

Recenzja pracy doktorskiej mgr Eweliny Małeckiej-Grajek pt.:

Specyficzność rozpoznawania małych regulatorowych RNA przez białko opiekuńcze Hfq

Praca doktorska mgr Eweliny Małeckiej-Grajek powstała w Instytucie Biologii Molekularnej i Biotechnologii Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza, w Zakładzie Biochemii kierowanym przez prof. UAM dr hab. Mikołaja Olejniczaka. Praca dotyczy oddziaływań małych bakteryjnych sRNA z białkiem opiekuńczym Hfq, a więc tematu, który zgłębiany jest w Zakładzie promotora, prof. Mikołaja Olejniczaka od kilku lat. Mimo dość rozległej wiedzy literaturowej na ten temat wciąż mechanizmy odpowiedzi komórki bakteryjnej na stres, w których uczestniczy Hfq są w pewnych obszarach niewyjaśnione. Takim obszarem jest spojrzenie na wpływ struktury sRNA oraz kompetycja różnych sRNA w oddziaływaniach z Hfq. Ten właśnie temat podjęła w swej rozprawie doktorskiej mgr Małecka-Grajek.

Celem ogólnym pracy doktorskiej było zbadanie właściwości cząsteczek sRNA, które odpowiadają za specyficzność oddziaływań sRNA/Hfq, a celami szczegółowymi było zidentyfikowanie elementów strukturalnych występujących w cząsteczkach sRNA, które są rozpoznawane przez Hfq, określenie roli poszczególnych miejsc wiązania RNA na powierzchni Hfq dla różnych sRNA i ich znaczenie w oddziaływaniach cząsteczek sRNA z komplementarnymi do nich anty-sRNA. Stwierdzam, że sformułowane cele badawcze zostały przez doktorantkę w pełni osiągnięte.

Praca doktorska posiada tradycyjny układ. Zawiera wszystkie rozdziały wymagane w rozprawie doktorskiej, w tym Streszczenie, Wstęp, Cel pracy, Materiały, Metody, Wyniki, Dyskusję i Wnioski. We Wstępie mgr Ewelina Małecka-Grajek zawarła literaturowe informacje na temat funkcji sRNA kodowanych w *trans*, a także znane fakty wpływu struktury sRNA i działania anty-sRNA na mechanizm regulacji ekspresji genów z udziałem sRNA. W drugiej części tego rozdziału doktorantka przedstawia obecny stan wiedzy na temat roli i mechanizmu działania białka opiekuńczego Hfq w potranskrypcyjnej regulacji translacji. Wstęp napisany jest czytelnie i ułatwia pełne zrozumienie i odpowiednie umiejscowienie badań doktorantki w świetle poznanych już faktów z tej dziedziny biologii bakterii. Rozdziały Materiały i Metody są zwarte i zawierają niezbędne informacje dla odtworzenia eksperymentów.

Do badań doktorantka wybrała siedem sRNA, różniących się kompetycyjnością wiązania z Hfq, a mianowicie; ChiX, OxyS, RybB, SgrS, DsrA, IstR1 i McaS. Doktorantka określiła nieznana do tej pory strukturę drugorzędową sRNA SgrS i McaS stosując hydrolizę enzymatyczną. Ich struktury oraz struktury pozostałych wymienionych sRNA, znane z doniesień literaturowych, posłużyły do interpretacji wyników badań ich dwu- i trójskładnikowych kompleksów z Hfq. W systematycznych badaniach zdolności do kompetycji wybranych sRNA doktorantka wykazała m.in., że ChiX, OxyS i DsrA są najbardziej efektywnymi kompetytorami oraz wskazała na odmienny, dwufazowy mechanizm wiązania dla słabszych kompetytorów IstR1 i SgrS. Dane dodatkowo wykazały, że najsilniejszym kompetytorem był ChiX.

Bardzo interesujące są wyniki badań z zastosowaniem chimerycznych konstruktów sRNA zawierających różne elementy strukturalne wybranych sRNA. Mgr Ewelina Małecka-Grajek zauważyła, że przede wszystkim struktura 5'-końcowego oraz centralnego rejonu sRNA wpływa na kompetycje o Hfq. Na uwagę zwraca staranne zaprojektowanie modelowych chimerycznych sRNA, których strukturę potwierdzono eksperymentalnie.

Kolejnym etapem było sprawdzenie, jakie powierzchnie w Hfq są zaangażowane w wiązanie poszczególnych sRNA. Mgr Małecka-Grajek zastosowała w tym celu otrzymane w zespole prof. Olejniczaka mutanty Hfq. Za jeden z najważniejszych wyników jej badań można uznać wykazanie, że RybB, DsrA i McaS są rozpoznawane nie tylko przez stronę proksymalną Hfq, ale również boczną. Doktorantka wykazała tworzenie się odmiennego typu oddziaływań dla ChiX, dla którego rozszerzone badania określiły, że oddziałuje ono ze stroną proksymalną i dystalną Hfq.

