



Prof. dr hab. Magdalena Rakowska-Boguta  
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN  
ul. Pawińskiego 5a  
02-106 Warszawa

Warszawa, 15 sierpnia 2019

### Recenzja pracy doktorskiej Patrycji Plewki

#### Transkrypty genów tRNA i tRNA-podobnych i pochodzące z nich małe RNA u *Arabidopsis thaliana*

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Patrycji Plewki została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Artura Jarmołowskiego. Praca składa się z trzech części, w których przedstawiono wyniki uzyskane w ramach równolegle realizowanych przez doktorantkę projektów. Celem pierwszej części było stworzenie i eksperymentalna weryfikacja atlasu aktywnych transkrypcyjnie genów tRNA w roślinie modelowej *Arabidopsis thaliana*. Część druga pracy doktorskiej poświęcona jest charakterystyce cząsteczki tRNA-podobnej pochodzącej z intronu długiego niekodującego RNA *GUT15*. Celem trzeciej części pracy było stworzenie kompleksowej bazy danych stabilnych fragmentów tRNA tzw. tRF u *Arabidopsis*.

Większość danych przedstawionych w częściach drugiej i trzeciej pracy wchodzi w skład publikacji, które ukazały się w 2018 roku, odpowiednio, w prestiżowym *RNA Biology*, oraz w *Plant Cell Physiology*. Wyniki badań opisane w części pierwszej będą przedstawione w kolejnej publikacji. Patrycja Plewka jest pierwszym autorem dwóch z tych artykułów, co świadczy o jej dominującym udziale. Recenzowana rozprawa reprezentuje wysoki poziom naukowy a opisane w niej wyniki mają charakter nowatorski. Dlatego, bez wątpienia spełnia wymagania pracy doktorskiej.

Transkrypcja genów tRNA w komórce eukariotycznej zachodzi z udziałem polimerazy III RNA. W genomie jądrowym drożdży *Saccharomyces cerevisiae* zidentyfikowano 275 genów tRNA, w większości rozproszonych w obrębie wszystkich chromosomów. W 2003 roku ukazały się prace, w których scharakteryzowano transkryptom polimerazy III RNA u drożdży. Choć wszystkie drożdżowe geny tRNA wiążą polimerazę III RNA i ulegają transkrypcji, poziom ich ekspresji jest zróżnicowany. Różnią się także zmiany poziomu ekspresji indywidualnych genów tRNA w odpowiedzi na warunki zewnętrzne. Wyniki ekspresji genów tRNA w komórkach ssaków opublikowano w latach 2010-2011, zaś regulacja transkrypcji tRNA jest ciągle aktualnym tematem badań. Stwierdzono, że w komórkach ssaków znaczna część genów tRNA w ogóle nie ulega transkrypcji. W obrębie 513 ludzkich genów tRNA tylko część (połowa do dwóch trzecich) wiąże polimerazę III RNA a pozostałe geny są transkrypcyjnie nieaktywne. Ekspresja genów tRNA zmienia się podczas różnicowania i jest różna w różnych typach komórek. Także regulacja transkrypcji indywidualnych genów tRNA w komórkach ludzkich jest zróżnicowana. Co ciekawe, ewolucja genów tRNA jest stosunkowo szybka, lecz profil ekspresji badany poprzez wiązanie polimerazy w komórkach ssaków jest w pewnym stopniu konserwowany na poziomie izotypów tRNA.

Stosunkowo niewiele informacji opublikowano na temat transkrypcji genów tRNA u roślin. W latach 2013-2018 ukazały się jedynie pojedyncze prace dotyczące roślinnych RNA polimeraz III i regulacji ich aktywności. Znajomość ekspresji genów tRNA w modelowej roślinie *Arabidopsis thaliana* jest znikoma i opiera się głównie na detekcji fragmentów tRF zidentyfikowanych w ciągu ostatnich dwóch lat poprzez sekwencjonowanie RNA. Opisane w pracy doktorskiej wyniki Patrycji mają więc wielkie znaczenie gdyż stanowią pierwszą próbę stworzenia zestawu aktywnych transkrypcyjnie genów tRNA u *Arabidopsis*.

