów wiązanych przez 3'-UTR białek ProQ i Hfq u *E. coli* jedynie częściowo na siebie zachodzą. Jednakże po przeanalizowaniu danych z CLIP-seq i RIP-seq dla tych białek z *N. meningitidis* (Bauriedl i wsp., 2020; Heidrich i wsp., 2017) okazało się, że ich pule ligandów wykazują wyraźnie wyższą frekwencję reszt adenozyiny po stronie 5' struktury terminatora transkrypcji. Co więcej, obserwowane wzbogacenie jest nie tyle cechą RNA wiązanych przez oba te białka, ile właściwością całego transkryptomu *N. meningitidis*, a same reszty adenozyiny zazwyczaj są sparowane z resztami urydyny ogona oligo(U) wydłużając u podstawy region dwuniciowy spinki terminatorowej.

Zważywszy na fakt, iż dla interakcji z białkiem ProQ z *N. meningitidis* znaczenie mają sekwencja 5'-terminalna, struktura spinki terminatorowej oraz sekwencja ogona oligo(U), postanowiłem sprawdzić czy sparowanie reszt adenozyiny z resztami urydyny po drugiej stronie spinki może wpływać na wiązanie RNA z białkiem. W tym celu zaprojektowałem zmodyfikowane warianty *rpmG*-3'UTR. *rpmG*-1UtoA, *rpmG*-2UtoA i *rpmG*-3UtoA posiadają substytucję urydyny na adenozyinę odpowiednio na pozycji pierwszej, drugiej i trzeciej sekwencji ogona oligo(U). Substytucje te prowadziły do częściowego (*rpmG*-1UtoA i *rpmG*-2UtoA) lub całkowitego (*rpmG*-3UtoA) zerwania wiązań tworzonych przez ogon oligo(U) z regionem po drugiej stronie spinki terminatorowej. Przebieg eksperymentów wiązania RNA do białka ProQ przedstawiono na rysunku 38, a średnie wartości stałych dysocjacji i procentu maksymalnej frakcji zebrano w tabeli 8. Dane dla *rpmG*-3'UTR uzyskane z poprzednich doświadczeń zamieściłem jako punkt odniesienia.



Rysunek 38. Sparowanie reszt adenozyiny z resztami urydyny ogona oligo(U) Rho-niezależnego terminatora transkrypcji nie wpływa na powinowactwo RNA do białka *N. meningitidis* ProQ. Wiązanie (A) ³²P-*rpmG*-3'UTR, (B) ³²P-*rpmG*-1UtoA, (C) ³²P-*rpmG*-2UtoA i (D) ³²P-*rpmG*-3UtoA do białka ProQ z *N. meningitidis* monitorowano techniką EMSA, (E) dane zależności frakcji związanej RNA od stężenia białka ProQ dopasowane do równania kwadratowego w programie GraphPad. Czerwonym kolorem zaznaczono nukleotydy odpowiadające pikowi z CLIP-seq; małą literą „g” oznaczono reszty guanozyiny dodane na końcu 5' cząsteczek po to, aby zapewnić wyższą wydajność transkrypcji *in vitro*; R – niezwiązane RNA, R-P – kompleks RNA-białko ProQ. Średnie wartości K_d i frakcji związanej ujęto w tabeli 8. Predykcje struktur drugorzędowych RNA wykonano w programie ViennaRNA (Lorenz i wsp., 2011). Dane stanowią reprezentatywny przykład z trzech niezależnych eksperymentów.

Jak widać z wykresu na rysunku 38, częściowe bądź całkowite przerwanie sparowania reszt adenozyiny z resztami urydyny ogona oligo(U) nie wpływa istotnie ani na wartość stałej dysocjacji, ani na maksymalną frakcję związaną RNA podczas wiązania z białkiem ProQ z *N. meningitidis*.

W celu przetestowania odwrotnego scenariusza, tj. takiego, w którym utworzone zostanie sparowanie między adenozyną a urydyną ogona oligo(U), w AniS, gdzie natywnie takie sparowanie nie występuje, trzy reszty urydyny po stronie 5' struktury spinki terminatorowej zastąpiono resztami adenozyiny. W ten sposób otrzymano AniS-toA, którego wiązanie porównano z oryginalną wersją AniS (rys. 39).

N. meningitidis ProQ, o tyle utworzenie takiego sparowania w AniS skutkowało zdecydowanie silniejszym wiązaniem. Trzeba tu jednak zaznaczyć, że o ile w przypadku pierwszego RNA tożsamość nukleotydów po stronie 5' spinki terminatorowej się nie zmieniła, o tyle w przypadku AniS nastąpiła substytucja aż trzech reszt urydyny na adenozyne. W związku z tym nie można stwierdzić, czy obserwowany wzrost siły wiązania wynika bezpośrednio ze sparowania reszt adenozyne z resztami ogona oligo(U), czy raczej jest rezultatem samej zmiany urydyny na adenozyne, która mogłaby tworzyć kontakty z białkiem, a wynikające z tego sparowanie ma pomniejsze znaczenie.

Tabela 8. Wiązanie RNA z substytucjami w sekwencjach przylegających do bazalnej pary struktury spinki terminatorowej.

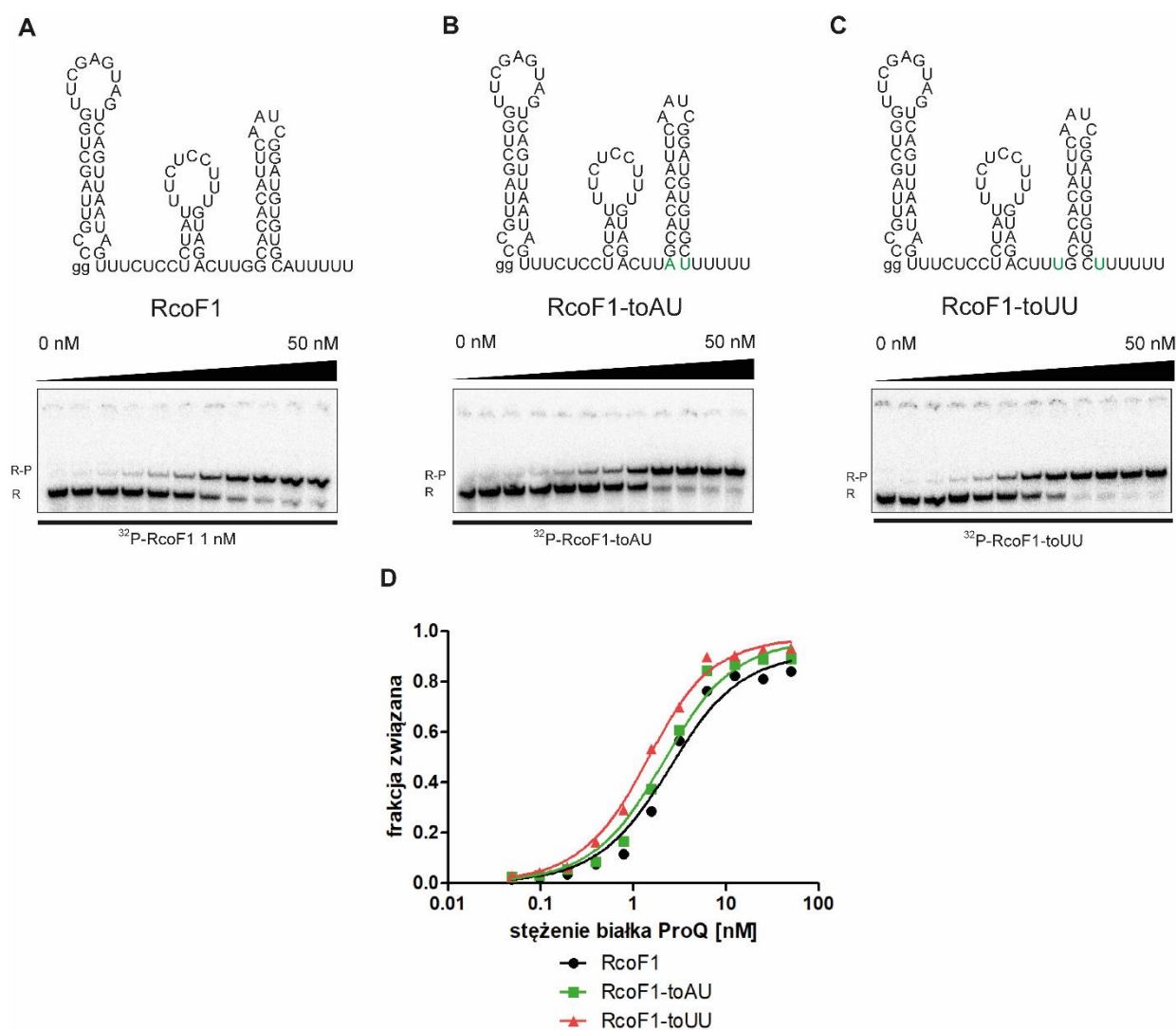
³² P-RNA	K_d [nM] (maksymalna frakcja związana)
<i>rpmG-3'UTR</i>	1 ± 0.5 (89 %)
<i>rpmG-1UtoA</i>	1.1 ± 0.3 (85 %)
<i>rpmG-2UtoA</i>	0.2 ± 0.2 (88 %)
<i>rpmG-3UtoA</i>	0.2 ± 0.2 (83 %)
AniS	5 ± 0.4 (91%)
AniS-toA	< 0.39 (96 %)

Wartości K_d uzyskano przez dopasowanie danych zależności frakcji związanej RNA od stężenia białka ProQ do równania kwadratowego w programie GraphPad. Średnie wartości K_d i frakcji związanej obliczono na podstawie 3 niezależnych doświadczeń.

