

Recenzja pracy doktorskiej mgr Ewy Stein pt.

„Rozpoznawanie cząsteczek RNA przez domenę FinO białka ProQ z bakterii *Escherichia coli*”.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Ewy Stein została wykonana pod kierunkiem dr hab. Mikołaja Olejniczaka na Wydziale Biologii, Uniwersytetu imienia Adama Mickiewicza w Poznaniu

Ocena wartości naukowej

U bakterii jednym z ciekawszych aspektów regulacji ekspresji genów jest działanie małych RNA (sRNA), które w różny sposób oddziałują z cząsteczkami mRNA wpływając na translację i stabilność. Białka oddziałujące z małymi RNA mają bardzo duży wpływ na ich działanie. Podstawowym białkiem oddziałującym z sRNA jest Hfq, które tworzy heksametyczne pierścienie. Jest to białko opiekuńcze RNA, które z wysokim powinowactwem wiąże sRNA, wspomagając parowanie pomiędzy sRNA a docelowymi mRNA. Poza Hfq wiele innych białek oddziałuje z sRNA. W ostatnich latach pojawiły się doniesienia świadczące o tym, że białka zawierające specyficzną domenę zwaną FinO mogą odgrywać ważną rolę w regulacji ekspresji genów przez sRNA. Praca doktorska mgr Ewy Stein skupia się na mechanizmie oddziaływania białka ProQ zawierającego domene FinQ z RNA. Dobrze zaplanowane biochemiczne eksperymenty *in vitro* wykorzystujące rekombinowane białko, jego warianty i enzymatycznie syntezowane RNA pozwoliły wciągnąć szereg wniosków, które poszerzają naszą wiedzę. Wszystkie one dotyczą powinowactwa domeny FinQ do RNA. Domeny FinQ oddziałują z RNA zawierającymi strukturę szpilki do włosów. W szczególności struktura terminatora niezależnego od Rho, w którym szpilka jest zakończona ogonem poliurydynowym, służy jako element RNA, który rozpoznaje domenę FinO białka ProQ. Aby osiągnąć optymalne wiązanie z domeną FinO, ogon poliurydynowy musi mieć minimalną długość czterech nukleotydów. Ponadto, dolna część spinki do włosów terminatora odgrywa znaczącą rolę w procesie przyłączania cząsteczek RNA ułatwionym przez domenę FinO. Wreszcie, motyw bogaty w adenozyne znajdujący się po 5'-stronie terminatora cząsteczek RNA - który jest wiązany przez białko ProQ w komórkach *E. coli* - ma tendencję do osłabiania potencjału wiązania białka Hfq. Sugeruje to potencjalną konkurencję między białkami ProQ i Hfq w zakresie wiązania z cząsteczkami RNA. Praca dostarcza też danych dotyczących roli poszczególnych aminokwasów domen FinO w oddziaływaniu z RNA. Przede wszystkim reszty aminokwasowe znajdujące się w kieszeni wiążącej RNA, K54, R58, R62, Y70 i R80, są niezbędne do wiązania RNA. Badania *in vitro* nie potwierdziły jednak udziału reszt R32, D41 i T65 w procesie wiązania. Ponadto zaobserwowano, różne efekty mutacji K35A i R69A na wiązanie siedmiu testowanych cząsteczek RNA. Sugerują to, że sposoby oddziaływania FinO z RNA nie są zawsze identyczne.

O istotności badań opisanych w dysertacji świadczy fakt, że wyniki zostały opublikowane w czasopiśmie *Nucleic Acids Research*, które jest najlepszym branżowym czasopismem specjalizującym się w biologii i chemii kwasów nukleinowych. Jednakże, same badania są dosyć jednostronne pod względem metodologicznym gdyż opierają się na pojedynczej metodzie badawczej. Praca ta została wsparta badaniami strukturalnymi i w związku z tym specyficzne właściwości cząsteczek RNA wpływające na różnice w oddziaływaniu i efekty mutacji pozostają nie wyjaśnione. Ponadto dla większego znaczenia badań należało by równoległe prowadzić eksperymenty badające wpływ badanych mutacji w białku ProQ zmieniających powinowactwa do różnych syntetycznych RNA na metabolizm RNA *in vivo* w *E. coli*. Dlatego też pomimo zdecydowanie pozytywnej opinii jeżeli chodzi o wartość naukową uzyskanych wyników mała różnorodność podejścia badawczego postawia pewien niedosyt.

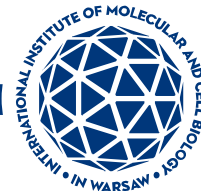
Ocena formalne strony pracy

Praca ma klasyczną budowę i składa się ze wstępu, rozdziału opisującego metody, wyniki oraz z dyskusji. Jako osobne rozdział zostały wydzielono Cel pracy oraz Wnioski. Praca zawiera wymagane streszczenie w języku angielskim i polskim. Bibliografia zawiera blisko 87 cytowań. Praca jest napisana, jasnym, zrozumiałym językiem dzięki czemu czytelnik nie ma problemu z jej śledzeniem. We **Wstępie** Autorka wprowadza czytelnika w tematykę pracy opisując dziania sRNA i białka z nimi oddziałujące. Opisuje dokładnie wiedzę o białku ProQ i domenach FinO. Dużo uwagi jest też poświęcone białku Hfq. Wiedza ta pozwala na dyskusję wyników dotyczących ProQ w kontekście wiedzy o Hfq.

Sekcja **Materialy i Metody** jest dokładnym spisem zastosowanych metod badawczych oraz użytych materiałów. Ta część pracy jest wyczerpująca, i nie mam do niej uwag krytycznych. Autorka pracy szczegółowo opisał wykorzystane metody użyte w pracy.

Wyniki są opisane w sposób niezwykle klarowny, a ryciny przygotowano z należytą starannością. Opis zawiera ciąg logiczny i dla czytelnika jest całkowicie jasne, dlatego taki a nie inny eksperyment został wykonany i jakie płyną z niego bezpośrednie wnioski. Wyniki są jasne i wiarygodne co jest dużą wartością tej dysertacji.

Dyskusja skupia się na bezpośrednim omówieniu uzyskanych wyników w kontekście istniejącej wiedzy o ProQ i Hfq. Omawiane są również inne białka z domeną FinQ i znaczenie wyników w pracy dla zrozumienia ich funkcji. Jest to podejście w pełni poprawne i często stosowane w publikacjach naukowych. Postawia jednak niedosyt. Autorka mogła się pokusić o umiejscowienie swoich wyników w szerszym kontekście. Można też głębiej się zastanowić jaki jest znacznie padań dla zrozumienia biologicznej funkcji ProQ. Dysertacja kończy się głównymi wnioskami.



Podsumowując stwierdzam, że przedłożona mi do oceny praca mgr. Ewy Stein spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.). Dlatego też z całym przekonaniem zwracam się do Rady Dyscypliny Nauk Biologicznych Uniwersytetu im Adama Mickiewicza o dopuszczenie mgr. Ewy Stein do dalszych etapów przewodu doktorskiego i popieram wnioski o nadanie jej stopnia naukowego doktora.