



UNIwersYTET GDAŃSKI

Dr hab. Iwona Mruk
Katedra Mikrobiologii
Uniwersytet Gdański
Wita Stwosza 59
80-308 Gdańsk
iwona.mruk@ug.edu.pl

Gdańsk, dnia 2 października 2023 roku

Ocena rozprawy doktorskiej Pani mgr Macieja Basczoka

„Elementy sekwencji i struktury RNA rozpoznawane przez białka z domeną FinO”.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pana mgr Macieja Basczoka została wykonana pod opieką pana prof. dr hab. Mikołaja Olejniczaka, a zrealizowana w Zakładzie Biochemii Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Praca doktorska była finansowana z grantu opiekuna projektu: Narodowego Centrum Nauki (OPUS 2018/31/B/NZ1/02612) oraz z grantu NCN Preludium 2021/41/N/NZ1/04133, którego kierownikiem był doktorant.

Praca pana mgr Macieja Basczoka dotyczy biochemii oddziaływań tzw. sRNA, czyli małych cząsteczek kwasów rybonukleinowych. Cząsteczki sRNA pełnią w komórkach prokariotycznych bardzo ważną rolę regulatorową, praktycznie we wszystkich procesach życiowych. W oddziaływaniu różnych cząsteczek RNA pośredniczą wyspecjalizowane białka opiekuńcze, z których najlepiej opisano funkcję białek Hfq i ProQ. Białka te ułatwiają tworzenie kompleksów sRNA z mRNA o zróżnicowanym efekcie komórkowym w regulacji post-transkrypcyjnej. Często pomagają wytworzyć właściwą aktywną konformację RNA lub wzmocnić stabilność RNA. Doktorant podjął się trudnego zadania polegającego na analizie cząsteczek RNA w celu identyfikacji ich determinant odpowiedzialnych za oddziaływanie z białkami opiekuńczymi ProQ lub Hfq, z bakterii *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* i *Neisseria meningitidis*. Celem badań było lepsze zrozumienie mechanizmów stojących za rozdziałem odrębnych grup cząsteczek RNA przeznaczonych do wiązania się do poszczególnych białek opiekuńczych, a także głębsze poznanie biochemii tych reakcji. Zwłaszcza wgląd w procesy interakcji cząsteczek RNA z najmniej poznany białkiem

ProQ w przypadku *N. meningitidis* dawał szansę na pogłębienie wiedzy na temat post-transkrypcyjnej regulacji ekspresji genów, a co za tym idzie, procesów adaptacyjnych bakterii. Różnorodność mechanizmów regulatorowych z udziałem RNA jest ciągle jeszcze mało scharakteryzowana. Dlatego przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska wpisuje się w nurt interesujących i bardzo aktualnych badań

Przedstawiana rozprawa doktorska liczy 120 stron, w skład których wchodzi 42 rozbudowane ryciny, 9 tabel oraz 92 pozycje literaturowe. Praca została napisana w układzie tekstu typowym dla eksperymentalnych prac doktorskich z następującymi rozdziałami: tytuł pracy, spis treści, streszczenie w jęz. polskim i angielskim, wstęp, cele pracy, materiały, metody, wyniki, dyskusja, wnioski oraz bibliografia.

W liczącym 15 stron **Wstępie** pan mgr Maciej Basczok na podstawie przeglądu danych literaturowych przedstawia wybrane zagadnienia związane z kryteriami podziału sRNA na grupy, ich funkcjami oraz z mechanizmem regulacji ekspresji genów przez sRNA ze skutkiem negatywnym lub pozytywnym. Następnie opisuje szczegółowo białka opiekuńcze wiążące RNA: białko Hfq oraz ProQ, które jest przedstawicielem grupy białek z domeną FinO odpowiedzialną za rozpoznanie i wiązanie z RNA. Doktorant przedstawia struktury tych białek i podkreśla rolę poszczególnych domen i elementów strukturalnych ważnych dla oddziaływania z cząsteczkami RNA. Zabrakło mi w tym rozdziale jedynie informacji, jak różna jest struktura białka Hfq z *E. coli* w stosunku do homologa z meningokoków, co analogicznie Autor dobrze przedstawił dla białka ProQ. W końcowej części Wstępu Autor na podstawie wyników eksperymentalnych innych badaczy dokonuje syntetycznego ilościowego porównania zbioru cząsteczek RNA oddziałujących z Hfq oraz z ProQ i stwierdza, że te pule RNA stanowią zbiory na ogół odrębne, co stanowi punkt wyjścia do pierwszej części badawczej recenzowanej pracy. Tę część pracy oceniam bardzo wysoko. Rozdział wprowadzający jest bogato ilustrowany, co ułatwia zrozumienie tekstu. Jest napisany zwięzłym językiem, bardzo jasno, co pozwala swobodnie zrozumieć problem badawczy pracy nakreślony w następnym rozdziale pracy.

