

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

Gdańsk, dn. 27 lipca 2021 r.

**Ocena rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny Kwiatkowskiej
„Mechanizm działania białka opiekuńczego Hfq w tworzeniu kompleksów
pomiędzy regulatorowymi RNA MgrR i ChiX, a cząsteczkami mRNA u bakterii
Escherichia coli”.**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pani mgr Joanny Kwiatkowskiej została wykonana pod opieką pana dr hab. Mikołaja Olejniczaka, prof. UAM, i realizowana w Zakładzie Biochemii Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Praca doktorska była finansowana z kilku grantów: Narodowego Centrum Nauki (OPUS 2011/01B/NZ1/05325 oraz 2015/15/B/NZ1/03330), Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej (projekt TEAM) oraz grantu Dziekana Wydziału Biologii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza.

Praca pani mgr Joanny Kwiatkowskiej dotyczy roli małych cząsteczek kwasów rybonukleinowych (czyli tzw. sRNA) w genetyce komórek bakterii. Odgrywają one bardzo ważne funkcje w zasadzie we wszystkich procesach życiowych bakterii, tych podstawowych, tych związanych ze stresem, i tych dotyczących patogenności bakterii względem zdrowia człowieka. Molekularny efekt sRNA wyraża się w ich niezwykłych interakcjach z innymi sRNA, a także z matrycowym RNA przy współdziałaniu białek i innych modulatorów reakcji. Rozumienie zjawisk związanych z biochemią tych oddziaływań jest kluczowe dla poznawania różnorodności efektów regulatorowych w skomplikowanych, wielopoziomowych zależnościach genetycznych bakterii. Eksploracja „świata sRNA” ciągle trwa w nauce i jesteśmy zaskakiwani coraz nowymi mechanizmami ich wpływu na aktywację lub wyciszenie genów. Dlatego przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska wpisuje się w nurt niezwykle interesujących i bardzo aktualnych badań.

Przedstawiana rozprawa doktorska liczy 157 stron tekstu wzbogaconego o 50 rycin i 8 tabel. Praca została napisana w spójnym tematycznie opracowaniu, o układzie tekstu typowym dla eksperymentalnych prac doktorskich z rozdziałami w następującej kolejności: tytuł pracy, spis treści, streszczenie w jęz. polskim i angielskim, wprowadzenie, cele pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja, podsumowanie z wnioskami końcowymi, wykaz rycin i tabel oraz spis literatury liczący 191 pozycji.

W liczącym 43 strony **Wprowadzeniu** pani mgr Joanna Kwiatkowska na podstawie przeglądu danych literaturowych bardzo obszernie opisuje rodzaje regulatorowych RNA, czyli charakteryzuje grupę ryboprzełączników i termosensorów, RNA związane z systemami CRISPR oraz najliczniejszą grupę sRNA działających *in cis* i *in trans*. Następnie na konkretnych przykładach przedstawia różne mechanizmy kontroli ekspresji genów przez sRNA oraz omawia budowę i funkcję białka opiekuńczego Hfq, który pośredniczy w procesach oddziaływania cząsteczek RNA. Rozdział ten jest bogato ilustrowany, co pozwala na szybsze zrozumienie skomplikowanych procesów z udziałem cząsteczek RNA. Jest też napisany zwięzłym językiem, w dobrej stylistyce, co sprawia, że rozdział dobrze się czyta i co świadczy o bardzo dobrej orientacji Autorki o stanie wiedzy w zagadnieniach podjętych w rozprawie. Wprowadzenie kończy się uzasadnieniem wyboru modelowych cząsteczek RNA do badań, których efekt *in vivo* częściowo już poznano, ale Autorka zwraca uwagę, że ten niepełny obraz powinien być wsparty o ustalenie szczegółowych biochemicznych mechanizmów *in vitro*, co czyni dalej formułując **Cele pracy**. Doktorantka nakreśliła je w postaci dwu głównych zadań badawczych, dotyczących oznaczenia roli białka Hfq w pośredniczeniu oddziaływań sRNA z ich regulowanymi cząsteczkami. W pierwszym zadaniu celem jest rola i mechanizm białka Hfq w tworzeniu kompleksów pomiędzy cząsteczką sRNA MgrR, a cząsteczkami mRNA genów *eptB* i *ygdQ*. Drugie zadanie zaś skupia się na porównaniu roli białka Hfq w tworzeniu kompleksów pomiędzy cząsteczkami sRNA Klasy II MgrR i ChiX, a regulowanymi przez nie, wybranymi cząsteczkami mRNA. Do każdego z dwu zadań Autorka dobrała poprawnie po kilka zadań szczegółowych, których wykonanie wymagało pracochłonnych podejść eksperymentalnych i zdobycia biegłości w pracy *in vitro* z RNA (o czym świadczy też opracowanie rozdziału Materiały i Metody), co w mojej opinii Doktorantka osiągnęła w najwyższym stopniu.