Ilościowe profilowanie ekspresji tRNA jest zadaniem bardzo wymagającym ze względu na występowanie licznych modyfikacji i struktur drugorzędowych RNA. Dodatkowo, proces generowania bibliotek tRNA i mapowania danych z sekwencjonowania utrudnia ogromne podobieństwo genów tRNA w obrębie rodzin liczących wielu członków. W 2015 roku nastąpił przełom w dziedzinie ilościowej analizy transkryptów tRNA dzięki zastosowaniu enzymów dealkilujących. Spowodowało to odejście od walidacji tRNA poprzez sekwencjonowanie transkryptów uzyskanych przez immunoprecypitację chromatyny z wykorzystaniem przeciwciał skierowanych przeciwko RNA polimerazie III (tzw. ChiP-seq). Pojawiły się natomiast nowe protokoły, które zostały szczegółowo scharakteryzowanych we wstępie do pracy doktorskiej.

W celu oznaczenia ekspresji genów tRNA w skali całego genomu *Arabidopsis* Patrycja Plewka opracowała własną, wiarygodną metodę masowego sekwencjonowania tRNA. Protokół ten został zaprojektowany w sposób umożliwiający wychwycenie największej różnorodności transkryptów tRNA poprzez usunięcie aminokwasu z załadowanych cząsteczek a także poronnych kopii tRNA generowanych gdy odwrotna transkryptaza napotka zmodyfikowane rybonukleozydy. Opracowana strategia odpowiada w znacznym stopniu klasycznemu protokołom RNA-seq. Spośród 664 sekwencji genów tRNA i tRNA-podobnych potwierdzono ekspresję 234 genów. Nie uzyskano dowodów na transkrypcję 24 genów kodujących kanoniczne tRNA. Zastosowany protokół masowego sekwencjonowania umożliwia identyfikację transkryptów tRNA, nie pozwala jednak na ilościowe profilowanie ekspresji. W dyskusji Patrycja przedstawiła projekt udoskonalonej metody, którą zastosowała do kolejnych eksperymentów zmierzających do porównania ilościowej ekspresji genów tRNA w różnych tkankach *Arabidopsis*.

Jestem pełna uznania dla osiągnięć eksperymentalnych doktorantki, szczególnie ustanowienia przez nią nowego protokołu, adnotacje poszczególnych tRNA i ich walidację. Tematyka pracy jest bardzo szeroka, lecz we wstępie, w którym nacisk położono na metody sekwencjonowania, zabrakło mi sumarycznego ujęcia biogenezy roślinnych tRNA. Co wiadomo na temat specyfiki aparatu transkrypcji i jego regulacji u roślin? Czy można coś powiedzieć o odmienności biogenezy roślinnych tRNA, ich struktury i modyfikacji oraz organizacji genów tRNA? Czy regulacja ekspresji tRNA wiąże się z obroną roślin przed patogenami?

Wygenerowany przez Patrycję Plewkę wiarygodny zestaw transkryptów tRNA *Arabidopsis* jest kompatybilny z publicznie dostępnymi danymi sekwencjonowania małych RNA i stanowi bazę do dalszych analiz dotyczących biogenezy pochodzących od tRNA małych fragmentów RNA tzw. tRF. W ostatnich latach fragmenty tRNA są obiektem intensywnych badań, jednak w bazach danych brakuje danych na temat fragmentów pochodzących od roślinnych tRNA. Badania Patrycji Plewki przyczyniły się do wypełnienia tej luki i stworzenia kompleksowego repozytorium o nazwie tRex dedykowanego różnym klasom fragmentów generowanych z tRNA w modelowej roślinie *Arabidopsis*. Pośród zidentyfikowanych heterogennych sekwencji pochodzących od tRNA wprowadzono zdefiniowane kategorie, z wyróżnieniem nowej grupy cząsteczek pochodzących wyłącznie z rejonów flankujących sekwencje tRNA, tRF-F3 i tRF-F5. Obecność fragmentów tego typu w siewkach roślin udowodniono eksperymentalnie metodą hybrydyzacji. Do tej części pracy mam drobne uwagi. Podpis do rys. 24 jest niekompletny, w szczególności nie jest jasne wyróżnienie części sekwencji innym kolorem. Czy są to sekwencje końców usuwane podczas dojrzewania czy też sekwencje flankujące? Na stronie 107 autorka zadaje interesujące pytanie dotyczące danych zgromadzonych


