

STRESZCZENIE

Transportowe RNA (tRNA) jako cząsteczki adaptorowe w procesie biosyntezy białek odgrywają kluczową rolę w dekodowaniu informacji genetycznej zawartej w sekwencji zasad DNA. Poza genami kodującymi klasyczne cząsteczki tRNA, w genomach wielu organizmów i wirusów zidentyfikowano także szeroką gamę sekwencji podobnych do tRNA, które posiadają tylko pewne cechy strukturalne charakterystyczne dla kanonicznych tRNA (TLS, ang. tRNA-like sequences). Poza dobrze scharakteryzowaną funkcją w procesie translacji, tRNA są także zaangażowane w szereg innych procesów zachodzących w komórkach, takich jak: globalna regulacja ekspresji genów, naznaczanie białek przeznaczonych do degradacji, modyfikacja lipidów w błonach komórkowych bakterii czy biosynteza antybiotyków. Ostatnie badania dowodzą, że tRNA mogą również stanowić źródło małych RNA (ang. tRF, tRNA-derived fragments), które odgrywają istotną rolę w regulacji ekspresji genów.

Niniejsza rozprawa doktorska składa się z trzech części, które dotyczą różnych aspektów biologii cząsteczek tRNA. W ramach pierwszej części, opracowano metodę masowego sekwencjonowania tRNA, bazującą na deacylacji cząsteczek tRNA i wykorzystującą technologię SMART (Clontech) opartą na mechanizmie przełączania matrycy podczas syntezy cDNA. Wyniki eksperymentu tRNA-seq w połączeniu z analizą RT-PCR i hybrydyzacją Northern, podparte wnikliwą analizą strukturalną, umożliwiły przeprowadzenie szczegółowej kontroli adnotacji tRNA w genomie *Arabidopsis* (pozwoliły na ich weryfikację, uzupełnienie i korektę). Wymiernym efektem tych badań było stworzenie pierwszego, eksperymentalnie sprawdzonego atlasu aktywnych transkrypcyjnie genów tRNA w siewkach roślin *Arabidopsis*.

Druga część rozprawy to studium przypadku, szczegółowa charakterystyka struktury, biogenezy i roli cząsteczki tRNA-podobnej pochodzącej z intronu długiego niekodującego RNA *GUT15* (lncRNA, ang. long noncoding RNA *GUT15*) i zawierającej motyw CCA. Wykazano, że cząsteczka ta jest generowana z transkryptu *GUT15* syntetyzowanego przez polimerazę RNA II (RNAP II), w przeciwieństwie do standardowych tRNA, które są produktem transkrypcji RNAP III. Ujawniono także rolę sekwencji *GUT15*-tRNA-podobnej w splicingu jej intronu gospodarza oraz w biogenezie innego niskocząsteczkowego RNA produkowanego z tego samego intronu genu *GUT15*. Ponadto, dowiedziano, że obecność sekwencji tRNA w intronach genów kodujących białka nie zaburza splicingu ich intronów-gospodarzy.

Trzecim celem niniejszej pracy było stworzenie pierwszej kompleksowej, publicznie dostępnej bazy danych dedykowanej roślinnym cząsteczkom tRF w roślinie modelowej *A. thaliana*. Projekt ten realizowano w ścisłej współpracy z dr Agnieszką Thompson. Moja rola polegała na genetycznej weryfikacji i przygotowaniu bibliotek małych RNA do masowego sekwencjonowania, w celu identyfikacji i charakterystyki cząsteczek tRF w mutantach genów metabolizmu RNA. Uzyskane wyniki zostały przeanalizowane i włączone w zasoby bazy tRex przez Agnieszkę Thompson i stanowią ważny komponent jej rozprawy doktorskiej.

ABSTRACT

Transfer RNAs (tRNA) act as adaptor molecules in protein synthesis and thus play a key role in decoding of genetic information stored in the sequence of DNA bases. Apart from genes encoding classical tRNA molecules, a wide array of sequences similar to tRNAs but deviating from the canonical tRNA cloverleaf structure have been identified in genomes of many organisms and viruses (TLS, tRNA-like structures). Beyond their well-known function in translation, tRNAs are implicated in a variety of cellular processes including: global gene expression regulation, tagging of protein for degradation, modification of phospholipids in bacterial cell membranes and antibiotics biosynthesis. Recent studies revealed that tRNA can also serve as a source of small RNA species called tRF (tRNA-derived fragments), that play an important role in gene expression regulation.

This doctoral dissertation consists of three parts concerning different aspects of tRNA biology in *Arabidopsis*. Within the first part, the method for massive sequencing of tRNA was developed that relies on deacylation of tRNA molecules and takes advantage of the SMART technology basing on the template switching mechanism during cDNA synthesis. The data obtained in tRNA-seq experiments along with RT-PCR and Northern blot analyses, and supported by a careful structural analysis allowed for detailed inspection (verification, completion and correction) of the tRNA genes annotation in the *Arabidopsis* genome. As a result, we created the first experimentally validated atlas of actively transcribed tRNA genes in *Arabidopsis* seedlings.

The second part of the thesis is the case study of structure, biogenesis and role of tRNA-like sequence originating from the final intron of long noncoding RNA *GUT15* (lncRNA *GUT15*), and containing CCA motif. The results presented in this study show that this molecule is generated from the RNAPII-produced *GUT15* transcript, contrary to classical tRNAs that are transcribed by RNAP III. Moreover, the *GUT15*-tRNA-like structure affects its host intron splicing and biogenesis of another small noncoding RNA deriving from the same intron of the *GUT15* gene. In addition, this study provides an evidence that the canonical tRNA genes nested within introns do not affect the splicing patterns of their host protein-coding transcripts.

The third goal of this dissertation was to create the first comprehensive, publicly available database on plant tRFs in a model plant *A. thaliana*. This project was conducted in close collaboration with Dr. Agnieszka Thompson. My contribution to the project was the genetic verification and construction of sRNA-seq libraries in order to identify and characterize tRFs in RNA metabolism mutants. The results obtained were analyzed and

included into tRex database resources by Ms. Thompson and are components of her PhD thesis.