

Warszawa, 4 maja 2026

dr hab. Małgorzata Cieśla
Instytut Biochemii i Biofizyki
Polskiej Akademii Nauk
Pracownia Transkrypcji tRNA

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr Marii Danuty Mamońskiej zatytułowanej
„Kompetycja pomiędzy białkami wiążącymi cząsteczki RNA u *Escherichia coli*”

Praca doktorska Pani mgr Marii Danuty Mamońskiej została wykonana pod opieką Prof. dr hab. Mikołaja Olejniczaka w Pracowni Biochemii RNA na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Tematyka rozprawy doktorskiej dotyczy oddziaływań między białkami a cząsteczkami RNA u bakterii *E. coli*. Celem badań było poznanie molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za selektywne wiązanie cząsteczek RNA przez określone białka, a także zależności pomiędzy białkami w wiązaniu RNA.

Część badań opisanych w rozprawie doktorskiej została opublikowana w międzynarodowym czasopiśmie naukowym *RNA* w 2025 roku (IF₂₀₂₅ 5.0, 140 pkt. MNISW), gdzie Doktorantka jest pierwszym autorem. Badania przedstawione w rozprawie doktorskiej zostały sfinansowane przez Narodowe Centrum Nauki (grant Preludium Bis) i Narodową Agencję Wymiany Akademickiej (NAWA), która sfinansowała trzymiesięczny staż badawczy Doktorantki w laboratorium prof. Giseli Storz w NIH, USA.

Przedstawione w rozprawie badania są kontynuacją wcześniej prowadzonych prac w zespole Prof. Olejniczaka nad białkami bakteryjnymi takimi jak: Hfq czy ProQ, które przez oddziaływanie z małymi niekodującymi RNA wpływają na stabilność, dostępność czy funkcje RNA, a przez to regulują wiele procesów komórkowych. W recenzowanej pracy Doktorantka podjęła się wyjaśnienia trzech nowych zagadnień badawczych dotyczących oddziaływań: RNA - białko. Pierwsze zagadnienie obejmowało analizę cech sekwencyjnych i strukturalnych RNA, które decydują o jego wiązaniu przez białka bakteryjne. Drugie zagadnienie badawcze miało na celu określenie znaczenia domeny FinO białka

ProQ na zdolność wiązania RNA. Trzecie zagadnienie dotyczyło roli kompetycji i wzajemnych oddziaływań między białkami w wiązaniu RNA.

Ocena redakcyjna rozprawy

Rozprawa doktorska została napisana w języku polskim, ma typowy dla rozpraw doktorskich układ i składa się ze *Streszczenia* w języku polskim i angielskim, *Wstępu*, *Celów pracy*, *Materiałów*, *Metod*, *Wyników*, *Dyskusji*, *Wniosków*, *Spisu skrótów i symboli* oraz *Bibliografii*. Praca liczy łącznie 147 stron, zawiera 34 rysunki i 30 tabel (dwie tabele przedstawione w rozdziale *Wyniki* zostały ponumerowane, reszta tabel z rozdziałów *Materiały*, *Metody* nie posiada numeracji). Rozprawa została napisana w sposób zrozumiały, logiczny, z użyciem odpowiedniej terminologii naukowej i poprawnie pod kątem edytorskim. Dodatkowo, należy podkreślić dużą staranność w przygotowaniu rozprawy, wyniki badań eksperymentalnych zostały przedstawione w sposób czytelny i przejrzysty. Wszystko to sprawia, że pracę czyta się z łatwością i przyjemnością.

Ocena naukowa rozprawy

We *Wstępie* Doktorantka opisała regulatorowe RNA u bakterii, wśród nich małe niekodujące RNA (sRNA), a także białka biorące udział w wiązaniu sRNA, co jest pomocne w zrozumieniu prowadzonych badań. Uważam, że ta część teoretyczna została dobrze napisana, w zwięzły i klarowny sposób, w oparciu o odpowiednie dane literaturowe.

Doktorantka skupiła się na przedstawieniu aktualnego stanu wiedzy na temat bakteryjnych białek wiążących RNA. Ciekawi mnie czy opisane bakteryjne białka wiążące RNA (Hfq, FinO, ProQ) mają homologii u organizmów eukariotycznych? Drugie pytanie dotyczy regionów w tych białkach, które wiążą się do RNA, czy znane są inne niż domena FinO, które umożliwiają wiązanie do RNA?

Cele pracy zostały jasno sformułowane w sześciu punktach i dotyczą trzech uzupełniających się zagadnień badawczych (wymienionych powyżej).

Na podstawie rozdziałów *Materiały*, *Metody* i *Wyniki* chcę podkreślić duże zaangażowanie Doktorantki w prace laboratoryjne. Mgr Mamońska opanowała wiele technik z zakresu inżynierii genetycznej, mikrobiologii czy biologii molekularnej, w tym wiele zaawansowanych metod, np. różnicowa migracja kompleksów w żelu poliakrylamidowym (ang. *Electromobility Shift Assay*, *EMSA*), metoda wyznaczania interakcji białko-RNA za pomocą hydrolizy enzymatycznej (ang. *RNA footprinting*), RIL-seq (ang. *RNA Interaction by Ligation and Sequencing*) czy RIP-seq (ang. *RNA Immunoprecipitation and Sequencing*). Sekwencjonowanie bibliotek i analizy bioinformatyczne wyników zostały wykonane w ramach współpracy z NIH, USA.



Dodatkowo, chcę zwrócić uwagę na duże zdolności manualne Doktorantki w przeprowadzaniu eksperymentów. Przedstawione w rozprawie analizy na żelach poliakrylamidowych (Rys. 10-19, 21, 25-30) były wykonane za każdym razem w sposób nienaganny technicznie. Uważam, że jest to bardzo ważna umiejętność w pracy eksperymentalnej.

Rozdział *Wyniki* został podzielony na trzy podrozdziały zgodnie z zagadnieniami badawczymi, a wyniki przedstawione w pierwszym z nich zostały poddane recenzjom eksperckim przed publikacją w czasopiśmie *RNA*, co ułatwia ocenę merytoryczną tej części rozprawy.

Mam jednak pytanie odnośnie wyników analiz powinowactwa pełnej długości białka ProQ z FinP sRNA, które wykazany ok. 3-krotne osłabienie ich oddziaływania w porównaniu z wiązaniem ProQ z *malM-3'* (na podstawie wartości stałej równowagi dysocjacji K_d , Tabela 1), przy czym maksymalna frakcja związana kompleksu ProQ-*malM-3'* wynosiła 91%, zaś ProQ-FinP 85%. Dlaczego wiązanie między ProQ-FinP jest znacznie osłabione biorąc pod uwagę wartość K_d , a niewiele zmienia się przy określeniu frakcji związanej? Czy wskazuje to na silne i stabilne wiązanie między ProQ-FinP? Proszę o komentarz w kontekście przytoczonych przez Doktorantkę danych literaturowych, cyt. ze strony 69 rozprawy: „Zgodnie z wynikami głębokiego sekwencjonowania RIL-seq oraz CLIP-seq cząsteczka *malM* (*malM-3'*) jest jedną z najważniejszych cząsteczek RNA wiązaną przez białko ProQ (Holmqvist i wsp. 2018; Melamed i wsp. 2020). Natomiast główną cząsteczką wiązaną przez białko FinO u *E. coli* i *S. enterica* jest FinP sRNA (van Biesen i Frost 1994; El Mouali i wsp. 2021).”

W drugiej części *Wyników* Kandydatka przeprowadziła analizę wpływu mutacji w domenie FinO białka ProQ na wiązanie RNA. Przy użyciu metody RIP-seq uzyskała globalne profile wiązania RNA dla pięciu mutantów białka ProQ. Analiza danych ujawniła, że najbardziej wrażliwe na mutacje są RNA z rodziny Sib i dalsze badania były skoncentrowane na ich oddziaływaniu z białkiem ProQ. Moje pytanie dotyczy innych niż Sib RNA, dla których mutacje w domenie FinO również prowadziły do osłabienia wiązania z RNA. Czy można wyodrębnić inne wspólne RNA dla analizowanych mutantów ProQ? Jeśli tak to proszę o charakterystykę tych RNA.

