

Grzegorz M. Cech*, Agnieszka Szalewska-Pałasz

Katedra Genetyki Molekularnej Bakterii, Uniwersytet Gdański

Wpłynęło w sierpniu, zaakceptowano w listopadzie 2017 r.

Streszczenie: Białko Hfq jest jednym z lepiej poznanych czynników regulacyjnych działających na poziomie RNA. Na początku, białko to zostało odkryte jako czynnik komórki gospodarza niezbędny do rozwoju bakteriofaga Q β . Od tego czasu rola białka Hfq w rozwoju fagów nie była szczególnie badana. Jednak w kolejnych latach, w wielu badaniach stwierdzono ryboregulacyjne funkcje tego białka. Polegają one na pośredniczeniu w oddziaływaniach pomiędzy małymi regulatorowymi sRNA a mRNA, będących celem ich działania. Oddziaływania te mogą prowadzić zarówno do degradacji lub stabilizacji, zależnie od transkryptu. Białko Hfq posiada zdolność wiązania się do kwasów nukleinowych, i pomimo iż dużo chętniej wiąże się do RNA, może również wiązać się do DNA. Zaobserwowano, iż Hfq jest również jednym z białek organizującym nukleoid bakterijny. Obserwacje te otwierają nowy rozdział w dyskusji na temat roli białka Hfq w regulacji replikacji DNA. Ponieważ białko Hfq wpływa na tak różne procesy biologiczne, nie jest więc dziwne iż jego brak prowadzi do efektów pleiotropowych.

1. Wprowadzenie. 2. Historia odkrycia oraz kontekst ewolucyjny białka Hfq. 3. Struktura białka Hfq oraz jego funkcje molekularne. 4. Charakterystyka komórek pozbawionych białka Hfq. 5. Interakcje białka Hfq oraz DNA. 6. Podsumowanie

The Hfq protein – a novel view on the well-known riboregulator

Abstract: The Hfq protein is one of the most important regulatory factors acting at the RNA level. This protein was first discovered as a host factor necessary for Q β bacteriophage development. Following the discovery, the Hfq role in bacteriophage development was not investigated in depth. In subsequent years, however, many studies revealed various riboregulatory functions of this protein, mainly focused on facilitating sRNA and mRNA pairing, regulating both the degradation and stability of many transcripts. The Hfq protein has the ability to bind to nucleic acids – it binds more efficiently to RNA, but can also attach to DNA. It has been also proved that Hfq is involved in the nucleoid organization. These observations open room for discussion on the potential role of Hfq in the regulation of DNA replication. Since Hfq protein affects many cellular processes, the deletion of the gene encoding this protein has a pleiotropic effect on the cell.

1. Introduction. 2. The history of the Hfq protein discovery and its evolutionary context. 3. Structure of the Hfq protein and its molecular function. 4. Characteristics of cells devoid of the Hfq protein. 5. Hfq interactions with the DNA. 6. Summary

Słowa kluczowe: Białko Hfq, DNA, RNA, ryboregulacja

Key words: Hfq protein, DNA, RNA, riboregulation

1. Wprowadzenie

Białko Hfq jest jednym z kluczowych czynników regulatorowych, działających w komórce na poziomie RNA. Początkowo białko to zostało opisane jako czynnik niezbędny do rozwoju bakteriofaga Q β , jednak rola tego białka w rozwoju bakteriofagów nie była później wnikliwie badana. W kolejnych latach opisywano natomiast wiele jego funkcji związanych z regulacją metabolizmu RNA, które w dużej mierze skupiają się na umożliwieniu interakcji pomiędzy sRNA a mRNA, jak również na udziale w procesach degradacji jak i stabilizacji wielu transkryptów. Białko Hfq posiada zdolność do wiązania się z kwasami nukleinowymi i, choć zdecydowanie silniej oddziałuje z RNA, wykazano również, iż wiąże się ono z DNA. Dzięki tym właściwościom może ono brać udział w organizacji nukleoidu. Otworzyło to nową drogę do spekulacji na temat potencjalnej roli białka Hfq w regulacji replikacji DNA. Ponieważ białko Hfq wpływa na wiele procesów komórkowych, efekty delekcji genu kodującego to białko mają charakter pleiotropowy.

2. Historia odkrycia oraz kontekst ewolucyjny białka Hfq

Białko Hfq (dawniej HF-1) zostało opisane na początku lat siedemdziesiątych ubiegłego stulecia jako czynnik niezbędny do replikacji bakteriofaga Q β w komórkach gospodarza, jakim dla tego faga jest bakteria *Escherichia coli*. Stąd też wzięła się akronimiczna nazwa tego białka – Hfq, od angielskiego **h**ost **f**actor for **Q** β replication [15]. Już we wczesnych doniesieniach naukowych białko to charakteryzowane było jako niezwykle termostabilne i wykazujące silne powinowactwo do kwasów nukleinowych, szczególnie chętnie wiążące się z jednoniciowym RNA bogatym w powtórzenia adenina-uracyl (AU) [8, 12, 21, 43]. W kolejnych latach wykazano, iż białko Hfq należy do olbrzymiej rodziny białek wiążących się do RNA, które można odnaleźć prawie w każdym organizmie, należącym do wszystkich trzech domen drzewa życia (*Prokaryota*, *Eucaryota* oraz *Archea*). Obecność ortologów genu kodującego białko Hfq, została potwierdzona

* Autor korespondencyjny: Grzegorz M. Cech; Katedra Genetyki Molekularnej Bakterii, Uniwersytet Gdański, Wita Stwosza 59, 80-308 Gdańsk, Polska; tel. 58 523 60 65, fax: 58 523 60 25; e-mail: grzegorz.cech@biol.ug.edu.pl

w prawie połowie zsekwencjonowanych genomów bakteryjnych [31].

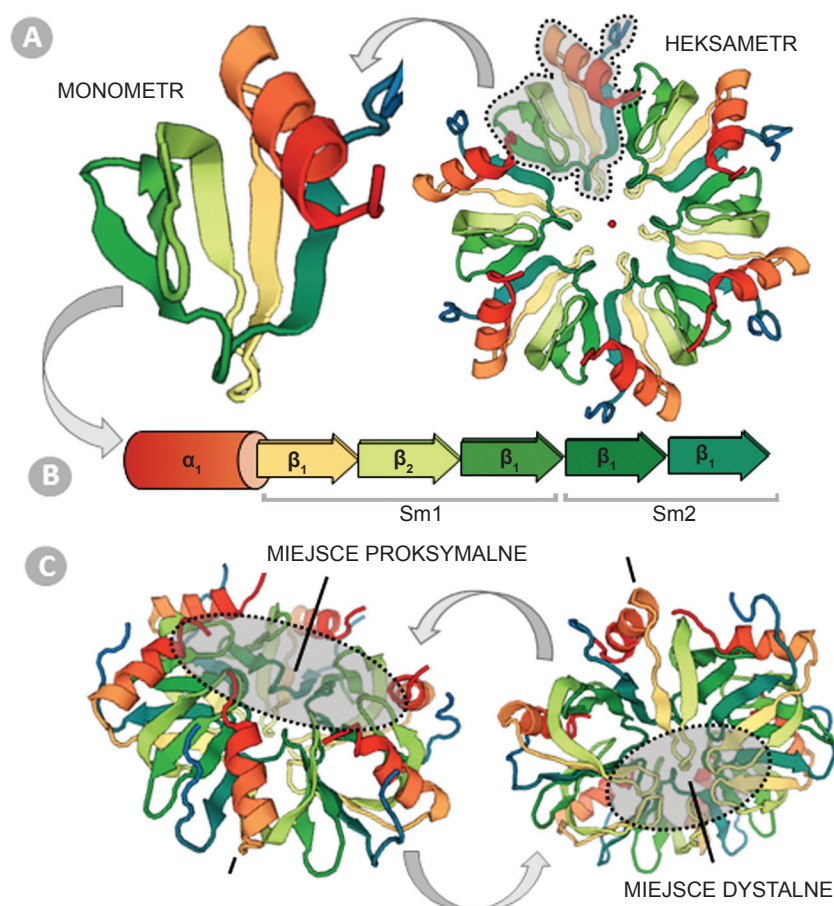
Homologami białka Hfq występującymi w królestwie zwierząt (*Metazoa*) są białka Sm oraz białka Sm-podobne (LSm), które możemy znaleźć w archeonach czy jednokomórkowych eukariontach. Zarówno białka Hfq, jak i białka z rodzin Sm czy Sm-podobnych mają wiele cech wspólnych, do których należy między innymi: multimeryczna czwartorzędowa struktura w kształcie pierścienia, umożliwiającą interakcje z makromolekułami oraz działanie w postaci czynników wiążących RNA, pełniących funkcję w regulacji post-transkrypcyjnej.

3. Struktura białka Hfq oraz jego funkcje molekularne

Białko to jest obecnie uważane za pleiotropowy regulator ekspresji genów bakteryjnych, który moduluje translację mRNA poprzez umożliwianie interakcji z małymi regulatorowymi RNA (sRNA) [33, 57]. Interakcje takie możliwe są dzięki charakterystycznej strukturze białka Hfq.

Na jeden monomer białka Hfq składają się 102 reszty aminokwasowe. N-terminalna domena każdego monomeru składa się z pięciu β -nici, które tworzą silnie związaną strukturę β -kartki zwieńczoną przez strukturę α -helisy. Białko Hfq składa się z sześciu takich monomerów (Ryc. 1).

Struktury β -kartki z poszczególnych monomerów oddziałują z sobą tworząc toroidalną heksameryczną strukturę [7, 53]. Monomery zawierają konserwowane ewolucyjnie motywy zwane Sm1 oraz Sm2 mające długość 32 oraz 14 reszt aminokwasowych [19]. Motywy te są cechą charakterystyczną białek należących do szeroko rozumianej rodziny białek Hfq, Sm oraz Sm-podobnych, oraz dowodzą wspólnego pochodzenia ewolucyjnego tych białek. Motyw Sm1 jest silnie konserwowany ewolucyjnie w obrębie tej rodziny, należą do niego pierwsze trzy β -nici. Struktura ta jest otoczona przez motyw Sm2, na który składają się kolejne dwie β -nici. Motyw ten jest mniej konserwowany ewolucyjnie i różni się pomiędzy poszczególnymi homologami białka Hfq, jak również pomiędzy eukariotycznymi i archealnymi białkami Sm oraz Sm-podobnymi. Zmienność ewolucyjna tego motywu jest również powodem występowania różnej



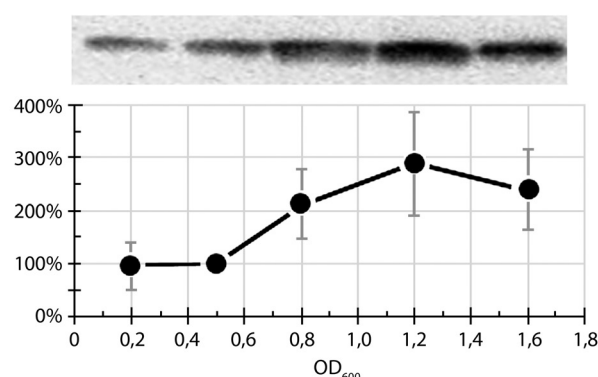
Ryc. 1. Struktura białka Hfq

Monomer oraz homoheksametr (panel A) z wyróżnionymi kolorystycznie strukturami α -helisy oraz β -nici z zaznaczonymi motywami Sm1 i Sm2 (panel B). Miejsca wiązania białka Hfq do kwasów nukleinowych, głównie RNA [57] (panel C). Obrazy Hfq na podstawie struktury 3QHS z bazy danych RCSB PDB (www.rcsb.org) [53].

liczby monomerów (oraz innych dodatkowych struktur) w ostatecznie funkcjonujących białkach, tworząc różne homo- i heterooligomery [36].

Pierścieniowa struktura białka Hfq ukazuje dwie strony, miejsce dystalne (distal face), oraz miejsce proksymalne (proximal face) (Ryc. 1, panel C), które są potencjalnymi miejscami oddziaływań tego białka z kwasami nukleinowymi. Pomimo, iż pełen mechanizm oddziaływań białka Hfq z RNA nie jest jeszcze poznany, wiadomo, że N-terminalna domena Sm, składająca się z około 65 aminokwasów, wiąże się z RNA [2]. Sekwencje RNA bogate w urydynę wiążą się do pierścienia Sm w części zwanej miejscem proksymalnym, natomiast sekwencje RNA bogate w adeninę wiążą się do części zwanej miejscem dystalnym, [25]. Niedawno zaproponowano, że strona boczna pierścienia Hfq (lateral face), zawierająca zachowane ewolucyjnie reszty argininowe, pełni rolę trzeciego miejsca wiązania RNA do Hfq [41], które jest ważne dla regulacji translacji niektórych mRNA [42]. Warto nadmienić, iż oprócz dobrze scharakteryzowanej domeny Sm, białko Hfq zawiera domenę C-terminalną, składającą się z około 35 reszt aminokwasowych. Wydaje się, iż domena ta nie posiada uporządkowanej struktury drugorzędowej a jej funkcja przez wiele lat pozostawała nieznana [57], jednak obecne odkrycia rzuciły nowe światło na rolę tej domeny. Jedną z zaproponowanych funkcji dotyczy udziału ujemnie naładowanych reszt aminokwasowych tej domeny w zapewnieniu specyficzności oddziaływań białka Hfq z kwasami nukleinowymi [40]. Ponadto zaobserwowano, iż wyizolowana C-terminalna część białka Hfq posiada niezwykle właściwości tworzenia wewnątrzkomórkowych struktur przypominających włókna. Opisano również, iż domena ta odpowiedzialna jest za wiązanie się cząsteczek białka Hfq w struktury wyższego rzędu, razem z innymi komponentami uczestniczącymi w szeroko pojętym przetwarzaniu RNA. Struktury przypominające włókna są zlokalizowane w sąsiedztwie błony wewnętrznej komórki i nie wpływają na zdolność białka Hfq do wiązania RNA. Już we wcześniejszych doniesieniach opisywane było, iż znacząca część tego białka jest wiązana z błoną komórkową, co łączono z jego rolą w regulacji degradacji RNA [3, 26]. Zrozumienie zarówno przestrzennego, jak i czasowego wiązania się białka Hfq, otwiera nowy rozdział w rozważaniach na temat ryboregulatorowych funkcji tego białka oraz regulacji post-transkrypcyjnej w czasie cyklu komórkowego [14].

W komórce bakteryjnej Hfq jest białkiem powszechnie występującym, zlokalizowanym również w cytoplazmie – jego stężenie wewnątrzkomórkowe szacuje się na około 10 μM . Początkowe badania opisywały, iż pewna frakcja tego białka związana była również z rybosomami [54], jednak późniejsze badania nie potwierdzają tej tezy [56]. Wewnątrzkomórkowy poziom białka Hfq wzrasta



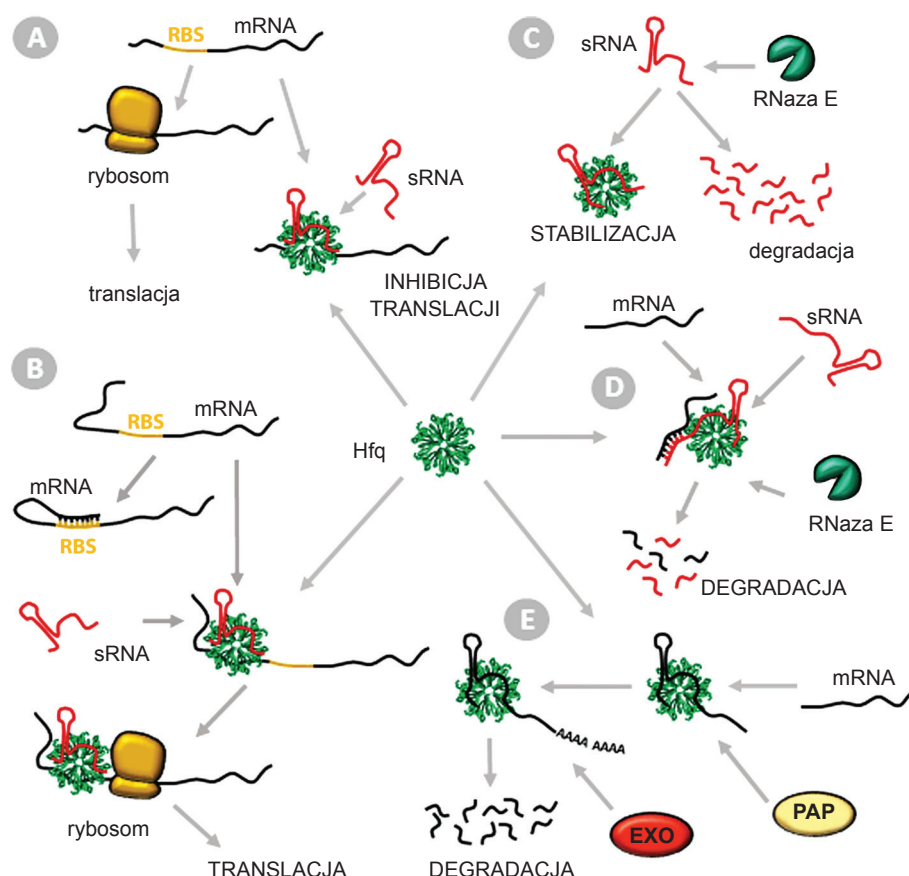
Ryc. 2. Relatywny poziom białka Hfq w komórce *E. coli* podczas wzrostu bakteryjnego

Górny panel prezentuje wizualizację zmian poziomu białka Hfq w komórkach typu dzikiego, podczas wzrostu (Western-blotting), dolny panel prezentuje te same zmiany w ujęciu ilościowym (na podstawie [54]).

w fazie stacjonarnej hodowli bakteryjnej względem fazy eksponentialnego wzrostu, Ryc. 2 [9, 13, 48], co eksponuje jego rolę w procesach zaangażowanych w regulację ekspresji genów związanych z fazą stacjonarną. Białko Hfq jest niezbędne do translacji mRNA dla podjednostki σ^S (białko RpoS) polimerazy RNA. Warunkuje to właściwą adaptację komórki bakteryjnej do stresu związanego z przejściem w fazę stacjonarną hodowli bakteryjnej [30]. Białko Hfq wpływa również na regulację poziomu innego białka niezbędnego w fazie stacjonarnej – białka FtsZ, które to tworzy strukturę pierścienia (tzw. pierścień Z) w obrębie miejsca przyszłego podziału komórki bakteryjnej [6, 55]

Białko Hfq związane jest z białkami zaangażowanymi w degradację mRNA takimi jak polimeraza poliadenylacyjna (PAP I), fosforylaza polinukleotydowa (PNP) czy RNaza E [22, 28]. Istnieje szereg scenariuszy, według których Hfq reguluje losy mRNA oraz sRNA (Ryc. 3).

Na ogół działanie białka Hfq odbywa się na poziomie regulacji translacji lub stabilności RNA. Niedawne badania z zastosowaniem technik wysokoprzepustowych ukazują bardzo liczne miejsca oddziaływań białka Hfq z cząsteczkami sRNA oraz mRNA w komórce bakteryjnej [27]. Jednym ze scenariuszy działania jest sytuacja, w której białko Hfq wraz z sRNA mogą blokować miejsce wiązania się rybosomów (RBS) w mRNA, co w konsekwencji powoduje zahamowanie translacji. W przypadku niektórych mRNA, struktura drugorzędowa końca 5' rejonu niepodlegającego translacji (UTR) może maskować miejsce wiązania się rybosomów (RBS), przez co może hamować translację, natomiast kompleks uformowany przez Hfq oraz specyficzne sRNA może aktywować translację poprzez umożliwienie ekspozycji RBS transkryptu dla podjednostki 30S rybosomu. W przypadku regulacji na poziomie stabilności transkryptów, białko Hfq może chronić niektóre sRNA przed degradacją, często przeprowadzaną przez RNazę E lub, alternatywnie, Hfq



Ryc. 3. Możliwe scenariusze oddziaływania RNA z białkiem Hfq

Inhibicja translacji (panel A), promocja translacji (panel B), stabilizacja i ochrona sRNA przed degradacją (panel C), indukcja degradacji przez RNazę E (panel D), jak również współdziałanie z polimerazą poliadenylacyjną (PAP) w konsekwencji prowadzące do degradacji RNA z udziałem egzorybonukleazy (EXO) (panel E), (schemat własny, na podstawie [57]).

może indukować degradację sRNA oraz ich docelowych mRNA, przeprowadzaną przez RNazę E. Również indukcja degradacji może odbyć się w interakcji z polimerazą poliadenylacyjną PAP I. W takim przypadku, Hfq może stymulować poliadenylację mRNA poprzez poli(A) polimerazę (PAP), co z kolei uruchamia degradację przez egzorybonukleazę [1, 10, 22, 28, 34, 52].

Przykłady oddziaływań Hfq z RNA:

- (i) interakcja Hfq z mRNA genu *oxyS* w celu negatywnej regulacji translacji podjednostki RpoS polimerazy RNA [61]. OxyS jest małym regulatorowym RNA i pełni rolę w odpowiedzi na stres oksydacyjny, jak również pełni funkcje antymutatorowe.
- (ii) Hfq wiąże się z transkryptem *ompA* (kodującym istotne białko błonowe) oraz jest niezbędne do stabilności tego transkryptu. Na stabilność tę wpływa *micA* – antysensowne RNA (ważny negatywny regulator wielu genów), które wiąże się również do mRNA *ompA* i blokuje wiązanie się rybosomów [50, 59, 60].
- (iii) Hfq jest istotne w ochronie transkryptów przed degradacją stymulowaną przez RNazę E. Do takich transkryptów należą: *ompA* (koduje białko błono-

we), *dsrA* (koduje ważny aktywator syntezy RpoS w fazie stacjonarnej oraz podczas wzrostu w niskich temperaturach), *ryhB* (obniża zapotrzebowanie na żelazo w warunkach jego niedoboru) [29].

Z powodu dużej różnorodności mRNA oraz celów działania sRNA, białko Hfq jest zaangażowane w regulację różnych ścieżek metabolicznych, z których należy wymienić transport cukrów, regulację ekspresji białek błonowych czy innych białek związanych z błoną komórkową, jak również zaangażowanie jest w regulację zmysłu gęstościowego komórki (quorum sensing) [5, 17, 37, 58].

4. Charakterystyka komórek pozbawionych białka Hfq

Z powodu wpływu białka Hfq na regulację licznych procesów komórkowych, mutacja Δhfq charakteryzuje się pleiotropowymi efektami. Wiele szczegółów charakterystyki fenotypowej mutantu *hfq::\Omega* dostarczyła praca Tsui i wsp. z 1994 roku. W pracy tej użyto mutantu insercyjnego posiadający omega kasetę oporności na kanamycynę oraz dwa silne terminatory Rho-zależne na początku i na końcu kasety znajdującej

się wewnątrz genu *hfq*. Opisane zostało wtedy wiele cech fenotypowych, włączając w to zmianę morfologii komórki, obniżone tempo wzrostu, jak również wrażliwość na substancje zaburzające osmotyczność komórki czy na promieniowanie ultrafioletowe.

