

**RECENZJA**

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

- **Wstęp**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Marii Mamońskiej wpisuje się w bardzo aktualny nurt badań nad potranskrypcyjną regulacją ekspresji genów u bakterii. Na wstępie, należy podkreślić, że w ostatnich latach stało się jasne, że małe niekodujące cząsteczki RNA (sRNA) nie stanowią jedynie uzupełniającego elementu regulacyjnego, lecz są elementem jednego z podstawowych mechanizmów, regulujących szybkie dostosowanie się komórki bakteryjnej do zmiennych warunków środowiskowych. Co ważne, aktywność sRNA jest nierozdzielnie związana z działaniem białek wiążących RNA, które determinują stabilność regulatorowych RNA, dostępność miejsc oddziaływania z mRNA, a także efektywność tworzenia kompleksów RNA-RNA.

Na tym tle szczególnie interesujące są białka Hfq oraz przedstawiciele rodziny FinO, w tym ProQ i FinO, ponieważ posiadają one ważne znaczenie fizjologiczne w komórce bakteryjnej, jednakże pomimo wczesnego ich odkrycia, nadal nie znane są w pełni mechanizmy selekcji docelowych sRNA. Dotychczasowe badania wykazały, że białka te rozpoznają częściowo nakładające się pule transkryptów, jednak w dalszym ciągu otwarte pozostaje pytanie, jakie cechy sekwencyjne, strukturalne i kontekst ich ekspresji w komórce, decydują o preferencyjnym wiązaniu konkretnych cząsteczek sRNA przez poszczególne białka. W tym kontekście, Autorka rozprawy trafnie identyfikuje lukę poznawczą i podejmuje szeroko zakrojone badania, mające charakter wielowymiarowy. Pani mgr Maria Mamońska, skoncentrowała się na *Escherichia coli*, czyli modelu eksperymentalnym o fundamentalnym znaczeniu dla biologii molekularnej, a zarazem organizmie, w którym współwystępowanie białek Hfq, ProQ i FinO tworzy szczególnie interesujący układ biologiczny. Już na etapie koncepcyjnym należy wysoko ocenić przyjęcie strategii łączącej podejście biochemiczne, strukturalne, z wykorzystaniem technik wysokoprzepustowych. Takie holistyczne ujęcie pozwala bowiem przejść od prostego pytania na temat, np. mechanizmu wiązania sRNA do badanego białka, do znacznie głębszego zagadnienia, mianowicie do zrozumienia zasad selektywności, kompetycji oraz funkcjonalnej współzależności białek wiążących sRNA w komórce bakteryjnej. Warto podkreślić, że problem badawczy został sformułowany bardzo precyzyjnie, tj. Autorka nie pyta tylko o ogólny mechanizm wiązania sRNA z ProQ lub Hfq, ale dąży do uchwycenia molekularnych determinant rozpoznawania oraz do wykazania, w jaki sposób determinanty te przekładają się na aktywność białek w układzie *in vivo*. Taka



konstrukcja celów świadczy o dojrzałym rozpoznaniu problemu naukowego co determinuje dalsze kroki badawcze, które zostały przeprowadzone z wysoką starannością, wykorzystując szeroki wachlarz technik analitycznych.

- **Ocena pracy**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma klasyczny układ, właściwy dla tego typu opracowań. Obejmuje streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, jasno sformułowany cel pracy, rozdział materiały i metody, wyniki, dyskusja i wnioski. Praca została napisana w języku polskim, przy zachowaniu wysokich standardów merytorycznych i formalnych. Wszystkie informacje w tym, opis materiałów i użytych metod, oraz dane eksperymentalne przedstawiono w sposób nad wyraz rzetelny i uporządkowany, z użyciem czytelnych rycin, tabel, którym towarzyszy spójna narracja naukowa, co wskazuje na bardzo wysoki profesjonalizm w prezentacji wyników naukowych.