5.2.13 Znaczenie typu nukleotydów bezpośrednio sąsiadujących z pierwszą parą GC/CG struktury spinki terminatorowej dla wiązania RNA przez białko ProQ z *N. meningitidis*

Za wyjątkiem AniS mającego trzy niesparowane reszty urydyny po stronie 5' pierwszej pary GC/CG struktury spinki terminatorowej, wszystkie natywne ligandy białka ProQ z *N. meningitidis* badane w niniejszej pracy posiadały w tym miejscu parę AU, w której uczestniczyła reszta urydyny ogona oligo(U), lub rzadziej UA. Co interesujące, zmiana reszt urydyny na reszty adenozyne, która obejmowała również pierwszą resztę po stronie 5' pierwszej pary GC struktury spinki, w przypadku AniS prowadziła do bardzo znacznego wzrostu powinowactwa tego RNA do białka ProQ. Częsteczka RcoF1, odnotowana

jako natywny ligand białka Hfq a nie ProQ u *N. meningitidis* (Bauriedl i wsp., 2020; Heidrich i wsp., 2017), w omawianym miejscu posiada niesparowane reszty guanozyny i adenozy. Zważywszy na fakt, iż w warunkach *in vitro* RcoF1 wiązał się silnie z białkiem ProQ ($K_d = 1.2$ nM oraz ok. 90 % maksymalnej frakcji związanej), cząsteczka okazała się przydatna do zbadania wpływu zamiany niesparowania G/A na występujące u badanych natywnych ligandów sparowanie AU (większość) lub niesparowanie U/U (AniS). Wyniki doświadczenia przedstawiono na rysunku 40, a średnie wartości stałej dysocjacji i maksymalnej frakcji związanej umieszczono w tabeli 9.



Rysunek 40. Obecność pary AU lub niesparowania UU na dole struktury spinki terminatorowej ma niewielki wpływ na powinowactwo RNA do białka ProQ z *N. meningitidis*. Wiązanie (A) 32 P-RcoF1, (B) 32 P-RcoF1-toAU i (C) 32 P-RcoF1-toUU do białka ProQ z *N. meningitidis* monitorowano techniką EMSA, (D) dane zależności frakcji związanej RNA od stężenia białka ProQ dopasowane do równania kwadratowego w programie GraphPad. Zielonym kolorem zaznaczono substytucje nukleotydów; małą literą „g” oznaczono reszty guanozyny dodane na końcu 5' cząsteczek po to, aby zapewnić wyższą wydajność transkrypcji *in vitro*; R – niezwiązane RNA, R-P – kompleks RNA-białko ProQ. Średnie wartości K_d i frakcji związanej ujęto w tabeli 9. Predykcje struktur drugorzędowych RNA wykonano w programie ViennaRNA (Lorenz i wsp., 2011). Dane stanowią reprezentatywny przykład z trzech niezależnych eksperymentów.

Rodzaj pierwszych nukleotydów poniżej pierwszej pary GC po obu stronach struktury spinki terminatorowej wydaje się nie mieć większego znaczenia dla siły oddziaływania RNA z białkiem ProQ z *N. meningitidis*. Podczas gdy RcoF1 ($K_d = 1.2$ nM, 89 % maksymalnej frakcji związanej) w omawianym miejscu miał niesparowanie G/A, jego warianty z parą AU i niesparowaniem U/U cechowały się zbliżoną wartością stałej dysocjacji i maksymalną frakcją związaną (odpowiednio RcoF1-toAU o K_d równej 2.4 nM i 89 % oraz RcoF1-toUU o 1.6 nM i 93 %).

Podsumowując, w eksperymencie nie odnotowałem, aby obecność występującej w innych natywnych i testowanych ligandach białka ProQ z *N. meningitidis* pary AU lub niesparowania U/U poniżej pierwszej pary GC struktury spinki terminatorowej odgrywała istotną rolę w oddziaływaniu RNA z białkiem ProQ *N. meningitidis*.

Tabela 9. Wiązanie RNA z substytucjami w sekwencji poniżej pierwszej pary GC/CG struktury spinki terminatorowej.

³² P-RNA	K_d [nM] (maksymalna frakcja związana)
RcoF1	1.2 ± 0.4 (89 %)
RcoF1-toAU	2.4 ± 0.8 (89 %)
RcoF1-toUU	1.6 ± 1.2 (93 %)

Wartości K_d uzyskano przez dopasowanie danych zależności frakcji związanej RNA od stężenia białka ProQ do równania kwadratowego w programie GraphPad. Średnie wartości K_d i frakcji związanej obliczono na podstawie 3 niezależnych doświadczeń

5.2.14 Podsumowanie drugiej części badań – eksperymentów *in vitro*

Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że w warunkach *in vitro* białko ProQ z *N. meningitidis* specyficznie rozpoznaje i wiąże strukturę Rho-niezależnego terminatora transkrypcji w RNA, którego dostępność na końcu 3' ma krytyczne znaczenie dla siły wiązania. W samym oddziaływaniu uczestniczy również sekwencja po stronie 5' spinki terminatorowej, chociaż jej udział w wiązaniu przez białko ProQ może się różnić pomiędzy ligandami. Ze strukturą spinki terminatorowej interakcja zachodzi za pośrednictwem jej dolnej części, gdyż skracanie regionu dwuniciowego od strony górnej nie osłabiało wiązania z *N. meningitidis* ProQ. Ponadto udowodniłem kluczową rolę 3'-terminalnej sekwencji ogona oligo(U) w tym oddziaływaniu, ponieważ jego skrócenie poniżej sześciu reszt urydyny skutkowało wzrostem wartości stałej dysocjacji i proporcjonalnym spadkiem maksymalnej frakcji związanej.

6. DYSKUSJA

Przedstawione w rozprawie wyniki z porównania sekwencji po stronie 5' Rho-niezależnego terminatora transkrypcji między najlepszymi ligandami białek ProQ i Hfq z *E. coli* i *S. enterica* są pierwszą próbą odpowiedzi na pytanie o przyczynę odmiennej specyficzności wobec struktur terminatora obu białek, której słuszność u *E. coli* została potwierdzona *in vitro* przez Ewę Stein i Joannę Kwiatkowską z naszej pracowni oraz *in vivo* w laboratorium prowadzonym przez prof. Katherine Berry z USA. Natomiast wyniki ujęte w drugiej części pracy opisują ilościowo do tej pory nieznane szczegóły rozpoznania struktur Rho-niezależnych terminatorów transkrypcji przez białko ProQ z *N. meningitidis*.

Pule ligandów białek ProQ i Hfq wiązanych przez region Rho-niezależnego terminatora transkrypcji u *S. enterica* i *E. coli* różnią się składem nukleotydowym sekwencji po stronie 5' spinki terminatorowej

Badania profilowania transkryptomu wiązanych przez białka ProQ i Hfq u *E. coli* i *S. enterica* przeprowadzone wcześniej przez zespoły prof. Jörga Vogela (Niemcy) (Holmqvist i wsp., 2018; Holmqvist i wsp., 2016) i prof. Giseli Storz (USA) (Melamed i wsp., 2020) wykazały, że mimo części wspólnych ligandów, pule RNA wiązanych przez oba białka pozostają w większości odrębne. Jak widać z rysunku 11 (A i B), odnosi się to nie tylko do całości wiązanych RNA, ale także po uwzględnieniu ich klas - 5'UTR, CDS, 3'UTR i sRNA. Sekwencje, które rozpoznaje Hfq, są dość dobrze scharakteryzowane i obejmują jednoniciowe regiony bogate w reszty urydyny, motywy (ARN)_n (gdzie A to adenozyne, R puryna, a N dowolny nukleotyd) lub bogate w urydynę i adenozyne jednocześnie (Holmqvist i wsp., 2016; Link i wsp., 2009; Sauer i wsp., 2012; Sauer i Weichenrieder, 2011; Schumacher i wsp., 2002). Z perspektywy niniejszej pracy na szczególną uwagę zasługują jednoniciowe sekwencje bogate w reszty urydyny powszechnie występujące w ogonach oligo(U) Rho-niezależnych terminatorów transkrypcji. Terminatory te okazały się jedynym motywem strukturalnym wśród ligandów wiązanych przez Hfq, który notowany był z względnie wysoką regularnością (Holmqvist i wsp., 2016; Melamed i wsp., 2020; Melamed i wsp., 2016). Co więcej, wiązane przez Hfq sRNA tzw. I klasy, posiadają motywy wzbogacone w UA w sekwencjach znajdujących się bezpośrednio po stronie 5' struktury spinki terminatorowej i są znane z wysokiego powinowactwa do Hfq (Schu i wsp., 2015). Potwierdza to ważną rolę regionów terminatorowych w interakcji z Hfq. Tymczasem analiza RNA wiązanych przez inne białko, ProQ, obecne u obu enterobakterii, również wskazała, że jedynym powtarzalnym motywem obecnym w danych była struktura Rho-niezależnego terminatora, przy czym nie

znaleziono żadnych wyraźnych różnic między terminatorami wiązanymi przez ProQ i Hfq ani u *E. coli*, ani u *S. enterica* (Holmqvist i wsp., 2018; Holmqvist i wsp., 2016; Melamed i wsp., 2020; Melamed i wsp., 2016). Poza regionami terminatorowymi oba białka wiązały wiele innych motywów, lecz żaden z nich nie osiągał istotnego statystycznie konsensusu. Fakt, że pule ligandów Hfq i ProQ po uwzględnieniu jedynie klas 3'UTR i sRNA, w których powszechnie występują Rho-niezależne terminatory, nadal pozostają odrębne, skłoniło mnie do poszukiwania odpowiedzi na pytanie o przyczynę tej odrębności w innym miejscu niż sama charakterystyka struktury terminatora. Oczywistym wyborem była sekwencja przystająca do spinki terminatorowej po stronie 5'. Regiony te okazały się mieć odmienny skład nukleotydowy – wśród najlepszych ligandów ProQ sekwencja ta cechuje się wzbogaceniem w adenozyne, podczas gdy w ligandach Hfq dominuje urydyna. Wzbogacenie w adenozyne i urydynę było istotne statystycznie nie tylko podczas porównywania motywów z ligandów obu białek, ale również przy porównaniu z rozkładem nukleotydów całego transkryptomu i dotyczyło danych zgromadzonych dla obu bakterii, *E. coli* i *S. enterica*. Wzbogacenia w urydynę regionów po stronie 5' struktury terminatora w puli ligandów Hfq można się było do pewnego stopnia spodziewać zważywszy na jego preferencje wobec reszt urydyny oraz to, że motywy zawierające UA w tym miejscu już wcześniej wskazywano jako charakterystyczne dla sRNA klasy I (co czyni je odmiennymi od sRNA klasy II, gdzie motyw ten nie występuje). Natomiast wzbogacenie w adenozyne analogicznego regionu w RNA wiązanych przez ProQ jest kwestią zasadniczo nową. Do tej pory w żadnym badaniu nie udało się zidentyfikować jakiegokolwiek preferowanego motywu w sekwencji RNA, a jedyną cechą wspólną ligandów ProQ były ich stabilne struktury drugorzędowe, wśród których Rho-niezależny terminator transkrypcji był notowany z wysoką regularnością (Holmqvist i wsp., 2020; Holmqvist i wsp., 2018; Melamed i wsp., 2020; Smirnov i wsp., 2016).

Wyniki mojej analizy zostały włączone jako część publikacji Stein i współpracowników z 2020 roku, w której Ewa Stein wraz z Joanną Kwiatkowską wykazały także w badaniach *in vitro*, że wzbogacenie w adenozyne występujące w sekwencji po stronie 5' spinki terminatorowej RNA wiązanych przez ProQ nie tyle zwiększa siłę wiązania do tego białka, ile osłabia powinowactwo względem konkurującego o ligandy białka Hfq u *E. coli*. Obserwacja ta została potwierdzona przez zespół prof. Katherine Berry *in vivo* w bakteryjnym systemie trójhybrydowym (z ang. *bacterial three-hybrid system*) (Stein i wsp., 2020). Zatem wzbogacenie badanego regionu w adenozyne obserwowane u ligandów ProQ oraz w urydynę w ligandach Hfq przynajmniej częściowo odpowiada za specyficzność białek w stosunku do RNA posiadających strukturę Rho-niezależnego terminatora transkrypcji u *E. coli*. Ze względu na bliskie

pokrewieństwo z *E. coli* można się spodziewać, że u *S. enterica* rozróżnianie ligandów przez ProQ i Hfq przebiega na podobnej zasadzie. Mimo to, nie można stwierdzić, iż różnice w składzie nukleotydowym sekwencji poprzedzającej spinkę terminatorową są jedynym czynnikiem decydującym o specyficzności tych białek. Być może występują również inne, jeszcze nieznane czynniki. Natomiast otwarte pozostaje pytanie o przyczynę odmiennych pul RNA wiązanych przez ProQ i Hfq u *E. coli* za pośrednictwem innych regionów niż Rho-niezależny terminator transkrypcji.

Pule ligandów białek ProQ i Hfq wiązanych przez region Rho-niezależnego terminatora transkrypcji u *N. meningitidis* cechują się podobnym składem nukleotydowym w sekwencji po stronie 5' spinki terminatorowej

Analogiczną analizę kompozycji nukleotydowej regionów po stronie 5' spinki terminatorowej białek ProQ i Hfq przeprowadziłem w relatywnie słabo spokrewnionej bakterii *N. meningitidis*. Dane dla ProQ pochodziły z CLIP-seq przeprowadzonego przez Bauriedl i współpracowników (Bauriedl i wsp., 2020), natomiast dla Hfq z RIP-seq (Heidrich i wsp., 2017). Podkreślić należy, że dane dla Hfq z RIP-seq nie wskazują sekwencji związanych z białkiem po naświetlaniu UV, zatem są mniej dokładne, gdyż zawierają tylko ogólne wskazanie z jakiego regionu dany RNA pochodzi (czy był to 5'UTR, CDS, 3'UTR czy sRNA). Dlatego fakt, że ligand pochodzi z 3'UTR lub jest nim sRNA nie oznacza, że wiązanie zachodziło z udziałem struktury terminatora. Jednakże w analizach ligandów ProQ i Hfq z RIL-seq i CLIP-seq sytuacje, w których sRNA lub 3'UTR wiązane były w innym miejscu niż Rho-niezależny terminator transkrypcji były bardzo sporadyczne zarówno w ligandach ProQ jak i Hfq z *E. coli* oraz *S. enterica*. Dlatego nie dysponując dokładniejszymi danymi postanowiłem przeanalizować dane zgromadzone w RIP-seq (Heidrich i wsp., 2017).

Białka ProQ z *N. meningitidis* i *E. coli* wyraźnie się różnią zarówno sekwencją jak i ogólną architekturą (rysunki 9 i 10) (Chaulk i wsp., 2010; Gonzalez i wsp., 2017). Jednocześnie oba wiążą liczne RNA w komórce, a jedynym powtarzalnym motywem był Rho-niezależny terminator transkrypcji. Wyniki mojej analizy wykazały, że ligandy *N. meningitidis* ProQ, podobnie do RNA wiązanych przez białko ProQ w *E. coli*, są wzbogacone w adenozyne w regionie przylegającym do spinki terminatorowej po stronie 5'. Co interesujące, wzbogacenie w adenozyne zostało odnotowane również dla *N. meningitidis* Hfq. W tym kontekście ligandy Hfq z enterobakterii są wyraźnie odmiennie, ponieważ w tym regionie cechują się wyższą frekwencją urydyny. Zatem możliwe, że o specyficzności białek ProQ i Hfq z *N. meningitidis*, wiążących w większości różne pule ligandów sRNA i 3'UTR, decydują inne

czynniki niż skład nukleotydowy sekwencji po stronie 5' spinek terminatorowych, który nie wykazywał żadnych istotnych statystycznie różnic. Z drugiej strony, obserwowane wzbogacenie w reszty adenozyne okazało się cechą całego transkryptomu *N. meningitidis*, czego konsekwencją z pewnością jest dominacja w puli komórkowych RNA transkryptów posiadających ten motyw. Dlatego też uważam, że istnieją co najmniej trzy scenariusze odpowiedzi na pytanie o przyczynę wiązania różnych pul RNA przez ProQ i Hfq z *N. meningitidis*. Pierwszy zakłada, że *N. meningitidis* Hfq podobnie do swojego homologu z *E. coli* preferuje w badanym regionie reszty urydyny, jednak zważywszy na dominację RNA wzbogaconych w adenozyne rzadko ma szansę taki ligand związać, co skutkuje częstszą, chociaż prawdopodobnie słabszą, interakcją z RNA wzbogaconymi w adenozyne. Dane pochodzą z RIP-seq (Heidrich i wsp., 2017), a zatem nie można stwierdzić, czy wiązanie jest silne, a jedynie, że zachodzi. Jeżeli jednak spojrzeć na proporcje liczb sRNA i 3'UTR wiązanych przez Hfq do liczb transkryptów tych samych klas wiązanych przez ProQ, to okazuje się, że u *N. meningitidis* i *S. enterica* proporcje są zbliżone. Dla sRNA wynoszą one 1.7 dla *N. meningitidis* i 1.79 dla *S. enterica*. Dla 3'UTR wynoszą one odpowiednio 0.36 i 0.45. Zatem skoro dla obu bakterii proporcje te są podobne, nie wydaje się, żeby wzbogacenie w adenozyne wyraźnie osłabiało interakcję RNA z *N. meningitidis* Hfq. Gdyby jednak tak było, należałoby się spodziewać, że przegrywające konkurencję o ligandy Hfq wiązałyby ich proporcjonalnie wyraźnie mniej niż Hfq z *S. enterica*.

W drugim scenariuszu preferencja wobec reszt urydyny poprzedzających strukturę spinki również zostaje zachowana, jednak miejsce wiązania Hfq występuje gdzie indziej niż region terminatora mimo, że ligandem jest sRNA lub 3'UTR. Przykładem takiej interakcji białka Hfq prawdopodobnie jest NrrF, gdzie autorzy przewidują miejsce przyłączenia Hfq kilkanaście nukleotydów w stronę 5' od regionu wzbogaconego w adenozyne (rys. 41) (Metruccio i wsp., 2009).



Rysunek 41. Przewidywane miejsce wiązania *N. meningitidis* Hfq na NrrF znajduje dalej w kierunku 5' od Rho-niezależnego terminatora transkrypcji. Drugorzędowa struktura sRNA NrrF, strzałka wskazuje przewidywane miejsce przyłączenia białka Hfq z *N. meningitidis*. Na podstawie (Metruccio i wsp., 2009) (zmodyfikowano).

Trzeci scenariusz bierze pod uwagę fakt, że powierzchnie interakcji z RNA między białkami Hfq obu bakterii się różnią, co stwarza możliwość odmiennej specyficzności, w której wzbogacenie w adenozyne regionu przylegającego do Rho-niezależnego terminatora po jego stronie 5' niekoniecznie musi osłabiać wiązanie RNA przez *N. meningitidis* Hfq. Prawdopodobieństwo przynajmniej częściowo odmiennej specyficzności białek Hfq *N. meningitidis* i enterobakterii zdaje się potwierdzać badanie heterologicznej ekspresji Hfq z *N. meningitidis* w *S. enterica*. Pule wiązanych sRNA przez natywne i heterologiczne Hfq były do pewnego stopnia odmienne (Sittka i wsp., 2009).