Ponadto mutant *hfq::Ω* charakteryzował się wzmocnionym utlenianiem wielu różnych źródeł węgla i azotu. Do związków, których oksydacja była zwiększona w mutancie *hfq::Ω* względem szczepu typu dzikiego, należą: L-arabinoza, N-acetyloglukozamina, D-sacharoza, kwas bursztynowy, D-galaktoza, D-mannoza, D-seryna, D-sorbitol, glicerol, L-fruktoza, D-ksyloza, D-mannitol, D-ryboza, D-fruktoza, α-D-glukoza, D-melobioza, tymidyna, L-asparagina, α-ketoglutaran, α-D-laktoza, urydyna, maltotrioza, kwas cytrynowy, treonina, kwas fumarowy, L-seryna, L-treonina, L-alanina, i inne. Pobudzone utlenianie związków świadczy o ich utylizacji przez komórki – użycia ich jako podstawowego źródła węgla [49].

Zbadano również barwienie się komórek mutantu *Δhfq* odczynnikami DAPI, jednak nie zaobserwowano drastycznych zmian w kompozycji nukleoidu, to znaczy nie zaobserwowano ani jego zwiększonej ilości, ani wyglądu, ani komórek jego pozbawionych. Jednak, co interesujące, opisano wtedy wpływ mutacji *Δhfq* na obniżenie superzwinięcia plazmidowego DNA w fazie stacjonarnej hodowli bakteryjnej [49].

Opisano również wpływ mutacji *hfq::Ω* na formowanie się łyśinek bakteriofaga lambda. Zaobserwowano, iż mutant *hfq::Ω* nie podtrzymuje rozwoju bakteriofaga λcIts857 w temperaturze 30°C, jednakże zaobserwowano formowanie się łyśinek fagowych bakteriofaga λvir, zarówno w temperaturze 30°C, jak i 42°C. Sugerowało to, iż białko Hfq może być potrzebne albo do adsorpcji cząstek bakteriofaga do powierzchni komórki albo do jego rozwoju litycznego [49].

W roku 2007 została opublikowana praca, w której opisano analizę pokazującą zmiany w transkryptomie bakterii pozbawionych funkcjonalnego białka Hfq w odniesieniu do szczepu typu dzikiego [18]. Analiza ta pozwoliła po części scharakteryzować wpływ mutacji w genie *hfq* na procesy wewnątrzkomórkowe, a przynajmniej opisać, w jakie procesy zaangażowane są geny, których poziom ekspresji uległ zmianie pod wpływem braku białka Hfq. Eksperyment ten wykonany został przy użyciu optycznych, dwubarwnych mikromacierzy DNA, a samą analizę poprzedzało pobieranie prób z hodowli bakterii będących w środkowej fazie logarytmicznego wzrostu ($OD_{450} = 0,3$), hodowanych w suplementowanej pożywce minimalnej M9 [18]. Zaobserwowano małe (lecz statystycznie istotne) zmiany w ekspresji 269 genów, jednak dalszej analizie poddano tylko te, których ekspresja uległa większej zmianie niż 1,5 raza względem kontroli. W ten sposób opisano i pogrupowano procesy regulowane przez białko Hfq.

Należą do nich:

- (i) Pobieranie przez komórkę aminokwasów oraz ich biosynteza. Zaobserwowano zmienioną ekspresję genów kodujących enzymy szlaków biosyntez kilku aminokwasów oraz stymulację ekspresji genów związanych z transportem aminokwasów oraz peptydów.
- (ii) Transport cukrów oraz ich metabolizm. Większość białek transportujących, których ekspresja uległa obniżeniu w mutancie *Δhfq*, zaangażowanych jest w pobór cukrów – zarówno tych z systemu fosfotransferazowego (np. egzogenne heksozy), jak i spoza niego (np.: maltoza, maltodekstryna). Dodatkowo geny, których ekspresja uległa obniżeniu w mutancie *Δhfq* należą do szlaków glikolizy, fermentacji kwasowej czy syntezy etanolu lub N-acetylo-D-glukozaminy.
- (iii) Metabolizm energetyczny komórki. Zaobserwowano obniżoną ekspresję genów zaangażowanych w łańcuch oddechowy (kodujących takie białka jak: dehydrogenaza mrówczanowa czy niektóre podjednostki syntetazy ATP [18]).

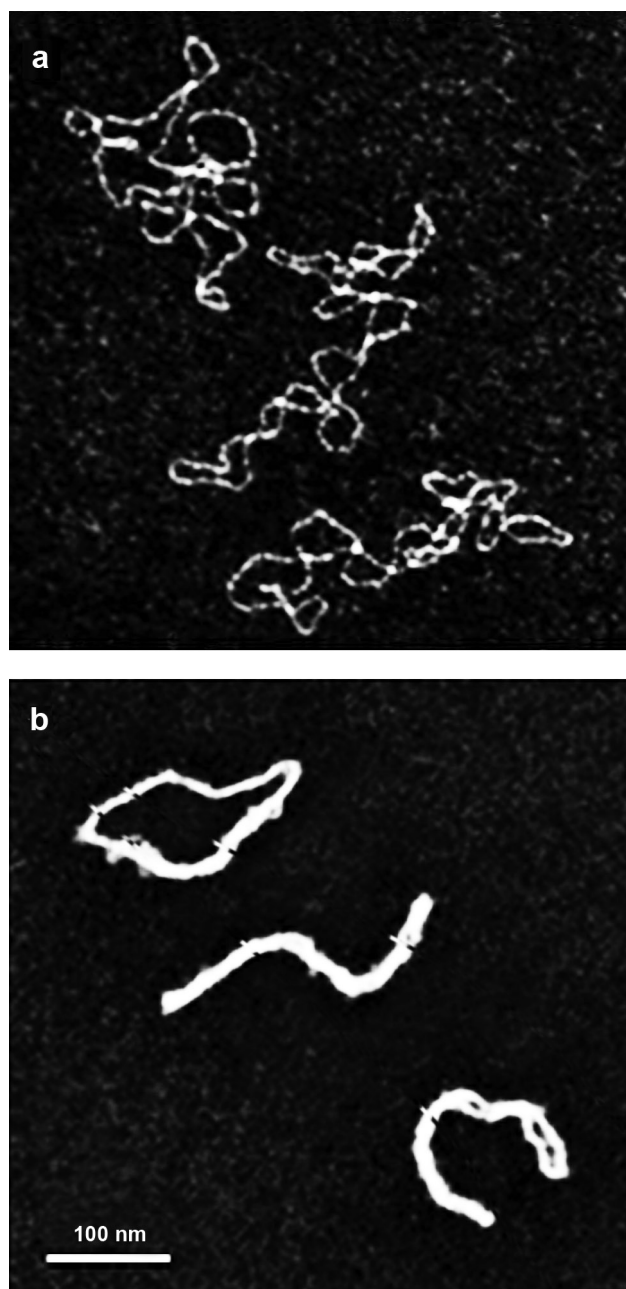
Hfq reguluje również aktywność podjednostki σ^E polimerazy RNA, odpowiedzialnej za ekspresję genów przystosowujących bakterie do ekstremalnego szoku cieplnego oraz stresu otoczeki. Poziom mRNA genu *rpoE* jest podwyższony w mutancie *hfq*, co wpływa na kilka elementów regulonu σ^E , jednak jest to zależne od fazy wzrostu bakterii [18].