Cel pracy jest przedstawiony w postaci dwu głównych zadań badawczych wraz z kilkoma celami szczegółowymi, gdzie pierwsze związane jest z analizą *in silico*, a drugie z biochemiczną pracą eksperymentalną. Generalnie pierwsze zadanie dotyczy porównania pul ligandów RNA białek Hfq i ProQ z *E. coli*, *S. enterica* i *N. meningitidis*, by zidentyfikować sekwencję w RNA, która determinuje preferencję w wiązaniu RNA do Hfq, a nie ProQ i odwrotnie. Drugie zadanie zaś skupia się na charakterystyce cech

biochemicznych cząsteczek RNA zapewniających specyficzną, silną i stabilną interakcję z mniej znanym białkiem ProQ z *N. meningitidis*.

W rozdziale **Materiały i Metody** Autor w sposób syntetyczny opisuje zastosowane metody, które pozwalają na zrealizowanie i powtórzenie zadań badawczych.

W kluczowym rozdziale **Wyniki** Doktorant w pierwszej części prezentuje analizy bioinformatyczne dla wyodrębnionych eksperymentalnie cząsteczek RNA pochodzących z wielkoprzepustowych technik profilowania transkryptomu dla komórek *E. coli*, *S. enterica* i *N. meningitidis* udostępnionych przez inne grupy badawcze. Z analiz z *E. coli* i *S. enterica* wynika, że oba białka rozpoznają cząsteczki RNA w regionie Rho-niezależnego terminatora transkrypcji, ale białko Hfq preferuje przyległe po stronie 5' do spinki terminatorowej sekwencje RNA bogatsze w urydynę, a białko ProQ w adenozyne. Wyniki zaprezentowano w formie porównań pozycyjnych (jako schematy LOGO). Z powodu bliskiego spokrewnienia *E. coli* i *S. enterica* można było się spodziewać takiej zbieżności. Natomiast te same porównania pozycyjne nie są już takie jednoznaczne, gdy analizuje się cząsteczki RNA z niespokrewnionej bakterii *N. meningitidis*. Sekwencja przyległa po stronie 5' od spinki terminatorowej jest wzbogacona w adenozyne w cząsteczkach RNA wiązanych zarówno przez białko ProQ, jak i Hfq, u *N. meningitidis*.

W drugiej, empirycznej części wyników, Doktorant oczyścił białko ProQ z meningokoków w systemie ekspresyjnym *E. coli*, a następnie wykonał bardzo wiele eksperymentów biochemicznych z wiązaniem różnych cząsteczek RNA z bakterii *N. meningitidis*, by zmapować determinanty wiązania do białka ProQ. Generalnie badał wpływ struktury Rho-niezależnego terminatora oraz przyległych do niego sekwencji w kierunku 5' oraz 3'. Ustalił, że struktura terminatora jest konieczna do interakcji z białkiem, a ogon urydynowy ma duży wpływ na siłę wiązania i na wartość stałej równowagi dysocjacji K_d . Podobnie miał się parametr długości sekwencji RNA po stronie 5' od terminatora. Dalej Doktorant manipulował długością dwuniciowej struktury terminatora i sekwencją pętli, co wykazało, że skracanie terminatora nie ma dużego znaczenia, ale rozpoznanie RNA odbywa się przez dolną część terminatora, tzw. podstawę. Dodatkowo zmiana sekwencji u podstawy spinki terminatora ma mniejsze znaczenie dla oddziaływania RNA z białkiem. Uważam otrzymane wyniki za cenne informacje dotyczące mało znanego homologa ProQ.

