

Poznań, 28.04.2026 r.

Prof. dr hab. Elżbieta Kierzek
Zakład Genomiki Strukturalnej RNA

Recenzja pracy doktorskiej mgr Marii Danuty Mamońskiej pt. „Kompetycja pomiędzy białkami wiążącymi cząsteczki RNA u *Escherichia coli*”

Przedstawiona do recenzji praca doktorska powstała w Pracowni Biochemii RNA Wydziału Biologii UAM, pod kierunkiem prof. dr hab. Mikołaja Olejniczaka. Praca doktorska ma formę monografii naukowej i jest napisana po polsku. Pod względem formalnym spełnia wszelkie wymagania i zawiera konieczne dla dysertacji rozdziały. Pomocne jest również umieszczenie dorobku doktorantki na końcowych stronach pracy. Część badań została opublikowana, obszerne pozostałe wyniki prawdopodobnie wkrótce zostaną zwieńczone publikacją. Dysertacja napisana jest bardzo czytelnie, zawiera przejrzyste rysunki, które są wyczerpująco opisane. Praktycznie nie zauważyłam literówek, a używane słownictwo prawie nie zawiera żargonu naukowego.

Badania przedstawione w rozprawie doktorskiej plasują się w nurcie badań prowadzonych w zespole badawczym prof. dr hab. Mikołaja Olejniczaka. Dotyczą poznania uwarunkowań prowadzących do selektywnego rozpoznawania cząsteczek RNA przez ProQ i Hfq u *Escherichia coli* oraz określenia czynników wpływających na konkurencję i wzajemne oddziaływanie pomiędzy tymi białkami. Uwagę zwraca systematyczność planowanych i przeprowadzanych badań oraz wykorzystanie wielu technik eksperymentalnych. W postawionych w dysertacji pytaniach kandydatka szukała odpowiedzi zarówno we właściwościach białka, jak i RNA. Dzięki takiemu podejściu uzyskane wyniki poszerzają znacząco wiedzę o potranskrypcyjnej regulacji genów u bakterii, a także są niezwykle ciekawe z ogólnego punktu widzenia.

Pracę doktorską rozpoczyna Streszczenie, następnie są Wstęp i omówienie Celów pracy. Streszczenie jest zwięzłe i klarownie napisane. Szczegóły eksperymentów opisane są w dwóch rozdziałach: Materiały oraz Metody. Wstęp, 19-stronicowy, nie jest obszerny, jednak zawiera najważniejsze informacje wprowadzające w tematykę doktoratu. Cele pracy ujęte są na jednej stronie, a są to aż trzy obszerne tematycznie problemy naukowe. Pierwszy z nich dotyczy określenia cech strukturalnych cząsteczek RNA odpowiedzialnych za rozróżnianie ich wiązania przez białko ProQ lub FinO. Drugi koncentruje się na poznaniu znaczenia domeny FinO białka ProQ dla jego zdolności rozpoznawania RNA w warunkach *in vivo*. Trzeci zakłada określenie roli kompetycji i wzajemnych oddziaływań białka ProQ i Hfq. Te ambitne cele zostały w pełni przez Kandydatkę zrealizowane.

Materiały oraz Metody są wyczerpująco napisane i zawierają niezbędne szczegóły pozwalające odtworzyć przeprowadzone eksperymenty. Do tej części mam kilka pytań, które sformułuję na końcu recenzji.

Rozdział Wyniki to 57 stron opisu przeprowadzonych badań, podzielony na 3 główne podrozdziały korespondujące z trzema celami pracy doktorskiej. Każdy z podrozdziałów zaczyna się obszernym wprowadzeniem nakreślającym umiejscowienie podjętych badań na tle zgromadzonej wiedzy oraz przypomnieniem pytań naukowych jakie stawiała sobie za cel pani mgr Mamońska. Należy podkreślić, że zakres tematyczny pracy doktorskiej, mimo bardzo spójnych celów, jest szeroki i wymagał użycia różnorodnych technik badawczych, dotyczących zarówno RNA, jak i DNA oraz białek w warunkach *in vitro*, *in vivo* oraz *in silico*. Kandydatka poradziła sobie znakomicie, przewyciężając prawdopodobnie wiele trudności, jakie mogły dostarczyć jej obiekty badań. Z powodzeniem otrzymała wiele niezbędnych cząsteczek (konstruktów, zmutowanych RNA, zmutowanych białek), a przedstawione w dysertacji żele są piękne jakościowo i świadczą o dobrym warsztacie pani mgr Mamońskiej. W opisie rezultatów, a także w Dyskusji Kandydatka wyraźnie określa badania jakie wykonała samodzielnie podczas stażu w laboratorium NIH, oraz badania innych osób. Jest to ciekawa część dysertacji, w której widać wysiłek włożony we wprowadzenie nowej techniki do macierzystej grupy badawczej. Trud ten zaowocował interesującymi odkryciami w obszarze biologii wybranych białek, które – zgodnie z naturą nauki – stawiają przed nami kolejne pytania.

Jednym z końcowych rozdziałów jest Dyskusja poprowadzona na 12 stronach pracy doktorskiej. Jest to ciekawy rozdział napisany z polotem, wyczerpujący i jednocześnie zwięzły. Dyskusja podzielona jest na trzy podrozdziały wpisujące się, podobnie jak Rezultaty, w trzy cele badawcze. Kandydatka jasno opisała najważniejsze wyniki, porównując je z wiedzą literaturową i dotychczasowymi ustaleniami o roli wybranych białek. Podoba mi się, że znalazły się w tym rozdziale perspektywy dalszych badań oraz ostrożność w interpretacji. Wszystko to świadczy o dojrzałości naukowej pani mgr Mamońskiej.

W kolejnym rozdziale zatytułowanym Wnioski w sposób dość ogólny i przede wszystkim krótki podsumowane są główne wnioski pracy doktorskiej. Rozdział ten podsumowuje wielowątkowe badania, a szczegółowe wnioski zawarte są wcześniej.

Pracę doktorską zamyka spis referencji. Referencji nie jest zbyt wiele (ok. 75) co trochę dziwi ze względu na obszerną tematykę badań. Prawdopodobnie Autorka starała się skupić na ściśle związanych z badaniami własnymi oraz stosunkowo nowych publikacjach.

Osiągnięciem Kandydatki jest udowodnienie, że sekwencja nukleotydowa RNA u podstawy spinki terminatorowej jest kluczowa w specyficznym rozpoznawaniu cząsteczek RNA przez białko ProQ i FinO. Mgr Mamońska pokazała również, jak mutacje w domenie FinO wpływają na zdolność wiązania RNA, i że szczególnie istotna jest dla wiązania reszta argininy w pozycji 80. Dodatkowo Kandydatka pokazała, że białko ProQ oraz jego domena FinO wiąże się w rejonie spinki terminatorowej SibA i SibC oraz w sąsiadujących motywach struktury drugorzędowej, prowadząc do zmiany struktury danego RNA. Ponadto, domena FinO rozpoznaje RNA zawierające terminator transkrypcji, podczas gdy pełnej długości białko ProQ wiąże również cząsteczki pozbawione tej struktury. Przeprowadzona Analiza RIL-seq wielu bakteryjno-plazmidowych systemów modelowych pozwoliła na wyciągnięcie wniosków dotyczących konkretnych substratów RNA dla białek ProQ i Hfq, świadczących o złożoności i dynamice oddziaływań ProQ i Hfq z docelowymi RNA.

Pracę doktorską oceniam wysoko. Kandydatka podjęła ciekawą tematykę zgłębiając podstawy biologii *E. coli* i wnosząc znaczący wkład w poszerzenie wiedzy o roli ProQ i Hfq. By cele pracy zostały zrealizowane, pani mgr Mamońska przeprowadziła szereg wymagających

i złożonych eksperymentów. Badania wymagały umiejętnego planowania, wyciągania wniosków pośrednich i konstrukcji wielu układów i cząsteczek modelowych. Praca jest staranna, wyniki opisane są przejrzysto, a dyskusja rezultatów, prowadząca do ciekawych wniosków, jest odpowiednio wyważona i świetnie wpisuje pracę w obecny nurt badań.