W trzeciej części *Wyników* Doktorantka analizowała kompetycje i wzajemne oddziaływania między białkami ProQ i Hfq w wiązaniu RNA. Przy użyciu metody RIL-seq możliwa była analiza par RNA-RNA oddziałujących z danym białkiem, która ujawniła, że białka te tworzą wzajemnie powiązaną i złożoną sieć regulacyjną. Analizy par RNA z białkiem ProQ czy Hfq częściowo potwierdziły wcześniej opublikowane dane (Melamed i wsp. 2020), ale ujawniły również wiele nowych oddziaływań RNA-RNA. Dlatego proszę Doktorantkę o przedstawienie nowych par RNA, które

wykazują istotne zależności w wiązaniu do białek ProQ i Hfq w odpowiedzi na zmieniające się ich stężenia.

W rozdziale *Dyskusja* Pani Mamońska podsumowała i omówiła uzyskane wyniki badań odnosząc się do danych literaturowych. Doktorantka zaproponowała kolejne eksperymenty, a tym samym kontynuacje badań co wskazuje, że temat oddziaływań RNA-białko u bakterii nie jest wyczerpany. W tym rozdziale zabrakło mi modelu graficznego podsumowującego wyniki badań, który, mam nadzieję, będzie przedstawiony przez Kandydatkę podczas obrony.

Rozprawa kończy się rozdziałem *Wnioski*, które są dobrze sformułowane, zgodnie z postawionymi celami badań. Wnioski są wyważone i dobrze uzasadnione.

Uwagi drobne:

- 1) Brak opisów dość złożonych rysunków 4 i 5, które zawierają tylko tytuł. Opis w tekście nie odzwierciedla szczegółów przedstawionych na nich.
- 2) W tekście rozprawy na str. 70 w pierwszym akapicie opisano, że mutant *malM*-FinP, zawiera trzy nukleotydy zmienione po stronie 5' od terminatora transkrypcji, a na rysunku 10A jest zmieniony tylko jeden nukleotyd. Jaka jest prawda?
- 3) Na rysunku 19 mam wątpliwości co do danych przedstawionych w postaci wykresów słupkowych na panelu C i E. Chodzi o kontrole ProQ i FinO w wiązaniu z FinP-U-U₆ (panel C) lub *malM*-RepX (panel E). Frakcja związana dla kontroli ProQ (panel C) wynosi ok. 0.6 a dla kontroli FinO ok. 0.5, czyli różnica jest niewielka w porównaniu z różnicą obserwowaną na żelu (linia druga i trzecia żelu), biorąc pod uwagę metodę kwantyfikacji opisaną w metodach na str. 54, sekcja 4.6.3. Co ciekawe, wykres słupkowy panelu E przedstawia odwrotne zależności dla kontroli ProQ i FinO w porównaniu do panelu C, choć proporcje na żelu między linią drugą a trzecią na obu panelach są podobne. Uprzejmie proszę o komentarz.
- 4) Drobne błędy redakcyjne: str. 11 jest konkurencji zamiast konkurencja, str. 53 jest różne zamiast różne, jest MultiGauche zamiast Multi Gauge, str. 56 odczynnik Tri zamiast Tris.

Ocena ogólna i wnioski końcowe:

Rozprawa doktorska mgr Marii Mamońskiej stanowi istotny wkład w zrozumienie mechanizmów selektywnego wiązania białek bakteryjnych z sRNA. Wyniki przedstawione w pracy są oryginalne, przekonujące i mają dużą wartość naukową. Zakres prowadzonych badań i jakość uzyskanych wyników wskazują jednoznacznie, że Pani Mamońska jest dobrym naukowcem, zdolnym do samodzielnej pracy naukowej.



W podsumowaniu stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa Pani mgr Marii Mamońskiej spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim opisane w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce* (Dz.U. 2018 poz. 1668 z późn. zmianami) i wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora. Ponadto, ze względu na dużą wartość naukową uzyskanych wyników wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej. Wniosek o wyróżnienie uzasadniam wyjaśnieniem przez Doktorantkę mechanizmu zależności regulacyjnych między białkami w wiązaniu RNA w komórkach *E. coli*. Wyjaśnienie tego złożonego i istotnego biologicznie mechanizmu było możliwe dzięki zastosowaniu różnorodnych i nowoczesnych metod badawczych, a także wnikliwym analizom wyników przeprowadzonych przez Kandydatkę.

Małgorzata Cieśla

dr hab. Małgorzata Cieśla