Doktorant w pracy bardzo krótko odniósł się do obserwacji, że wszystkie eksperymenty ujawniły tylko jeden kompleks białka ProQ – RNA, czyli stechiometrycznie 1:1. Czy mogę prosić o komentarz w tej sprawie? Czy to zaskakujące wobec badań nad Hfq, które tworzą kompleksy wyższego rzędu? Czy można to jakoś odnieść do odmiennej struktury ProQ, zredukowanej tylko do domeny FinO u meningokoków? Jak to tłumaczyć?

W rozdziale **Dyskusja**, w najciekawszym dla mnie wątku, Autor kontynuuje porównawcze rozważania dotyczące podobieństw i różnic w rozpoznawaniu cząsteczek RNA ze swoich obserwacji i wyników do tych znanych dla ProQ z *E. coli*. Znajduje wiele spójności. Niemniej jednak, w mojej opinii, zgromadzone wyniki wskazują, że trudno wskazać jednoznacznie na specyficzną sekwencję, czy element RNA dyskryminujący rozpoznanie konkretnego białka opiekuńczego Hfq lub ProQ, a sortowanie cząsteczek RNA u meningokoków jest bardziej skomplikowane, niż wydawałoby się początkowo. Być może ta dyskryminacja cząstek RNA jest bardziej oparta na parametrach czysto biochemicznych. Sam Autor wydaje się również to dostrzegać. Czy Doktorant uważa, że w tym procesie sortowania cząsteczek RNA u meningokoków w kontekście reakcji *in vivo* mogłyby uczestniczyć jeszcze jakieś inne elementy komórkowe i warunki reakcji stwarzające środowisko w komórce?

Podoba mi się również wątek Dyskusji dotyczący scenariuszy interpretacji podobieństwa sekwencji cząsteczek RNA po stronie 5' spinki wiązanych przez oba białka opiekuńcze u *N. meningitidis*. Podsumowując, rozdział **Dyskusja** jest napisany dojrzałe i rzeczowo. Autor uzyskane wyniki i obserwacje krytycznie zestawia z danymi literaturowymi i właściwie przedyskutowuje, co świadczy o doskonałej orientacji w badanej dziedzinie.

Podobnie wysoko oceniam rozdział **Wnioski**, w którym konkluzje pracy zostały przedstawione w syntetycznej formie.

Jeśli chodzi o sposób przedstawienia rozprawy doktorskiej od strony formy językowej, oceniam, iż została ona napisana poprawnym językiem i przygotowana bardzo przejrzysto, z zachowaniem wysokiej dbałości o szatę graficzną i poczuciem estetyki. Doszukałam się tylko nielicznych drobnych pomyłek i uchybień edytorskich (np. powtórzenie zdania, str. 28), błędne użycie słowa *gen*, zamiast transkrypt/mRNA tego genu (str. 59 i Rys. 20A), użycie słowa „przyrównanie” sekwencji zamiast porównanie sekwencji (str. 60, 61 i Rys. 21,22) oraz użycie mniej fortunnego wyrażenia „kultura bakteryjna” (str. 64) zamiast po prostu hodowla bakteryjna.

Te drobne uchybienia nie wpływają na ostateczną ocenę pracy doktorskiej, ani nie pomniejszają wartości badawczej rozprawy doktorskiej.

Podsumowanie

Na podstawie wnikliwie przeprowadzonej analizy merytorycznej i formalnej oceniam rozprawę doktorską Pana mgr Macieja Basczoka pozytywnie. Stwierdzam z pełnym przekonaniem, że stanowi ona oryginalne opracowanie problemu naukowego, oraz że dostarczyła solidnych wyników poszerzających naszą wiedzę o biochemii oddziaływań cząsteczek RNA oraz funkcji białek Hfq i ProQ pośredniczących w tych oddziaływaniach. Pragnę podkreślić dużą ilość włożonej pracy laboratoryjnej kandydata, który wykazał się samodzielnością badawczą. Zdobył też finansowanie na projekt badawczy. Potrafił umiejętnie i w sposób syntetyczny opracować swoje wyniki naukowe i przedyskutować je wobec aktualnych, najnowszych danych literaturowych z zakresu związanego z pracą doktorską.

Podsumowując, oświadczam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska w pełni spełnia wymogi stawiane tego typu pracom, zawarte w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce”. Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. A. Mickiewicza o przyjęcie tej rozprawy i dopuszczenie pana mgr Macieja Basczoka do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Dr hab. Iwona Mruk, prof. UG

