

## STRESZCZENIE

W przedstawionej pracy doktorskiej analizowano w jaki sposób bakteryjne białko Hfq uczestniczy w tworzeniu oddziaływań pomiędzy małymi niekodującymi cząsteczkami RNA (sRNA) oraz regulowanym przez nie mRNA. Do tej pory dokładny molekularny mechanizm działania Hfq opisany został jedynie w pozytywnej regulacji translacji mRNA *rpoS* z bakterii *E. coli* z udziałem sRNA DsrA, które rozpoznaje mRNA w regionie 5' nieulegającym translacji. Niewiele wiadomo jednak w jaki sposób białko Hfq uczestniczy w kontroli ekspresji innych mRNA, szczególnie takich, które podlegają regulacji negatywnej i są rozpoznawane przez sRNA w sekwencji kodującej. Aby to wyjaśnić w niniejszej pracy zbadano udział białka Hfq w oddziaływaniach pomiędzy RybB, SdsR i MicC cząsteczkami sRNA z bakterii *Salmonella* a sekwencją kodującą mRNA *ompD*.

Wyniki badań przedstawionych w niniejszej pracy pokazały, że białko Hfq w sposób bezpośredni i specyficzny oddziałuje z mRNA *ompD* i w znaczący sposób przyspiesza szybkość asocjacji sRNA RybB i MicC z tym mRNA, natomiast jedynie w niewielkim stopniu wpływa na szybkość tworzenia kompleksów SdsR-*ompD*. Eksperymenty, w których wykorzystano krótkie, nieustrukturyzowane fragmenty sRNA i mRNA sugerowały, że Hfq w odmienny sposób uczestniczy w wiązaniu cząsteczek sRNA do mRNA *ompD*, a jego rola zależna jest od struktur sRNA, a także kontekstu strukturalnego ich miejsc wiązania w obrębie mRNA. Przeprowadzona częściowa degradacja mRNA z wykorzystaniem enzymów nukleolitycznych pozwoliła na wyznaczenie struktury drugorzędowej sekwencji liderowej mRNA *ompD*. Obejmuje ona 5 struktur typu spinka, a sekwencje komplementarne względem sRNA mają odmienny kontekst strukturalny, co może wyjaśniać różnice w sposobie w jaki Hfq uczestniczy w tworzeniu oddziaływań sRNA z mRNA. Dodatkowo, wykazano, że wiązanie RybB i MicC wywołuje zmiany konformacyjne strukturze mRNA *ompD*. Stwierdzono także, że sekwencja bogata w reszty adenozyń i urydyn zlokalizowana w regionie 5' UTR mRNA stanowi funkcjonalne miejsce wiązania Hfq i ma kluczowe znaczenie dla zależnego od białka Hfq tworzenia kompleksów sRNA z sekwencją kodującą mRNA. Podsumowując, przedstawione dane wskazują, że białko Hfq ułatwia oddziaływania wszystkich trzech badanych cząsteczek sRNA z mRNA *ompD*, jednak dokładny sposób jego działania w każdym przypadku zależy od sekwencji oraz struktury oddziałujących cząsteczek RNA.

## SUMMARY

In the presented PhD thesis the contribution of Hfq protein to the annealing of small noncoding RNAs (sRNAs) to the complementary sequences in a target mRNA was analyzed. So far, the detailed molecular mechanism used by Hfq has been described only for its role in the positive regulation of *E. coli rpoS* mRNA by DsrA sRNA, which recognizes a sequence located in the 5' untranslated region of this mRNA. However, little is known about how Hfq protein contributes to the annealing of other sRNAs to their mRNA targets, especially those, which exert negative regulation of translation and bind to the coding sequence of their mRNA targets. To address this issue the contribution of Hfq to the annealing of three sRNAs to the coding sequence of *Salmonella ompD* mRNA was explored. The results presented in this thesis showed that Hfq protein interacted with *ompD* mRNA in direct and specific way and significantly accelerated the rate of RybB and MicC sRNA association with this mRNA, while it had a smaller effect on the SdsR-*ompD* complex formation. The experiments using truncated, unstructured sRNA and mRNA molecules suggested that the Hfq protein differently contributed to the annealing of each sRNA molecule to *ompD* mRNA. *In vitro* structure probing revealed that the *ompD* mRNA leader sequence folds into 5 stem-loop structures with RybB, SdsR, and MicC binding sites located in different structural contexts, which may explain differences in Hfq contributions to their interactions. Additionally, the binding of RybB and MicC sRNAs induced conformational changes in *ompD* mRNA leader, which were consistent with local unfolding of mRNA secondary structure. Finally, the results indicated that the binding of Hfq to the long AU-rich sequence located in the 5'-untranslated region of *ompD* mRNA was essential for the Hfq-dependent annealing of sRNAs to the mRNA coding sequence. Overall, the data showed that Hfq assists small RNAs in binding to the *ompD* mRNA coding sequence but its specific contributions depend on the sequence and structure of interacting RNA molecules.