Białko Hfq reguluje również aktywność podjednostki σ^{32} , odpowiedzialnej za ekspresję genów związanych z odpowiedzią komórki na szok cieplny. Jednakże regulacja ta zachodzi nie poprzez obniżenie poziomu mRNA tej podjednostki, a poprzez wpływ na dwa białka opiekuńcze GroEL oraz DnaKJ, które regulują aktywność σ^{32} . W mutancie *hfq* zaobserwowano obniżony poziom zarówno białka GroEL, jak i jego mRNA. Jednak w przypadku białka DnaK zaobserwowano wzmoczoną jego syntezę przy jednoczesnym niskim poziomie transkryptu. Sugeruje to bardziej złożony mechanizm działania tego białka opiekuńczego [18].

Liczne badania pokazują, jak brak funkcjonalnego Hfq wpływa na komórkę bakteryjną, przejawiając zmiany zarówno na poziomie transkryptomu jak i przekładając się na zmieniony fenotyp komórek. Pomimo ponad czterech dekad badań nad rolą i właściwościami białka Hfq, obraz jest ten ciągle jest niekompletny, choć wydaje się on złożony.

5. Interakcje białka Hfq oraz DNA

Już we wczesnych doniesieniach opisano biochemiczną charakterystykę białka Hfq wskazującą na wysoką termostabilność białka oraz silne powinowac-



Ryc. 4. Wiązanie się Hfq do DNA

Zdjęcia wykonane z użyciem transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM), superzwinęte plazmidy pBR322 (panel A) oraz te same plazmidy po krótkiej inkubacji (5 min) z białkiem Hfq (stosunek masowy 1:2) (panel B). Zdjęcia pokazują zdolność Hfq do tworzenia mostkowania segmentów DNA [18].

two do kwasów nukleinowych. Nawet jeżeli białko Hfq wydaje się preferować wiązanie się do RNA, wykazuje ono też znaczne powinowactwo do DNA (Ryc. 4). Te biofizyczne właściwości białka Hfq potwierdzone zostały w różnych doniesieniach na przestrzeni lat [4, 13, 16, 32, 51].

Możliwość wiązania się Hfq do DNA *in vitro* została szczegółowo zbadana przez Geinguenauda i współpracowników. Przy użyciu między innymi spektroskopii fourierowskiej (FTIR) oraz techniki rozpraszania

neutronów (neutron scattering), udało się zaobserwować i potwierdzić częściowe rozplatanie się podwójnej nici DNA bogatej w reszty adeniny oraz tyminy, które stymulowane było przez wiązanie się białka Hfq. Jest to o tyle interesujące, iż jest zbieżne z generalną zawartością nukleotydową sekwencji promotorowych. Otworzyło to drogę do spekulacji na temat regulatorowej roli Hfq.

Zmierzono stałą równowagi dysocjacji (K_d) kompleksu Hfq:DNA przy użyciu fluorescencji anizotropowej. Dla kompleksów utworzonych z Hfq oraz DNA bogatego w powtórzenia adeninowe (dA_{20}), stała dysocjacji wynosiła $K_d = 180 \pm 22$ nM, natomiast dla kompleksów utworzonych z Hfq oraz dupleksów adenino-tyminowych ($dA_{20}-dT_{20}$), stała dysocjacji wynosiła $K_d = 250 \pm 14$ nM. Nie udało się natomiast zmierzyć, przy użyciu tej techniki, stałej dysocjacji dla kompleksów Hfq oraz DNA bogatego w cytozynę czy też dupleksy cytozynowo-guaninowe (dC_{20} , $dC_{20}-dG_{20}$). Co ciekawe, pomimo silnego powinowactwa do sekwencji DNA bogatych w adeninę, w przypadku dużego stężenia Hfq względem DNA, wiąże się ono niespecyficycznie do DNA. Potwierdziły to obserwacje, z użyciem transmisyjnej mikroskopii elektronowej, plazmidów inkubowanych wcześniej z różną ilością molową białka Hfq [16]. Wydaje się również, iż takie wiązanie się Hfq wymaga specyficznej lokalnej architektury DNA.

Zarówno część dystalna jak i C-terminalna domena białka Hfq, biorą czynny udział w interakcjach tego białka z DNA. Badania pokazały, iż zarówno delecja 37 reszt aminokwasowych domeny C-terminalnej, jak i dwie mutacje punktowe (K31A oraz Y25A), powodują całkowitą utratę zdolności wiązania się białka Hfq do DNA. Efekt wywołany przez te mutacje jest dokładnie taki sam, jak delecja całego rejonu C-terminalnego. Postuluje się, iż C-terminalna część białka może kotwiczyć całe białko do DNA, natomiast reszty aminokwasowe w pozycji K31 oraz Y25 zapewniają powstawanie wiązań wodorowych niezbędnych do interakcji białka z DNA. Co interesujące, mutacja punktowa w pozycji R16A, która zlokalizowana jest na samej krawędzi białka, powoduje również całkowitą utratę właściwości wiązania się Hfq do DNA, natomiast mutacja R17A jedynie nieco zmienia sposób formowania się kompleksu Hfq-DNA. W związku z powyższym, strona boczna białka jest również postulowana jako element ważny dla wiązania się Hfq do DNA [51].

Updegrave i wsp. w trakcie oczyszczania białka Hfq natknęli się na fragmenty kwasów nukleinowych, które zostały zidentyfikowane jako fragmenty DNA. Fragmenty te cechowała helikalna, skręcona osiowo topologia [51]. Potwierdziło to wcześnie doniesienia o silniejszym wiązaniu się Hfq do DNA o skręconej, zakrzywionej konformacji [4]. Jednakże niezwykle

ciekawym okazał się fakt, iż wyizolowane fragmenty były segmentami genów kodujących głównie białka błonowe (białka transportujące, symporty, antyporty, pompy aktywnego usuwania czy białka kanałowe) – 65% zidentyfikowanych sekwencji. Jest to dość niezwykle jak na, mimo wszystko, niespecyficzne wiązanie się DNA do Hfq. Udało się również zidentyfikować wspólną sekwencję, z pomocą której fragmenty DNA wiązały się do Hfq – był to motyw (A/T)T(A/G)TGCCG [4]. Motyw ten różni się od opisywanych przez Geinguenauda i wsp. sekwencji bogatych w powtórzenia adeninowe [16]. Geny zidentyfikowane wśród wyizolowanych fragmentów DNA nie kodowały żadnego mRNA podlegającego Hfq-zależnej regulacji, nie flankowały również rejonów międzygenowych kodujących regulatorowe sRNA. Jednakże, kiedy sekwencja genomu *E. coli* została przeszukana pod kątem wyżej wymienionego motywu, okazało się, iż odnaleziono dokładnie 924 miejsca występowania tego motywu, a więc miejsca wiązania się białka Hfq do chromosomu bakteryjnego. Zapewne w przypadku przeszukania chromosomu pod kątem motywu o mniejszej konserwatywności, liczba znalezionych miejsc wiązania byłaby jeszcze większa [51]. Szacuje się, iż jeżeli tylko jedna cząsteczka heksamery białka Hfq przypadłaby na jedną sekwencję motywu, to około 15% całej komórkowej puli białka Hfq znalazłoby się w obrębie nukleoidu. Wyniki te potwierdziły wcześniejsze doniesienia, iż pewna frakcja białka Hfq (10–20%) związana jest z chromosomem bakteryjnym [24].

