

**Recenzja rozprawy doktorskiej
Pani mgr Ewy Stein
pt. „Rozpoznawanie cząsteczek RNA
przez domenę FinO białka ProQ z bakterii *Escherichia coli*”**

Rozprawa doktorska Pani mgr Ewy Stein dotyczy zagadnienia poznania molekularnych mechanizmów oraz specyficzności oddziaływań białek z niekodującymi, regulatorowymi cząsteczkami RNA występującymi w komórkach bakteryjnych. Tego typu kwasy rybonukleinowe jeszcze kilkadziesiąt lat temu były mało znane, a ich rola w procesach komórkowych zdecydowanie niedoceniana. Obecnie wiadomo, że niekodujące RNA biorą udział w procesach regulacji ekspresji genów oraz kontroli replikacji DNA, stanowiąc jedne z ważniejszych elementów genetycznych determinujących efektywność procesów biochemicznych zachodzących w komórkach. Funkcje tych cząsteczek są w dużej mierze zależne od białek, które oddziałując z nimi modulują ich aktywność. Kluczowym i zapewne jednym z najlepiej poznanych wśród tych białek jest Hfq – stosunkowo małe białko o niezwykłych właściwościach biochemicznych, które w znaczący sposób wpływa na funkcje nie tylko niekodujących rodzajów RNA, ale także wiąże się do jedno- i dwuniciowego DNA, przez co wpływa na wydajność różnych procesów związanych z biologią kwasów nukleinowych. Mniej poznanym, ale prawdopodobnie równie ważnym dla fizjologii komórki jest białko ProQ, które również oddziałuje z cząsteczkami RNA.

Niemniej szczegóły tego procesu, jak również cechy budowy tego białka umożliwiające wybiórcze wiązanie się do cząsteczek RNA są w dużej mierze nieznane. Stąd podstawowy cel pracy, jaki postawiła Pani mgr Ewa Stein – wyjaśnienie „w jaki sposób białko ProQ rozpoznaje cząsteczki RNA” należy uznać za ważny naukowo, a jednocześnie ambitny i stanowiący wyzwanie badawcze.

Dwa główne zadania badawcze jakie zamierzała zrealizować Doktorantka obejmowały: (1) „określenie cech cząsteczek RNA decydujących o ich wiązaniu przez domenę FinO białka ProQ” oraz (2) „poznanie znaczenia reszt aminokwasowych zlokalizowanych w obrębie domeny FinO białka ProQ dla oddziaływania z różnymi cząsteczkami RNA”. Zadania te wykonane zostały poprzez zastosowanie metod biochemicznych, w szczególności określania efektywności oddziaływań pomiędzy białkami a kwasami nukleinowymi przy pomocy techniki badania opóźnienia migracji kompleksów nukleo-proteinowych w żelach ekektroforetycznych. Z jej pomocą możliwe było wyznaczenie stałej równowagi reakcji dysocjacji (Kd) i określenie efektywności wiązania RNA do białka. Zaznaczyć należy, że wykonanie tych kluczowych dla uzyskania odpowiedzi na postawione pytania doświadczeń musiało być poprzedzone dokładnym zaplanowaniem, a następnie uzyskaniem konstruktów genetycznych, umożliwiających oczyszczenie specyficznym zmianom białek i kwasów rybonukleinowych. Ta część badań była niewątpliwie bardzo pracochłonna, ale umożliwiła przeprowadzenie doświadczeń pozwalających na wyciągnięcie ważnych biologicznie wniosków. Muszę stwierdzić, że jestem pod wrażeniem jakości wykonanych doświadczeń, udokumentowanych w pracy obrazami ekektroforegramów. Znakomitej jakości obrazy elektroforetyczne umożliwiły precyzyjne wyznaczenie wartości Kd, co biorąc pod uwagę różne warunki reakcji i różne modyfikacje biochemiczne używanych w doświadczeniach kwasów nukleinowych i polipeptydów doprowadziło do wyciągnięcia ważnych naukowo wniosków. Za najważniejsze z nich uważam następujące:

1. N-końcowa domena białka ProQ, zwana FinO, rozpoznaje strukturę Rho-niezależnego terminatora w cząsteczce RNA, złożonego z motywu typu „spinki do włosów” a zakończonej „ogonem” poliurydynowym.
2. Minimalny odcinek „ogona” poliurydynowego, wymagany do efektywnego wiązania cząsteczki RNA przez domenę FinO białka ProQ ma długość czterech nukleotydów.
3. Występuje zjawisko współzawodniczenia pomiędzy białkami ProQ i Hfq o wiązanie do cząsteczek RNA.
4. Najistotniejsze dla wiązania cząsteczek RNA reszty aminokwasowe domeny FinO białka ProQ występują w rejonie kieszeni zlokalizowanej po stronie wklęsłej tej domeny i są to: K54, R58, R62, Y70 oraz R80.

Wnioski te w istotny sposób poszerzają naszą wiedzę o mechanizmach oddziaływania białka ProQ z cząsteczkami RNA. Nie ma zatem wątpliwości, że Pani mgr Ewa Stein rozwiązała problem naukowy, czym spełniła najważniejszy warunek ustawowy wymagany od kandydatów do stopnia doktora. Jej pracę doktorską oceniam wysoko pod względem merytorycznym. Rozdziały „Wstęp” oraz „Dyskusja” wskazują również na opanowanie przez Doktorantkę wiedzy teoretycznej w zakresie tematyki pracy. Niemniej mam uwagi i pytania szczegółowe do ocenianej rozprawy, które w kolejności przedstawię poniżej.

