

Warszawa, dn. 09.11.2021 r.

mgr Róża Szatkowska

Katedra Biotechnologii Środków Leczniczych i Kosmetyków

Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej

**Streszczenie rozprawy doktorskiej pt.: „Wpływ aktywności polimerazy III RNA na metabolizm węgla w organizmie modelowym *Saccharomyces cerevisiae*”**

**Promotor: dr hab. inż. Małgorzata Adamczyk**

Pomimo ogromnego postępu jakiego dokonano w ostatnich latach w kwestii wyjaśniania wpływu polimerazy III RNA (RNAP III) na metabolizm, wiele aspektów tego procesu pozostaje niewyjaśnionych. RNAP III odpowiada za syntezę niekodujących RNA, w tym tRNA, U6 snRNA, 5S rRNA, 7SL RNA oraz komponentu RNowego rybonukleazy P (RNaza P). Aktywność tego enzymu jest hamowana przez białko Maf1 w odpowiedzi na sygnały wewnątrz i zewnątrzkomórkowe, takie jak zmiana źródła węgla, wejście w fazę stacjonarnego wzrostu, uszkodzenia DNA, stres oksydacyjny, czy też traktowanie komórek rapamycyną lub chloropromazyną. Białko Maf1 jest jedynym scharakteryzowanym regulatorem RNAP III u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (Boguta, Czerna i Żołądek, 1997; Pluta *et al.*, 2001), a jego funkcja jest konserwowana ewolucyjnie (Vannini *et al.*, 2010). Wobec tego, komórki drożdży z delecją genu *MAF1* (*maf1-Δ*) wykazują podwyższoną aktywność RNAP III, co skutkuje zwiększonym poziomem niektórych tRNA oraz ich prekursorów (Karkusiewicz *et al.*, 2011).

Z dostępnej literatury wynika, że aktywność RNAP III jest powiązana także z metabolizmem węgla. Należy podkreślić, że w komórkach szczepu *maf1-Δ* zaobserwowano obniżenie ekspresji genów glukoneogenetycznych (Morawiec *et al.*, 2013). Ponadto, komórki *maf1-Δ* wykazują defekt wzrostu na niefermentowalnym źródle węgla (Boguta, Czerna i Żołądek, 1997). Opisany fenotyp delecji *MAF1* jest znoszony przez punktową mutację (zamianę reszty aminokwasowej glicyny na alaninę) w pozycji 1007 w drugiej co do wielkości podjednostce RNAP III, C128 (Cieśla *et al.*, 2007). Mutacja ta (*rpc128-1007*) prowadzi do obniżenia stabilności i aktywności RNAP III (Cieśla *et al.*, 2015). Powyższe obserwacje

sugerują, że przełączanie metabolizmu z glikolizy na fosforylację oksydacyjną jest zależne od aktywności RNAP III oraz syntezy cząsteczek tRNA.

Badania opisane w niniejszej rozprawie doktorskiej są poświęcone globalnej, porównawczej analizie metabolizmu szczepów *maf1-Δ* i *rpc128-1007* o zmienionej aktywności RNAP III. Celem niniejszej pracy było odkrycie mechanizmu leżącego u podstaw wcześniej obserwowanych fenotypów. Z przeprowadzonych badań wynika, że nieprawidłowa synteza tRNA, powoduje zmiany w ekspresji genów powiązanych z metabolizmem węgla na poziomie transkrypcji oraz translacji. Przedstawione dane pokazały różnice w poziomach transkryptów transporterów glukozy oraz zmiany w biosyntezie oligosacharydów zapasowych. Jednocześnie szczepy *maf1-Δ* i *rpc128-1007* wykazują szerokie zmiany w poziomach oraz aktywnościach enzymów glikolitycznych, cyklu kwasów trikarboksylowych (TCA) i szlaku pentozofosforanowego (PPP).

Prezentowane wyniki badań potwierdzają, że szczep *maf1-Δ* wykorzystuje głównie tlenową glikolizę do produkcji ATP. W komórkach *maf1-Δ* następuje redystrybucja strumienia metabolitów do cyklu PPP, a także do szlaków biosyntezy trehalozy oraz glikogenu, aminokwasów, czy też nukleotydów. Ma to na celu ochronę komórek przed wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia glukozy, bądź przed gromadzeniem produktów pośrednich glikolizy, jak glukoza-6-fosforan (G6P). Wykluczono, że zmiany obserwowane w szczepie *maf1-Δ* wynikają z zaburzeń represji katabolicznej powiązanej z aktywnością kinazy SNF1. Wyniki uzyskane dla *maf1-Δ* sugerują obniżenie aktywności cyklu glioksalowego i przekierowanie metabolitów przejściowych TCA do syntezy kwasu glutaminowego oraz asparaginowego. Ponadto w niniejszej pracy wykazano, że zmiany w metabolizmie oligosacharydów zapasowych są związane z aktywnością kinazy białkowej A (PKA).

W toku niniejszej pracy badawczej zaobserwowano, że obniżona procesywność RNAP III wynikająca z mutacji punktowej w podjednostce C128 jest skorelowana z ograniczoną zdolnością zmutowanych komórek do wykorzystania glukozy jako źródła węgla (Adamecyk i Szatkowska, 2017; Szatkowska *et al.*, 2019). Jednocześnie szczep *rpc128-1007* wykazuje charakterystyczne cechy dla konstytutywnie aktywnego genu *GCN4* (tzw. fenotyp Gcd). Szczep ten wykazuje odpowiedź na stres charakterystyczną dla niedoboru w podłożu hodowlanym węgla oraz azotu, pomimo optymalnych warunków środowiskowych i prawidłowo funkcjonujących szlaków transdukcji sygnałów przekazujących informację o dostępności składników pokarmowych. W toku niniejszej rozprawy zaobserwowano również: zwiększoną ilość transkryptów genów transporterów glukozy (*HXT2*, *HXT6/7*),

obniżenie poziomów oraz aktywności enzymów glikolitycznych, przy jednoczesnym podwyższeniu aktywności białek biorących udział w syntezie aminokwasów *de novo*. W przeciwieństwie do *maf1-Δ*, szczep *rpc128-1007* wykazuje wysoką aktywność metaboliczną TCA, co pozwala na efektywne wykorzystanie glicerolu jako źródła węgla.

Przedstawione wyniki jednoznacznie potwierdzają, że aktywność RNAP III ma kluczowe znaczenie w systemowej regulacji metabolizmu u *S. cerevisiae*, zarówno na poziomie transkrypcji genów kodujących białka, jak i translacji. Powoduje również zmiany w przepływie strumieni metabolitów. Powyższe uwarunkowania przekładają się na kondycję zmutowanych szczepów, a także ich obniżoną zdolność do wzrostu w zmieniających się warunkach środowiska.

**Słowa kluczowe:** polimeraza III RNA; *Maf1*; metabolizm węgla; metabolizm aminokwasów; proteomika porównawcza; glikoliza; transportery glukozy; oligosacharydy zapasowe; cykl kwasów trikarboksylowych; drożdże