Jest to zbieżne z innymi badaniami, które opisywały białko Hfq jako jedno z 12 najliczniej reprezentowanych białek w nukleoidzie bakterii *Escherichia coli*, a jego udział procentowy szacowany był na około 25% wszystkich białek związanych z nukleoidem bakteryjnym w stacjonarnej fazie wzrostu [47]. Ilość tego białka w nukleoidzie jest porównywalna z innymi charakterystycznymi białkami nukleoidu, takimi jak Fis czy HU. W związku z tym, białko Hfq jest obecnie opisywane również jako jedno z białek organizujących nukleoid bakteryjny oraz jako białko współdziałające z innymi białkami nukleoidu. Obok wyżej wspomnianych białek Fis oraz HU, wymieniane są białka: IHF, H-NS, czy StpA [32]. W fazie logarytmicznego wzrostu struktura nukleoidu opisywana jest jako chromatyna o średnicy od 30 do 80 nm. Ta sama chromatyna ulega znaczącej kondensacji po wejściu komórek w fazę stacjonarną [32]. Wiele badań *in vitro* pokazało, iż chromosomalne białka, takie jak HU, IHF, H-NS, StpA, Fis, oraz Hfq, w różny sposób wiążą się z cząsteczkami DNA [11, 32, 35, 44–46]. Jednakże nie do końca poznany jest mechanizm ich współdziałania *in vivo*. Badania organizacji nukleoidu z użyciem mikroskopii sił atomowych wykazały, iż chromosomy bakteryjne, selektywnie pozbawiane wyżej wymienionych białek, wykazywały

zróżnicowanie grubości chromatyny w uwalnianym nukleoidzie. Wyizolowany ze szczepu typu dzikiego nukleoid składa się w ponad 10% z populacji cienkich nici chromatynowych (definiowanych jako nici o grubości od 5 nm do 20 nm) oraz zawiera mniej więcej tyle samo nici grubych (powyżej 70 nm). Natomiast największą część populacji (powyżej 70%), stanowią intermediały o grubości od 20 nm do 70 nm. Efekty delekcji niektórych spośród wspomnianych białek powodowały zwiększenie częstości występowania grubszych nici, podczas gdy innych powodowały częstsze formowanie się nici cienkich. W przypadku mutantu Δhfq zaobserwowano zarówno zwiększenie populacji nici cienkich (powyżej 20%) jak i grubych (ok. 20%). Jednakże żadna pojedyncza mutacja nie spowodowała istotnego statystycznie wzrostu częstości pojawiania się nici najcieńszych, definiowanych jako te poniżej 5 nm średnicy. Została postawiona hipoteza, iż żadne z wyżej wymienionych białek nie jest konieczne do formowania się chromatyny z nagiego DNA do struktur wyższego rzędu. Badania te pokazały, iż formą podstawową chromatyny jest chromatyna o średnicy 10 nm a wyizolowany chromosom poddany traktowaniu RNazą A przekształca się właśnie w chromatynę o średnicy 10 nm. Do jej formowania się niezbędne są wprawdzie różne białka oraz proces superzwinięcia DNA, jednak nie są niezbędne białka HU, IHF, H-NS, StpA, Fis czy Hfq, zaś efekt braku któregośkolwiek z nich jest kompensowany przez pozostałe białka [32].

W 2015 roku ukazała się praca, w której bliżej przyjrano się problemowi wiązania się Hfq do DNA oraz jego roli w konformacji oraz upakowaniu DNA [23]. W pracy tej wykorzystano wiele zaawansowanych technik, w tym użycie nanofluidów w kwazi-jednowymiarowych kanałach w połączeniu z mikroskopią fluorescencyjną czy technika omiatania neutronami o niskich kątach (SANS, Small Angle Neutron Scattering). Za pomocą pierwszej z tych technik udało się zaobserwować i zmierzyć kondensację DNA pod wpływem różnych czynników, a w szczególności białka Hfq. Z kolei technika omiatania neutronami umożliwiła szczegółowe zobrazowanie oddziaływania cząsteczek DNA oraz C-terminalnej domeny białka Hfq. Zaobserwowano, iż Hfq posiada zdolności do łączenia segmentów DNA, co prowadzi do upakowania DNA, a finalnie skutkuje raptownym przejściem do stanu skondensowanego DNA. Jednakże dzieje się tak dopiero po przekroczeniu pewnej wartości progowej w stężeniu białka Hfq względem DNA. Zasadnicze znaczenie w tej kondensacji DNA mają interakcje pomiędzy segmentami DNA kontrolowane zarówno poprzez oddziaływania elektrostatyczne, jak i sam układ segmentów [23]. Wyniki te eksponują rolę białka Hfq w organizacji architektury nukleoidu i bardziej bezpośredni wpływ na regulację ekspresji genów. Z kolei wyniki doświad-

czeń omiatania neutronami wykazały, iż heksamer białka Hfq nie jest sztywno zakotwiczony a raczej jest luźno związany w odległości około 5 nm od helikalnej osi dupleksu nukleoproteinowego. Obecnie rozważany model zakłada, iż C-terminalna część białka Hfq wiąże się z sekwencjami bogatymi w powtórzenia AT. Wymaga to jednak częściowego otwarcia się dupleksu, co z kolei skutkuje skróceniem się (pozornym, bo tylko w obrysie) cząsteczki DNA. Kiedy już heksamer Hfq przyłączy się jedną z C-terminalnych domen do DNA, może przyłączyć kolejne segmenty DNA do pozostałych domen C-terminalnych – w ten sposób właśnie tworzy się „mostkowanie” DNA w konsekwencji prowadzące do raptownego przejścia DNA w stan skondensowany [23].

Interakcje białka Hfq z DNA otworzyły nowy rozdział w rozważaniach na temat roli tego białka w regulacji replikacji DNA. Rola ta została wyeksponowana jak do tej pory jedynie jednym doniesieniem naukowym, gdzie użyto jako modelu replikacji różnych replikonów plazmidowych. W mutancie Δhfq zbadano wydajność replikacji plazmidów ColE1 podobnych (pMB1 oraz p15A) jak również pochodnej bakteriofaga λ – plazmidu pKBamp. W przypadku komórek pozbawionych białka Hfq, w porównaniu do szczepu typu dzikiego, zaobserwowano wydajniejszą syntezę DNA plazmidów ColE1 – podobnych. Tę wydajniejszą syntezę zaobserwowano pod koniec fazy logarytmicznego wzrostu i na początku fazy stacjonarnej. Jest to zbieżne z fizjologicznym wzrostem stężenia białka Hfq w komórkach szczepu typu dzikiego [9]. Co interesujące, nie zaobserwowano efektu wzmożonej replikacji dla plazmidu będącego pochodną faga λ . Ponieważ regulacja replikacji plazmidów ColE1 wymaga specyficznych oddziaływań na poziomie RNA, wydaje się, iż brak głównego białka opiekuńczego RNA może zaburzać proces tej regulacji, prowadząc do stymulacji replikacji DNA [9]. Jednak biorąc pod uwagę iż brak białka Hfq wywołuje w komórce liczne efekty pleiotropowe, może być to tylko jeden z możliwych scenariuszy działania białka Hfq.

Oprócz wymienionych powyżej bezpośrednich i pośrednich oddziaływań białka Hfq z DNA oraz ich skutków, zaobserwowane zostały również inne efekty pośrednie działania białka Hfq na procesy związane z DNA. Do takich należy zaliczyć rolę białka Hfq w procesie regulacji transpozycji. Badania wykazały, iż Hfq negatywnie reguluje transpozycję transpozonu *Tn10* poprzez inhibicję transpozazy IS50 na post-transkrypcyjnym poziomie. Zaobserwowano również silną supresję procesu transpozycji dla transpozonu *Tn5*, jednak w tym przypadku regulacja odbywa się na poziomie zahamowania transkrypcji transpozazy IS50. Zidentyfikowano, iż czynnikiem pośredniczącym w tej regulacji jest Crp, białko receptora cyklicznego AMP [38, 39].

