



Prof. dr hab. Marcin Nowotny

Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Macieja Basczoka "Elementy sekwencji i struktury RNA rozpoznawane przez białka z domeną FinO"

Tematem pracy są bakteryjne białko opiekuńcze wiążące RNA. Celem było poznanie elementów RNA, które decydują o specyficznym oddziaływaniu tych białek, a w szczególności ProQ oraz Hfq, z danymi RNA. Nie będę szczegółowo opisywał całej treści pracy. Zostanie ona zaprezentowana podczas obrony. Chciałbym zwrócić uwagę na te elementy pracy, które uznałem za szczególnie istotne.

Wstęp napisany jest przystępnym językiem i umiejętnie wprowadza czytelnika w badaną tematykę. Opisuje mechanizmy regulacji genów przez bakteryjne krótkie RNA (sRNA) oraz białka opiekuńcze wiążące RNA. Oddzielne rozdziały poświęcono kanonicznemu białku Hfq oraz rodzinie białek z domeną FinO. Do tej drugiej grupy należy ProQ. Białko z *E. coli* zawiera N-kończącą domenę FinO, nieuporządkowany linker oraz C-kończącą domenę Tudor. Ortolog z *N. meningitidis* zawiera jedynie domenę FinO z krótkimi sekwencjami po obu stronach. Ważnym elementem wstępu jest rozdział opisujący wcześniejsze badania, które pokazały, że Hfq i ProQ wiążą różne pule RNA; ich wspólne ligandy stanowią znacząco mniejszość badanych RNA. To, czego zabrakło mi we wstępie to opis roli i mechanizmu działania Rho-niezależnych terminatorów transkrypcji. Jest to element, który odgrywa kluczową rolę w badaniach opisanych w pracy. Przypomnienie znaczenia fizjologicznego oraz mechanizmu działania terminatorów byłoby pomocne dla czytelnika, aby zrozumieć znaczenie opisywanych badań.

Rozdział Metody zawiera dokładny opis procedur eksperymentalnych, który powinien umożliwić powtórzenie przeprowadzonych eksperymentów. W pracy zastosowano metody bioinformatyczne do analizy sekwencji RNA wiązanych przez ProQ i Hfq. Część doświadczalna opierała się na oczyszczaniu białka oraz testów wiązania metodą różnicowej migracji kompleksów w żelu poliakrylamidowym (ang. electromobility shift assay EMSA).

Rozdział Wyniki składa się z dwóch części. Pierwsza zawiera analizę dostępnych, opublikowanych wcześniej danych z sekwencjonowania RNA (uzyskane metodami RIL-seq, CLIP-seq). Celem była analiza sekwencji po stronie 5' struktur spinki do włosów Rho-

niezależnych terminatorów transkrypcji wiązanych przez białka Hfq and ProQ. W skrócie białko ProQ z *E. coli* oraz *S. enterica* preferencyjnie wiąże struktury spinki do włosów, w których po stronie 5' pary zasad G/C u podstawy spinki znajdują się dwie do pięciu reszt adenozyne. Białko Hfq z *E. coli* i *S. enterica* wykazywało pewną preferencję dla reszt urydyny. Białko ProQ z *N. meningitidis* preferowało trzy adenozyne przed parą G/C u podstawy spinki. Co ciekawe, białko Hfq z tego samego organizmu miało podobną preferencję sekwencyjną, co ProQ, i jest to cecha, która odróżnia go od jego ortologów z *E. coli* i *S. enterica*. Oznacza to, że sekwencja po stronie 5' spinki terminatora nie jest elementem, który determinuje to, że białka Hfq i ProQ z *N. meningitidis* wiążą różne pule RNA. Stąd założenie, że jakieś inne elementy decydują o obserwowanych różnicach w wiązaniu RNA. Porównanie sekwencji aminokwasowej białek Hfq z *E. coli* i *N. meningitidis* wskazało elementy w sekwencji, które mogą odpowiadać za te różnice.

Druga część rozdziału Wyniki opisuje prace doświadczalne – wnikliwą analizę elementów determinujących preferencyjne wiązanie danych RNA przez ProQ z *N. meningitidis*. Białko oczyszczono do wysokiej homogenności. Wiązanie RNA badane metodą EMSA dla bardzo dużej liczby wariantów różnych RNA. Uznanie budzi przeprowadzenie tak szeroko zakrojonych i pracochłonnych badań. Wyniki pokazały, że ProQ wiąże strukturę spinki do włosów Rho-niezależnego terminatora transkrypcji z wysokim (nanomolarnym) powinowactwem. Dodatkowo doktorant pokazał stosując modelowe RNA oraz ich warianty, że:

- kluczowa dla wiązania spinki terminatora jest dostępność końca 3' oraz to, by zawierał ciąg co najmniej sześciu urydyn,
- wkład do wiązania ma również sekwencja po stronie 5' spinki,
- ProQ wiąże dolną część spinki.

W mojej opinii ważnym uzupełnieniem opisywanych prac byłyby doświadczenia, w których zbadano by współzawodnictwo Hfq i ProQ o wiązanie modelowych RNA. Chciałbym prosić Doktoranta o omówienie możliwych podejść doświadczalnych do wykonania tego typu eksperymentów. W części Wyniki zabrakło mi powiązania obu części (bioinformatycznej i doświadczalnej). Czy wszystkie RNA testowane *in vitro* posiadały sekwencję adenozyne przed parą G/C u podstawy spinki terminatora? Czy na podstawie zmierzonych stałych powinowactwa dla różnych RNA można potwierdzić preferencję dla adenozyne obserwowaną

w wynikach sekwencjonowania nowej generacji? Nasuwa mi się też pytanie techniczne. Wykresy analizy ilościowej doświadczeń EMSA pokazują wyniki dla trzech niezależnych pomiarów. Na wykresach nie pokazano jednak słupków błędów dla każdego pomiaru. Czy było to intencjonalne? Jaki był rozrzut poszczególnych pomiarów?

Rozdział Dyskusja zawiera kompletną i wnikliwą analizę uzyskanych wyników. Co ważne jasno definiuje braki w naszym rozumieniu oddziaływań białek Hfq oraz ProQ z terminatorami transkrypcji w tym kwestie, których nie udało się wyjaśnić w niniejszej pracy. Komplikacją tych badań jest to, że białka opiekuńcze mogą oddziaływać z RNA na kilka sposobów (opisano to np. dla Hfq). Oznacza to, że może być konieczne określenie wielu struktur przestrzennych dla kompleksów z różnymi RNA, aby w pełni zrozumieć molekularne determinanty badanych oddziaływań.

Podsumowując, opisane badania dostarczyły istotnych informacji o elementach decydujących o wiązaniu poszczególnych RNA przez białka Hfq i ProQ. Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska opisuje badania na wysokim poziomie merytorycznym i technicznym. Uważam, że rozprawa spełnia warunki określone w ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.) i z pełnym przekonaniem wnioskuję o dopuszczenie Pana mgr Macieja Basczoka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Marcin Nowotny