



Poznań, dnia 05.01.2022

Dr hab. Marek Żywicki  
Zakład Biologii Obliczeniowej  
Wydział Biologii  
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

**Recenzja pracy doktorskiej 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”**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Julity Gumnej wykonana została pod kierunkiem dr hab. Katarzyny Pachulskiej-Wieczorek w Zakładzie Struktury i Funkcji Retrotranspozonów Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu. Przedstawiona praca skupia się na badaniach procesów dimeryzacji i pakowania do cząsteczek RNA drożdżowego retrotraspozonu Ty1, które są kluczowe dla procesu retrotranspozycji.

Głównymi celami pracy doktorskiej były:

- jednoznaczne rozstrzygnięcie mechanizmu oraz determinantów dimeryzacji gRNA retrotranspozonu Ty1,
- dogłębna charakteryzacja oddziaływań białek Gag Ty1 z RNA retrotranspozonu,
- analiza zmian struktury drugorzędowej RNA retrotraspozonu w wyniku dimeryzacji oraz wiązania białek Gag Ty1,
- opracowanie narzędzia bioinformatycznego do porównawczej analizy wyników eksperymentów próbkowania strukturalnego RNA.

W wyniku realizacji pracy wszystkie powyższe cele zostały osiągnięte.

Struktura rozprawy jest zgodna ze wzorcami tego typu prac przyjętymi w Polsce. Jej główny trzon stanowią trzy prace opublikowane w renomowanych czasopismach z listy Filadelfijskiej, które stanowią załącznik nr 2 do zaprezentowanej rozprawy. Warto zaznaczyć, że sumaryczny wskaźnik *Impact Factor* tych prac wynosi aż 14,513. Najistotniejsze wyniki i wnioski zawarte w tych pracach zostały syntetycznie opisane w rozdziale 7 rozprawy, natomiast w rozdziale 5 zreferowany został aktualny stan wiedzy na temat retrotraspozonów, w szczególności Ty1, oraz białek Gag. Rozdziały te zostały napisane bardzo klarownie i zwięźle i stanowią doskonałe wprowadzenie do lektury przedstawionych prac.

**Praca 1** - Julita Gumna, Katarzyna J. Purzycka, Hyo Won Ahn, David J. Garfinkel, Katarzyna Pachulska-Wieczorek (2019) *Retroviral-like determinants and functions required for dimerization of Ty1 retrotransposon RNA*; *RNA Biology* 16: 1749-1763

Głównym celem pracy była jednoznaczna weryfikacja obecnych w literaturze modeli dimeryzacji RNA retrotraspozonu Ty1 oraz zbadanie roli białka Gag w tym procesie. W toku prowadzonych badań, sukcesywnie przetestowane zostały postulowane hipotezy dotyczące mechanizmu dimeryzacji RNA Ty1. Na podstawie uzyskanych wyników doktorantka dowiodła, że elementem kluczowym dla dimeryzacji jest oddziaływanie w obrębie sekwencji PAL1/PAL2, jednoznacznie negując rolę tRNA<sup>i</sup>-Met oraz oddziaływań typu *kissin loops* pomiędzy rejonami SL1 i SL4 w tym procesie. Co więcej, wykazała że białko Gag promuje zarówno dimeryzacji RNA Ty1 jak i wiązanie tRNA<sup>i</sup>-Met do rejonu inicjacji odwrotnej transkrypcji PBS.

Praca wykonana została za pomocą trafnie dobranych modeli oraz metod eksperymentalnych (m.in. próbkowanie strukturalne RNA, zastosowanie skróconych form RNA Ty1 oraz mutantów funkcjonalnych). Poprzez zastosowanie serii eksperymentów *in vitro* które pozwoliły na konsekwentną weryfikację stawianych hipotez na poziomie mechanistycznym, wraz z eksperymentami *in vivo* które pozwoliły na potwierdzenie istotności funkcjonalnej wysnutych wniosków, praca sprawia wrażenie bardzo dobrze udokumentowanej i kompletnej.

