



UNIwersytet GDAŃSKI

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

Gdańsk, dnia 09 kwietnia 2018 roku

**Ocena rozprawy doktorskiej Pani mgr Darii Sobańskiej
„Znaczenie sekwencji i struktury mRNA i anty-sRNA w ich oddziaływaniach z
niekodującymi RNA bakterii”.**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pani mgr Darii Sobańskiej została wykonana pod opieką pana dr hab. Mikołaja Olejniczaka, prof. UAM, a zrealizowana 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 Darii Sobańskiej dotyczy biochemii oddziaływań tzw. sRNA, czyli małych cząsteczek kwasów rybonukleinowych (zazwyczaj do 200 nt) z innymi sRNA na modelu wybranych cząsteczek RNA, w tym RybB pochodzącej z *Salmonella enterica*. Cząsteczki sRNA pełnią w komórkach prokariotycznych bardzo ważną rolę regulatorową, praktycznie we wszystkich procesach życiowych, tych podstawowych, i tych związanych ze stresem komórkowym. Są to zwykle regulacje złożone, angażujące więcej niż jeden rodzaj cząsteczek RNA oddziałujący z kilkoma innymi cząsteczkami RNA w sposób aktywujący lub hamujący. W efekcie, obserwuje się skomplikowaną sieć zależności genetycznych, często także o charakterze pośrednim, sprawiającą, że studiowanie biologii i biochemii sRNA jest wyjątkowo trudne, ale możliwe. „Świat sRNA” jest szalenie fascynujący z uwagi m.in. na różnorodność mechanizmów regulatorowych, które są ciągle jeszcze mało scharakteryzowane. Dlatego przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska wpisuje się w nurt interesujących i bardzo aktualnych badań

naukowych oraz podejmuje trud wyjaśniania pewnych nowych aspektów biochemicznych oddziaływań RNA–RNA.

Przedstawiana rozprawa doktorska liczy 150 stron, w tym 32 rozbudowane ryciny, 3 tabele oraz 232 pozycje literaturowe. Praca została napisana w układzie tekstu typowym dla eksperymentalnych prac doktorskich w rozdziałami w następującej kolejności: tytuł pracy, spis treści, streszczenie w jęz. polskim i angielskim, wstęp, cele pracy, materiały, metody, wyniki, dyskusja, wnioski oraz spis literatury.

W liczącym 31 stron **Wstępie** pani mgr Daria Sobańska na podstawie przeglądu danych literaturowych przedstawia wybrane zagadnienia związane z klasyfikacją sRNA, ich funkcją, rolą wybranych RNA w stresie komórkowym, wreszcie zróżnicowaniem struktur sRNA. Dalej skupia się na charakterystyce oddziaływań sRNA z regulowanymi mRNA i wyczerpująco opisuje na przykładach mechanizmy regulacji ekspresji mRNA ze skutkiem negatywnym i pozytywnym. W końcowej części Wstępu Autorka objaśnia rolę, strukturę i mechanizmy działania białka opiekuńczego Hfq w oddziaływaniach pomiędzy cząsteczkami RNA. Píše także o innych mniej znanych, bądź przypuszczalnych funkcjach tego białka. Tę część pracy oceniam bardzo wysoko. Rozdział ten jest napisany zwięzłym językiem, bardzo klarownie, co pozwala czytelnikowi swobodnie przejść przez skomplikowane zagadnienia regulacji z udziałem sRNA. Jest też bardzo bogato ilustrowany, co ułatwia zrozumienie tekstu.

Następnie Doktorantka jasno i zwięzle nakreśla **cele pracy** w postaci dwu głównych zadań badawczych wraz z kilkoma celami szczegółowymi. Generalnie pierwsze zadanie dotyczy określenia istotności występowania zasady purynowej w mRNA w pozycji 3' względem miejsca wiązania sRNA. Drugie zadanie zaś skupia się na oznaczeniu roli białka Hfq w pośredniczeniu oddziaływań sRNA z ich regulatorowymi cząsteczkami anti-sRNA lub regulowanymi mRNA.

W rozdziale **Materiały i Metody** Autorka w sposób syntetyczny opisuje zastosowane metody, które dzieli na metody mikrobiologiczne, biologii molekularnej oraz na metody pracy z RNA i białkami. Opisy oceniam jako bardzo zasadne i pozwalające na zrealizowanie i powtórzenie zadań badawczych. Ponadto trzeba zaznaczyć cenną współpracę z prof. Ryszardem Kierzakiem z Zakładu Chemii i Biologii Strukturalnej Kwasów Nukleinowych Instytutu Chemii Bioorganicznej w Poznaniu w zakresie syntezy oligorybonukleotydów stosowanych w pracy.

W kluczowym rozdziale **Wyniki** Autorka najpierw prezentuje eksperymenty używając modelowej cząsteczki sRNA – RybB, które wskazują, że w regulowanych mRNA puryna

w pozycji 3' względem wiązania z sRNA oprócz stabilności termodynamicznej zwiększa szybkość asocjacji sRNA do regulowanych mRNA. Istotność zasady purynowej Autorka wykazała dla różnych substratów, krótkich oraz kilku pełnej długości mRNA – naturalnych cząsteczek mRNA regulowanych przez RybB wobec ich zmutowanych wariantów. Autorka powołuje się na fakt konserwowanej lokalizacji omawianej zasady purynowej, ale nie przedstawia żadnego zestawienia graficznego, które by go dokumentowało. Przedstawia jedynie grupę pięciu wybranych mRNA w interakcji z RybB na Rycinie 13. Brakuje mi również na tej rycinie zaznaczenia lokalizacji sekwencji wiążącej rybosom (rbs) w mRNA. Ciekawi mnie, czy testowana w niniejszej pracy, w ramach pierwszego zadania badawczego pozycja 3' jest szczególna dla większości mRNA, które są regulowane negatywnie przez sRNA, czy też ma to znaczenie tylko dla grupy nielicznych wybranych sRNA, jak RybB? Czy istnieją jeszcze inne zakonserwowane pozycje, czy to w mRNA, czy w samym sRNA, które są warte badania ich istotności poza oczywistymi pozycjami, które są ważne dla uzyskania ich aktywnych struktur?

