

Prof. dr hab. Edward Darżynkiewicz
Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki Dośw.
Wydział Fizyki, Uniwersytet Warszawski
edek@fuw.edu.pl
Tel. 691 392 320

Warszawa, 20.12.2021

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Julity Gumnej pt. „*Identyfikacja i charakterystyka elementów strukturalnych genomowego RNA retrotranspozonu Ty1 oraz jego oddziaływań z białkiem Gag kluczowych dla dimeryzacji i pakowania genomu do cząstek wirusopodobnych*”

W ramach pracy doktorskiej Pani mgr Julita Gumna zajęła się badaniem molekularnego mechanizmu dimeryzacji i pakowania genomowego RNA (gRNA) do cząstek wirusopodobnych (VLPs) u retrotranspozonów LTR, a konkretnie, retrotranspozonu Ty1, występującego w genomie drożdżowym *Sacharomyces cerevisiae*. O ile w przypadku infekcyjnych retrowirusów, np. HIV-1, ich cykl replikacyjny jest od dawna intensywnie badany, znajomość mechanizmu replikacji endogennych retroelementów jest zdecydowanie mniej poznana. Celowość podjęcia tej tematyki jest bezsprzeczna gdyż należy ona do podstawowych zagadnień biologii molekularnej.

Trzon rozprawy stanowią trzy oryginalne prace opublikowane w bardzo dobrych czasopismach, w których Pani mgr Gumna jest pierwszym autorem. Prace te poprzedzone są 50-cio stronicowym opisem ich zawartości wraz ze wstępem wprowadzającym czytelnika w dziedzinę badań. Wstęp ten jest bardzo pomocny dla recenzenta, ponieważ poruszane zagadnienia są tematycznie bliskie jedynie wąskiemu gronu ekspertów. Opis zawiera 116 pozycji bibliografii.

Mechanizm cyklu replikacyjnego retrotranspozonu Ty1 jest wieloetapowy. Wchodzi wń: transkrypcja Ty1 do RNA Ty1, transport tego RNA do cytoplazmy a następnie jego translacja do białek Gag i Gag-Pol z którymi tworzy tzw. retrosomy, w których gRNA Ty1 i tRNA^{Met} pakowane są do VLPs. Z kolei proteoliza Gag i Gag-Pol przez proteazę Ty1 prowadzi do dojrzewania VLPs. Dopiero na końcu tego procesu RNA Ty1 ulega odwrotnej transkrypcji do cDNA, ulegającego integracji z genomem gospodarza. Mechanizm ten jest dużo bardziej złożony, obejmuje m.in. etap wycinania z poliproteiny Gag-Pol proteazy PR-p20, która katalizuje kolejne cięcia białek prekursorowych, np. integrazy IN-p71 i odwrotnej transkryptazy RT/RH-p63.

Przechodząc do szczegółowej recenzji rozprawy, postaram się pokrótce scharakteryzować zawartość załączonych trzech publikacji. Drobiazgowo recenzowanie prac, których warunkiem przyjęcia do druku były pozytywne oceny przez ekspertów, mija się z celem.

W pracy: **Gumna et al. „*Retroviral-like determinants and functions required for dimerization of Ty1 retrotransposon RNA*”, *RNA Biology*, 2019** Autorka zajęła się badaniem mechanizmu dimeryzacji genomowego RNA Ty1 dążąc do wytypowania kluczowych sekwencji nukleotydowych zaangażowanych w tym procesie oraz określeniem roli białka Gag Ty1. W oparciu o wcześniejsze dane z badań nad

