



UNIwersytet Gdański



Prof. dr hab. Agnieszka Szalewska-Pałasz
Katedra Genetyki Molekularnej Bakterii
Uniwersytet Gdański
ul. Wita Stwosza 59
80-308 Gdańsk

Gdańsk, 06.06.2017

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani magister Eweliny Małeckiej-Grajek

"Specyficzność rozpoznawania małych regulatorowych RNA przez białko opiekuńcze Hfq"

Od czasu zaproponowania teorii operonu, badania nad regulacją ekspresji genów wykazały wiele mechanizmów kontroli funkcjonowania komórek na poziomie ilości powstających transkryptów, ich stabilności, możliwości ich translacji a także wydajności syntezy białka. Szczególnie istotne są badania prowadzone na modelu bakteryjnym, gdzie procesy te przestrzennie i funkcjonalnie skorelowane, poznawane są w szczegółach molekularnych. Istotną rolę dla poznania działania mechanizmów regulatorowych odgrywają białka oddziałujące z kwasami nukleinowymi w procesach transkrypcji, translacji i replikacji. Zazwyczaj, białka takie należą do czynników globalnej regulacji, uczestnicząc w wielu procesach. Do takich białek zalicza się niewielkie, funkcjonujące jako heksamery, białko Hfq. Białko to, opisane po raz pierwszy jako niezbędne do rozwoju bakteriofaga QB, zostało następnie intensywnie badane w zakresie jego działania jako ryboregulatora. Na istotność pełnionych przez nie funkcji wskazuje obecność homologów Hfq w wielu organizmów oraz efekty plejotropowe braku Hfq w komórce. Mimo wielu raportów na temat roli białka Hfq w oddziaływaniach między RNA i funkcji tych interakcji w regulacji ekspresji genów, mnogość poszczególnych doniesień nie pozwalała wyciągnąć jednoznacznych wniosków na temat generalnego modelu oddziaływań między sRNA

a Hfq szczególnie w zakresie specyfiki ich struktur i sekwencji. Dlatego podjęcie tej problematyki badawczej przez Panią mgr Ewelinę Małecką-Grajek w swojej rozprawie doktorskiej uważam za wysoce uzasadnione i cenne naukowo.

Pani Małecka-Grajek wykonywała prace nad doktoratem w Zakładzie Biochemii Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu, pod kierunkiem prof. Mikołaja Olejniczaka. Zespół Pana profesora już od wielu lat zajmuje się rolą regulatorowych RNA w komórkach bakteryjnych, zatem Doktorantka mogła skorzystać z bogatego doświadczenia i zaplecza naukowego zespołu, co przyniosło skutek w postaci bardzo dobrej rozprawy doktorskiej.

Głównym celem pracy doktorskiej Pani Małeckiej-Grajek było zbadanie oddziaływań między sRNA a białkiem Hfq i roli, jaką w tych oddziaływaniach pełnią strukturalne cechy cząsteczek RNA oraz poszczególne powierzchnie wiązania w strukturze białka. Modelem badawczym były znane cząsteczki sRNA o różnych strukturach, w pracy wykorzystano także szereg skonstruowanych w ramach tego projektu cząsteczek zawierających określone zmiany w sekwencjach, odzwierciedlające się w ich strukturze. W pracy wykorzystano też białka Hfq ze zmienionymi aminokwasami, wpływającymi na wiązanie RNA. Wyniki zaprezentowane w ocenianej rozprawie oparte są o metodycznie przeprowadzone, i dokładnie udokumentowane doświadczenia biochemiczne: wiązania sRNA do Hfq i kompetycji pomiędzy cząsteczkami sRNA. Praca wykorzystująca bardzo szeroki zestaw cząsteczek RNA oraz precyzyjne pomiary m.in. stałej wiązania i szybkości asocjacji i dysocjacji kompleksów białko-RNA wymaga nie tylko dużego nakładu pracy ale dokładności i sumienności w przeprowadzeniu analiz i ich dokumentowaniu. Z tym zadaniem Doktorantka poradziła sobie bardzo dobrze.

Do głównych osiągnięć rozprawy należy:

- usystematyzowanie wiedzy (osiągnięte dzięki szczegółowym badaniom) na temat wpływu określonych struktur i sekwencji cząsteczki RNA na specyficzność wiązania białka ryboregulatorowego, Hfq
- określenie powierzchni Hfq uczestniczących w rozpoznawaniu i wiązaniu sRNA
- zbadanie wpływu Hfq (i jego części strukturalnych) na wiązanie się między sRNA a odpowiednim anty-sRNA

Podkreślić należy, że wyniki przedstawione w pracy zostały uzyskane z zastosowaniem szerokiego zakresu nowoczesnych metod biochemicznych i molekularnych, wykorzystując bogaty warsztat badawczy dotyczący pracy z RNA, co stanowi o wartości wniosków wynikających z rozprawy.

