

## 1. STRESZCZENIE

W przedstawionej pracy doktorskiej badano znaczenie sekwencji i struktury regulowanych mRNA oraz cząsteczek anty-sRNA w ich oddziaływaniach z niekodującymi RNA bakterii (sRNA). Do tej pory nie określono jednoznacznie znaczenia zachowanych ewolucyjnie sekwencji mRNA znajdujących się w sąsiedztwie miejsca wiążania sRNA. Niewiele wiadomo także na temat sposobu działania białka Hfq w promowaniu oddziaływań cząsteczek sRNA z regulującymi ich poziom w komórce cząsteczkami anty-sRNA. Aby wyjaśnić pierwsze zagadnienie dotyczące roli sekwencji mRNA w wiązaniu regulatorowych sRNA, w niniejszej pracy zbadano oddziaływanie sRNA RybB z *S. enterica* z komplementarnymi mRNA posiadającymi różne reszty nukleotydowe w pozycji 3' względem miejsca wiążania RybB. Druga część pracy dotyczyła poznania znaczenia sekwencji i struktury mRNA i anty-sRNA w zależnych od białka Hfq oddziaływaniach sRNA z cząsteczkami anty-sRNA oraz z regulowanymi przez nie mRNA. Badania wykonano, porównując oddziaływanie z *E. coli*: sRNA klasy II ChiX z anty-sRNA *chbBC-IGR* oraz mRNA *chiP*, a także sRNA klasy I RybB z komplementarnym anty-sRNA 3'ETS<sup>leuZ</sup> oraz mRNA *tsx*. Ponadto zbadano udział białka Hfq w asocjacji sRNA klasy I GcvB z regulatorowym anty-sRNA AgvB z *E. coli*.

Wyniki badań dotyczących pierwszego zagadnienia pokazały, że obecność reszty purynowej w pozycji 3' względem miejsca wiążania sRNA w mRNA zwiększa stabilność termodynamiczną zarówno krótkich dupleksów RNA odpowiadających miejscom oddziaływanego sRNA RybB z mRNA *ompC*, *tsx* i *ompW*, jak i kompleksów tworzonych przez naturalną cząsteczkę RybB z fragmentami mRNA *ompC*, *tsx*, *ompW*, *ompS* i *ompA*. Zostało to potwierdzone przez analizę struktury mRNA *ompC* związanego z RybB. Ponadto ustalono, że rodzaj reszty nukleotydowej w pozycji 3' względem miejsca wiążania sRNA w mRNA wpływa na szybkość asocjacji sRNA RybB do mRNA. Określono, że obecność białka Hfq zmniejsza znaczenie sekwencji mRNA sąsiadującej z miejscem wiążania sRNA dla oddziaływań cząsteczki RybB z regulowanymi mRNA. Co więcej, wskazano, że cząsteczki mRNA *ompC* posiadające resztę purynową w pozycji 3' ulegają bardziej

wydajnej represji translacji w obecności RybB, niż te, które posiadają resztę pirymidynową.

Badania w drugiej części pracy wykazały, że struktury anty-sRNA AgvB oraz 3'ETS<sup>leuZ</sup> przypominają te tworzone przez sRNA, ponieważ zawierają spinkę terminatorową na końcu 3', za którą następuje sekwencja oligo(U), podczas gdy struktura anty-sRNA *chbBC*-IGR nie zawiera stabilnych struktur drugorzędowych. Co więcej, wskazano, że sekwencje odpowiedzialne za oddziaływanie z komplementarnymi RNA w strukturach anty-sRNA AgvB, 3'ETS<sup>leuZ</sup> i *chbBC*-IGR oraz sRNA GcvB są zlokalizowane w dostępnych dla wiązania regionach jednoniciowych. Z kolei sekwencje rozpoznawane przez białko Hfq w cząsteczkach anty-sRNA i mRNA wiążących się z tą samą cząsteczką sRNA zawierają podobne motywy, co może wyjaśniać podobieństwo w ich oddziaływaniach z Hfq. Określono, że oddziaływanie sRNA klasy II ChiX z anty-sRNA *chbBC*-IGR, jak i z mRNA *chiP* wykazują porównywalny mechanizm działania białka Hfq. Z kolei oddziaływanie sRNA klasy I RybB z anty-sRNA 3'ETS<sup>leuZ</sup> przejawia zbliżony sposób interakcji z białkiem Hfq, co podczas wiązania RybB z mRNA *tsx*. Natomiast oddziaływanie sRNA klasy I GcvB z anty-sRNA AgvB z w kompleksie z Hfq jest podobne do wiązania sRNA klasy II z regulowanymi mRNA, w którym rolę sRNA pełni AgvB, a GcvB zachowuje się jak mRNA

Podsumowując, wyniki niniejszej pracy stanowią wkład w poznanie znaczenia sekwencji i struktury cząsteczek RNA w oddziaływaniach sRNA bakterii z cząsteczkami mRNA oraz anty-sRNA. Zaproponowano, że ewolucyjna preferencja reszt purynowych w sekwencjach mRNA w pobliżu miejsca oddziaływania z sRNA umożliwia wydajną interakcję tych RNA, co prowadzi do efektywnej represji translacji mRNA. Ponadto scharakteryzowano sposób oddziaływania anty-sRNA z regulowanymi sRNA w kompleksie z białkiem Hfq. Ustalono, że zależne od Hfq wiązanie sRNA z cząsteczkami anty-sRNA oraz mRNA wykazuje zbliżony mechanizm, co może wynikać z podobieństwa w sekwencjach rozpoznawanych przez mRNA i anty-sRNA oraz białko Hfq.