6. Podsumowanie

Białko Hfq jest jednym z kluczowych ryboregulatorów, którego działania w dużej mierze polegają na umożliwianiu interakcji pomiędzy sRNA a mRNA, jak również na udziale w procesach degradacji i stabilizacji transkryptów. Strukturalnie białko to jest homoheksamerem o strukturze pierścienia. W jego budowie można wyróżnić dwie strony, stronę proksymalną i dystalną, które są odpowiedzialne za wiązanie się białka Hfq z kwasami nukleinowymi. Choć zdecydowanie silniej oddziałuje z RNA, wykazano również, iż wiąże się ono z DNA. Możliwość wiązania się Hfq do DNA została szczegółowo zbadana i udało się zaobserwować częściowe rozplatanie się podwójnej nici DNA bogatej w reszty adeniny oraz tyminy, które stymulowane było przez wiązanie się białka Hfq. Inne badania wykazały wspólny motyw sekwencji dla fragmentów DNA oczyszczonych razem z białkiem Hfq. Co ciekawe, stwierdzono również, iż w przypadku dużego stężenia Hfq, wiąże się ono niespecyficycznie do DNA. Wydaje się również, iż takie wiązanie się Hfq wymaga specyficznej lokalnej architektury DNA. Właściwości te mogą wynikać z udziału białka Hfq w organizacji nukleoidu, co otwiera nową drogę do spekulacji na temat potencjalnej roli białka Hfq w regulacji replikacji DNA.

Ponieważ białko Hfq wpływa na wiele procesów komórkowych, efekty delekcji genu kodującego to białko mają charakter pleiotropowy. Dlatego, kolejne lata badań dostarczają wielu nowych informacji na temat tego wydawałoby się dobrze poznanego ryboregulatora.

Podziękowania

Sfinansowano ze środków Narodowego Centrum Nauki, z grantu nr 2017/24/C/NZ1/00456 (GMC).

Piśmiennictwo

1. Aiba H.: Mechanism of RNA silencing by Hfq-binding small RNAs. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**, 134–139 (2007)
2. Arluison V., Folichon M., Marco S., Derreumaux P., Pellegrini O., Seguin J., Hajnsdorf E., Regnier P.: The C-terminal domain of *Escherichia coli* Hfq increases the stability of the hexamer. *Eur. J. Biochem.* **271**, 1258–1265 (2004)
3. Arluison V., Mura C., Guzmán M.R., Liquier J., Pellegrini O., Gingery M., Régnier P., Marco S.: Three-dimensional structures of fibrillar Sm proteins: Hfq and other Sm-like proteins. *J. Mol. Biol.* **356**, 86–96 (2006)
4. Azam T.A., Ishihama A.: Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli*. Sequence recognition specificity and DNA binding affinity. *J. Biol. Chem.* **274**, 33105–33113 (1999)
5. Bardill J.P., Zhao X., Hammer B.K.: The *Vibrio cholerae* quorum sensing response is mediated by Hfq-dependent sRNA/mRNA base pairing interactions. *Mol. Microbiol.* **80**, 1381–1394 (2011)
6. Bi E.F., Lutkenhaus J.: FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature*, **354**, 161–4 (1991)

7. Brennan R.G., Link T.M.: Hfq structure, function and ligand binding. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**, 125–133 (2007)
8. Carmichael G.G., Weber K., Niveleau A., Wahba A.J.: The host factor required for RNA phage Q beta RNA replication *in vitro*. Intracellular location, quantitation, and purification by polyadenylate-cellulose chromatography. *J. Biol. Chem.* **250**, 3607–3612 (1975)
9. Cech G.M., Pakula B., Kamrowska D., Wegrzyn G., Arluison V., Szalewska-Palasz A.: Hfq protein deficiency in *Escherichia coli* affects ColE1-like but not lambda plasmid DNA replication. *Plasmid*, **73**, 10–15 (2014)
10. Chao Y., Vogel J.: The role of Hfq in bacterial pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 24–33 (2010)
11. Dame R.T., Noom M.C., Wuite G.J.L.: Bacterial chromatin organization by H-NS protein unravelled using dual DNA manipulation. *Nature*, **444**, 387–390 (2006)
12. de Haseth P. L., Uhlenbeck O. C.: Interaction of *Escherichia coli* host factor protein with oligoriboadenylates. *Biochemistry*, **19**, 6138–6146 (1980)
13. Diestra E., Cayrol B., Arluison V., Risco C.: Cellular electron microscopy imaging reveals the localization of the *hfq* protein close to the bacterial membrane. *Plos One*, **4**, (2009)
14. Fortas E., Piccirilli F., Malabirade A., Militello V., Trépout S., Marco S., Taghbalout A., Arluison V.: New insight into the structure and function of Hfq C-terminus. *Biosci. Rep.* **35**, 1–9 (2015)
15. Franze de Fernandez M.T., Hayward W.S., August J.T.: Bacterial proteins required for replication of phage Q ribonucleic acid. Purification and properties of host factor I, a ribonucleic acid-binding protein. *J. Biol. Chem.* **247**, 824–831 (1972)
16. Geinguenaud F., Calandrini V., Teixeira J., Mayer C., Liquier J., Lavelle C., Arluison V.: Conformational transition of DNA bound to Hfq probed by infrared spectroscopy. *Phys. Chem.* **13**, 1222–1229 (2011)
17. Guillier M., Gottesman S., Storz G.: Modulating the outer membrane with small RNAs. *Gene. Dev.* **20**, 2338–2348 (2006)
18. Guisbert E., Rhodius V.A., Ahuja N., Witkin E., Gross C.A.: Hfq modulates the sigmaE-mediated envelope stress response and the sigma32-mediated cytoplasmic stress response in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **189**, 1963–1973 (2007)
19. Hermann H., Fabrizio P., Raker V.A., Foulaki K., Hornig H., Brahm H., Luhrmann R.: snRNP Sm proteins share two evolutionarily conserved sequence motifs which are involved in Sm protein-protein interactions. *EMBO J.* **14**, 2076–2088 (1995)
20. Holmqvist E., Wright P. R., Li L., Bischler T., Barquist L., Reinhardt R., Vogel J.: Global RNA recognition patterns of post-transcriptional regulators Hfq and CsrA revealed by UV cross-linking *in vivo*. *EMBO J.* **35**(9), 991–1011. (2016)
21. Hori K., Yanazaki Y.: Nucleotide sequence specific interaction of host factor I with bacteriophage Q beta RNA. *FEBS Lett.* **43**, 20–22 (1974)
22. Ikeda Y., Yagi M., Morita T., Aiba H.: Hfq binding at RhlB-recognition region of RNase E is crucial for the rapid degradation of target mRNAs mediated by sRNAs in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **79**, 419–432 (2011)
23. Jiang K., Zhang C., Guttula D., Liu F., van Kan J. A., Lavelle C., Kubiak K., Malabirade A., Lapp A., Arluison V., van der Maarel J.R.C.: Effects of Hfq on the conformation and compaction of DNA. *Nucleic Acids Res.* **43**, 4332–4341 (2015)
24. Kajitani M., Kato A., Wada A., Inokuchi Y., Ishihama A.: Regulation of the *Escherichia coli hfq* gene encoding the host factor for phage Q beta. *J. Bacteriol.* **176**, 531–534 (1994)
25. Link T.M., Valentin-Hansen P., Brennan R.G.: Structure of *Escherichia coli* Hfq bound to polyriboadenylate RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 19292–19297 (2009)
26. Lu F., Taghbalout A.: Membrane association via an amino-terminal amphipathic helix is required for the cellular organization and function of RNase II. *J. Biol. Chem.* **288**, 7241–7251 (2013)
27. Melamed S., Peer A., Faigenbaum-Romm R., Gatt Y.E., Reiss N., Bar A., Margalit, H.: Global Mapping of Small RNA-Target Interactions in Bacteria. *Molecular Cell*, **63**(5), 884–897 (2016)
28. Mohanty B.K., Maples V.F., Kushner S.R.: The Sm-like protein Hfq regulates polyadenylation dependent mRNA decay in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **54**, 905–920 (2004)
29. Moll I., Afonyushkin T., Vytvytska O., Kaberdin V. R., Blasi U.: Coincident Hfq binding and RNase E cleavage sites on mRNA and small regulatory RNAs. *RNA*, **9**, 1308–1314 (2003)
30. Muffler A., Fischer D., Hengge-Aronis R.: The RNA-binding protein HF-I, known as a host factor for phage Qbeta RNA replication, is essential for rpoS translation in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **10**, 1143–1151 (1996)
31. Mura C., Randolph P.S., Patterson J., Cozen A.E.: Archaeal and eukaryotic homologs of Hfq: A structural and evolutionary perspective on Sm function. *RNA Biol.* **10**, 636–651 (2013)
32. Ohniwa R.L., Muchaku H., Saito S., Wada C., Morikawa K.: Atomic force microscopy analysis of the role of major DNA-binding proteins in organization of the nucleoid in *Escherichia coli*. *Plos One*, **8**, e72954 (2013)
33. Olejniczak M.: Despite similar binding to the Hfq protein regulatory RNAs widely differ in their competition performance. *Biochemistry* **50**, 4427–4440 (2011)
34. Papenfort K., Vogel J.: Regulatory RNA in bacterial pathogens. *Cell Host Microbe*, **8**, 116–127 (2010)
35. Paull T.T., Haykinson M.J., Johnson R.C.: The nonspecific DNA-binding and -bending proteins HMG1 and HMG2 promote the assembly of complex nucleoprotein structures. *Genes Dev.* **7**, 1521–1534 (1993)
36. Ramos C.G., Sousa S.A., Grilo A.M., Feliciano J.R., Leitao J.H.: The second RNA chaperone, Hfq2, is also required for survival under stress and full virulence of *Burkholderia cenocepacia* J2315. *J. Bacteriol.* **193**, 1515–1526 (2011)
37. Rice J.B., Vanderpool C.K.: The small RNA SgrS controls sugar-phosphate accumulation by regulating multiple PTS genes. *Nucleic Acids Res.* **39**, 3806–3819 (2011)
38. Ross J.A., Ellis M.J., Hossain S., Haniford D.B.: Hfq restructures RNA-IN and RNA-OUT and facilitates antisense pairing in the Tn10/IS10 system. *RNA*, **19**, 670–684 (2013)
39. Ross J.A., Trussler R.S., Black M.D., McLellan C.R., Haniford D.B.: Tn5 transposition in *Escherichia coli* is repressed by Hfq and activated by over-expression of the small non-coding RNA SgrS. *Mob. DNA*, **5**, 27 (2014)
40. Santiago-Frangos A., Jeliazkov J.R., Gray J.J., Woodson S.A.: Acidic C-terminal domains autoregulate the RNA chaperone Hfq. *eLife*, **6**, e27049 (2017)
41. Sauer E., Schmidt S., Weichenrieder O.: Small RNA binding to the lateral surface of Hfq hexamers and structural rearrangements upon mRNA target recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 9396–9401 (2012)
42. Schu D.J., Zhang A., Gottesman S., Storz G.: Alternative Hfq-sRNA interaction modes dictate alternative mRNA recognition. *EMBO J.* **34** (20), 2557–2573 (2015)
43. Senear A.W., Steitz J.A.: Site-specific interaction of Q beta host factor and ribosomal protein S1 with Q beta and R17 bacteriophage RNAs. *J. Biol. Chem.* **251**, 1902–1912 (1976)
44. Skoko D., Yan J., Johnson R.C., Marko J.F.: Low-force DNA condensation and discontinuous high-force decondensation reveal a loop-stabilizing function of the protein Fis. *Phys. Rev. Lett.* **95**, 208101 (2005)
45. Sonnenfield J.M., Burns C.M., Higgins C.F., Hinton J.C.: The nucleoid-associated protein StpA binds curved DNA, has a gre-