**Praca 2** - Julita Gumna, Angelika Andrzejewska-Romanowska, David J. Garfinkel and Katarzyna Pachulska-Wieczorek (2021) *RNA binding properties of the Ty1 LTR-retrotransposon Gag protein*; *International Journal of Molecular Sciences* 22(16):9103

Druga z przedstawionych publikacji koncentruje się na dogłębnym zbadaniu charakterystyki wiązania białka Gag do RNA Ty1. W pracy zastosowano szereg eksperymentów biochemicznych (MST, EMSA, wiązanie kompetycyjne) w odniesieniu do dwóch form RNA Ty1 (pełnej, oraz nie posiadającej istotnego dla pakowania do VLP rejonu Psi) oraz dwóch form białka Gag – dojrzałej Gag-p45 oraz prekursorowej Gag-p49. Uzyskane wyniki wskazują na stosunkowo niespecyficzne wiązanie RNA przez obie formy białka Gag, jednak eksperymenty przeprowadzone w rosnącym stężeniu soli oraz testy kompetycyjne sugerują niewielkie preferencje dla wiązania białka Gag w rejonie Psi RNA Ty1. Wykazano również rolę struktury pseudowęzła w wiązaniu białka Gag.

Praca pozostawia jednak pewien niedosyt - zabrakło jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, czy białko Gag wiąże RNA Ty1 w sposób niespecyficzny, charakterystyczny raczej dla białek opiekuńczych, czy też rozpoznaje określone motywy strukturalne? Z tego względu otwartym pozostaje pytanie, w jaki sposób zachodzi selekcja transkryptów podczas pakowania RNA do cząstek VLP? Odpowiedź na te pytania mogłaby zostać uzyskana chociażby za pomocą technik identyfikacji miejsc wiązania białek do RNA takich jak iCLIP czy PAR-CLIP zastosowanych w odniesieniu do RNA Ty1 lub całego transkryptomu. Co więcej, eksperymenty



takie mogłyby zostać przeprowadzone *in vivo*, co umożliwiłoby obserwację interakcji pomiędzy białkiem Gag a RNA Ty1 w warunkach natywnych. Czy, a jeśli tak, to za pomocą jakich eksperymentów doktorantka planuje jednoznacznie odpowiedzieć na postawione powyżej pytania?

**Praca 3** - *Julita Gumna, Tomasz Zok, Kacper Figurski, Katarzyna Pachulska-Wieczorek, Marta Szachniuk* (2020) *RNAthor – fast, accurate normalization, visualization and statistical analysis of RNA probing data resolved by capillary electrophoresis; PLoS One 15(10):e0239287*

Trzecia z przedstawionych prac opisuje nowe narzędzie bioinformatyczne do analizy danych z eksperymentów próbkowania strukturalnego opartych o elektroforezę kapilarną. Najważniejsze funkcjonalności wyróżniające to narzędzie to możliwość automatycznego usuwania silnych sygnałów, które potencjalnie nie są powiązane z sygnałem strukturalnym oraz moduł do analizy porównawczej kilku eksperymentów. O ile pierwsza z tych cech, opracowana według koncepcji własnej doktorantki, jest niezwykle użyteczna i wykazuje się wysoką skutecznością, o tyle dziwi ograniczony dostęp do modułu analizy porównawczej (wymagana rejestracja w serwisie). Stronę merytoryczną obu funkcjonalności oceniam jednak bardzo wysoko.

#### *Podsumowanie*

Zaprezentowane wyniki badań stanowią spójną całość, w kompleksowy sposób charakteryzując strukturalne i termodynamiczne aspekty dimeryzacji RNA Ty1 oraz wstępnie wskazując na mechanizm wiązania białka Gag. Zarówno w rozprawie jak i przedstawionych artykułach wyniki zostały opatrzone trafnymi wnioskami i wyczerpująco przedyskutowane w odniesieniu do istniejącej wiedzy. Przedstawiona rozprawa doktorska świadczy o wysokiej dojrzałości naukowej Autorki oraz stanowi cenny wkład w badania nad mechanizmem retrotranspozycji.

**W mojej ocenie rozprawa doktorska Pani mgr Julity Gumnej spełnia wszystkie wymagania, stawiane rozprawom doktorskim i zwracam się do Rady Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr Julity Gumnej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Poznań, 05.01.2022

Dr hab. Marek Żywicki