Pierwszy nurt badawczy dotyczył znaczenia sekwencji nukleotydowych otaczających spinki terminatorowe, które mogą determinować specyfikę wiązania różnych sRNA przez białka ProQ i FinO. Uważam tę część rozprawy za szczególnie ważną, ponieważ Autorka skupiła się na dostarczeniu kluczowych informacji na temat specyfiki działania białek ProQ i FinO. Autorka wykorzystowała sRNA, jak malM-3' i FinP czy RepX, które są rozpoznawane przez badanie białka, co ważne wykorzystując starannie zaprojektowane mutanty oraz zamianę sekwencji nukleotydowych między poszczególnymi sRNA preferencyjnie rozpoznawanymi przez ProQ i FinO. Doktorantka wykazała, że nawet niewielkie zmiany u podstawy spinki terminatorowej (np. pojedynczy nukleotyd) mogą przeprogramować preferencję wiązania dla białek z rodziny FinO. Wyniki te mają dużą wagę poznawczą, ponieważ przesuwają punkt ciężkości z ogólnego modelu rozpoznawania terminatora na znacznie subtelniejszy model, w którym kluczowy jest lokalny kontekst sekwencyjny i mikroarchitektura dolnej części struktury terminatorowej. Szczególnie przekonujące są tutaj doświadczenia kompetycyjne, potwierdzające, że obserwowane różnice nie są jedynie efektem zmian w powinowactwie mierzonym osobno dla każdego białka, lecz przekładają się na realne współzawodnictwo ProQ i FinO o specyficzny sRNA dla danego białka. Ta część pracy została ponadto zwieńczona publikacją w czasopiśmie RNA, co dodatkowo potwierdza jej wysoki poziom merytoryczny. W ramach przeprowadzonych badań, nasuwa się pytanie czy było by zasadne sprawdzenie stabilności struktury zmutowanego sRNA, a tym samym czy mutacja nie wpływa negatywnie na strukturę i na powinowactwo sRNA do badanego białka. Ponadto, czy jest możliwe rozwinięcie, czy potwierdzenie tych badań w przyszłości i sprawdzenie, w jakim stopniu zidentyfikowane determinanty sekwencyjne zachowują swą siłę rozdzielczą także w warunkach in vivo dla sztucznie przeprojektowanych sRNA.

Drugi nurt badań poświęcono znaczeniu wybranych reszt aminokwasowych domeny FinO białka ProQ dla wiązania sRNA w komórkach E. coli. Jest to część bardzo dobrze przygotowana metodycznie, gdyż łączy wcześniejsze przestanki strukturalne z badaniem funkcjonalnym na poziomie komórkowym. Autorka uczestniczyła w kompleksowej analizie RIP-seq we współpracy



z zagranicznymi ośrodkami naukowymi, i wykazała, że mutacje w domenie FinO nie wpływają jednolicie na wiązanie wszystkich sRNA, lecz prowadzą do zróżnicowanych, selektywnych zmian profilu wiązania. Za szczególnie ważne uznaje wykazanie kluczowego znaczenia reszty R80, której mutacja osłabiała oddziaływanie z licznymi sRNA, zwłaszcza związanymi z układami toksyna-antytoksyna. Wynik ten nie tylko potwierdza centralną rolę określonych elementów powierzchni wiążącej białka ProQ, ale także porządkuje hierarchię znaczenia poszczególnych reszt aminokwasowych i potwierdza wcześniejsze badania *in vitro*, wykorzystując analizy *in vivo*. W związku z otrzymanym wynikiem, mam pytanie: jak Doktorantka interpretuje funkcję R80 w wiązaniu sRNA, spoglądając na problem mechanistycznie. Na wyróżnienie zasługuje również decyzja Autorki, aby pogłębić poczynioną obserwację na przykładzie cząsteczek SibA i SibC. Dzięki połączeniu analiz struktury drugorzędowej RNA z mapowaniem miejsc wiązania do białka ProQ, Doktorantka wykazała, że domena FinO rozpoznaje sRNA<sup>A</sup> zawierające motyw terminatora transkrypcji, natomiast pełnej długości białko ProQ zachowuje zdolność wiązania także form pozbawionych tej struktury. Jest to bardzo interesujący rezultat, ponieważ wskazuje na funkcjonalne współdziałanie domen w obrębie białka ProQ oraz sugeruje, że jego specyfika wiązania nie może być zredukowana wyłącznie do właściwości izolowanej domeny FinO. Jednocześnie analiza footprintingu pokazała, że wiązanie ProQ i ProQ-NTD wywołuje lokalne zmiany konformacyjne w sRNA, a więc nie jest aktem biernego rozpoznania, lecz zdarzeniem modulującym strukturę sRNA, co może mieć potencjalne konsekwencje regulacyjne. W tym miejscu nasuwa się pytanie, czy obserwowane różnice pomiędzy SibA i SibC wynikają jedynie z odmienności ich architektury lokalnej, czy również z różnic kinetycznych w tworzeniu i stabilności kompleksów RNA-białko.