Podsumowując, istnieje co najmniej kilka możliwych wyjaśnień przyczyny, dla której nie zaobserwowano analogicznej różnicy w składzie nukleotydowym sekwencji po stronie 5' Rho-niezależnego terminatora RNA wiązanych przez ProQ i Hfq u *N. meningitidis*, co u *E. coli* i *S. enterica*. Niewykluczone również, że odpowiada za to jakaś kombinacja przedstawionych scenariuszy. Ostatecznej odpowiedzi z pewnością mogłyby udzielić eksperymenty typu CLIP-seq lub RIL-seq, w których piki z sekwencjonowania z dużą dokładnością wskazują miejsce oddziaływania RNA z białkiem.

***N. meningitidis* ProQ specyficznie rozpoznaje i wiąże RNA z wysokim powinowactwem**

Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że białko ProQ z *N. meningitidis* wiąże RNA *in vitro* z wysokim powinowactwem. Wszystkie natywne ligandy, czyli RNA już wcześniej znane jako wiązane przez *N. meningitidis* ProQ, cechowały niskie wartości stałych dysocjacji w zakresie od 0.31 nM do 7.8 nM z maksymalną frakcją związaną powyżej 50 %. Z kolei RNA nienotowane wcześniej jako naturalne ligandy białka ProQ wykazywały znaczne zróżnicowanie w sile wiązania. Niektóre oddziaływały w sposób zbliżony do ligandów natywnych, inne nie wiązały się wcale. Zmierzone wartości K_d podobnie jak wartości raportowane podczas interakcji RNA z białkiem ProQ z *E. coli* (Stein i wsp., 2020) znajdują się w dolnej skali nanomolarnej, chociaż średnio są od nich niższe o ok. 10 nM. Co więcej, *E. coli* ProQ, przeważnie wiążące ligandy w stechiometrii 1:1, mogło tworzyć również kompleksy wyższego rzędu (Stein i wsp., 2020), czego nie zaobserwowałem u ProQ z *N. meningitidis*. Wszystkie testowane RNA posiadały Rho-niezależny terminator transkrypcji będący motywem powszechnie rozpoznawanym przez inne białka z domeną FinO – FinO (Arthur i wsp., 2011; El Mouali i wsp., 2021; Ghetu i wsp., 2002), RocC (Attaiech i wsp., 2016; Kim i wsp., 2022) czy ProQ

z *E. coli* i *S. enterica* (Chaulk i wsp., 2011; Holmqvist i wsp., 2018; Melamed i wsp., 2020; Stein i wsp., 2020). Tym niemniej, z przeprowadzonych eksperymentów, w których NrrF-3' i *NMV_RS07325*-3'UTR zasadniczo nie wykazały wiązania do *N. meningitidis* ProQ należy wnioskować, że sam motyw o ogólnym planie budowy Rho-niezależnego terminatora transkrypcji nie wystarcza, aby zapewnić silne oddziaływanie z białkiem. To wskazuje na pewne właściwości struktury bądź sekwencji terminatora decydujące o tym, czy dany RNA zostanie związany czy nie.

Dostępność struktury Rho-niezależnego terminatora transkrypcji na końcu 3' jest krytycznie ważna dla silnego oddziaływania RNA z ProQ z *N. meningitidis*

W doświadczeniach, w których *rpmG*-3'UTR i *iga*-3'UTR wydłużyłem w kierunku 5', wydłużenie to nie miało większego wpływu na ich powinowactwo do *N. meningitidis* ProQ. Jednak gdy z tych cząsteczek usunąłem struktury terminatorowe, to *iga*-NS całkowicie utracił powinowactwo do ProQ, natomiast *rpmG*-NS wiązał się śladowo. Jak już wcześniej wspomniałem, spodziewam się, że to bardzo słabe wiązanie jest efektem formowania alternatywnej struktury drugorzędowej na końcu 3' po usunięciu terminatora. Struktura ta do pewnego stopnia przypomina Rho-niezależny terminator, gdyż za stabilną strukturą typu spinki znajduje się kilkunukleotydowa sekwencja jednoniciowa. Chociaż kluczowa rola Rho-niezależnego terminatora w oddziaływaniu z ProQ z *N. meningitidis* została w takim razie potwierdzona, na tym etapie nie było wiadomo, czy musi być ona dostępna na końcu 3', czy też może znajdować się gdzieś w środku sekwencji RNA. Eksperymenty na cząsteczkach z wydłużonymi sekwencjami 3'-terminalnymi – wydłużonym *rpmG*-3'UTR, *pnp*-3'ext i *sodC*-3'ext – wiążącymi się o wiele słabiej od wariantów kończących się na resztach urydyny sekwencji ogona oligo(U) dowiodły, że silne oddziaływanie z *N. meningitidis* ProQ zachodzi wówczas, gdy sekwencja RNA kończy się na Rho-niezależnym terminatorze, tj. wtedy, gdy spinka terminatorowa i 3'-terminalna sekwencja ogona oligo(U) są w pełni dostępne na końcu 3'. Obserwacja ta jest zgodna z danymi zebranymi dla *E. coli* ProQ, gdzie nadmierne wydłużenie sekwencji 3'-terminalnej również miało negatywny wpływ na siłę wiązania RNA z białkiem (Stein i wsp., 2020).

Wśród ośmiu przypadków, w których RNA było wiązane przez 5'UTR, aż w pięciu pik z CLIP-seq pokrywał motyw bardzo zbliżony do terminatora transkrypcji (Bauriedl i wsp., 2020). W warunkach prawidłowej ekspresji genu jego transkrypt za regionem 5'UTR zawiera jeszcze CDS i 3'UTR. Natomiast z przeprowadzonych eksperymentów na *pnp*-5'UTR i *pnp*-3'ext wynika, że do uformowanej struktury podobnej do Rho-niezależnego terminatora, za

którą znajduje się dalsza sekwencja, siła wiązania *N. meningitidis* ProQ jest znikoma. To stwarza co najmniej kilka możliwości sposobu oddziaływania 5'UTR zawierającego strukturę typu spinki terminatorowej z białkiem ProQ np.: siła wiązania *in vivo* jest odmienna od tej obserwowanej *in vitro*, interakcja ze strukturą spinki zachodzi głównie wówczas, gdy faktycznie zakończy ona transkrypcję na etapie 5'UTR lub gdy struktura spinki terminatorowej zostaje „uwolniona” przez nukleazy.

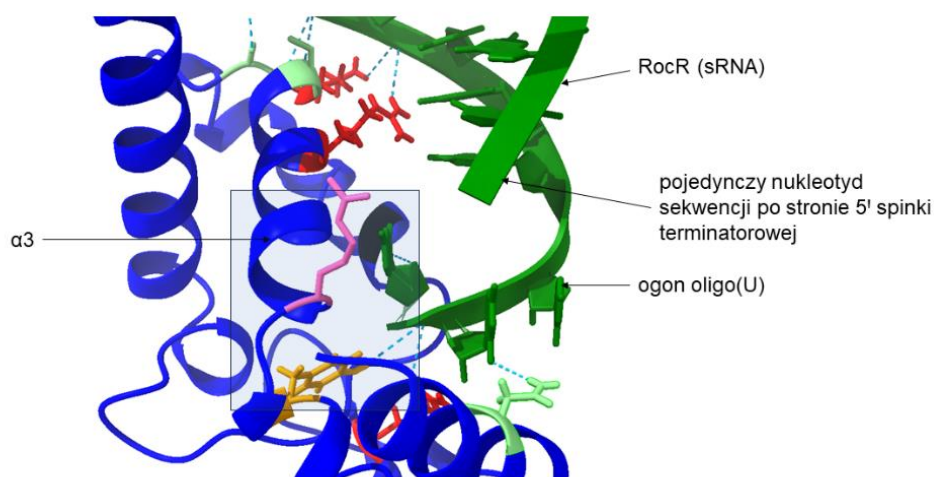
Oddziaływanie RNA z białkiem *N. meningitidis* ProQ zachodzi poprzez dolną część struktury spinki terminatorowej, a także poprzez sekwencję po jej stronie 5' oraz 3'-terminalną sekwencję ogona oligo(U)

Z wykonanych eksperymentów wynika, że RNA wiązane przez ProQ *N. meningitidis* przez region Rho-niezależnego terminatora transkrypcji oddziałują z białkiem poprzez dolną część spinki terminatorowej, ogon oligo(U) oraz poprzez sekwencję po stronie 5' struktury spinki. Wyniki te są spójne z danymi zgromadzonymi dla innych białek z domeną FinO: FinO (Arthur i wsp., 2011), domeny NTD (FinO) z ProQ *E. coli* (Stein i wsp., 2020; Stein i wsp., 2023) oraz wsparte strukturą kompleksu RocC/RocR (rys. 8), w którym ogon oligo(U) wiąże się w kieszonce na stronie wklęsłej białka RocC, a cztery pierwsze pary spinki terminatorowej oddziałują z powierzchnią znajdującą się tuż obok poprzez szkielet fosforanowy nici dystalnej (bliżej końca 3') (Kim i wsp., 2022).