Badania te, choć wydają się wąskie w tematyce, dotyczą oddziaływań RNA-białko, jednej z podstaw procesów biologicznych. W badaniach naukowych, w których opinia publiczna zawsze oczekuje zastosowań, niezwykle ważne jest zrozumienie fundamentalnych procesów życiowych. Badania takie prowadzą również do rozwoju metodologii, która może być wykorzystana dla innych obiektów badań. Wszystko to widzimy w niniejszej rozprawie doktorskiej. Dodatkowo, dotyczy ona potencjalnie niebezpiecznej dla człowieka bakterii, której lepsze poznanie może być pomocne w walce z różnego typu zakażeniami.

Lektura pracy doktorskiej nasunęła mi następujące pytania, na które proszę o odpowiedź podczas obrony:

Niezrozumiałe jest dla mnie użycie „buforu strukturalnego” (Invitrogen). Dlaczego Autorka zdecydowała się na użycie tego buforu? Jaki jest jego skład? Czy nie lepiej samemu decydować o najlepszym składzie buforu dla planowanych badań?

Dlaczego dopiero po znakowaniu radioaktywnym RNA użyto DNazy I w celu usunięcia pozostałości matrycy DNA po reakcji transkrypcji *in vitro* (str. 44)? Standardowo robi się to po reakcji transkrypcji.

Dlaczego w teście kompetencji, w celu zbadania interakcji pomiędzy cząsteczkami RNA i białkami ProQ i FinO, denaturowano gwałtownie RNA? Czy denaturacja była prowadzona w wodzie? Jeśli autorkę interesował wpływ struktury RNA na wiązanie wybranych białek dziwi brak warunków, które sprzyjałyby natywnemu pofałdowaniu RNA przed inkubacją z białkami.

Na jakie procesy może mieć wpływ zaburzona równowaga oddziaływań ProQ i Hfq? Czy wytworzone modele badawcze (bakteryjno/plazmidowe) można wykorzystać w celu zbadania pewnych hipotez na ten temat? Na przykład zdolność adaptacji do zmienionego środowiska, o której wielokrotnie wspomina Kandydatka w doktoracie lub inne procesy związane z konkretnym RNA.

W Dyskusji Autorka zwięźle formułuje perspektywy dalszych badań. Szczególnie interesujące wydaje mi się zidentyfikowanie wspólnych motywów sekwencyjnych lub strukturalnych sRNA, które mają znaczenie dla wiązania przez ProQ lub Hfq. Czy z dotychczasowych badań można niektóre takie (nowe) motywy już wskazać?

Kandydatka słusznie wskazuje na zalety i wady metody RIL-seq. Jaką inną metodę można by zastosować (najlepiej również wysokoprzepustową), by uzupełnić bądź potwierdzić zebrane wyniki?

Autorka przedstawia analizę zmian w oddziaływaniach RNA-RNA na podstawie RIL-seq (rysunek 32 i 33). Które z par oddziaływań RNA-RNA wydają się interesujące do dalszych badań z perspektywy wpływu struktury sRNA na wiązanie odpowiedniego białka?

Mam też drobne uwagi językowe. Zwracam uwagę, już na przyszłość, na uważne tłumaczenie z języka angielskiego, co oczywiście przysparza często kłopotów. Bezpośrednie tłumaczenie, które zakończyło się sformułowaniem tytułu rozdziału: 4.6.4. „Technika oddziaływania RNA przez ligację i sekwencjonowanie (RIL-seq)” brzmi niegramatycznie i po prostu źle.

W procedurach pojawia się często sformułowanie „zawieszono w wodzie/buforze” (np. str. 40) substancji, które po prostu się w wodzie rozpuszczają. „Zawieszanie” kojarzy się z substancjami nierozpuszczalnymi.

Powyższe uwagi i wątpliwości w żaden sposób nie obniżają mojej wysokiej oceny pracy doktorskiej.

Podsumowując, pragnę stwierdzić, że przedstawiona do oceny praca doktorska mgr Marii Danuty Mamońskiej spełnia wymogi merytoryczne i formalne stawiane pracom doktorskim, zgodnie z art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r., poz. 1668, z późniejszymi zmianami; tekst jednolity: Dz.U. z 2024 r., poz. 1571, z późniejszymi zmianami) - i dlatego wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie mgr Marii Danuty Mamońskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Elżbieta Kienek