Trzeci nurt badań, obejmujący analizę kompetycji oraz analiz funkcjonalnej zależności między białkami ProQ i Hfq metodą RIL-seq, oceniam jako szczególnie ambitne podejście o charakterze analiz funkcjonalnych. Autorka podjęła próbę poznania dynamicznej organizacji sieci interakcji RNA-RNA w warunkach *in vivo*, jednocześnie regulowanych za pośrednictwem dwóch białek ProQ i Hfq. Uzyskane wyniki pokazują, że zwiększenie poziomu jednego z białek prowadzi do selektywnych zmian w parach RNA-RNA związanych przez drugie białko, przy czym kierunek i siła efektu zależą od konkretnej pary RNA oraz od poziomu nadekspresji danego białka. Doktorantka buduje obraz, wykraczający poza prosty model bezpośredniej konkurencji o identyczne miejsca wiązania, między białkami ProQ i Hfq, wskazując, że istnieje pozytywna współzależność między poszczególnymi białkami. Rozprawa przekonująco pokazuje, że ProQ i Hfq tworzą dynamiczny układ regulacyjny, w którym konkurencja, redystrybucja sRNA i pośrednie efekty funkcjonalne współistnieją i razem kształtują pulę interakcji RNA-RNA w komórce. Za bardzo mocną stroną tej części pracy uważam staranną, wręcz benedyktyńską walidację systemu nadekspresji i kontrolę poziomów białek w komórce oraz umiejętne zestawienie wyników RIL-seq z wcześniejszymi danymi literaturowymi, a tym samym dogłębną walidacją systemu eksperymentalnego. Szczególnie przekonujące jest tu pokazanie, że sam obserwowany efekt nie sprowadza się do prostego zaniku lub pojawienia się pojedynczych interakcji, lecz obejmuje bardziej subtelną reorganizację sieci RNA-RNA. Nasuwa się pytanie co dalej, czy planowane są badania w kierunku rozszerzenia tej analizy na



warunki stresowe, w których fizjologiczna presja selekcyjna na przeprogramowanie interaktomu RNA może być jeszcze wyraźniejsza.

- **Podsumowanie wyników**

Podsumowując, rozprawa przedstawia spójny i jednocześnie nowy obraz mechanizmów selekcji sRNA przez białka ProQ, FinO i Hfq. Autorka wykazała, że o swoistości oddziaływań decydują nie tylko pojedyncze, izolowane cechy, lecz układ wielopoziomowy obejmujący: - lokalny kontekst sekwencyjny, przede wszystkim u podstawy spinki terminatorowej; - zdefiniowała poszczególne reszty aminokwasowe w domeny FinO białka ProQ; - oraz pokazała w skali globalnej funkcjonalne relacje między białkami wiążącymi sRNA w komórce bakteryjnej. Przedstawiony model ma wysoką wartość poznawczą, gdyż porządkuje rozproszone dotychczas obserwacje i osadza je w jednym, konsekwentnie rozwijanym modelu biologicznym. W konsekwencji, Doktorantka pokazuje, że selektywność wiązania sRNA nie jest własnością pojedynczej domeny czy pojedynczego motywu sekwencyjnego, lecz cechą całego układu obejmującego strukturę sRNA, architekturę białka oraz komórkowy kontekst konkurencji między poszczególnymi białkami.

Na podstawie przedstawionej rozprawy doktorskiej należy bardzo wysoko ocenić warsztat badawczy Doktorantki. Pani mgr Maria Danuta Mamońska swobodnie posługuje się technikami biologii molekularnej, biochemii RNA oraz technikami wysokoprzepustowymi, a co równie istotne, potrafi łączyć dane uzyskane różnymi podejściami eksperymentalnymi w spójną całość, co świadczy o dużej samodzielności badawczej, umiejętności formułowania trafnych hipotez, projektowania doświadczeń oraz krytycznej analizy wyników. Na podkreślenie zasługuje również dojrzałość naukowa widoczna w sposobie prowadzenia narracji oraz w świadomym odróżnianiu wniosków bezpośrednio wynikających z danych od bardziej ogólnych implikacji biologicznych. Za dodatkowy argument przemawiający na korzyść Doktorantki uznaję fakt, że część wyników została już opublikowana w renomowanym czasopiśmie międzynarodowym, a pozostałe rozdziały mają wyraźny potencjał publikacyjny. Rozprawa pokazuje także, że Autorka potrafi efektywnie funkcjonować w środowisku współpracy międzynarodowej oraz korzystać z zaawansowanego zaplecza eksperymentalnego i bioinformatycznego. Wysoko oceniam również przejrzystość przedstawienia celów, logiczny porządek rozdziałów oraz konsekwencję, z jaką każda część eksperymentalna prowadzi do następnej.

- **Ocena dyskusji**

Dyskusja została przygotowana bardzo starannie i stanowi mocny element rozprawy. Autorka nie ogranicza się do ponownego streszczenia wyników, lecz osadza je w szerokim kontekście literaturowym i konsekwentnie buduje model biologiczny, w którym poszczególne części pracy wzajemnie dopełniają cały obraz. Na uznanie zasługuje to, że dyskusja zachowuje właściwe proporcje między wnioskowaniem a interpretacją wyników. Tam, gdzie dane pozwalają na jednoznaczne konkluzje, Autorka formułuje je jasno; tam natomiast, gdzie



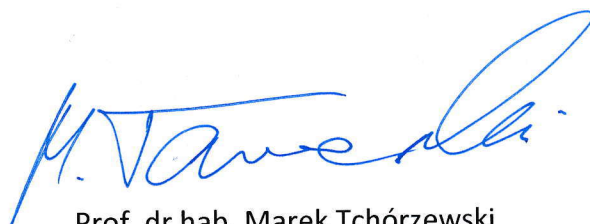
pozostaje przestrzeń dla dalszych badań, sygnalizuje alternatywne możliwości i pytania otwarte. Za cenne uważam również to, że w Dyskusji, Doktorantka nie rozprasza się na zbyt liczne wątki poboczne, lecz pozostaje ściśle związana z główną osią rozprawy doktorskiej, czyli z mechanizmami selektywnego rozpoznawania sRNA i z funkcjonalnym znaczeniem kompetencji pomiędzy białkami wiążącymi sRNA. W mojej ocenie rozdział ten dobrze świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki.

- **Wniosek końcowy**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Marii Danuty Mamońskiej pt., „Kompetycja pomiędzy białkami wiążącymi cząsteczki RNA u *Escherichia coli*” stanowi wartościowe i oryginalne opracowanie naukowe, wnoszące istotny wkład do badań nad potranskrypcyjną regulacją ekspresji genów u bakterii. Autorka wykazała się bardzo dobrym przygotowaniem teoretycznym, dojrzałością interpretacyjną oraz wysokimi kompetencjami eksperymentalnymi. Stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki ustawowe zgodnie z Prawem o szkolnictwie wyższym i nauce (podstawa prawna: art. 187 ustawa z dnia 20 lipca 2018 roku, Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce – Dz. U. 2024, poz. 1571 z późn. Zm.) i wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr Marii Danuty Mamońskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Uważam, że rozprawa doktorska zasługuje na wyróżnienie, przede wszystkim ze względu na nad wyraz konsekwentne rozwijanie programu badawczego, kartezyjsko uporządkowany układ eksperymentalny oraz wyjątkową determinację w dążeniu do kompleksowego wyjaśnienia mechanizmów interakcji między sRNA a białkami regulatorowymi. Praca stanowi przykład dojrzałego, logicznie zaplanowanego i metodycznie dopracowanego projektu naukowego, którego wyniki istotnie poszerzają wiedzę o potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów u bakterii.

Lublin 11.05.2026



Prof. dr hab. Marek Tchórzewski

