

STRESZCZENIE

Niniejsza rozprawa doktorska dotyczy rybosomalnego centrum GTPazowego (GAC, ang. *GTPase Associated Center*), jednego z miejsc aktywnych rybosomu, którego funkcją jest rekrutacja i stymulacja aktywności GTPazowej czynników translacyjnych. Energia uwolniona w wyniku hydrolizy GTP zasila maszynę translacyjną, zapewniając jednokierunkowość i procesywność translacji oraz precyzję dekodowania informacji genetycznej. Struktura GAC formuje się podczas końcowych etapów biogenezy dużej podjednostki rybosomalnej (60S) w wyniku wymiany białkowego czynnika wspomagającego biogenezę Mrt4 na rybosomalne białko uL10. Dojrzałą strukturę GAC stanowi oligomeryczny kompleks zwany boczną wyniosłością rybosomalną, zbudowany z białek uL10, P1, P2 oraz elementów rRNA. Jednym z mechanizmów regulacji procesu dojrzewania rybosomów jest fosforylacja reszt serynowych/treoninowych białek wspomagających biogenezę rybosomów. Potencjalnym regulatorem biogenezy struktury GAC jest białko Mrt4 zawierające w regionie C-końcowym reszty seryny ulegające fosforylacji. GAC w swej kanonicznej kompozycji odgrywa istotną rolę w optymalnym funkcjonowaniu rybosomu, jednakże w literaturze można znaleźć wiele doniesień dotyczących modyfikacji metabolizmu komórki poprzez zmiany w stechiometrii struktury GAC. Zmiany te mogą prowadzić do powstania populacji "wyspecjalizowanych rybosomów" oraz do ujawnienia się tzw. "pozarybosomalnych" funkcji białek formujących strukturę GAC, odmiennych od ich roli w translacji. Rybosomalne białko uL10, postrzegane jako białko "wielofunkcyjne" (ang. *moonlightening protein*) o nieznanym "poza-translacyjnych" aktywnościach, zostało powiązane z wieloma szlakami metabolicznymi oraz stanami chorobowymi. Mimo dostępności tych danych, pytanie o dokładną charakterystykę "pozarybosomalnych" funkcji białka uL10 w dalszym ciągu pozostaje otwarte.

Celem rozprawy doktorskiej było poznanie roli białek formujących strukturę GAC: Mrt4 oraz uL10, P1, P2 w adaptacji metabolizmu komórki do warunków stresowych. Analizy subkomórkowej lokalizacji i dynamiki białek w warunkach *in vivo*, przeprowadzone na poziomie pojedynczej komórki w oparciu o przejściową ekspresję badanych białek w fuzji z białkami fluorescencyjnymi, komplementowane były analizami biochemicznymi *in vitro*, przeprowadzonymi na poziomie populacji komórek zarówno dla badanych białek natywnych jak i fuzyjnych.

Realizację postawionego celu rozpoczęto od analizy subkomórkowej lokalizacji wariantów białka Mrt4: formy natywnej, delecyjnej (pozbawionej regionu C-końcowego), fosfomimetycznej (imitującej stan permanentnej fosforylacji) oraz defosfomimetycznej (imitującej stan permanentnej defosforylacji) w warunkach stresowych indukowanych aktynomycyną D (ActD) ("stres jąderkowy") oraz leptomycyną B (LMB). Zaobserwowano, że w przeciwieństwie do formy natywnej, w warunkach stresowych, wszystkie trzy warianty białka Mrt4 ze zmodyfikowanym regionem C-końcowym wykazują retencję cytoplazmatyczną na niedojrzałych podjednostkach 60S, wskazując na bezpośredni związek statusu fosforylacji Mrt4 z regulacją biogenezy rybosomów. Następnie przeprowadzono analizy subkomórkowej dystrybucji białkowych komponentów dojrzałego centrum GTPazowego w warunkach stresu indukowanego ActD, pokazując odmienne zachowanie się białek uL10, P1, P2 w stosunku do innych białek rybosomalnych. W "stresie jąderkowym" zaobserwowano unikalne zjawisko pojawienia się w cytoplazmie białka uL10 w formie niezwiązanej z rybosomem. Zwiększoną szybkość dyfuzji uL10 w "stresie jąderkowym" pokazano za pomocą technik FRAP (ang. *Fluorescence Recovery After Photobleaching*) oraz FLAC (ang. *Fluorescence Loss After photoConversion*). Uniwersalny charakter tego zjawiska potwierdzono wykorzystując różne linie komórkowe oraz różne induktory stresu. Wykorzystując nowatorskie podejście eksperymentalne nazwane FRAP-AC (ang. *FRAP After photoConversion*) udowodniono, że pojawienie się uL10 w cytoplazmie w formie niezwiązanej z rybosomem w "stresie jąderkowym" jest wynikiem uwolnienia uL10 z istniejących w komórce rybosomów.

Otrzymane wyniki wskazują na nowe mechanizmy metaboliczne związane z adaptacją komórki do zmiennych warunków środowiskowych, poprzez modyfikacje konkretnej struktury maszyny translacyjnej. W tym kontekście zarówno "niedojrzała" jak i "dojrzała" struktura GAC może odgrywać ważną rolę w modulowaniu metabolizmu komórki poprzez regulację biogenezy rybosomów, translacji oraz poprzez "pozarybosomalne" funkcje białek GAC. Na bazie otrzymanych wyników można zaproponować model funkcjonowania struktury GAC w warunkach stresowych według którego: białko Mrt4 ulega retencji na niedojrzałych podjednostkach 60S blokując dalsze etapy ich dojrzenia a białko uL10 ulega uwolnieniu z rybosomu prawdopodobnie zyskując "nowe życie" metaboliczne w celu pełnienia odmiennej funkcji biologicznej.

Maria Depta