

Mechanizmy rozpoznawania RNA przez białko ProQ oraz rola tego białka w oddziaływaniach pomiędzy niekodującymi RNA a regulowanymi mRNA u bakterii *Escherichia coli*.

Małe niekodujące RNA (sRNA) bakterii uczestniczą w adaptacji komórek bakteryjnych do zmian w środowisku zewnętrznym, w utrzymywaniu homeostazy wewnątrzkomórkowej, a także w procesach związanych z infekcją organizmu człowieka. Ich mechanizm działania polega na regulacji ekspresji genów poprzez wiązanie się z komplementarnymi sekwencjami w cząsteczkach informacyjnych RNA (mRNA), co prowadzi do zmian w stabilności lub translacji mRNA. Dla działania wielu z tych regulatorowych RNA niezbędne jest homoheksameryczne białko Hfq, które ułatwia oddziaływania sRNA z regulowanymi przez nie mRNA. W toku ostatnich badań prowadzonych za pomocą metod opartych o wysokoprzepustową analizę oddziaływań cząsteczek RNA z białkami stwierdzono jednak, że wiele z niekodujących RNA wiąże się w komórkach bakteryjnych z innym białkiem, nazwanym ProQ.

Białko ProQ jest członkiem rodziny białek posiadających domenę ProQ/FinO. Białka te mają zwykle budowę modułową i oprócz domeny ProQ/FinO w ich skład wchodzi także inne domeny zlokalizowane na N-końcu lub C-końcu białka, które mogą nadawać im dodatkowe funkcje. Białka z rodziny ProQ/FinO występują w licznych β - and γ -proteobakteriach, do których należą także gatunki ważne dla zdrowia człowieka. Obiektem badań w niniejszym projekcie jest białko ProQ z bakterii *Escherichia coli*, które jest zbudowane z dwóch domen: N-końcowej domeny ProQ/FinO oraz C-końcowej domeny homologicznej do domen typu Tudor. Białko to oddziałuje z licznymi cząsteczkami sRNA i mRNA u bakterii *E. coli*, jednak nieznanym jest mechanizm rozpoznawania cząsteczek RNA przez ProQ oraz przyczyny dla których białko ProQ oraz białko Hfq oddziałują w większości z innymi cząsteczkami RNA. Nie wiemy także, czy poza wiązaniem cząsteczek sRNA białko ProQ pomaga im także w tworzeniu oddziaływań z regulowanymi przez nie cząsteczkami mRNA.

Celem projektu jest wyjaśnienie jakie elementy struktury cząsteczek RNA oraz białka ProQ uczestniczą w ich wzajemnym rozpoznawaniu się, a także czy białko ProQ ułatwia tworzenie stabilnych oddziaływań pomiędzy cząsteczkami sRNA a regulowanymi mRNA. Aby to wyjaśnić zamierzamy podjąć trzy główne zagadnienia. Pierwszym z nich jest poznanie struktury cząsteczek RNA wiązanych przez białko ProQ i określenie jakie elementy sekwencji oraz struktury tych cząsteczek RNA powodują, że są one wiązane przez białko ProQ, a nie przez białko Hfq. Drugim z nich jest identyfikacja tych reszt aminokwasowych znajdujących się na powierzchni białka ProQ, które mają największe znaczenie w rozpoznawaniu cząsteczek RNA, a także wyjaśnienie czy w rozpoznawaniu różnych cząsteczek RNA uczestniczą te same reszty aminokwasowe ProQ, czy też inne. Trzecim z nich jest wyjaśnienie w jaki sposób dochodzi do tworzenia kompleksu pomiędzy cząsteczką sRNA a regulowaną przez nią cząsteczką mRNA w obecności białka ProQ w porównaniu do sytuacji bez białka ProQ, po to aby zrozumieć jaki jest mechanizm udziału białka ProQ w tworzeniu kompleksów pomiędzy cząsteczkami sRNA a regulowanymi przez nie mRNA.

W proponowanych badaniach zamierzamy zastosować metody badania stabilności oraz kinetyki oddziaływań pomiędzy cząsteczkami RNA oraz białek monitorowane za pomocą techniki różnicowej migracji kompleksów w żelu poliakrylamidowym, których wyniki będą analizowane globalnie w celu określenia stałych szybkości poszczególnych etapów reakcji. W badaniach dotyczących pierwszego zagadnienia będziemy analizować tą metodą wpływ mutacji w cząsteczkach RNA na oddziaływanie z ProQ, a w badaniach dotyczących drugiego zagadnienia wpływ mutacji w ProQ na te oddziaływania. Ponadto znaczenie mutacji w białku ProQ dla oddziaływania z cząsteczkami RNA w komórkach bakteryjnych zostanie zbadane metodą koimmunoprecypitacji mutantów białka ProQ wraz ze związanymi cząsteczkami RNA. W badaniach dotyczących trzeciego zagadnienia zamierzamy zbadać dokładny mechanizm kinetyczny określający udział ProQ w oddziaływaniach pomiędzy sRNA a mRNA po to aby ustalić, który z możliwych modeli opisujących rolę ProQ najlepiej tłumaczy dane eksperymentalne. Ponadto zbadamy wpływ mutacji w ProQ na oddziaływania pomiędzy cząsteczkami sRNA a cząsteczkami mRNA w *E. coli* za pomocą metody RIL-seq, która pozwala na identyfikację cząsteczek RNA jednocześnie oddziałujących z białkiem ProQ.