



Prof. dr hab.  
Jadwiga Jaruzelska  
ul. Strzeszyńska 32  
60-479 Poznań

tel. +48/61/657 91 00  
fax +48/61/823 32 35  
e-mail: [jadwiga.jaruzelska@igcz.poznan.pl](mailto:jadwiga.jaruzelska@igcz.poznan.pl)  
[www.igcz.poznan.pl](http://www.igcz.poznan.pl)

Recenzja rozprawy doktorskiej

pt. **"Charakterystyka dynamiki strukturalnej i funkcjonalnej genomów RNA aktywnych retrotranspozonów LTR"**

Doktorantka: **Pani mgr Angelika Andrzejewska-Romanowska**

Przedłożona rozprawa doktorska dotyczy bardzo ważnego zagadnienia, związku pomiędzy strukturą a funkcją cząsteczek RNA, w zestawieniu z ich niezwykle plastycznością i powiązaniem z tą cechą licznymi interakcjami w komórce. Analiza struktury drugorzędowej RNA opiera się obecnie o technikę SHAPE (*Selective 2' Hydroxyl Acylation analyzed by Primer Extension*), która dwie dekady wstecz zrewolucjonizowała badania struktury drugorzędowej RNA. Była analizowana najczęściej w warunkach *in vitro*, nie odzwierciedlając lub w niewystarczającym stopniu ukazując stan rzeczy w komórce. Jak zaznacza Autorka, *in vivo* analizowano ją dotąd w odniesieniu do RNA nielicznych wirusów.

Rozprawa została wykonana w Zakładzie Struktury i Funkcji RNA, kierowanym przez Panią dr hab. Katarzynę Pachulską-Wieczorek, posiadającą duże doświadczenie i osiągnięcia w badaniu struktury RNA. Modelem do badań zależności pomiędzy strukturą RNA a funkcją były w rozprawie dwa typy aktywnych drożdżowych retrotranspozonów LTR, Ty1 i Ty3. Analizie poddano genomowy RNA (gRNA) i badano wpływ struktury na ich replikację oraz inicjację translacji w komórce *Saccharomyces cerevisiae*. Opisane w niniejszej rozprawie badania tych gRNA stanowiły kontynuację wcześniejszego projektu tegoż laboratorium, w którym uzyskano

strukturę retrotranspozonu Ty1, lecz jedynie *in vitro* i dotyczyła wyłącznie pierwszych 1482 nt spośród 5.7 kb.

W skład rozprawy wchodzi artykuł przeglądowy opublikowany w *International Journal of Molecular Sciences* z dzielnym pierwszym autorstwem Doktorantki oraz dwa artykuły oryginalne opublikowane w *Nucleic Acids Research*, oba z jej pierwszym autorstwem. Artykuły poprzedza zwarty i znakomicie skonstruowany Wstęp wprowadzający w świat retrotranspozonów LTR, zawierający opis ich cyklu życiowego oraz sekwencji regulatorowych. W dalszej części następuje przedstawienie metod badania struktury RNA z zastosowaniem chemicznego mapowania (SHAPE). Omówione zostały zalety i wady poszczególnych odmian SHAPE zastosowanych w rozprawie a także narzędzia bioinformatyczne oraz analizy statystyczne. Jedynym mankamentem polskiego omówienia rozprawy jest stosunkowo ubogi zestaw skrótów.

W ARTYKULE PRZEGLĄDOWYM Autorka wykorzystała bogate dane pochodzące z badań transkryptomów różnych organizmów by przedstawić bieżący stan wiedzy na temat zależności pomiędzy strukturą RNA *in vivo* a funkcją w powiązaniu z translacją, stabilnością RNA, jego degradacją, wiązaniem RBPs oraz potranslacyjnymi modyfikacjami. Artykuł jest napisany w sposób zwarty i informatywny. Ukazuje szersze tło zagadnień ujętych następnie w sposób bardziej szczegółowy w artykułach oryginalnych. Opisane w nim zagadnienia świetnie podsumowuje zamieszczona w artykule Tabela 2.

PIERWSZY ARTYKUŁ ORYGINALNY zawiera nowatorskie i ukoronowane sukcesem podejście badawcze, które polegało na przeprowadzeniu po raz pierwszy analizy *in vivo* struktury całego genomowego RNA aktywnego retrotranspozonu drożdżowego Ty1, z zastosowaniem techniki SHAPE-CE skonfrontowane następnie ze strukturą w warunkach *in vitro* wykonaną przez Panią dr Zawadzką, z tego samego laboratorium. To porównanie pozwoliło wyodrębnić struktury zachowane w obu stanach, według Autorki prawdopodobnie najważniejsze funkcjonalnie. Bowiem owe występujące w obu stanach struktury obejmowały końce 5' i 3' w których zawarte są sygnały istotne dla dimeryzacji, cyklizacji oraz miejsce przyłączania tRNA<sup>iMet</sup> stanowiące starter do odwrotnej transkrypcji. Zastanawia mnie zamieszczone kilkakrotnie w polskim omówieniu stwierdzenie, obecne również w artykułach oryginalnych „Uzyskane wyniki ujawniły silny wpływ środowiska komórkowego na zwijanie gRNA retrotranspozonu...”, np. w abstrakcie NAR 2021: “Comparative analyses reveal the strong impact of the cellular environment on folding of Ty1 RNA”. Te sformułowania wskazywałoby że *in vitro* jest stanem naturalnym dla tego gRNA Ty1. Powiedziałbym raczej, “Uzyskane wyniki pokazują, że struktura cząsteczki RNA analizowana *in vitro* odbiega w znacznym stopniu od struktury w komórce.”

Bardzo interesującym wątkiem było zastosowanie kasugamycyny blokującej translację które pokazało gRNA Ty1 jako bardziej ustrukturyzowany w porównaniu z kontrolą, co według Autorki mogłoby wskazywać na to że aktywne rybosomy rozplatają strukturę. Na pewno stanowi ważny wynik wstępny do bardziej szczegółowej analizy tego mechanizmu.

Autorka potwierdziła wcześniejsze analizy pokazujące występowanie struktury pseudowęzła w regionie 5' retrotranspozonu Ty1. Jej analizy doprowadziły do wniosku że struktura ta powstaje wcześniej niż sądzono, tzn. przed pakowaniem gRNA w cząstki VLP. Interesujący byłby komentarz w jaki sposób zmienia to myślenie o znaczeniu tego pseudowęzła?

DRUGI ARTYKUŁ ORYGINALNY ma znacznie szerszy zakres w porównaniu z pierwszym. Dotyczy analizy struktury retrotranspozonu Ty3. W tej części rozprawy Autorka zastosowała nieco inne, nowocześniejsze podejście metodologiczne SHAPE-MaP. Analizę gRNA w obu stanach, *in vitro* i *in vivo*, przeprowadziła samodzielnie. Analizy doprowadziły do wniosku, że podobnie do Ty1, cząsteczka gRNA Ty3 *in vivo* jest mniej ustrukturyzowana, chociaż z drugiej strony region 5' gRNA jest nawet bardziej stabilny *in vivo* niż *in vitro*. Również w przypadku Ty3 i pomimo zastosowania odmiennego podejścia sekwencje ważne funkcjonalnie występowały w regionach ustrukturyzowanych w obu stanach, *in vitro* i *in vivo*. Sugestia zawarta w obu artykułach, że regiony stabilne w obu stanach są najistotniejszymi funkcjonalnie np. w regionach 5' oraz 3' gRNA, znalazła również poparcie w artykule opisującym retrotranspozon Ty3. Pokazano w nim obecność dużej liczby motywów tworzących rdzeń (nazwany w ten sposób przez Autorkę, bo obecny w obu stanach), która znajduje się w obrębie lub w pobliżu regionu kodującego odwrotną transkryptazę, stanowiącą najbardziej ewolucyjnie zachowaną domenę białkową wśród retroelementów.

Osiągnięciem było również pokazanie kluczowego, nieopisanego dotąd znaczenia palindromowej sekwencji PAL6 w dimeryzacji gRNA Ty3 od końca 5', która według Autorki może stanowić główne miejsce tworzenia dimeru *in vitro*.

Analiza pod kątem występowania pseudowęzłów oraz kwadrupleksu G *in vivo* pokazała potencjalne tworzenie dwóch pseudowęzłów oraz wskazała na miejsce potencjalnie tworzące kwadrupleks G, to ostatnie zaraz za kodonem AUG. Wyniki obu analiz *in vitro* i *in vivo* są zgodne. Czy można przypuszczać jakie znaczenie ma ich obecność, np. dla translacji gRNA?

Doceniam identyfikację struktur rdzeniowych, które ze względu na stabilność w obu stanach wydają się funkcjonalnie bardzo istotne. Jednak kierunek badań fragmentów gRNA których stopień ustrukturyzowania zmienia się *in vivo* w porównaniu ze stanem *in vitro* wydaje się równie lub nawet bardziej interesujący, choć strategicznie skomplikowany. Rozprawa nasuwa oczywiste pytanie, odzwierciedleniem jakich interakcji są regiony gRNA mniej lub bardziej ustrukturyzowane *in vivo* w porównaniu ze stanem *in vitro*. W jakim stopniu bardziej rozwinięta

struktura uzyskana *in vivo* odzwierciedla interakcje z białkami których brak w badaniach *in vitro* i *vice versa*. Jednym z walorów rozprawy jest otwarcie tego typu pytań i nowej perspektywy badań.

### **Podsumowanie**

Rozprawę uważam za niezwykle wartościową. Opisane w niej osiągnięcia oceniam wysoko. Zastosowana metodologia rozprawy, w istotnym stopniu wzbogacona przez Autorkę, umożliwiła przeprowadzenie wielostronnej charakterystyki i porównanie struktur długich cząsteczek RNA w warunkach *in vivo*, nie tylko *in vitro*. Nowum rozprawy stanowi m. in. zaproponowanie na przykładzie retrotranspozonu Ty1 pierwszego ogólnogomowego modelu *in vivo* struktury endogennego drożdżowego jednoniciowego RNA. To porównanie pozwoliło dostrzec istotne różnice w zwijaniu wirusowych gRNA w obu stanach, *in vitro* i *in vivo*, oraz wskazać stabilne w obu stanach sekwencje rdzeniowe, które pokrywały się z regionami istotnymi funkcjonalnie. Było to ważne w kontekście postawionych pytań o zależność pomiędzy strukturą gRNA a funkcją w cyklu replikacji retrotranspozonu oraz w translacji. Ponadto badania wskazały rejony gRNA które mogłyby potencjalnie służyć jako cele dla leków przeciwwirusowych, biorąc pod uwagę homologie pomiędzy retrotranspozonami Ty1 i Ty3 a wirusami RNA.

### **Wniosek końcowy**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.), Ustawie z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.) oraz w sposobie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (uchwała Rady Naukowej ICHB PAN nr 28/2024/Internet z dnia 20 marca 2024 r.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie Panią mgr Angelikę Andrzejewską-Romanowską do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora. Biorąc pod uwagę wysoką wartość rozprawy wnioskuję również o jej nagrodzenie.

