

„Rola małego RNA-GraL, w regulacji ekspresji genów *Escherichia coli*”
Mgr Maciej Dylewski

Małe RNA są cząsteczkami zaangażowanymi w kontrolę ekspresji wielu genów w komórkach bakteryjnych. Wykazują wiele różnorodnych mechanizmów działania, ale zwykle wywierają swój wpływ poprzez bezpośrednie oddziaływanie z docelowym mRNA. Wiele z nich do prawidłowego działania wymaga białka Hfq. sRNA wpływają na przebieg odpowiedzi bakterii na stres oksydacyjny, stres błonowy czy niedobór żelaza. Zaangażowane są też w kontrolę takich procesów jak wirulencja, metabolizm węgla czy *quorum sensing*. GraL jest małym RNA *Escherichia coli* kodowanym w regionie liderowym genu *greA*, najprawdopodobniej działającym *in cis* oraz *in trans*. Powstaje on w wyniku wcześniejszej terminacji transkryptu *greA*. Samo białko GreA jest czynnikiem transkrypcyjnym zwiększającym wierność transkrypcji i zapobiegającym zatrzymywaniu się kompleksu elongacyjnego polimerazy RNA. Gen *greA* ulega autoregulacji- nadprodukcja białka GreA *in trans* powoduje zmniejszenie ekspresji genu *greA*.

Celem niniejszej pracy było ustalenie roli GraL w komórce bakteryjnej. Skonstruowano 13 fuzji reporterowych potencjalnych celów GraL z genem β -galaktozydazy. Zbadano zmiany ich aktywności przy różnych poziomach GraL w komórce. Najbardziej prawdopodobnym celem molekularnym GraL okazał się gen *nudE*, kodujący hydrolazę Nudix. Aktywność β -galaktozydazy fuzji *nudE-lacZ* zmienia się jednak również w odpowiedzi na zmiany poziomu GreA. Następnie, w celu potwierdzenia interakcji między mRNA *nudE* a GraL, przeprowadzono eksperymenty *in vitro* typu EMSA. GraL wiąże się do Hfq ale jest łatwo usuwany z tych kompleksów przez mRNA *nudE*. Podsumowując, ekspresja *nudE* jest najprawdopodobniej kontrolowana zarówno przez GraL jak i GreA.

Kolejnym etapem niniejszej pracy było ustalenie roli GraL *in cis*. Używając fuzji transkrypcyjnych zawierających wybrane elementy rejonu promotorowego i liderowego *greA* z genem β -galaktozydazy ustalono, że sekwencja GraL jest niezbędna i wystarczająca do autoregulacji ekspresji genu *greA*, tzn. nie zależy od sekwencji promotora. Ponadto, GraL nie wymaga białka Hfq do działania *in cis*. Dodatkowo, za pomocą metody Northern blot zmierzono poziom GraL w komórkach w zależności od wewnątrzkomórkowego stężenia GreA. Okazało się, iż białko to jest niezbędne do produkcji GraL, którego poziom wzrasta przy nadprodukcji GreA *in trans*. Sugeruje to, że kontrola ekspresji *greA* odbywa się na etapie terminacji GraL. Kolejne eksperymenty potwierdziły, że sekwencja terminatora GraL odgrywa ważną rolę w autoregulacji *greA*, choć prawdopodobnie struktura drugorzędowa terminatora także odgrywa w niej pewną rolę.

Przeprowadzono również dodatkowe poszukiwania czynników wpływających na ekspresję *greA*. Zrealizowano to konstruując biblioteki genomowe z losowymi insercjami transpozonu niosącego gen oporności na kanamycynę. Wyniki sugerują, iż zaburzenie ekspresji genów zaangażowanych w metabolizm błon komórkowych, odpowiedź na stres błonowy, oraz metabolizm NAD i komórkowy potencjał redoks, wpływa na ekspresję *greA/GraL*.