1. O ile główne cele pracy, opisane na str. 27, są przedstawione jasno, to według mnie cele szczegółowe są zbyt rozbudowane, a niektóre z nich mogły pojawić się dopiero w trakcie badań, po uzyskaniu wcześniejszych wyników, nie były zatem sprecyzowane przez rozpoczęciem projektu.
2. Praca zawiera różne nieprawidłowe sformułowania, wynikające z używania tzw. „żargonu laboratoryjnego”; na przykład na str. 33 i 36 użyto sformułowania „nadekspresja białka” – w rzeczywistości ekspresji ulegają geny, a nie białka, które jako produkty ekspresji genów mogą być syntezowane czy produkowane, ale nie „eksprymowane”.

3. W rozdziale „Metody”, w opisach warunków wirowania podawane są wartości „rpm” (obroty na minutę). Ten sposób przedstawienia powoduje trudności w powtórzeniu doświadczeń w takich samych warunkach jeśli nie dysponuje się identycznym sprzętem jak autorka pracy. Wskazane jest zatem podawane wartości wielokrotności g zamiast rpm.
4. Tytuł rozdziału nr 4.3. jest zaskakujący – „Metody pracy eksperymentalnej”. Wszystkie opisane w pracy metody są zasadniczo eksperymentalne, zatem niejasne jest takie wyróżnienie.
5. Co Autorka miała na myśli pisząc na str. 48 „nakładano 5 μ l alikwoty”? Według „Słownika języka polskiego” PWN, pojęcie „aliquot” zdefiniowane jest jako „ton składowy dźwięku decydujący o jego barwie” (<https://sjp.pwn.pl/sjp/alikwot;2549474.html>). Dźwięku nie da się zmierzyć w mikrolitrach, ale też nie o dźwięk zapewne chodziło w tym zdaniu.... To znakomity przykład jak ostrożnym/ostrożną trzeba być próbując używać dosłownej transkrypcji słów z języka angielskiego na język polski. Angielskie słowo „aliquot” (oznaczające porcję większej całości) ma zupełnie inne znaczenie niż polskie słowo „aliquot”, którego definicja podana jest powyżej.
6. Na str. 51 autorka pisze „Zmierzyłam wiązanie wymienionych 6 cząsteczek RNA do oczyszczonego białka....”. Jak można „zmierzyć wiązanie”? Z opisu doświadczeń nie wynika aby Doktorantka mierzyła długość wiązań chemicznych, jak można by się zasugerować czytając zacytowany fragment pracy. Zapewne chodziło o zmierzenie siły czy efektywności wiązania się białek do RNA, ale takiego sprecyzowania zabrakło w tym zdaniu. Podobny problem nomenklaturowy występuje w tekście na str. 54.
7. Również na str. 54 czytamy: „Wprowadzone zmiany znacznie poprawiły wiązanie tych cząsteczek....”. Nie zgadzam się z tym stwierdzeniem. Wspomniane zmiany zwiększyły efektywność lub siłę wiązania, ale go nie

poprawiły. Poprawić można coś, co jest złe. Jednak w biologii takie wartościowanie bywa bardzo niebezpieczne. Coś co ma większą efektywność albo mierzalną wartość nie musi być „lepsze”. Czy jeśli ktoś ma podwyższone ciśnienie krwi, to jest ono lepsze albo polepszone? Na pewno nie. Podobny błąd widnieje w legendzie do Rysunku 19. Wskazane jest zatem w języku naukowym (szczególnie z zakresu nauk ścisłych i przyrodniczych) używanie precyzyjnych określeń i unikanie wartościowania w odniesieniu do opisywanych zjawisk czy procesów.

8. Na str. 61 ponownie występuje nieprecyzyjne określenie „obniżenie maksymalnej frakcji” – rozumiem, że chodzi o obniżenie poziomu tej frakcji.
9. Na str. 63 wspomniane są badania wykonane w „Pracowni Biochemii RNA”. Jest to mało precyzyjne określenie, nie wiadomo bowiem o jednostkę organizacyjną której uczelni bądź którego instytutu chodzi.
10. Zaprezentowane na str. 105 wnioski są ważne i poprawnie sformułowane. Wskazują na poznanie podstaw mechanizmu oddziaływania białka ProQ z cząsteczkami RNA. Uważam, że Doktorantka mogła pokusić się o graficzne przedstawienie modelu tych oddziaływań, co byłoby znakomitą ilustracją uzyskanych wyników badań.
11. W spisie literatury dwie pozycje mają podane niepełne dane bibliograficzne. W pracy „Cech i wsp. 2016” brak jest numeru artykułu. W pracy „Ghetu i wsp. 2002” brakuje numeru woluminu.

W podsumowaniu uważam, że Pani mgr Ewa Stein wykazała się wiedzą teoretyczną z zakresu prowadzonych przez siebie badań. Udowodniła także, że potrafi rozwiązać problem naukowy poprzez odpowiednie zaplanowanie badań, wykonanie doświadczeń, przeprowadzenie analizy wyników oraz wyciągnięcie wniosków. Uzyskała bardzo istotne naukowo rezultaty doświadczeń, poprawnie je zinterpretowała i zaprezentowała uprawnione wnioski. Stwierdzam zatem, że spełnione zostały

wymagania ustawowe dotyczące warunków jakie musi spełniać rozprawa doktorska. W związku z powyższym, wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza o dopuszczenie Pani mgr Anny Stein do dalszych etapów procedury zmierzającej do nadania Jej stopnia doktora.

Biorąc pod uwagę bardzo ważny naukowo temat pracy, znakomite opanowanie przez Doktorantkę metod badawczych, a także uzyskanie bardzo ważnych naukowo wyników, zbliżających nas znacząco do poznania szczegółów molekularnych oddziaływań białka ProQ z cząsteczkami RNA, zwracam się z wnioskiem o rozważenie możliwości odpowiedniego wyróżnienia tej rozprawy doktorskiej.



prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn