

Prof. dr hab. Krzysztof Liberek  
Kierownik Zakładu Biochemii Białek  
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG-GUMed  
ul. Abrahama 58  
80-307 Gdańsk

Gdańsk, 26.10.2023

Opinia o rozprawie doktorskiej Pana mgr Macieja Basczok pt. "Elementy sekwencji i struktury RNA rozpoznawane przez białka z domeną FinO"

W rozprawie doktorskiej mgr Maciej Basczok przedstawia badania mające na celu poznanie podstaw oddziaływania białek z domeną FinO z RNA. Praca doktorska mgr Macieja Basczoka została wykonana w Pracowni Biochemii RNA Wydziału Biologii UAM pod kierunkiem prof. dr hab. Mikołaja Olejniczaka.

Rozprawa doktorska ma układ tradycyjny. Liczy 120 stron. Praca opatrzona jest *Wstępem*, w którym doktorant przedstawia wiedzę na temat bakteryjnych białek opiekuńczych RNA biorących udział w potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów. W szczególności przedstawia informacje na temat oddziaływania tych białek z RNA, budowy białka Hfq oraz białek z domeną FinO. Wstęp bardzo dobrze wprowadza czytelnika w tematykę rozprawy doktorskiej. W rozdziałach *Materiały* oraz *Metody* doktorant w sposób jasny, rzeczowy i wyczerpujący przedstawia informacje pozwalające na odtworzenie eksperymentów zaprezentowanych w rozprawie.

Rozdział *Wyniki* rozprawy doktorskiej jest podzielony na dwa zadania badawcze. W pierwszej części tego rozdziału doktorant przedstawia badania mające na celu poznanie motywów w sRNA oraz w regionach 3'UTR RNA rozpoznawanych przez białka Hfq oraz ProQ. Białko ProQ jest białkiem należącym do rodziny białek z domeną FinO. Przedstawione badania zostały wykonane *in silico*. Doktorant wykorzystał informacje z szeregu publikacji eksperymentalnych, w których analizowano z jakimi sekwencjami RNA w bakteriiach *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* i *Neisseria meningitidis* oddziałują białka Hfq oraz ProQ.

W szczególności poddał analizie 10 reszt nukleotydowych po stronie 5' szpilki Rho-niezależnych terminatorów transkrypcji. Pokazał, że dla *E. coli* oraz *S. enterica* sekwencje oddziałujące preferencyjnie z ProQ charakteryzowały się wzbogaceniem w reszty adenozyiny w analizowanym regionie, w odróżnieniu od sekwencji oddziałujących z Hfq, które są wzbogacone w reszty urydyny. Prowadzone badania wskazują, że wzbogacenie sekwencji RNA w adenozyiny skutkuje obniżonym powinowactwem w stosunku do Hfq. Takiej zależności doktorant nie zaobserwował dla sekwencji RNA pochodzących z bakterii *N. meningitidis*, gdzie sekwencje RNA oddziałujące z Hfq i ProQ były wzbogacone w reszty adenozyiny po stronie 5' szpilki terminatorowej w przypadku obu białek. Ta część wyników została opublikowana w czasopiśmie *Nucleic Acids Research* jako część artykułu.

Druga, znacznie dłuższa część rozdziału *Wyniki* jest poświęcona badaniom eksperymentalnym mającym na celu określenie cech cząsteczek RNA rozpoznawanych przez białko ProQ z *N. meningitidis*. Doktorant oczyścił to białko, a następnie analizował jego wiązanie do siedmiu sekwencji określonych wcześniej jako oddziałujące z ProQ i posiadających szpilkę Rho-niezależnego terminatora transkrypcji. Odpowiednie sekwencje RNA były syntezowane w firmie komercyjnej i oczyszczane przez doktoranta albo były produktem reakcji transkrypcji *in vitro* na odpowiedniej matrycy. W obu wypadkach doktorant przeprowadzał dodatkową procedurę ich oczyszczania oraz znakowania końca 5' radioaktywnym izotopem fosforu <sup>32</sup>P. Stała dysocjacji dla reakcji oddziaływania ProQ z odpowiednimi cząsteczkami RNA została wyznaczona w eksperymentach typu EMSA. Doktorant w tej części rozprawy doktorskiej rozpoczął badania od oznaczenia powinowactwa ProQ do każdego z siedmiu analizowanych konstruktów RNA. Następnie, w sposób bardzo metodyczny zmieniał sekwencje analizowanych RNA. Pokazał, że sekwencja Rho-niezależnego terminatora transkrypcji jest konieczna do wiązania RNA z białkiem ProQ. Pokazał następnie, że wydłużenie końca 3' poza region oligo(U) zmniejsza powinowactwo RNA do ProQ. Pokazał również, że skrócenie sekwencji Oligo(U) bardzo znacząco obniża oddziaływanie. W kolejnej serii eksperymentów doktorant analizował znaczenie sekwencji po stronie 5' szpilki terminatora. Wykazał, że sekwencja ta jest istotna dla oddziaływania z ProQ. W następnej serii eksperymentów mgr Basczok zanalizował wpływ zmian w samej sekwencji szpilki terminatora na siłę wiązania. Uzyskane wyniki pokazały, że usuwanie „górných” par nukleotydów ze struktury szpilki nie wpływało znacząco na oddziaływanie z ProQ co sugeruje istotność par nukleotydów znajdujących się w „dolnej” części spinki terminatora. W sumie w trakcie badań