## 2. ABSTRACT

In the presented PhD dissertation, the significance of sequence and structure of regulated mRNAs, and anti-sRNA molecules for their interactions with bacterial noncoding RNAs (sRNAs) was examined. So far, the significance of the evolutionally conserved mRNA sequence located in the neighborhood to the sRNA binding sites was not resolved. Little is known about the mode of Hfq action in promotion of sRNA interactions with anti-sRNAs, which regulate sRNA level in the cell. To elucidate the first issue about the role of mRNA sequence for binding of regulatory sRNAs in the presented PhD thesis, *S. enterica* RybB sRNA interactions with complementary mRNAs containing different nucleotides located 3' to the RybB binding sites were analyzed. The second part of the dissertation applied to the determination of the importance of mRNA and anti-sRNA sequence and structure for Hfq-dependent sRNA interactions with anti-sRNAs. Research was done by comparison of *E. coli* interactions: class II sRNA ChiX binding with anti-sRNA *chbBC*-IGR and with *chiP* mRNA, and class I sRNA RybB with anti-sRNA 3'ETS<sup>leuZ</sup>, and with *tsx* mRNA. Moreover, the contribution of the Hfq protein in class I sRNA GcvB association with regulatory anti-sRNA from *E. coli* was examined.

Results applied to the first issue pointed out that the presence of the purine residue 3' to the sRNA binding site in the mRNA sequence increases the thermodynamic stability of not only short RNA duplexes corresponding to the RybB interaction sites with *ompC*, *tsx* and *ompW* mRNAs, but also natural RybB with *ompC*, *tsx*, *ompW*, *ompS* and *ompA* mRNA fragments. It was also confirmed by footprinting analysis of RybB bound to *ompC* mRNA. Moreover, it was determined that the identity of the nucleotide residue located 3' to the sRNA binding sites in the mRNA sequence influences the rate of RybB association to mRNA targets. It was also evaluated that the presence of the Hfq protein decreases the significance of the mRNA sequence neighboring the sRNA binding sites for RybB interactions with regulated mRNAs. Moreover, it was pointed out that *ompC* mRNAs containing purines in the 3' position are more efficiently repressed by RybB sRNA than those with pyrimidines.

Examination of the second part of this thesis evaluated that anti-sRNA AgvB, and 3'ETS<sup>leuZ</sup> structures are similar to those formed by sRNAs, because contain terminator stem loop at the 3'end followed by oligo(U) sequence, while anti-sRNA

*chbBC*-IGR doesn't form stable secondary structures. Moreover, it was determined that sequences responsible for interactions with complementary RNAs in anti-sRNA AgvB, 3'ETS<sup>leuZ</sup>, and *chbBC*-IGR, and in GcvB sRNA are localized in the single stranded, available for binding regions. In turn, sequences recognized by Hfq protein in anti-sRNAs and mRNAs complementary to the same sRNAs contain similar motifs, which can explain their resemblance in interactions with Hfq. It was evaluated that the mechanism of class II sRNA ChiX binding with both *chbBC*-IGR anti-sRNA and *chiP* mRNA is similar. Moreover, class II sRNA RybB interaction with both 3'ETS<sup>leuZ</sup> and *tsx* mRNA display resemblance in the way of Hfq binding. By contrast, class I sRNA GcvB interaction with AgvB anti-sRNA in the complex with Hfq is comparable to class II sRNAs interactions with regulated mRNAs, in which AgvB plays a role of class II sRNA, and GcvB behaves as if it were mRNA.

Overall, results presented in this dissertation provide contribution to the knowledge about the RNA sequence and structure for bacterial sRNAs interactions with mRNA molecules and with regulatory anti-sRNAs. It was proposed that the evolutionary preference for purine residues in the mRNA sequences close to the sRNA binding sites enables efficient interactions of those RNAs, which leads to effective mRNA translation repression. Moreover, the mode of anti-sRNAs interactions with regulatory sRNAs in a complex with the Hfq protein was characterized. It was determined that Hfq-dependent sRNA binding with anti-sRNAs and mRNAs shows similar mechanism, which can be explained by the resemblance of sequences recognized by sRNAs and Hfq in mRNAs and anti-sRNAs.