Skrócenie 3'-terminalnej sekwencji ogona oligo(U) poniżej czterech reszt urydyny znacznie osłabiało wiązanie RNA do domeny NTD z ProQ *E. coli* (Stein i wsp., 2020), co jest pewną różnicą z moimi badaniami nad ProQ z *N. meningitidis*, w których warianty RNA posiadające mniej niż sześć reszt urydyny już cechowało słabsze wiązania z białkiem. Warto jednak zaznaczyć, że mimo, iż ProQ z *N. meningitidis* niemal w całości składa się z domeny FinO, to jednak posiada N- i C-końcowe rozszerzenia mogące modyfikować oddziaływanie z samą domeną FinO, i niewykluczone, że do wyizolowanej domeny FinO wiązanie ligandów z 4-nukleotydowym ogonem oligo(U) byłoby silniejsze. Takie różnice, gdzie wyizolowana domena FinO wiązała RNA mocniej niż białka pełnej długości, były notowane dla ProQ z *E. coli* i wyizolowanej domeny NTD (Stein i wsp., 2020) oraz białka FinO i jego mutantu pozbawionego domeny N-końcowej (Arthur i wsp., 2003). Kompleks między RocC i RocR z 5-nukleotydowym ogonem oligo(U) wspiera pogląd o optymalnej dla wiązania z domeną FinO długości ogona oligo(U) między 4 a 6 nukleotydów. Natomiast ciekawy okazał się osłabiający wpływ na siłę wiązania przez białko ProQ z *N. meningitidis* jakie miało zakończenie ogona oligo(U) resztą adenozyiny, a nie urydyny. Warianty *rpmG-3'UTR* o ogonie krótszym (6 reszt U)

a także dłuższym (8 i 9 reszt U) wiązane były mocniej, niż wariant z 6 resztami U i adenozyzną na pozycji siódmej. Wskazuje to na znaczenie nie tylko długości sekwencji ogona oligo(U), ale także typu ostatniego nukleotydu, którym preferencyjnie dla wiązania przez ProQ jest urydyna (sekwencje ogonów oligo(U) czasami mogą mieć pojedyncze substytucje w resztach urydyny). Obserwacja ta jest spójna z uczestnictwem w wiązaniu RocR przez RocC nie tylko grupy fosforanowej ostatniej reszty urydyny, ale również samej zasady azotowej (Kim i wsp., 2022).

Rola sekwencji poprzedzającej spinkę terminatorową w wiązaniu RNA przez białka z domeną FinO pozostaje słabo udokumentowana. Uzyskane dane z eksperymentów wiązania ProQ z *N. meningitidis* z RNA ze stopniowo skracaną sekwencją po stronie 5' spinki terminatorowej wykazały, że skrócenie jej poniżej 8 (AniS) lub 6 (*rpmG*-3'UTR) nukleotydów ma negatywny efekt dla powinowactwa do białka ProQ. Odnotowana różnica jest interesująca w kontekście danych z CLIP-seq (Bauriedl i wsp., 2020) – podczas gdy pik z sekwencjonowania u *rpmG*-3'UTR pokrywał wyłącznie Rho-niezależny terminator transkrypcji, u AniS sięgał również daleko w kierunku 5'. Zatem udział tego regionu w interakcji z białkiem wydaje się różnić w zależności od RNA. ProQ z *E. coli* podobnie nie wiązało RNA złożonego wyłącznie ze struktury terminatora, jednak wpływ długości sekwencji po stronie 5' struktury spinki na wiązanie z białkiem nie był badany (Stein i wsp., 2023). Z kolei wartości stałych dysocjacji zmierzonych podczas wiązania sRNA RocR z zaledwie jednym nukleotydem po stronie 5' bazalnej pary spinki terminatorowej z białkiem RocC (rys. 8, te same badania które pozwoliły poznać strukturę kompleksu białka z domeną FinO RocC z RNA RocR) (Kim i wsp., 2022) są 2-3 rzędów wielkości wyższe, niż wartości zmierzone dla *E. coli* ProQ (Stein i wsp., 2020) i obserwowane w niniejszej pracy dla *N. meningitidis* ProQ. To z kolei może sugerować, że niepozabawione sekwencji 5'-terminalnej RocR tworzy dodatkowe kontakty z białkiem, a obraz uzyskany z badań krystalograficznych pozostaje niepełny. Miejsca wiązania RNA na domenie FinO białka RocC ze wskazaniem powierzchni mogącej oddziaływać z regionem po stronie 5' spinki terminatorowej przedstawia rysunek 42.



Rysunek 42. Miejsce wiązanie RNA w domenie FinO białka RocC. (PDB 7RGU).

Zbliżenie na miejsce wiązania Rho-niezależnego terminatora transkrypcji z RocR na powierzchni domeny FinO białka RocC. Kolor niebieski – powierzchnie białka RocC niewytwarzające wiązań wodorowych z RNA, zielony – RNA (RocR), łańcuchy boczne uwidocznione dla reszt tworzących wiązania z RNA: jasnozielony – reszty polarne, czerwony – reszty o ładunku dodatnim, pomarańczowy – tyrozyna. Różowym kolorem oznaczono argininę 83, ramka otacza obszar hipotetycznie uczestniczący w wiązaniu sekwencji po stronie 5' spinki terminatorowej; niebieskie przerywane linie ilustrują wiązania wodorowe między białkiem a RNA. Zwizualizowano w programie ChimeraX (Pettersen i wsp., 2021).

Jak widać z rysunku 42, dłuższa sekwencja po stronie 5' spinki terminatorowej miałaby szansę znaleźć się w pobliżu helisy α_3 , na której dystalnym końcu znajduje się zorientowany w stronę RNA dodatnio naładowany łańcuch boczny argininy 83. Co więcej, inne białka z domeną FinO – ProQ z *N. meningitidis* (Chaulk i wsp., 2010), ProQ z *E. coli* (Gonzalez i wsp., 2017) czy FinO (Ghetu i wsp., 2000), posiadają reszty o dodatnio naładowanych łańcuchach bocznych nie tylko w części dystalnej helisy α_3 , ale również środkowej. Tworzy to interesującą możliwość interakcji sekwencji 5'-terminalnej z powierzchnią helisy α_3 . Z pewnością konieczne są dalsze badania aby ustalić rolę tego regionu podczas wiązania z RNA.

Niejednoznaczna rola reszt adenozyiny w sekwencji po stronie 5' Rho-niezależnego terminatora transkrypcji podczas wiązania RNA przez białko ProQ z *N. meningitidis*

Udział sekwencji po stronie 5' struktury spinki terminatorowej w wiązaniu RNA przez *N. meningitidis* pozostaje w zgodzie z obserwacją poczynioną dla ProQ z *E. coli* (Stein i wsp., 2023), gdzie wariant RNA jej pozbawiony praktycznie nie wykazywał wiązania do białka. Ponadto obecność wzbogacenia w adenozyinę w tym regionie nie wpływała znacząco na to oddziaływanie (Stein i wsp., 2020). Reszty adenozyiny często parują się z resztami urydyny 3'-terminalnej sekwencji ogona oligo(U), wydłużając u podstawy region dwuniciowy spinki terminatorowej. W przeprowadzonych doświadczeniach wiązania do białka ProQ z *N. meningitidis* wariantów *rpmG*-3'UTR z częściowo lub całkowicie zredukowanym sparowaniem adenozyiny (poprzez pojedyncze substytucje reszt urydyny na reszty adenozyiny w sekwencji ogona oligo(U)) warianty te wiązały się tak samo, jak *rpmG*-3'UTR z pełnym sparowaniem reszt adenozyiny. Wnioskiem jest brak wpływu tworzenia par przez reszty sekwencji ogona oligo(U) z resztami adenozyiny po drugiej stronie struktury spinki na powinowactwo do białka *N. meningitidis*. Z drugiej jednak strony, utworzenie takiego sparowania adenozyin w AniS, który natywnie go nie posiada, znacznie wzmocniło jego wiązanie do ProQ. Jeżeli wzrost siły oddziaływania wynika tu nie z samego sparowania, a z obecności adenozyiny po stronie 5' struktury terminatora, wtedy rola adenozyiny w wiązaniu przez

N. meningitidis ProQ może okazać się inna niż dla ProQ z *E. coli*, gdzie nie miała ona większego znaczenia. Tym niemniej, utworzenie pojedynczej pary reszty adenozyyny z resztą urydyny sekwencji ogona oligo(U) w RocF1 nie wpłynęło na siłę wiązania RNA do białka. Być może zaobserwowany wzrost siły wiązania jest specyficzny dla AniS lub pojedyncza substytucja na adenozynę w RcoF1 (i wynikające z niej sparowanie z urydyną) nie wystarcza, aby zaobserwować ten efekt.

Kwestia wzbogacenia w adenozynę sekwencji po stronie 5' struktury Rho-niezależnego terminatora transkrypcji wśród ligandów *N. meningitidis* ProQ jest tylko jednym z wielu aspektów biologii białek z domeną FinO, który pozostaje niejasny. Na pytanie dlaczego niektóre białka opiekuńcze z domeną FinO wiążą wiele ligandów, podczas gdy inne zaledwie kilka, także do tej pory nie poznano odpowiedzi. Ponadto, poza mechanistycznymi szczegółami samej interakcji RNA z białkiem z domeną FinO, jedynie częściowo zrozumiane są funkcjonalne następstwa tego oddziaływania. Tym bardziej, że bliżej studiowano wyłącznie kilku przedstawicieli tej rodziny białek. Dalsze badania z pewnością dostarczą nowych odkryć i interesujących spostrzeżeń.

Niniejsza praca stanowi próbę lepszego zrozumienia właściwości białek z domeną FinO. Wiązanie transkryptu przez białko jest jednak zaledwie pierwszym z wielu etapów potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów, której rozległe zależności pozwalają na prawidłowe funkcjonowanie i procesy adaptacyjne komórki bakteryjnej. Tym niemniej, uzyskane wyniki z analiz *in silico* oraz eksperymentów *in vitro* uzupełniają wciąż skromną wiedzę na temat białek z domeną FinO, wiedzę, którą wraz z kolejnymi badaniami powoli i konsekwentnie udaje się czynić coraz bardziej pełną i kompletną.