Mam kilka pytań merytorycznych do rozprawy:

- jakie były kryteria doboru stosowanych w doświadczeniach zmienionych dzięki mutacjom w genie białek Hfq?
- czy w doświadczeniach *in vitro* brano pod uwagę tendencję białka Hfq do agregacji a w rezultacie precypitacji z roztworu, i jak był weryfikowany poziom aktywnego białka?
- poprosiłabym o przedyskutowanie korzyści dla komórki bakteryjnej posiadania białka takiego jak Hfq, mającego bardzo szeroki zakres działania, od globalnej ryboregulacji aż do wpływu na replikację DNA. Czy taka sytuacja nie powoduje "szumu" informacyjnego i regulacyjnego dla komórki?

Praca pani Eweliny Małeckiej-Grajek ma układ typowy dla tego rodzaju opracowań, z podziałem na odpowiednie rozdziały. Wstęp zawiera dobrze opisane informacje niezbędne dla zrozumienia doświadczeń wykonanych w pracy i ich interpretacji, w tym rozdziale przedstawione są typy małych RNA i ich funkcje pełnione w komórce, oraz budowa i działanie białka Hfq. W zrozumieniu tego rozdziału pomagają dobrze przygotowane ryciny. Cel pracy wraz z celami szczegółowymi określa właściwie i precyzyjnie podjętą tematykę. Rozdziały Materiały i Metody przedstawia szczegóły eksperymentalnego podejścia stosowanego w rozprawie. Tu, miałabym kilka uwag: w Tabeli 3 nie podano źródła plazmidów; nie jest bezpośrednio w trakcie lektury jasne, które RNA były syntetyzowane w jaki sposób. Nie podano również odnośnika do procedury oczyszczania Hfq (niezmienionego oraz niosącego zmiany aminokwasów) poza określeniem, kto wykonał to oczyszczanie (np. warto by dodać informację, czy było to białko ze znacznikiem His, czy natywne). Rozdział Wyniki dobrze dokumentuje podjęte i przeprowadzone badania. W nich, określona zostały eksperymentalnie i z zastosowaniem programu RNAstructure budowa i struktura przestrzenna cząsteczek RNA wybranych do badań, zbadana kompetycja między cząsteczkami sRNA o wiązanie z Hfq, określone zostały związki między strukturą poszczególnych elementów sRNA a oddziaływaniem

z Hfq, a także, dzięki zastosowaniu par sRNA-anty-sRNA wpływu Hfq na oddziaływania między sRNA. W rozdziale Wyniki szczegółowo i jasno podane zostały wyniki eksperymentów, zilustrowane rycinami, tabelami i schematami (tu mam uwagę do jakości kolorów i zbyt małych rozmiarów struktur RNA na rycinach np. 18 czy 19). W dyskusji wyniki uzyskane w rozprawie zostały omówione w kontekście dotychczasowej wiedzy o działaniu białka Hfq i roli sRNA. W rozprawie cytowanych jest wiele aktualnych i dobrze dobranych publikacji. Praca napisana jest poprawnym językiem naukowym, z obowiązku recenzenta zauważę pojawianie się żargonowego i niepoprawnego stwierdzenia o mutacji w białku czy przeszczepianiu określonego motywu. Ponadto, układ elementów pracy pozostawia nieco do życzenia, np. gdy część legendy do danej ryciny znajduje się na następnej stronie.

Chciałam zaznaczyć, iż przedstawione uwagi krytyczne odnoszą się głównie do sposobu prezentacji wyników i nie umniejszają wysokiej oceny merytorycznej pracy.

Mimo, iż nie zostało to podane w rozprawie, ani, co zastanawiające, publikacja ta nie została zacytowana w pracy, część wyników zawartych w rozprawie została opublikowana w 2015 roku w czasopiśmie Biochemistry, w pracy tej Doktorantka jest pierwszym autorem.

Podsumowując, stwierdzam, iż rozprawa doktorska Pani mgr Eweliny Małeckiej-Grajek spełnia wszystkie wymogi stawiane pracom doktorskim a określone odpowiednią ustawą. Wkład w wiedzę na temat regulacji przy udziale małych cząsteczek RNA i ryboregulatora -białka Hfq stanowi o wysokiej wartości naukowej pracy. W związku z tym zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu z wnioskiem o przyjęcie pracy i dopuszczenie Pani mgr Eweliny Małeckiej-Grajek do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Z uwagi na wagę podjętego tematu i wartość naukową rozprawy, wnioskuję także o wyróżnienie pracy.

U. Szolowska-Paon