

## **1. OPIS PROJEKTU DOKTOSKIEGO (4000 znaków max., łącznie z celami i planem pracy)**

**Tytuł projektu:** Udział transkryptomu jądrowego w powstawaniu granul stresowych u roślin

### 1. Cele projektu :

Problem badawczy tego projektu dotyczy molekularnych mechanizmów reakcji roślin na stres abiotyczny. Celem głównym projektu jest poznanie składu granul stresowych (RNA) oraz roli jaką w ich tworzeniu pełni transkryptom jądra komórkowego

Cele szczegółowe:

1. Poznanie transkryptomu granul stresowych (SG) w celu ujawnienia mechanizmów tworzenia i funkcjonowania tych struktur,
2. Rozszyfrowanie interakcji między jądrem komórkowym a SG podczas kolejnych etapów stresu aby poznać funkcję transkryptów jądrowych w biogenezie granul stresowych,
3. Identyfikacja białek RBP (RNA binding protein) biorących udział w selektywnym transporcie RNA z jądra komórkowego do SG.

### **1.1. Ogólna charakterystyka projektu**

Ekstremalne warunki środowiskowe wymagają wyjątkowych reakcji na poziomie genomowym, które zwiększają adaptację do stresu. Rośliny są organizmami, których miejsce życia jest trwale związane z miejscem wykiełkowania. Dlatego plastyczność ekspresji genów w odpowiedzi na stres jest bardzo ważna. Te procesy są regulowane jednocześnie na poziomie transkrypcyjnym i popostranskrypcyjnym (PTGR) (Litholdo i Bousquet-Antonelli 2019). Ostatnio wykazano, że jednym z ważnych mechanizmów PTGR w niekorzystnych warunkach u roślin jest przestrzenna organizacja transkryptomu w komórkach. Wykazaliśmy, że podczas stresu hipoksji następuje retencja RNA w jądrze komórkowym a w cytoplazmie powstają granule stresowe (SG) bogate w nietranslatable RNA. Uważa się, że tworzenie SG ma bezpośredni wpływ na ekspresję genów podczas stresu (Guzikowski et al. 2019), ponieważ przechowywany w nich RNA obniża pośrednio tempo syntezy białka. Dodatkowo sugeruje się, że przechowywany w nich RNA może być wykorzystany w komórce po ustaniu warunków stresowych.

Pewnym zaskoczeniem były nasze badania wstępne ujawniające, że zatrzymanie a nawet obniżenie efektywności transportu jądrowo-cytoplazmatycznego hamuje powstawanie SG. Towarzyszyło temu zmniejszenie ilości poli(A) RNA w cytoplazmie. Wskazuje to na udział pewnych transkryptów jądrowych w powstawaniu granul stresowych. Nasze wyniki potwierdzają także dane literaturowe (i) aktynomycyny D (ActD) stosowana w komórkach zainfekowana wirusem virus 1A (CrPV-1A) hamuje transkrypcję gospodarza co uniemożliwia tworzenie SG (Khong et al. 2017); (ii) ActD hamuje składanie SG pod wpływem arsenianu; ActD powoduje translokację jądrowego białka HuR do cytoplazmy; translokacja białek HuR do cytoplazmy prowadzi do rozpraszania stresowych granul (Boundedjah et al. 2014);

Powyższe dane wskazują na udział jądrowych RNA w tworzeniu SG. W celu weryfikacji tej hipotezy doktorant przeprowadzi (i) identyfikację RNA pochodzących z jądra, które występują w SG; w tym celu przeprowadzi inkubować komórki poddane stresowi z użyciem BrU (analogu urydyny); kiedy nowo transkrybowany RNA opuści jądro komórkowe, wyizoluje SG i z sekwencjonuje RNA zawierające BrU (ii) porównanie transkryptomu

jądrowego roślin poddanych stresowi, traktowanych i nietraktowanych leptomycyną B (inhibitor transportu jądro-cytoplazmatycznego, aby zidentyfikować potencjalne RNA, których zatrzymanie w jądrze powoduje hamowanie tworzenia SG; (iii) sprawdzenie czy w SG są jądrowe „seeds” RNA; badanie czy w mutantach *A. thaliana* z zaburzoną ekspresją potencjalnych „seeds” RNA.

Proponuję tutaj projekt doktoratu dotyczący mechanizmów odpowiedzi roślin na stres abiotyczny, który łączy szereg ścieżek eksperymentalnych i znacznie poprawi nasze zrozumienie roli SG w tym zjawisku. W przedstawionym projekcie chcemy zbadać zupełnie nową kwestię, która dotychczas nie była podejmowana, czyli udział transkryptomu jądrowego w formowaniu SGs, struktur będącym głównym miejscem kumulacji RNA w cytoplazmie podczas stresu.

## 1.2. Plan pracy

- 1) Hodowla siewek *A. thaliana* w kulturach in vitro w warunkach fizjologicznych i stresu hipoksji
- 2) Izolacja i analiza transkryptomu SG (techniki RIP, RNA-seq)
- 3) Śledzenie i identyfikacja transkryptów jądrowych w SG (techniki z użyciem BrU, RIP, BrU-RNA-seq)
- 4) Wewnątrzkomórkowa lokalizacja transkryptów obecnych w SG i jądrze komórkowym (hybrydyzacja in situ)
- 5) Badania transkryptomu jądrowego w warunkach stresu u roślin traktowanych i nietraktowanych inhibitorami transportu jądrowego (izolacja jąder komórkowych techniką INTACT i RNA-seq)
- 6) Analiza obecności granul stresowych w mutantach *A. thaliana* z knockout genów kodujących RNA "seeds" (technika FISH)
- 7) Identyfikacja białek związanych z RNA pozostających w jądrze komórkowym i transportowanych z jądra do SG w trakcie stresu (izolacja wybranych RNP oraz identyfikacja białek techniką bottom-up LC-MS/MS)

## 1.3. Literatura (max. 10 pozycji/sugestia lektury dla kandydatów)

- 1) **Maruri-López** et al. (2021) *Front Plant Sci.* 12:722643;
- 2) **Niedojadło** et al. (2016) *RNA Biol.* 13:531-543;
- 3) **Parker** et al. (2020) *eLife* 9:e49658;
- 4) **Guzikowski** et al. (2019) *Wiley Interdiscip.*
- 5) **Sorenson and Bailey-Serres** (2014) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111:2373-2378;
- 6) **Sorenson and Bailey-Serres** (2015) *Methods Mol. Biol.* 1284:209-219;

## 1.4. Wymagana wstępna wiedza i umiejętności kandydata/tki na doktoranta/kę

Kandydat/ka musi posiadać tytuł magistra z zakresu biologii molekularnej, biotechnologii, biologii lub pokrewnych nauk. Kandydat/ka powinien/na być gotowy/owa na nowe wyzwania i entuzjastycznie podchodzić do ich podejmowania. Doktorant/tka powinien/a radzić sobie z drobnymi niepowodzeniami w pracy naukowej oraz konsekwentnie dążyć do osiągnięcia wyznaczonych celów. Osoba ubiegająca się o to stanowisko powinna wykazywać zaangażowanie w pracę naukową oraz być dyspozycyjna i gotowa do wyjazdów naukowych. Dodatkowo, mile widziane są umiejętności z zakresu biologii komórkowej i molekularnej, takie jak techniki in situ, praca z RNA, genotypowanie czy hodowla *A.*

thaliana. Wymagana jest również biegła znajomość języka angielskiego oraz doskonała umiejętność pracy w zespole.

#### **1.5. Oczekiwany rozwój wiedzy i umiejętności kandydata/tki na doktoranta/kę**

Podczas wykonywania doktoratu oczekuje się, że doktorant/ka stale będzie rozwijał/a swoją wiedzę i umiejętności. Praca na tym stanowisku wymaga przede wszystkim zdobywania nowych kompetencji, interpretacji wyników oraz rozwijania nowych koncepcji w ramach prowadzonych badań.

W pierwszym roku pracy, doktorant/ka powinien/a opanować podstawy merytoryczne swoich badań oraz nauczyć się technik izolacji jąder komórkowych i granul stresowych, ekstrakcji z nich RNA oraz generowania bibliotek ekspresyjnych. W kolejnym roku powinien/a osiągnąć pierwsze wyniki z analizy transkryptomu izolowanych struktur oraz z lokalizacji specyficznych RNA. Do końca trzeciego roku pracy, doktorant/ka powinien/a dysponować wynikami wystarczającymi do napisania pierwszej publikacji. W tym czasie powinien/a także przeprowadzić identyfikację białek związanych z konkretnymi RNA oraz analizę mutantów.

Podczas pracy doktorskiej, Doktorant/ka będzie objęty/a opieką naukową promotora oraz będzie miał/a możliwość rozwijania swoich umiejętności podczas wyjazdów naukowych i uczestnictwa w konferencjach naukowych.