w Tabeli 3 : czy biogeneza tRF zależna jest od białek odpowiedzialnych za dojrzewanie tRNA, siRNA i miRNA? W tekście pracy nie znalazłam na to pytanie odpowiedzi. Zabrakło mi także interpretacji danych przedstawionych w tabeli 1 na stronie 96, które wskazują na znaczne różnice w liczbie odczytów odpowiadających RNA *GUT15*-tRF-F5 w różnych mutantach *Arabidopsis*. W tekście pracy nie znalazłam odpowiedniego komentarza; czy przedstawione dane mogą sugerować funkcję transkryptu *GUT15*-tRF-F5?

Za największe osiągnięcie merytoryczne Patrycji Plewki uważam identyfikację i funkcjonalną analizę tRNA-podobnego transkryptu (TLS) i małego RNA *GUT15*-tRF-F5 kodowanych w intronie lnc RNA *GUT15*. Jest to zarazem dla mnie najciekawsza część pracy. Wykazano, że TLS nie jest niezależnie transkrybowany przez polimerazę III RNA, zaś jest generowany z transkryptu *GUT15* syntetyzowanego przez RNA polimerazę II. Przystawiono ponadto dowody na funkcję regulatorową cząsteczki TLS jako inhibitora wycinania intronu, w którym jest zakodowana oraz wycinania intronu w innym niezależnym RNA, mRNACBP80. Co ciekawe, sekwencja kanonicznego tRNA w intronach nie miała wpływu na ich wycinanie. TLS także negatywnie oddziałuje na akumulację RNA *GUT15*-tRF-F5. Wnioski są oparte na inteligentnie zaplanowanych i perfekcyjnie wykonanych eksperymentach. Ciekawe wyniki rodzą dalsze pytania, które przytaczam poniżej i proponuję przedyskutować podczas obrony pracy.

Jaki mógłby być teoretycznie mechanizm generowania TLS skoro proces ten nie zależy od wycinania kodującego tę cząsteczkę intronu? Zwykle lnc RNA są niestabilne. Jaka jest stabilność transkryptu lnc RNA *GUT15* i czy sekwencja TLS może mieć na nią wpływ? Czy istnieją przesłanki, że cząsteczki TLS w innych organizmach wyższych są syntetyzowane przez RNA polimerazę III? Identyfikacja sekwencji CCA w transkrypcie *GUT15*-TLS sugeruje rolę tego RNA w translacji. W jaki sposób można by zweryfikować to przypuszczenie eksperymentalnie? Czy sekwencje *GUT15*-TLS i *GUT15*-tRF-F5 są unikane w genomie *Arabidopsis* czy może występują także w innych lokalizacjach? Czy wiadomo o konserwacji lncRNA *GUT15* wraz z *GUT15*-TLS i *GUT15*-tRF-F5 w genomach innych roślin?

Niewątpliwie nowatorski charakter wyników Patrycji Plewki stwarza perspektywę dalszych badań. Własne koncepcje autorka opisała w osobnym podrozdziale dyskusji. Podsumowując, recenzowana praca reprezentuje wysoki poziom merytoryczny badań z dziedziny podstawowej biologii molekularnej. Podejmuje aktualne, bardzo istotne problemy naukowe. Wartość naukowa eksperymentów oceniam bardzo wysoko, ich wykonanie i opis nie budzi zastrzeżeń. Wnioski i hipotezy postawione na podstawie uzyskanych wyników są w pełni uzasadnione. Praca napisana jest starannie, a komentarze właściwie wyważone.

W konkluzji uważam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska w pełni spełnia wymogi ustawy o Tytule i Stopniach Naukowych i wnoszę do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr Patrycji Plewki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na wagę merytoryczną problemu naukowego i wysoką jakość wyników wnioskuję o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.

  
Magdalena Rakowska-Boguta