W najważniejszym rozdziale **Wyniki** Autorka najpierw przedstawia wątek związany z mechanizmem regulatorowym cząsteczki sRNA MgrR uczestniczącej w adaptacji komórki bakterii do niedoborów jonów magnezu. Zastosowane podejścia eksperymentalne obejmują, m.in: mapowanie struktury drugorzędowej tej cząsteczki oraz wybranych cząsteczek mRNA, z którymi oddziałuje MgrR, ustalenie interakcji z białkiem opiekuńczym Hfq w kompleksach dwu- i trójskładnikowych z uwzględnieniem motywów w RNA rozpoznawanych przez Hfq, w technice różnicowej migracji w żelu poliakrylamidowym (EMSA). Autorka wykazała, że MgrR jednocześnie oddziałuje ze stroną proksymalną i dystalną Hfq. Za szczególnie istotne dla tej rozprawy uważam analizy biochemiczne asocjacji badanych cząstek RNA z udziałem Hfq i wyznaczenie stałych dysocjacji. Na podstawie pomiarów kinetycznych Doktorantka z dużym sukcesem opracowała model globalny uwzględniający szereg możliwych interakcji MgrR-mRNA-Hfq z zastosowaniem algorytmu do symulacji dynamiki reakcji biochemicznych, co pozwoliło na przewidywanie poszczególnych etapów reakcji asocjacji z różnymi składnikami kompleksów przejściowych. Wykonała takie modele globalne także dla wariantów Hfq z defektem wiązania RNA po stronie proksymalnej, dystalnej i bocznej. Autorka zinterpretowała otrzymane wyniki, i określiła, że brak wiązania ze strony proksymalnej wpływa na brak stymulacji wiązania MgrR do mRNA i powstaje tylko znikoma ilość kompleksu trójskładnikowego z białkiem. Z kolei defekt w stronie dystalnej białka Hfq wpływa na powstawanie pewnej ilości kompleksu MgrR-mRNA-Hfq, ale mniejszej niż w reakcjach z Hfq typu dzikiego. Natomiast wariant Hfq z zaburzeniem wiązania RNA ze strony bocznej wykazywał silne wiązanie sRNA do białka Hfq, które uniemożliwiało asocjację z mRNA. Ponadto Autorka wykazała dla poszczególnych badanych mRNA obecność motywów bogatych w reszty urydyny i adenozyne kluczowych dla wiązania Hfq. Potwierdziła eksperymentalnie, że mutacje w tych motywach skutkują brakiem formowania się kompleksów trójskładnikowych.

