

Prof. dr hab. Jerzy Ciesiolka
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN
ul. Noskowskiego 12/14
61-704 Poznań

Poznań, dnia 6 kwietnia 2018

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Darii Sobańskiej pt.: Znaczenie sekwencji i struktury mRNA i anty-sRNA w ich oddziaływaniach z niekodującymi RNA bakterii.

Rozprawa doktorska mgr Darii Sobańskiej wykonana została pod kierunkiem dr hab. Mikołaja Olejniczaka, prof. UAM w Zakładzie Biochemii, Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Wydziału Biologii UAM w Poznaniu. Od kilku lat, w Zakładzie kierowanym przez Promotora rozprawy, prowadzone są z dużym powodzeniem badania krótkich niekodujących RNA bakterii oraz ich roli w procesie translacji. Recenzowana rozprawa doktorska wpisuje się w tę ważną i aktualną problematykę badawczą.

Przedstawiona do recenzji rozprawa jest liczącym 151 stron opracowaniem, podzielonym na następujące, zasadnicze części: *wstęp* (31 stron), *materiały i metody* (łącznie 34 strony), *wyniki* (44 strony) oraz *dyskusja* (15 stron). Po wstępie do rozprawy Autorka zamieściła opis *celów pracy*, a dyskusję zamyka *wnioskami*. Rozprawa zawiera także *streszczenie* w wersji polsko i anglojęzycznej, *wykaz stosowanych skrótów* oraz bibliografię liczącą ok. 230 pozycji cytowanej literatury źródłowej.

We *wstępie* do rozprawy Autorka opisała regulatorowe RNA bakterii oraz białko opiekuńcze Hfq, jako regulator ekspresji. Obydwa podrozdziały, oprócz podstawowych, zawierają informacje oparte na najnowszej literaturze przedmiotu i przygotowane zostały bardzo kompetentnie. Przedstawione informacje wprowadzają czytelnika w tematykę rozprawy i są bardzo przydatne dla przeanalizowania wyników badań eksperymentalnych opisanych w jej dalszych częściach.

Rozdział – *wyniki* podzielony został na dwie części. W pierwszej części opisano rezultaty prac mających na celu zbadanie znaczenia sekwencji nukleotydowej mRNA w oddziaływaniach z sRNA RybB, a w szczególności, znaczenia rodzaju nukleotydu bezpośrednio sąsiadującego z miejscem wiązania tego regulatorowego RNA. Celem drugiej części pracy było poznanie roli białka Hfq w oddziaływaniach sRNA z regulatorowymi anty-sRNA oraz porównanie jej do roli tego białka w oddziaływaniach cząsteczek sRNA z regulowanymi przez nie mRNA.

Realizację pierwszego celu rozprawy Doktorantka podzieliła na kilka etapów. W pierwszym etapie skoncentrowała się na badaniach oddziaływań w obrębie krótkich, modelowych dupleksów RNA, odpowiadających miejscu oddziaływania sRNA RybB z wybranymi miejscami w mRNA, regulowanymi przez ten niekodujący RNA. Wyznaczyła z dużą precyzją parametry termodynamiczne dla tych oddziaływań. Wyniki wskazały, że niesparowane puryny zlokalizowane w pozycji 3' przyległej do dupleksu RNA zwiększają jego stabilność termodynamiczną bardziej niż pirymidyny w tej pozycji. Wyznaczone różnice w energii oddziaływania są jednak stosunkowo małe, co Autorka tłumaczy wpływem kilku dodatkowych, niesparowanych nukleotydów od strony 3' dupleksu. Proponuje przetestowanie oddziaływań w obrębie dupleksów wyłącznie z jedną niesparowaną resztą nukleotydową od strony 3'. Zgadza się, że różnice w energii oddziaływania byłyby prawdopodobnie bardziej znaczące. Jednak, czy wyniki badań takich układów modelowych byłyby bardziej reprezentatywne dla wyjaśnienia zachowawczości nukleotydu 3' w cząsteczkach mRNA pełnej długości? Ponadto, czy badając krótkie dupleksy, odpowiadające miejscu oddziaływania sRNA-mRNA, w niektórych przypadkach nie należałoby wziąć pod uwagę dodatkowych oddziaływań pomiędzy tymi cząsteczkami, poza analizowanym dupleksem?

W kolejnym kroku, do badań stabilności termodynamicznej oraz szybkości asocjacji wybranych kompleksów sRNA-mRNA Doktorantka zastosowała technikę różnicowej migracji w żelu poliakrylamidowym (EMSA). Do analiz wybrała fragmenty mRNA oddziałujące z sRNA RybB a także warianty tych fragmentów ze zmutowaną pozycją 3', przylegającą do dupleksu będącego miejscem oddziaływania. Wyznaczyła zarówno wartości stałej dysocjacji K_d , jak i obserwowanej szybkości asocjacji k_{obs} , przy nieobecności oraz obecności białka Hfq. Wyniki wskazały, że rodzaj reszty nukleotydowej w pozycji 3' względem miejsca wiązania sRNA w mRNA wpływa na szybkość asocjacji sRNA RybB do mRNA. Ponadto, obecność białka Hfq zmniejsza znaczenie sekwencji mRNA sąsiadującej z miejscem wiązania sRNA dla ich oddziaływań. W tej części rozprawy, na podkreślenie zasługują wysokie umiejętności Doktorantki w prowadzeniu zaawansowanych badań właściwości termodynamicznych kompleksów RNA-RNA oraz analiz kinetyki tworzenia się tych kompleksów.