W dalszej części związanej z realizacją pierwszego zadania badawczego pani Daria Sobańska skupia się na roli białka Hfq we wspomnianych interakcjach cząsteczek RNA i wykazuje, że białko to niejako kompensuje efekt różnic w szybkości asocjacji kompleksów RybB z ich mRNA naturalnym i tym zmutowanym w badanej pozycji 3'. W zastosowanych warunkach efekt represji translacji wybranego mRNA poprzez RybB z udziałem Hfq jest niemal jednakowy bez względu na rodzaj nukleotydu w badanej pozycji 3' testowanego mRNA. Jak Autorka może skomentować te obserwacje w odniesieniu do warunków *in vivo*, gdzie białko Hfq jest obecne?

W realizacji drugiego celu badawczego związanego z określeniem funkcji białka Hfq zwłaszcza w interakcjach cząsteczek sRNA z cząsteczkami anty-sRNA, czyli ich inhibitorami, doktorantka stara się porównać, czy rola i mechanizm białka Hfq jest inny od tej obserwowanej dla interakcji cząsteczek sRNA z ich regulowanymi mRNA. Autorka najpierw eksperymentalnie potwierdza strukturę cząsteczek RNA używanych do analiz, potem ustala lokalizację wiązania poszczególnych cząsteczek RNA na powierzchni Hfq metodą reakcji kompetycji wobec znakowanych radioaktywnie oligorybonukleotydów wiążących się specyficznym do części dystalnej, bądź proksymalnej Hfq. Następnie uzyskane wyniki krytycznie porównuje z obecnością motywów strukturalnych w sekwencjach RNA przewidywanych jako miejsca wiązania

białka Hfq. W zastosowaniu tej techniki nie wynikało dla mnie dość jasno z opisu, kiedy określa się wiązanie RNA do powierzchni bocznej w strukturze białka Hfq. Czy w przypadkach, gdy zdolność konkurencji badanego RNA z oboma oligo RNA w części dystalnej i proksymalnej jest słaba, czy inaczej (Tabela 3)? Proszę o odniesienie się do tej kwestii.

W dalszych eksperymentach Doktorantka weryfikuje swoje wyniki w oparciu o testy analizy różnicowej migracji w żelu kompleksów RNA – RNA wraz z Hfq typu dzikiego oraz trzech wariantów K56A, Y25D oraz R16A, z których każdy był defektywny w wiązaniu RNA z powierzchnią białka odpowiednio proksymalną, dystalną oraz boczną. Autorka uzyskuje różnice w typie wiązania poszczególnych testowanych sRNA i anty-sRNA do Hfq, ale generalnie oddziaływanie anty-sRNA z sRNA za pośrednictwem Hfq jest analogiczne do mechanizmu wiązania się sRNA do regulowanego mRNA. Niektóre testowane anty-sRNA wykazują większe powinowactwo do wiązania ich sRNA, niż sRNA do wiązania mRNA, co udowadnia regulatorową rolę anty-sRNA w zmniejszaniu puli komórkowego sRNA. Niemniej jednak, funkcja Hfq jest kluczowa dla oddziaływań RNA – RNA. Interesuje mnie, co Autorka sądzi o regulacji ekspresji genów z udziałem sRNA u mikroorganizmów, które nie mają homologa Hfq? Czy coś wiadomo na ten temat?

Jedynym mankamentem w bardzo dobrym opracowaniu rozdziału Wyniki w mojej opinii jest brak odwoływania się do informacji zawartych w rozdziałach, takich jak Materiały, czy Metody, co ułatwiałoby śledzenie szczegółów technicznych przeprowadzanych eksperymentów.

Rozdział **Dyskusja** jest napisany dojrzałe i rzeczowo. Autorka swoje 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 na ogół 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. Ryc. 24A, a nie 25A, str. 98) oraz przypadków użycia żargonu laboratoryjnego, np. „wyższa frakcja związana” (str. 107), zamiast frakcja wolniej migrująca; „konserwatywna puryna” (str. 75), zamiast konserwowana puryna; czy

„strony białka” (str. 114). Pragnę podkreślić, że uchybienia te nie wpływają na ostateczną ocenę pracy doktorskiej, ani nie pomniejszają wartości badawczej doktorantki.

Podsumowanie

Na podstawie przeprowadzonej analizy merytorycznej i formalnej oceniam rozprawę doktorską Pani mgr Darii Sobańskiej 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 białka Hfq pośredniczącego w tych oddziaływaniach. Pragnę podkreślić dużą ilość włożonej pracy laboratoryjnej kandydatki, która wykazała się samodzielnością badawczą opanowując biegle warsztat biochemiczny, warsztat pracy z izotopami oraz pracy z RNA. Potrafiła 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 stosownej ustawie „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach w zakresie sztuki”. Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza o przyjęcie tej rozprawy i dopuszczenie pani mgr Darii Sobańskiej do dalszych etapów postępowania przewidzianego w przewodzie doktorskim.

Dr hab. Iwona Mruk