- ater DNA-binding affinity than H-NS and is present in significant levels in *hns* mutants. *Biochimie*, **83**, 243–249 (2001)
46. Swinger K.K., Rice P.A.: IHF and HU: Flexible architects of bent DNA. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**, 28–35 (2004)
 47. Talukder A., Ishihama A.: Growth phase dependent changes in the structure and protein composition of nucleoid in *Escherichia coli*. *Sci. China Life Sci.* **58**, 902–911 (2015)
 48. Tsui H.C., Feng G., Winkler M.E.: Negative regulation of *mutS* and *mutH* repair gene expression by the Hfq and RpoS global regulators of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **179**, 7476–7487 (1997)
 49. Tsui H.C., Leung H.C., Winkler M.E.: Characterization of broadly pleiotropic phenotypes caused by an *hfq* insertion mutation in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* **13**, 35–49 (1994)
 50. Udekwi K.I., Darfeuille F., Vogel J., Reimegård J., Holmqvist E., Wagner E.G.H.: Hfq-dependent regulation of OmpA synthesis is mediated by an antisense RNA. *Gene. Dev.* **19**, 2355–2366 (2005)
 51. Updegrove T.B., Correia J.J., Galletto R., Bujalowski W., Wartell R.M.: *E. coli* DNA associated with isolated Hfq interacts with Hfq's distal surface and C-terminal domain. *Biochim. Biophys. Acta*, **1799**, 588–596 (2010)
 52. Valentin-Hansen P., Eriksen M., Udesen C.: The bacterial Sm-like protein Hfq: A key player in RNA transactions. *Mol. Microbiol.* **51**, 1525–1533 (2004)
 53. Vassilieva I.M., Nikulin A.D., Blasi U., Moll I., Garber M.B.: Crystallization of Hfq protein: a bacterial gene-expression regulator. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **59**, 1061–1063 (2003)
 54. Vassilieva I.M., Rouzanov M.V., Zelinskaya N.V., Moll I., Blasi U., Garber M.B.: Cloning, purification, and crystallization of a bacterial gene expression regulator – Hfq protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **67**, 1293–1297 (2002)
 55. Vaughan S., Wickstead B., Gull K., Addinall S.G.: Molecular evolution of FtsZ protein sequences encoded within the genomes of archaea, bacteria, and eukaryota. *J. Mol. Evol.* **58**, 19–29 (2004)
 56. Vecerek B., Beich-Frandsen M., Resch A., Blasi U.: Translational activation of *rpoS* mRNA by the non-coding RNA DsrA and Hfq does not require ribosome binding. *Nucleic Acids Res.* **38**, 1284–1293 (2010)
 57. Vogel J., Luisi B.F.: Hfq and its constellation of RNA. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 578–589 (2011)
 58. Vogt S.L., Raivio T.L.: Hfq reduces envelope stress by controlling expression of envelope-localized proteins and protein complexes in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **92**, 681–697 (2014)
 59. Vytvytska O., Jakobsen J.S., Balcunaite G., Andersen J.S., Baccharini M., von Gabain A.: Host factor I, Hfq, binds to *Escherichia coli ompA* mRNA in a growth rate-dependent fashion and regulates its stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 14118–14123 (1998)
 60. Vytvytska O., Moll I., Kabardin V.R., Von Gabain A., Bläsi U.: Hfq (HF1) stimulates *ompA* mRNA decay by interfering with ribosome binding. *Gen. Dev.* **14**, 1109–1118 (2000)
 61. Zhang A., Altuvia S., Tiwari A., Argaman L., Hengge-Aronis R., Storz G.: The OxyS regulatory RNA represses *rpoS* translation and binds the Hfq (HF-I) protein. *EMBO J.* **17**, 6061–6068 (1998)