W realizacji drugiego celu badawczego Autorka stosuje analogiczne podejścia eksperymentalne, w których uzyskała już duże doświadczenie podczas pierwszego zadania i testuje je na modelu cząsteczki RNA ChiX oddziałującej z mRNA genu *chiP*, a biorącej udział w regulacji homeostazy chitocukrów. Dodatkowo Doktorantka testuje efekt kompetytorowego sRNA na proces dysocjacji kompleksu ChiX-*chiP* od białka Hfq. Wyniki pokazują, że defekt wiązania RNA po stronie dystalnej, a nie proksymalnej Hfq wpływa na formowanie się kompleksu trójskładnikowego, zaś strona boczna Hfq,

podobnie jak w przypadku MgrR, wpływa pozytywnie na proces asocjacji ChiX do mRNA i uwalnia białko. Zaciekało mnie, że proces asocjacji i dysocjacji cząsteczek RNA przy współudziale białka Hfq zależny jest również od właściwości kompetycyjnych cząsteczek RNA, gdzie pewne RNA mogą łatwiej wypierać inne RNA z wiązania do Hfq. Zastanawia mnie aspekt biologiczny tego zjawiska. Zakładając, że pula komórkowa Hfq jest ograniczona, czy to znaczy, że pewne sRNA będą mieć ułatwiony dostęp do Hfq? Czy to jest determinowane biologicznie w ten sposób, że te wspomniane sRNA biorą udział w bardziej ważnych procesach komórkowych lub ich rola jest bardziej nadrzędna, bo są skutecznymi kompetytorami? Innymi słowy, na przykładzie Tabeli 1, czy można powiedzieć, że ChiX pełni ważniejszą rolę w komórce niż cząsteczki RNA takie jak, McaS, czy CyaR?

Rozdział **Dyskusja** jest napisany na bardzo wysokim poziomie. Autorka bardzo swobodnie swoje wyniki i obserwacje zestawia z danymi literaturowymi i właściwie przedyskutowuje. Nie mam żadnych wątpliwości, że w tym rozdziale Autorka udowadnia poziom ekspercki w swojej dziedzinie. Na szczególne uznanie zasługuje w mojej opinii zaproponowanie modelu mechanizmu asocjacji sRNA MgrR do mRNA *eptB* przy współudziale białka opiekuńczego Hfq. Jest również cenne, że Autorka rozumie znaczenie i ograniczenia swoich badań, co wynika m.in. ze stwierdzenia umieszczonego pod koniec rozdziału, że „analiza *in vitro* jest jedynie uproszczoną formą zjawisk” występujących w żywych komórkach. Taka uwaga niewątpliwie świadczy o osiągniętej dojrzałości badawczej Autorki.

Równie wysoko oceniam rozdział **Wnioski Końcowe**, który streszcza osiągnięte cele naukowe i podsumowuje podobieństwa i różnice w testowanych modelach badawczych.

Jeśli chodzi o sposób przedstawienia rozprawy doktorskiej od strony formy językowej, oceniam, iż praca została napisana bardzo dobrym językiem i niemal bez błędów edytorskich. Jest też napisana z dużym wyczuciem estetycznym i dbałością o szatę graficzną.

Podsumowanie

Na podstawie przeprowadzonej analizy merytorycznej i formalnej oceniam rozprawę doktorską Pani mgr Joanny Kwiatkowskiej pozytywnie. Stwierdzam, że stanowi ona oryginalne opracowanie oraz, że dostarczyła bardzo wartościowych wyników poszerzających naszą wiedzę z zakresu biochemii regulatorowych cząsteczek RNA. Dowodem tego jest też opublikowanie tych wyników w czasopiśmie „RNA”. Pragnę bardzo pochwalić Autorkę za pracowitość i za niezwykłą zręczność w warsztacie biochemii kwasów nukleinowych. Ponadto Doktorantka potrafiła w sposób syntetyczny opracować swoje wyniki naukowe i przedyskutować je wobec aktualnych, najnowszych danych literaturowych z zakresu związanego z pracą doktorską.

Oświadczam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska w pełni spełnia wymogi ustawowe. Wnoszę, zatem do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o przyjęcie tej rozprawy i dopuszczenie pani mgr Joanny Kwiatkowskiej do dalszych etapów postępowania przewidzianego w przewodzie doktorskim. Jednocześnie, biorąc pod uwagę wartość naukową uzyskanych wyników oraz ich opublikowanie w prestiżowym czasopiśmie „RNA”, wnioskuję o stosowne wyróżnienie tej rozprawy.



Dr hab. Iwona Mruk, prof. UG