7. WNIOSKI

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów i analiz sformułowałem następujące wnioski końcowe:

- Wiązane przez region Rho-niezależnego terminatora transkrypcji pule ligandów białek ProQ i Hfq z *E. coli* i *S. enterica* różnią się frekwencją nukleotydów w sekwencji przyległej po stronie 5' do spinki terminatorowej – ligandy ProQ są wzbogacone w adenozyne, a Hfq w urydynę. Funkcjonalne znaczenie tej różnicy zostało potwierdzone *in vitro* przez Ewę Stein i Joannę Kwiatkowską oraz *in vivo* przez zespół prof. Katherine Berry. Obecność reszt adenozyiny w tym regionie osłabia wiązanie RNA przez białko Hfq, co jest elementem konkurencji obu białek o ligandy
- Sekwencja przyległa po stronie 5' do spinki terminatorowej RNA wiązanych zarówno przez białko ProQ, jak i Hfq, jest wzbogacona w adenozyne u *N. meningitidis*. Wzbogacenie w adenozyne tego regionu jest ponadto cechą całego transkryptomu *N. meningitidis*
- Białko ProQ z *N. meningitidis* silnie wiąże *in vitro* cząsteczki RNA zidentyfikowane jako ligandy *in vivo* – *iga-3'UTR*, *rpmG-3'UTR*, *carA-5'UTR*, *pnp-5'UTR*, AniS, NMnc0006 oraz i pochodzący z regionu międzygenowego *inter*
- Rho-niezależny terminator transkrypcji jest głównym motywem specyficznie rozpoznawanym i wiązany przez białko *N. meningitidis* ProQ, a interakcja zachodzi za pośrednictwem jego dolnej części
- Sekwencja po stronie 5' spinki terminatorowej bierze udział w wiązaniu RNA przez ProQ z *N. meningitidis*
- Skrócenie ogona oligo(U) poniżej 6 reszt urydyny negatywnie wpływa na powinowactwo RNA do białka ProQ z *N. meningitidis*

Białko *N. meningitidis* ProQ, zbudowane jedynie z domeny FinO i niewielkich rozszerzeń na końcach N i C, posiada podobne preferencje względem wiązanych RNA jak N-końcowa domena FinO białka ProQ z *E. coli*. Świadczy to o tym, że mimo niskiego podobieństwa sekwencji aminokwasowej, domeny FinO pełnią podobną rolę w wiązaniu RNA w relatywnie słabo spokrewnionych gatunkach bakterii, jakimi są *E. coli* i *N. meningitidis*.

WYKAZ RYSUNKÓW

Rysunek 1. Potranskrypcyjna regulacja ekspresji genów bakterii z udziałem sRNA.	14
Rysunek 2. Ułożenie w genomie i regulacja ekspresji genów z udziałem sRNA.	16
Rysunek 3. Funkcje białek opiekuńczych wiążących RNA.	17
Rysunek 4. Kompleks heksameru Hfq i sRNA RydC.	18
Rysunek 5. Rola białka Hfq w procesach molekularnych.	19
Rysunek 6. Struktura białka FinO oraz domeny FinO.	20
Rysunek 7. Sekwencja białek z domeną FinO jest ewolucyjnie słabo zakonserwowana.	21
Rysunek 8. Struktura białka RocC w kompleksie z RocR.	22
Rysunek 9. Struktura białka ProQ z <i>E. coli</i>	23
Rysunek 10. Struktura białka ProQ z <i>N. meningitidis</i>	25
Rysunek 11. Białka ProQ i Hfq wiążą w większości odrębne pule RNA.	26
Rysunek 12. Schemat regionu kodującego białko <i>N. meningitidis</i> ProQ w konstrukcie ekspresyjnym.	37
Rysunek 13. Sekwencja po stronie 5' struktury spinki terminatorowej najlepszych ligandów RNA wiązanych przez białko <i>E. coli</i> ProQ jest wzbogacona w reszty adenozyne.	52
Rysunek 14. Sekwencja po stronie 5' struktury spinki terminatorowej najlepszych ligandów RNA wiązanych przez białko <i>E. coli</i> Hfq jest wzbogacona w reszty urydyny.	53
Rysunek 15. Sekwencja po stronie 5' struktury spinki terminatorowej najlepszych ligandów RNA wiązanych przez białko <i>S. enterica</i> ProQ jest wzbogacona w reszty adenozyne, podczas gdy ligandy białka Hfq wykazują wzbogacenie w reszty urydyny.	54
Rysunek 16. Sekwencja po stronie 5' struktury spinki terminatorowej najlepszych ligandów RNA wiązanych przez białko <i>N. meningitidis</i> ProQ jest wzbogacona w reszty adenozyne.	55
Rysunek 17. Sekwencja po stronie 5' struktury spinki terminatorowej najlepszych ligandów RNA wiązanych przez białko <i>N. meningitidis</i> Hfq jest wzbogacona w reszty adenozyne.	56
Rysunek 18. Wzbogacenie w adenozyne sekwencji po stronie 5' struktury spinki terminatorowej najlepszych ligandów RNA białka ProQ w stosunku do ligandów białka Hfq u <i>E. coli</i> i <i>S. enterica</i> jest statystycznie istotne.	57
Rysunek 19. U <i>Neisseria meningitidis</i> pule ligandów białek ProQ i Hfq nie wykazują różnic istotnych statystycznie w sekwencji po stronie 5' struktury spinki terminatorowej.	58
Rysunek 20. Wzbogacenie w reszty adenozyne sekwencji po stronie 5' struktury spinki terminatorowej RNA jest cechą całego transkryptomu <i>N. meningitidis</i>	59
Rysunek 21. Białka Hfq z <i>E. coli</i> oraz <i>N. meningitidis</i> wykazują niewielką zmienność w regionach wiążących RNA.	60
Rysunek 22. Białka ProQ z <i>E. coli</i> oraz <i>N. meningitidis</i> wykazują wysoką zmienność w regionach wiążących RNA.	62
Rysunek 23. Białko ProQ z <i>N. meningitidis</i> zostało oczyszczone techniką FPLC z wykorzystaniem znacznika histydynowego (His ₆ -tag).	64
Rysunek 24. Częsteczki RNA wybrane do badań wyznaczających siłę ich wiązania z białkiem <i>N. meningitidis</i> ProQ.	65
Rysunek 25. Wariant cząsteczki rpmG-3'UTR ze skróconym ogonem oligo(U) wiąże się do białka <i>N. meningitidis</i> ProQ w stężeniach nanomolarnych.	67

Rysunek 26. Wyższe stężenie NaCl nie wpływa na siłę wiązania rpmG-3'UTR przez białko <i>N. meningitidis</i> ProQ.	69
Rysunek 27. Wiązanie badanych RNA do białka ProQ z <i>Neisseria meningitidis</i>	70
Rysunek 28. Porównanie wiązania kontrolnych cząsteczek RNA do białka ProQ z <i>Neisseria meningitidis</i>	72
Rysunek 29. Rho-niezależny terminator transkrypcji jest konieczny do silnego wiązania rpmG-3'UTR z białkiem <i>N. meningitidis</i> ProQ.	75
Rysunek 30. Rho-niezależny terminator transkrypcji jest konieczny do silnego wiązania iga-3'UTR z białkiem <i>N. meningitidis</i> ProQ.	76
Rysunek 31. Wydłużenie końca 3' poza ogon oligo(U) zmniejsza powinowactwo RNA do białka <i>N. meningitidis</i> ProQ.	79
Rysunek 32. Skrócenie ogona oligo(U) poniżej sześciu reszt urydyny znacznie osłabia powinowactwo rpmG-3'UTR do białka <i>N. meningitidis</i> ProQ.	83
Rysunek 33. AniS z ogonem oligo(U) złożonym z sześciu reszt urydyny wykazuje najwyższe powinowactwo do białka <i>N. meningitidis</i> ProQ.	84
Rysunek 34. Sekwencja po stronie 5' struktury Rho-niezależnego terminatora transkrypcji bierze udział w wiązaniu rpmG-3'UTR do białka <i>N. meningitidis</i> ProQ.	87
Rysunek 35. Sekwencja po stronie 5' struktury Rho-niezależnego terminatora transkrypcji bierze udział w wiązaniu AniS do białka <i>N. meningitidis</i> ProQ.	89
Rysunek 36. Zmiana pętli apikalnej rpmG-3'UTR na pętlę czteronukleotydową nie zmienia drugorzędowej struktury RNA i nie wpływa na wiązanie do białka <i>N. meningitidis</i> ProQ.	92
Rysunek 37. Białko <i>N. meningitidis</i> ProQ rozpoznaje i wiąże podstawę Rho-niezależnego terminatora transkrypcji.	93
Rysunek 38. Sparowanie reszt adenozyliny z resztami urydyny ogona oligo(U) Rho-niezależnego terminatora transkrypcji nie wpływa na powinowactwo RNA do białka <i>N. meningitidis</i> ProQ.	96
Rysunek 39. Utworzenie sparowania między resztami ogona oligo(U) a adenozyną po stronie 5' spinki terminatorowej zwiększa powinowactwo AniS do białka ProQ z <i>N. meningitidis</i>	97
Rysunek 40. Obecność pary AU lub niesparowania UU na dole struktury spinki terminatorowej ma niewielki wpływ na powinowactwo RNA do białka ProQ z <i>N. meningitidis</i>	99
Rysunek 41. Przewidywane miejsce wiązania <i>N. meningitidis</i> Hfq na NrrF znajduje dalej w kierunku 5' od Rho-niezależnego terminatora transkrypcji.	105
Rysunek 42. Miejsce wiązanie RNA w domenie FinO białka RocC.	109

WYKAZ TABEL

Tabela 1. Wiązanie badanych RNA do białka ProQ z <i>Neisseria meningitidis</i>.....	71
Tabela 2. Wiązanie cząsteczek RNA nieoddziałujących in vivo do białka ProQ z <i>Neisseria meningitidis</i>.	73
Tabela 3. Wiązanie RNA posiadających Rho-niezależny terminator transkrypcji oraz RNA pozbawionych terminatora do białka ProQ z <i>Neisseria meningitidis</i>.....	77
Tabela 4. Wiązanie RNA z dostępnymi strukturami terminatorów i ich wariantów z wydłużonym końcem 3' do białka ProQ z <i>Neisseria meningitidis</i>.....	80
Tabela 5. Wiązanie RNA z wydłużonymi i skróconymi sekwencjami ogona oligo(U) do białka ProQ z <i>Neisseria meningitidis</i>.....	85
Tabela 6. Wiązanie RNA ze skróconą sekwencją 5'-terminalną przez ProQ z <i>Neisseria meningitidis</i>.	90
Tabela 7. Wiązanie RNA ze zredukowaną sekwencją dwuniciową Rho-niezależnego terminatora transkrypcji.	94
Tabela 8. Wiązanie RNA z substytucjami w sekwencjach przylegających do bazalnej pary struktury spinki terminatorowej.....	98
Tabela 9. Wiązanie RNA z substytucjami w sekwencji poniżej pierwszej pary GC/CG struktury spinki terminatorowej.....	100

BIBLIOGRAFIA

- Adams, P. P., Baniulyte, G., Esnault, C., Chegiredy, K., Singh, N., Monge, M., Dale, R. K., Storz, G., i 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>
- Andrade, J. M., Dos Santos, R. F., Chelysheva, I., Ignatova, Z., i Arraiano, C. M. (2018). The RNA-binding protein Hfq is important for ribosome biogenesis and affects translation fidelity. *EMBO J*, 37(11). <https://doi.org/10.15252/emboj.201797631>
- Arthur, D. C., Edwards, R. A., Tsutakawa, S., Tainer, J. A., Frost, L. S., i 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>
- Arthur, D. C., Ghetu, A. F., Gubbins, M. J., Edwards, R. A., Frost, L. S., i 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>
- Attaiech, L., Boughammoura, A., Brochier-Armanet, C., Allatif, O., Peillard-Fiorente, F., Edwards, R. A., Omar, A. R., MacMillan, A. M., Glover, M., i 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., i 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>
- Azam, M. S., i Vanderpool, C. K. (2018). Translational regulation by bacterial small RNAs via an unusual Hfq-dependent mechanism. *Nucleic Acids Res*, 46(5), 2585-2599. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1286>
- Barrera, I., Schuppli, D., Sogo, J. M., i Weber, H. (1993). Different mechanisms of recognition of bacteriophage Q beta plus and minus strand RNAs by Q beta replicase. *J Mol Biol*, 232(2), 512-521. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1407>
- Bauriedl, S., Gerovac, M., Heidrich, N., Bischler, T., Barquist, L., Vogel, J., i 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>
- Carrier, M. C., Ng Kwan Lim, E., Jeannotte, G., i Masse, E. (2020). Trans-Acting Effectors Versus RNA Cis-Elements: A Tightly Knit Regulatory Mesh. *Front Microbiol*, 11, 609237. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.609237>
- Chaulk, S., Lu, J., Tan, K., Arthur, D. C., Edwards, R. A., Frost, L. S., Joachimiak, A., i Glover, J. N. (2010). N. meningitidis 1681 is a member of the FinO family of RNA chaperones. *RNA Biol*, 7(6), 812-819. <https://doi.org/10.4161/rna.7.6.13688>
- Chaulk, S. G., Smith Frieday, M. N., Arthur, D. C., Culham, D. E., Edwards, R. A., Soo, P., Frost, L. S., Keates, R. A., Glover, J. N., i 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>
- Cheah, K. C., i Skurray, R. (1986). The F plasmid carries an IS3 insertion within finO. *J Gen Microbiol*, 132(12), 3269-3275. <https://doi.org/10.1099/00221287-132-12-3269>
- Conn, G. L., i Draper, D. E. (1998). RNA structure. *Curr Opin Struct Biol*, 8(3), 278-285. [https://doi.org/10.1016/s0959-440x\(98\)80059-6](https://doi.org/10.1016/s0959-440x(98)80059-6)
- Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J.-M., i Brenner, S. E. (2004). WebLogo: A Sequence Logo Generator: Figure 1. *Genome Research*, 14(6), 1188-1190. <https://doi.org/10.1101/gr.849004>
- Dimastrogiovanni, D., Frohlich, K. S., Bandyra, K. J., Bruce, H. A., Hohensee, S., Vogel, J., i Luisi, B. F. (2014). Recognition of the small regulatory RNA RydC by the bacterial Hfq protein. *Elife*, 3. <https://doi.org/10.7554/eLife.05375>
- Dos Santos, R. F., Arraiano, C. M., i Andrade, J. M. (2019). New molecular interactions broaden the functions of the RNA chaperone Hfq. *Curr Genet*, 65(6), 1313-1319. <https://doi.org/10.1007/s00294-019-00990-y>

- El Mouali, Y., Gerovac, M., Mineikaite, R., i 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>
- Fantappie, L., Oriente, F., Muzzi, A., Serruto, D., Scarlato, V., i Delany, I. (2011). A novel Hfq-dependent sRNA that is under FNR control and is synthesized in oxygen limitation in Neisseria meningitidis. *Mol Microbiol*, 80(2), 507-523. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07592.x>
- Gerovac, M., El Mouali, Y., Kuper, J., Kisker, C., Barquist, L., i Vogel, J. (2020). Global discovery of bacterial RNA-binding proteins by RNase-sensitive gradient profiles reports a new FinO domain protein. *RNA*, 26(10), 1448-1463. <https://doi.org/10.1261/rna.076992.120>
- Ghetu, A. F., Arthur, D. C., Kerppola, T. K., i 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>
- Ghetu, A. F., Gubbins, M. J., Frost, L. S., i 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., Gubbins, M. J., Oikawa, K., Kay, C. M., Frost, L. S., i 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>
- Gonzalez, G. M., Hardwick, S. W., Maslen, S. L., Skehel, J. M., Holmqvist, E., Vogel, J., Bateman, A., Luisi, B. F., i 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>
- Gulliver, E. L., Sy, B. M., Wong, J. L., Deveson Lucas, D. S., Powell, D. R., Harper, M., Tree, J. J., i Boyce, J. D. (2022). The Role and Targets of the RNA-Binding Protein ProQ in the Gram-Negative Bacterial Pathogen Pasteurella multocida. *J Bacteriol*, 204(4), e0059221. <https://doi.org/10.1128/jb.00592-21>
- Heidrich, N., Bauriedl, S., Barquist, L., Li, L., Schoen, C., i Vogel, J. (2017). The primary transcriptome of Neisseria meningitidis and its interaction with the RNA chaperone Hfq. *Nucleic Acids Res*, 45(10), 6147-6167. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx168>
- Holmqvist, E., Berggren, S., i Rizvanovic, A. (2020). RNA-binding activity and regulatory functions of the emerging sRNA-binding protein ProQ. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 1863(9), 194596. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2020.194596>
- Holmqvist, E., Li, L., Bischler, T., Barquist, L., i 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., Wright, P. R., Li, L., Bischler, T., Barquist, L., Reinhardt, R., Backofen, R., i 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/embj.201593360>
- Hor, J., Gorski, S. A., i Vogel, J. (2018). Bacterial RNA Biology on a Genome Scale. *Mol Cell*, 70(5), 785-799. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.12.023>
- Immer, C., Hacker, C., i 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>
- Ishikawa, H., Otaka, H., Maki, K., Morita, T., i Aiba, H. (2012). The functional Hfq-binding module of bacterial sRNAs consists of a double or single hairpin preceded by a U-rich sequence and followed by a 3' poly(U) tail. *RNA*, 18(5), 1062-1074. <https://doi.org/10.1261/rna.031575.111>
- 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>
- Katsuya-Gaviria, K., Paris, G., Dendooven, T., i Bandyra, K. J. (2022). Bacterial RNA chaperones and chaperone-like riboregulators: behind the scenes of RNA-mediated regulation of cellular metabolism. *RNA Biol*, 19(1), 419-436. <https://doi.org/10.1080/15476286.2022.2048565>

- 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., i 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>
- Lamm-Schmidt, V., Fuchs, M., Sulzer, J., Gerovac, M., Hor, J., Dersch, P., Vogel, J., i Faber, F. (2021). Grad-seq identifies KhpB as a global RNA-binding protein in *Clostridioides difficile* that regulates toxin production. *MicroLife*, 2, uqab004. <https://doi.org/10.1093/femsml/uqab004>
- Lee, T., i Feig, A. L. (2008). The RNA binding protein Hfq interacts specifically with tRNAs. *RNA*, 14(3), 514-523. <https://doi.org/10.1261/rna.531408>
- Leonard, S., Villard, C., Nasser, W., Reverchon, S., i Hommais, F. (2021). RNA Chaperones Hfq and ProQ Play a Key Role in the Virulence of the Plant Pathogenic Bacterium *Dickeya dadantii*. *Front Microbiol*, 12, 687484. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.687484>
- Liao, Z., i Smirnov, A. (2023). FinO/ProQ-family proteins: an evolutionary perspective. *Biosci Rep*, 43(3). <https://doi.org/10.1042/BSR20220313>
- Link, T. M., Valentin-Hansen, P., i Brennan, R. G. (2009). Structure of *Escherichia coli* Hfq bound to polyriboadenylate RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(46), 19292-19297. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908744106>
- Lorenz, R., Bernhart, S. H., Honer Zu Siederdisen, C., Tafer, H., Flamm, C., Stadler, P. F., i Hofacker, I. L. (2011). ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms Mol Biol*, 6, 26. <https://doi.org/10.1186/1748-7188-6-26>
- Malecka, E. M., Sobanska, D., i Olejniczak, M. (2021). Bacterial Chaperone Protein Hfq Facilitates the Annealing of Sponge RNAs to Small Regulatory RNAs. *J Mol Biol*, 433(23), 167291. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167291>
- Melamed, S., Adams, P. P., Zhang, A., Zhang, H., i 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>
- Melamed, S., Peer, A., Faigenbaum-Romm, R., Gatt, Y. E., Reiss, N., Bar, A., Altuvia, Y., Argaman, L., i 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>
- Metruccio, M. M., Fantappie, L., Serruto, D., Muzzi, A., Roncarati, D., Donati, C., Scarlato, V., i Delany, I. (2009). The Hfq-dependent small noncoding RNA NrrF directly mediates Fur-dependent positive regulation of succinate dehydrogenase in *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol*, 191(4), 1330-1342. <https://doi.org/10.1128/JB.00849-08>
- Milner, J. L., i 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>
- Mirdita, M., Schutze, K., Moriwaki, Y., Heo, L., Ovchinnikov, S., i Steinegger, M. (2022). ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nat Methods*, 19(6), 679-682. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01488-1>
- Miyakoshi, M., Chao, Y., i Vogel, J. (2015). Regulatory small RNAs from the 3' regions of bacterial mRNAs. *Curr Opin Microbiol*, 24, 132-139. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.01.013>
- Nitzan, M., Rehani, R., i 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>
- Novick, R. P., i Geisinger, E. (2008). Quorum sensing in staphylococci. *Annu Rev Genet*, 42, 541-564. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.42.110807.091640>
- O'Shea, J. P., Chou, M. F., Quader, S. A., Ryan, J. K., Church, G. M., i Schwartz, D. (2013). pLogo: a probabilistic approach to visualizing sequence motifs. *Nat Methods*, 10(12), 1211-1212. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2646>
- Olejniczak, M., Jiang, X., Basczok, M. M., i Storz, G. (2022). KH domain proteins: Another family of bacterial RNA matchmakers? *Mol Microbiol*, 117(1), 10-19. <https://doi.org/10.1111/mmi.14842>

- Olejniczak, M., i 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>
- Otaka, H., Ishikawa, H., Morita, T., i Aiba, H. (2011). PolyU tail of rho-independent terminator of bacterial small RNAs is essential for Hfq action. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(32), 13059-13064. <https://doi.org/10.1073/pnas.1107050108>
- Pandey, S., Gravel, C. M., Stockert, O. M., Wang, C. D., Hegner, C. L., LeBlanc, H., i 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>
- Papenfort, K., i 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>
- Papenfort, K., i Vanderpool, C. K. (2015). Target activation by regulatory RNAs in bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 39(3), 362-378. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv016>
- Peng, Y., Curtis, J. E., Fang, X., i Woodson, S. A. (2014). Structural model of an mRNA in complex with the bacterial chaperone Hfq. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(48), 17134-17139. <https://doi.org/10.1073/pnas.1410114111>
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Meng, E. C., Couch, G. S., Croll, T. I., Morris, J. H., i Ferrin, T. E. (2021). UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Sci*, 30(1), 70-82. <https://doi.org/10.1002/pro.3943>
- Ponath, F., Hor, J., i Vogel, J. (2022). An overview of gene regulation in bacteria by small RNAs derived from mRNA 3' ends. *FEMS Microbiol Rev*, 46(5). <https://doi.org/10.1093/femsre/ruac017>
- Quendera, A. P., Seixas, A. F., Dos Santos, R. F., Santos, I., Silva, J. P. N., Arraiano, C. M., i 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>
- Reuter, J. S., i Mathews, D. H. (2010). RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis. *BMC Bioinformatics*, 11, 129. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-129>
- Romeo, T., i Babitzke, P. (2018). Global Regulation by CsrA and Its RNA Antagonists. *Microbiol Spectr*, 6(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.RWR-0009-2017>
- Santiago-Frangos, A., Kavita, K., Schu, D. J., Gottesman, S., i Woodson, S. A. (2016). C-terminal domain of the RNA chaperone Hfq drives sRNA competition and release of target RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(41), E6089-E6096. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613053113>
- Santiago-Frangos, A., i 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>
- Sauer, E., Schmidt, S., i Weichenrieder, O. (2012). Small RNA binding to the lateral surface of Hfq hexamers and structural rearrangements upon mRNA target recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(24), 9396-9401. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202521109>
- Sauer, E., i Weichenrieder, O. (2011). Structural basis for RNA 3'-end recognition by Hfq. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(32), 13065-13070. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103420108>
- Schu, D. J., Zhang, A., Gottesman, S., i Storz, G. (2015). Alternative Hfq- <scp>sRNA</scp> interaction modes dictate alternative <scp>mRNA</scp> recognition. *The EMBO Journal*, 34(20), 2557-2573. <https://doi.org/10.15252/emboj.201591569>
- Schumacher, M. A., Pearson, R. F., Moller, T., Valentin-Hansen, P., i 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>
- Sheidy, D. T., i Zielke, R. A. (2013). Analysis and expansion of the role of the Escherichia coli protein ProQ. *PLoS One*, 8(10), e79656. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079656>
- Sittka, A., Sharma, C. M., Rolle, K., i Vogel, J. (2009). Deep sequencing of Salmonella RNA associated with heterologous Hfq proteins in vivo reveals small RNAs as a major target class and identifies RNA processing phenotypes. *RNA Biol*, 6(3), 266-275. <https://doi.org/10.4161/rna.6.3.8332>
- Smirnov, A., Förstner, K. U., Holmqvist, E., Otto, A., Günster, R., Becher, D., Reinhardt, R., i 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>

- Smirnov, A., Wang, C., Drewry, L. L., i Vogel, J. (2017). Molecular mechanism of mRNA repression in trans by a ProQ-dependent small RNA. *EMBO J*, 36(8), 1029-1045. <https://doi.org/10.15252/emboj.201696127>
- Stein, E. M., Kwiatkowska, J., Basczok, M. M., Gravel, C. M., Berry, K. E., i 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., i 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., Vogel, J., i Wassarman, K. M. (2011). Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers. *Mol Cell*, 43(6), 880-891. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.08.022>
- Svensson, S. L., i Sharma, C. M. (2021). RNase III-mediated processing of a trans-acting bacterial sRNA and its cis-encoded antagonist. *Elife*, 10. <https://doi.org/10.7554/eLife.69064>
- Thomason, M. K., Voichek, M., Dar, D., Addis, V., Fitzgerald, D., Gottesman, S., Sorek, R., i Greenberg, E. P. (2019). A rhII 5' UTR-Derived sRNA Regulates RhIR-Dependent Quorum Sensing in Pseudomonas aeruginosa. *mBio*, 10(5). <https://doi.org/10.1128/mBio.02253-19>
- Timmermans, J., i Van Melderen, L. (2010). Post-transcriptional global regulation by CsrA in bacteria. *Cell Mol Life Sci*, 67(17), 2897-2908. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0381-z>
- Updegrove, T. B., Zhang, A., i 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., i 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., i Luisi, B. F. (2011). Hfq and its constellation of RNA. *Nat Rev Microbiol*, 9(8), 578-589. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2615>
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M., Clamp, M., i Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, 25(9), 1189-1191. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>
- Waters, L. S., i Storz, G. (2009). Regulatory RNAs in bacteria. *Cell*, 136(4), 615-628. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.043>
- Westermann, A. J., Venturini, E., Sellin, M. E., Forstner, K. U., Hardt, W. D., i 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>
- Williamson, J. R. (2000). Induced fit in RNA-protein recognition. *Nat Struct Biol*, 7(10), 834-837. <https://doi.org/10.1038/79575>
- Wilusz, C. J., i Wilusz, J. (2013). Lsm proteins and Hfq: Life at the 3' end. *RNA Biol*, 10(4), 592-601. <https://doi.org/10.4161/rna.23695>
- Woodson, S. A., Panja, S., i Santiago-Frangos, A. (2018). Proteins That Chaperone RNA Regulation. *Microbiol Spectr*, 6(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.RWR-0026-2018>
- Yakhnin, H., Pandit, P., Petty, T. J., Baker, C. S., Romeo, T., i Babitzke, P. (2007). CsrA of Bacillus subtilis regulates translation initiation of the gene encoding the flagellin protein (hag) by blocking ribosome binding. *Mol Microbiol*, 64(6), 1605-1620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05765.x>
- Yuan, X., Eldred, L. I., Kharadi, R. R., Slack, S. M., i Sundin, G. W. (2022). The RNA-Binding Protein ProQ Impacts Exopolysaccharide Biosynthesis and Second Messenger Cyclic di-GMP Signaling in the Fire Blight Pathogen Erwinia amylovora. *Appl Environ Microbiol*, 88(9), e0023922. <https://doi.org/10.1128/aem.00239-22>
- Zheng, A., Panja, S., i Woodson, S. A. (2016). Arginine Patch Predicts the RNA Annealing Activity of Hfq from Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. *J Mol Biol*, 428(11), 2259-2264. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.03.027>
- Zheng, J. J., Perez, A. J., Tsui, H. T., Massidda, O., i Winkler, M. E. (2017). Absence of the KhpA and KhpB (JAG/EloR) RNA-binding proteins suppresses the requirement for PBP2b by overproduction of

FtsA in *Streptococcus pneumoniae* D39. *Mol Microbiol*, 106(5), 793-814.
<https://doi.org/10.1111/mmi.13847>