Badania doktorantki przyczyniły się do usystematyzowania wiedzy o sRNA, które można podzielić na dwie klasy. Klasa I to sRNA z rejonami wewnętrznymi bogatymi w urydyny, zależne od strony bocznej Hfq, a klasa II sRNA jest rozpoznawana przez stronę dystalną białka Hfq, z udziałem rejonów sRNA bogatych w adenozyne. W dyskusji wyników porównując badania własne z doniesieniami literaturowymi doktorantka wyjaśniła mechanizm działania sRNA ChiX, który owija się wokół Hfq kotwicząc po stronie proksymalnej poprzez rejonu zawierające U, a struktura sRNA umożliwia specyficzne oddziaływanie również ze stroną dystalną Hfq.

Dodatkowo, doktorantka analizowała wpływ anty-sRNA względem sRNA, które oddziałują z innymi powierzchniami Hfq, a mianowicie ChiX i AgvB oraz Ryb B.

Przeprowadzono szerokie badania stałych szybkości reakcji dysocjacji wiązania sRNA i regulujących je anty-sRNA oraz ich mutantów, do Hfq naturalnego i zmutowanego. Na podstawie tych badań i porównań z dostępnymi informacjami literaturowymi doktorantka określiła, bądź potwierdziła, udział różnych stron Hfq w tworzeniu potrójnych kompleksów sRNA/Hfq/anty-sRNA i specyficzność tych wiązań w zależności do sRNA i anty-sRNA. Dla pary chbBC-IGR/ChiX wykazała, że jest to strona boczna Hfq, dla RybB/3'ETS^{leuZ} - strona dystalna, a dla AgvB/GcvB - strona boczna i dystalna Hfq.

Ciekawym wynikiem jest zaobserwowanie konkurencji między niektórymi sRNA i anty-sRNA o wiązanie do Hfq. Badania te pokazały z jednej strony istnienie niezwykle specyficznych oddziaływań (układ sRNA ChiX/Hfq/chbBC-IGR) oraz oddziaływań bardziej labilnych, zależnych od dostępności tej samej, bocznej powierzchni białka Hfq (sRNA AgvB/GcvB), co poprzez konkurencję prowadzi do zmniejszenia szybkości asocjacji cząsteczek.

Praca napisana jest bardzo starannie i czyta się ją z przyjemnością. Mgr Małecka-Grajek przeprowadziła wyrafinowane i systematyczne badania mechanizmu regulacji translacji, które stanowią spójną całość poszerzając wiedzę podstawową w tej dziedzinie. Zastosowanie odpowiednio dobranych technik oraz mutantów zarówno wybranych sRNA, anty-sRNA, jak i Hfq pozwoliło zaproponować prawdopodobny mechanizm oddziaływania danego sRNA z uwzględnieniem jego struktury drugorzędowej.

Badania i dyskusja jest spójna, a wyniki korelują z danymi literaturowymi, również tymi przeprowadzonymi *in vivo*. Recenzent zastanawia się jednak czy w przeprowadzonych eksperymentach *in vitro* obecność lub brak MgCl₂, a także wybrane różne warunki buforowe (przy enzymatycznej hydrolizie) nie wpływają na strukturę badanych sRNA. Zastosowano w badaniach struktury RNA warunki fałdowania zaczynające się denaturacją w 90°C i odstawieniem próbki na 10 min w temperaturze pokojowej (a więc stosunkowo szybki i krótki był to proces), następnie przeprowadzono hydrolizę enzymatyczną w buforze bez MgCl₂. Tymczasem eksperymenty wiązania z białkiem Hfq prowadzone były w obecności 2.5 mM MgCl₂. Czy doktorantka potwierdziła na żelu natywnym obecność jednej struktury sRNA dla tych warunków fałdowania, w różnych buforach stosowanych przy enzymatycznej hydrolizie, które nie zawierały MgCl₂? Dodatkowo, w badaniach szybkości asocjacji sRNA i anty-sRNA, recenzent odczytał, że nie było MgCl₂ w stosowanym buforze. Czy doktorantka mogłaby uzasadnić taką decyzję?

Prosiłabym również doktorantkę o jej opinię jak można wykorzystać przygotowane mutanty cząsteczek RNA i Hfq w badaniach *in vivo*, jaki eksperyment *in vivo* uważałaby za najważniejszy dla potwierdzenia swoich wniosków o mechanizmach oddziaływań, w których uczestniczy sRNA.

Podsumowując, przedstawione w rozprawie doktorskiej badania dostarczają nowych informacji o regułach rozpoznawania sRNA przez białko Hfq, co w kontekście znanych faktów literaturowych wyjaśnia niektóre mechanizmy regulacji translacji, w których badane sRNA uczestniczą. Pragnę stwierdzić, że przedstawiona do oceny praca doktorska mgr Eweliny Małeckiej-Grajek spełnia całkowicie wymagania merytoryczne i formalne stawiane pracom doktorskim i wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie mgr Eweliny Małeckiej-Grajek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Elżbieta Kierzek

dr hab. Elżbieta Kierzek, profesor IChB PAN