*in vitro* wykonanych techniką EMSA doktorant zanalizował wiązanie ponad pięćdziesięciu różnych konstruktów RNA z białkiem ProQ. Każdy konstrukt RNA wymagał zaprojektowania, otrzymania, oczyszczenia oraz wyznakowania izotopem. W każdym doświadczeniu określającym siłę wiązania doktorant miareczkował białko ProQ i każde z tych doświadczeń było powtórzone trzykrotnie. To pokazuje ogrom pracy eksperymentalnej którą doktorant wykonał aby przeanalizować od jakich elementów sekwencji i struktury RNA zależy wiązanie białka ProQ z *N. meningitidis*. Chciałbym również podkreślić, że doświadczenia przeprowadzone przez doktoranta były w racjonalny sposób zaprojektowane i wykonane.

ProQ z *N. meningitidis* składa się wyłącznie z domeny FinO i znacząco różni się od swojego odpowiednika z *E. coli* zbudowanego dodatkowo z domeny Tudor oraz linkera łączącego tę domenę z domeną FinO. Dodatkowo, podobieństwo sekwencji aminokwasowej w domenie FinO w obu białkach nie jest duże. To powoduje, że nie można wyników dla ProQ z *E. coli* ekstrapolować dla układu doświadczalnego wykorzystującego ProQ z *N. meningitidis* oraz sekwencje RNA tej bakterii. Po przeczytaniu rozprawy nasunęło mi się kilka pytań do doktoranta. W eksperymentach EMSA zawsze pozostawała pewna frakcja nieoddziałującego z białkiem ProQ RNA, pomimo wzrostu stężenia ProQ i osiągnięcia wypłaszczenia krzywych wiązania. Czy w przypadku gdy taka frakcja była stosunkowo wysoka (np. Rysunek 27 i Tabela 1; iga-3'UTR oraz NMNc0006) doktorant przeprowadzał powtórny procedurę otrzymywania wyznakowanego RNA? Czy w takich przypadkach programy do analizy struktur RNA sugerowały, że może istnieć również struktura alternatywna? Czy doktorant próbował oznaczać stałą dysocjacji kompleksu badane RNA - ProQ innymi niż EMSA metodami? Jakie inne metody eksperymentalne można do takich badań próbować zastosować?

W rozdziale *Dyskusja* doktorant w sposób rzeczowy podsumowuje swoje wyniki, konfrontując je równocześnie z danymi literaturowymi.

Praca jest napisana w sposób jasny. Szata graficzna, przygotowanie rycin oraz edycja tekstu są bardzo staranne.

Podsumowując, praca doktorska pana mgr Macieja Basczoka przedstawia nowe, oryginalne badania w których doktorant z sukcesem przeprowadził analizę elementów w sekwencji i strukturze Rho-niezależnego terminatora istotnych dla oddziaływania ProQ z *N. meningitidis*. Doktorant wykazał, że w oddziaływaniu z ProQ bierze udział „dolna” część spinki terminatora wraz z sekwencją po stronie 5' oraz 3' terminalną sekwencją ogona oligo(U).

Realizowane przez doktoranta zadania badawcze uważam za ambitne oraz istotne z punktu widzenia naukowego i poznawczego.

Nie mam wątpliwości, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, tekst jednolity: Dz.U. z 2021 r. poz. 478. W związku z tym składam wniosek do Rady Dyscypliny nauki biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza o dopuszczenie Pana mgr Macieja Basczoka do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora.