

U bakterii małe, regulatorowe RNA (sRNA) biorą udział w odpowiedzi na czynniki stresowe pochodzące ze środowiska zewnętrznego. U *Escherichia coli* oraz pokrewnych gatunków bakterii białko opiekuńcze Hfq stymuluje wiązanie sRNA do regulowanych przez nie cząsteczek mRNA. Białko to posiada trzy powierzchnie oddziaływania z RNA. W oparciu o profile akumulacji sRNA w komórkach *E. coli* z mutacjami w miejscach wiązania RNA w poprzednich badaniach zaproponowano podział tych cząsteczek na dwie klasy. sRNA Klasy I oddziałują ze stroną proksymalną za pomocą ogona poli(U) zlokalizowanego na ich 3' końcach oraz z powierzchnią dystalną wewnętrznymi motywami bogatymi w reszty U i A. Cząsteczki mRNA regulowane przez te sRNA wiążą się do strony dystalnej Hfq za pomocą motywów ARN. sRNA Klasy II oddziałują z białkiem w alternatywny sposób. W komórkach z mutacją stron proksymalnej i dystalnej charakteryzowała je niższa akumulacja niż w obecności Hfq z mutacją strony bocznej. Na tej podstawie stwierdzono, że sRNA Klasy II kontaktują się z powierzchnią proksymalną i dystalną, podczas gdy mRNA przez nie regulowane wiążą się do strony bocznej.

W rozprawie doktorskiej badałam wpływ białka Hfq na asocjację cząsteczek sRNA Klasy II MgrR i ChiX do regulowanych przez nie mRNA, odpowiednio *eptB* lub *ygdQ* i *chiP*. W pierwszym etapie badań wyznaczyłam struktury drugorzędowe badanych RNA. Zbadałam również zależność powinowactwa MgrR do Hfq od mutacji w poszczególnych miejscach wiązania oraz określiłam właściwości tego sRNA w procesie konkurencji o dostęp do Hfq z innymi cząsteczkami. Następnie wykorzystując program *KinTek Explorer* przeprowadziłam globalną analizę danych asocjacji MgrR do *eptB* lub *ygdQ* oraz ChiX do *chiP* w obecności Hfq i wariantów białka z mutacjami stron rozpoznających RNA. Sprawdziłam także efekt kompetytorowej cząsteczki sRNA na dysocjację kompleksu ChiX-*chiP* od białka.

Otrzymane wyniki pozwoliły na lepsze zrozumienie sposobu rozpoznawania MgrR przez Hfq. Wskazałam również motywy sekwencyjne w MgrR, *eptB* i *ygdQ* odpowiadające za kontakt z białkiem. Następnie, scharakteryzowałam wpływ białka na asocjację badanych sRNA Klasy II do regulowanych przez nie mRNA. Zauważyłam także, że mutacja w miejscu wiązania RNA znajdującym się na bocznej stronie Hfq zatrzymywała MgrR i ChiX na białku i uniemożliwiała ich asocjację do mRNA. Co więcej, stwierdziłam, że mutacje w miejscach wiązania RNA na stronach dystalnej i proksymalnej miały bardziej negatywny wpływ na wiązanie MgrR do *eptB* lub *ygdQ* niż na wiązanie ChiX do *chiP*. Jest to zgodne z danymi innych badaczy,

potwierdzającymi silniejsze oddziaływanie ChiX z przeciwległymi powierzchniami białka. Wykorzystując program *KinTek Explorer* wyznaczyłam kinetycznie preferowane ścieżki dla wykonanych reakcji asocjacji. Na ich podstawie zauważyłam, że strona dystalna Hfq jest miejscem wiązania kompetytorowego RNA, które warunkuje uwalnianie kompleksu sRNA Klasy II-mRNA od białka. Obserwację tę potwierdziłam przeprowadzając analizy kinetyk dysocjacji kompleksu ChiX-*chiP* od Hfq, indukowane obecnością dodatkowej cząsteczki sRNA.

Podsumowując, wyniki wykonanych eksperymentów pokazały, że zarówno MgrR jak i ChiX wykorzystują typowy dla sRNA Klasy II model oddziaływania z Hfq. Jednakże cząsteczki te różnią się powinowactwem do poszczególnych miejsc wiązania RNA na powierzchni badanego białka opiekuńczego. Proponuję, że obserwowane różnice mogą mieć wpływ na fizjologiczną rolę badanych sRNA, zapewniającą przystosowanie komórek bakteryjnych do zmieniających się warunków środowiska.