dimeryzacją i pakowaniem RNA Ty1 do cząstek wirusopodobnych, wytypowała do badań skrócony rejon 5' gRNA retrotranspozonu, mTy1 (+1-576 nt). Istotnym wynikiem badań było wykazanie, że dimer RNA powstawał jedynie w obecności pełnej długości białka Gag-p45, a wydajność jego tworzenia rośnie wraz ze wzrostem stężenia białka. Badania strukturalne, wykorzystujące szereg nowoczesnych strategii, m.in. poprzez wprowadzenie ukierunkowanych mutacji w newralgicznych regionach RNA, metodę analizy SHAPE, analizę funkcjonalną, Doktorantka wykazała istotną rolę oddziaływań wzajemnie komplementarnych sekwencji palindromowych PAL1 i PAL2 w tworzeniu dimeru gRNA Ty1. Wykluczony został udział tRNA^{Met} jak również rola międzycząsteczkowych oddziaływań PAL3/PAL3 i SL1/SL4 w tworzeniu dimeru RNA Ty1. W publikacji zaproponowany został wiarygodny model (Fig. 4b) dimeru RNA mTy1, utrzymywanego poprzez dwa krótkie, międzycząsteczkowe dupleksy PAL1/PAL2. Wspomniane wyżej badania zaprezentowane zostały w obszernej, 15-stronicowej publikacji, z 83-ema odnośnikami literaturowymi oraz Dodatkami (*Supplementary data 1 & 2*), natomiast wersja polska streszczenia obejmuje 7 stron maszynopisu.

W drugiej publikacji wchodzącej w skład rozprawy: **Gumna et al. „RNA binding properties of the Ty1 LTR-retrotransposon Gag protein”, *International Journal of Molecular Sciences*, 2021** Pani mgr Julita Gumna skoncentrowała się na zbadaniu specyficzności oddziaływań białek Gag Ty1: formy prekursorowej Gag-p49 oraz dojrzałej Gag-p45, z trzema modelowymi RNA: RNA mTy1, non-Psi Ty1 RNA i 18S rRNA z *S. cerevisiae*. Badania te były podyktowane zamiarem bliższego poznania mechanizmu rozpoznawania gRNA retrotranspozonu podczas jego selektywnego pakowania do cząstek wirusopodobnych. Badania oddziaływań białko-RNA prowadzone były w oparciu o dwie metody: termoforezę w skali mikro (MST) oraz technikę elektroforetycznej opóźnionej migracji kompleksów w żelu (EMSA). W cyklu badań stężeniowych w buforach o różnej sile jonowej Doktorantka wykazała wysokie powinowactwo i jednocześnie stosunkowo niską specyficzność wiązania białek Gag-p49 i Gag-p45 do różnych RNA. Z kolei w badaniach kompetycyjnych pokazała, że stosunkowo nieduża różnica w powinowactwie wiązania może warunkować preferencyjne oddziaływanie białka Gag z RNA Ty1 zawierającego sygnał pakowania gRNA Ty1 do VLPs. W dyskusji Doktorantka podchodzi bardzo ostrożnie do swoich wyników, sugerując, że zaobserwowane preferencyjne oddziaływanie białka Gag z RNA Ty1 może stanowić istotny, aczkolwiek nie jedyny czynnik odpowiedzialny za pakowanie RNA do cząstek wirusopodobnych (VLPs). Szczegółowa prezentacja tego cyklu badań zawarta została w 16-stronicowej publikacji z 61-ma odnośnikami, 6-ma rozbudowanymi wykresami oraz Dodatkami (*Supplementary data*) z kolejnymi 6-ma wykresami i tabelami.

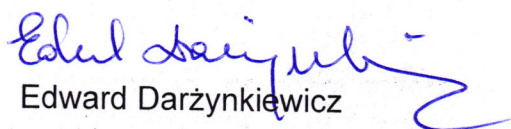
Trzecia publikacja: **Gumna et al. „RNAtor – fast, accurate normalization, visualization and statistical analysis of RNA probing data resolved by capillary electrophoresis”, *PloS one*, 2020** prezentuje nowe narzędzie, tzw. RNAtor, oparte na wykorzystaniu elektroforezy kapilarnej (CE; *capillary electrophoresis*), służący do w pełni zautomatyzowanej normalizacji, wizualizacji oraz analizy statystycznej danych otrzymanych z chemicznego mapowania (SHAPE, DMS) struktury RNA. Badania te Pani mgr Gumna prowadziła w ścisłej współpracy z Zakładem Bioinformatyki Strukturalnej ICHB PAN. Metoda normalizacji danych RNAtor została przetestowana na podstawie danych uzyskanych z próbkowania struktury RNA mTy1. Może być również rozszerzona pod kątem analizy danych uzyskanych z innych niżeli SHAPE i DMS metod próbkowania strukturalnego RNA, co Autorka pokazała w eksperymencie

próbkowania kompleksów RNA/białko rodnikami hydroksylowymi. Wprawdzie nie jestem ekspertem w dziedzinie stosowania metod bioinformatycznych w ustalaniu struktury drugorzędowej kwasów nukleinowych, tym niemniej, w świetle lektury pracy oraz dołączonego do rozprawy 4-stronicowego streszczenia, zdaję sobie sprawę z wagi tego narzędzia i wkładu intelektualnego Autorki, która, oprócz bogatej wiedzy eksperymetalnej w dziedzinie próbkowania chemicznego różnych cząsteczek RNA, musiała opanować zawile tajniki bioinformatyki. Opracowana nowatorska metoda posiada wiele zalet: w porównaniu z ręcznym czy półautomatycznym przetwarzaniem danych, istotnie skraca czas potrzebny na analizę danych, potrafi dokonać normalizacji z kilku eksperymentów jednocześnie, automatycznie wykrywa dane niewiarygodne, dokonuje wizualizacji znormalizowanych wartości reaktywności, może prowadzić analizę statystyczną i porównawczą kilku serii danych jednocześnie, przewiduje strukturę drugorzędową RNA na podstawie danych eksperymetalnych. Taka wielofunkcyjność czyni RNAtor narzędziem w ogromnym stopniu wielofunkcyjnym. Niezwykle cennym jest ogólnodostępność tego bardzo użytecznego narzędzia. Publikacja ma 12 stron, 4 schematy/wykresy, 47 odnośników.

Zarówno pozycja pierwszego Autora jak też oświadczenia Promotora i innych współautorów w publikacjach stanowiących trzon rozprawy doktorskiej, świadczą dobitnie o dominującej roli Pani mgr Julity Gumnej w znakomitej większości prezentowanych badań. Na uwagę zasługuje też skrótna forma opisu, niejako spinająca te prace. Autorka doskonale potrafiła, bez zbędnego rozpisywania się, wypunktować najważniejsze wyniki badań i w sposób dojrzały je skomentować.

Oprócz trzech publikacji stanowiących rozprawę doktorską, Pani Julita Gumna jest współautorką trzech innych prac o tematyce bardzo zbliżonej do zaliczonych jako doktorat. Dwie z tych prac zostały opublikowane w wysoko prestiżowym czasopiśmie, ***Nucleic Acids Research***. Uważam, że powinny one również zostać wzięte pod uwagę przy finalnej ocenie doktoratu. Dobry, w tym wypadku bardzo dobry doktorat, stanowi o ogólnym poziomie naukowym Kandydatki, dojrzałości do samodzielnego kierowania pracą badawczą, również zespołem naukowym. W przypadku Doktorantki, oprócz 6-ciu oryginalnych publikacji, ma Ona w swoim dorobku 10 doniesień konferencyjnych, kierowała trzema projektami badawczymi, w tym Preludium (NCN) oraz uczestniczyła w 6-ciu innych grantach, m.in. Maestro, Opus i Sonata. Nie dziwi zatem, że dwukrotnie, kolejno w 2020 i 2021 roku, uzyskała prestiżowe stypendia dla najlepszych doktorantów IChB PAN.

Reasumując, oceniam rozprawę doktorską Pani mgr Julity Gumnej bardzo wysoko, zdecydowanie powyżej średniego poziomu doktoratów, jakie dane mi było recenzować na przestrzeni wielu lat mojego funkcjonowania w nauce. Zarówno bogaty dorobek naukowy uzyskany w stosunkowo krótkim czasie studiów doktoranckich, jak też dojrzały sposób prezentacji trzech prac stanowiących rozprawę, dają podstawę do **wnioskowania o wyróżnienie**, co czynię z pełnym przekonaniem. Jednocześnie składam formalny wniosek do Wysokiej Rady Naukowej IChB PAN o **dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu**.


Edward Darzynkiewicz