Ostatnim etapem, opisanym w pierwszej części *wyników*, była translacja modelowego mRNA ompC w fuzji z mRNA GFP w warunkach *in vitro*. Zaobserwowano obniżenie efektywności translacji w obecności sRNA RybB oraz sRNA RybB i białka Hfq, przy czym było ono silniejsze, gdy od strony 3' miejsca wiązania sRNA RybB do mRNA znajdowała się reszta puryny a nie reszta pirymidyny. Sądzę, że warto byłoby zaproponować możliwy

mechanizm obserwowanego efektu. Czy w mechanizmie tym należałoby uwzględnić związek pomiędzy lokalizacją miejsca oddziaływania sRNA z mRNA a regionem Shine-Dalgarno i kodonem inicjującym w mRNA?

W drugiej części rozdziału *wyniki* opisano badania dotyczące udziału białka Hfq w oddziaływaniu między regulatorowymi sRNA a cząsteczkami anty-sRNA oraz cząsteczkami mRNA. Do badań wybrano sRNA, dla których znany był mechanizm działania w wiązaniu mRNA. Analizowano oddziaływania sRNA: RybB, ChiX i GcvB a także anty-sRNA: 3'ETS^{leuZ}, *chbBC*-IGR i AgvB. Aby móc zaproponować sposób oddziaływania anty-sRNA z sRNA, Doktorantka wyznaczyła struktury drugorzędowe sRNA GcvB oraz anty-sRNA: *chbBC*-IGR, 3'ETS^{leuZ} i AgvB. W analizie strukturalnej wykorzystwała kilka enzymów nukleolitycznych o dobrze znanej specyficzności działania. Czy Autorka rozważała możliwość zastosowania do tego celu również reagentów chemicznych, szczególnie takich, które umożliwiałyby mapowanie struktury cząsteczek RNA oraz ich kompleksów w warunkach komórkowych?

Do monitorowania oddziaływań anty-sRNA z regulatorowymi sRNA i białkiem opiekuńczym Hfq Doktorantka wykorzystwała technikę elektroforezy kompleksów wybranych cząsteczek w żelu poliakrylamidowym w warunkach natywnych. Na tej podstawie wyznaczyła szybkości asocjacji dla tworzenia się kompleksów sRNA z mRNA lub anty-sRNA w obecności Hfq oraz w obecności mutantów tego białka. Przeprowadziła kompleksową analizę zdolności do kompetycji wybranych anty-sRNA o wiązanie do miejsca oddziaływania z RNA na powierzchni białka Hfq. Na tej podstawie wyciągnęła szereg ważnych wniosków dotyczących przestrzennej organizacji kompleksów. Ustaliła, że anty-sRNA, wiążąc się z cząsteczkami sRNA i białkiem opiekuńczym Hfq, imituje oddziaływania pomiędzy cząsteczkami mRNA a sRNA. Dyskusję wyników tej części rozprawy ułatwiłby schematyczny rysunek przedstawiający organizację kompleksu, z uwzględnieniem sposobu oddziaływania cząsteczek RNA z białkiem Hfq, jego stroną proksymalną, dystalną bądź boczną. Co Autorka sądzi o możliwości wykorzystania fragmentów sRNA lub anty-sRNA do badań organizacji kompleksów tych cząsteczek z białkiem Hfq? W badaniach prowadzonych wcześniej w macierzystym laboratorium Doktorantki, opisanych w artykule, którego jest współautorką, z powodzeniem wykorzystane zostały chimeryczne cząsteczki sRNA.

Rozprawa doktorska mgr Darii Sobańskiej przygotowana została bardzo starannie. Z obowiązku recenzenta muszę jednak odnotować kilka pomyłek i niezręcznych sformułowań zauważonych w tekście np.: str. 15 – niewłaściwa terminologia: grupa trójfosforowa, monofosforowa; str. 57 i 66 – wyrażenia żargonowe: suplementowane, kwantyfikowano; str.

73, zamiast „280 nM” powinno być „280 nm”; str. 101 – zamiast niskiej rozdzielczości „najkrótszych” powinno być „najdłuższych”; str. 120 – zamiast „Ryc. 21” powinno być „Ryc. 18”. Wymienienie tych usterek nie ma służyć wykazaniu, że recenzent uważnie przeczytał rozprawę. Każdy tekst naukowy powinien charakteryzować się dużą precyzją opisu i brakiem błędów, także tych edytorskich. Pod tym względem recenzowana rozprawa została przygotowana bardzo dobrze.

Problematyka badawcza podjęta przez mgr Darię Sobańską w recenzowanej rozprawie jest bardzo aktualna, a otrzymane wyniki mają istotne znaczenie dla poznania związku między sekwencją i strukturą mRNA a sposobem oddziaływania sRNA bakterii z regulowanymi mRNA. Uzyskano nowe, ważne informacje na temat sposobu oddziaływania anty-sRNA z regulowanymi sRNA w kompleksie z białkiem Hfq. Wyniki zostały wnikliwie przedyskutowane, w sposób świadczący o szerokim zorientowaniu Autorki rozprawy w uprawianej dziedzinie.

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa mgr Darii Sobańskiej spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789) i wnoszę do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie mgr Darii Sobańskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

