

## STRESZCZENIE

Niniejsza rozprawa doktorska dotyczy określenia funkcji multiplikacji rybosomalnych białek P, które stanowią główny element białkowy eukariotycznego centrum GTPazowego - GAC, ang. „*GTPase Associated Center*”. Centrum to znajduje się na dużej podjednostce rybosomalnej, a jego funkcja polega na wiązaniu i stymulacji aktywności GTPazowej czynników translacyjnych, tzw. trGTPaz. GAC jest odpowiedzialny za uwolnienie energii zgromadzonej w GTP, która jest głównym motorem napędowym w funkcjonowaniu rybosomu i zapewnia jednokierunkowość procesu translacji. Eukariotyczne białka P tworzą dwa hetero-dimery P1-P2, które nie oddziałują bezpośrednio z rybosomalnym RNA, ale wiążą się z rybosomem za pośrednictwem białka uL10, tworząc pentameryczny kompleks uL10-(P1-P2)<sub>2</sub>. W komórkach drożdżowych kompleks ten posiada zmodyfikowaną konfigurację, uL10-(P1A-P2B)(P1B-P2A). Unikatową cechą białek P wchodzących w skład kompleksu jest ich multiplikacja, a przede wszystkim powielenie tzw. domen P, które zawierają konserwatywny C-terminalny fragment, odpowiedzialny za bezpośrednie oddziaływanie z trGTPazami. W eukariotycznym kompleksie uL10-(P1-P2)<sub>2</sub> występuje pięć identycznych C-końcowych fragmentów; cztery pochodzą z dwóch dimerów P1-P2 oraz piąty z domeny P w białku uL10. Obecność tylko jednego takiego elementu na rybosomie wystarcza do stymulacji, zależnej od czynników translacyjnych, hydrolizy GTP *in vitro* co zapewnia przebieg biosyntezy białka i żywotność komórek.

Celem pracy jest poznanie funkcji eukariotycznych białek P, a przede wszystkim roli multiplikacji tych białek w aspekcie działania maszynerii translacyjnej.

Jako model badawczy wykorzystano komórki drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, zestaw mutantów na bazie szczepu BY4741, które posiadały zmodyfikowaną konfigurację kompleksu białek P. Wykorzystano trzy szczepy drożdżowe, BY4741 posiadający niezmienny kompleks w formie uL10-(P1A-P2B)(P1B-P2A), oraz mutanty: uL10<sub>Δh2</sub> oraz uL10<sub>Δh1h2</sub> posiadające konfigurację kompleksu odpowiednio, uL10-(P1A-P2B) i uL10. Realizację zadań badawczych rozpoczęto od charakterystyki fenotypowej otrzymanych mutantów drożdżowych. Zaobserwowano, że szczep drożdżowy uL10<sub>Δh1h2</sub>, w którym rybosomy pozbawione są wszystkich białek P charakteryzuje się powolnym wzrostem, a cecha ta związana jest z zaburzeniami w cyklu komórkowym, w fazie G1, czego rezultatem jest znacznie wydłużony czas generacji komórki drożdżowej. Analizy fenotypowe wykazały ponadto, że mutant uL10<sub>Δh1h2</sub> wykazuje defekt metaboliczny, tj. nie wykorzystuje tzw. niefermentowalnych źródeł węgla, jak etanol czy glicerol. Następne kroki to analizy

skierowane na opisanie funkcjonowania maszynerii translacyjnej w aspekcie ilościowym jak i jakościowym. Analizy ilościowe, czyli określenie wydajności translacji na poszczególnych jej etapach. Wykorzystano takie analizy jak „profile polisomów” w tym analizę „runoff” oraz „half transit time”. Analizy te wykazały, że brak białek P na rybosomie nie zaburza efektywności translacji na poszczególnych etapach cyklu translacyjnego. Jednakże, najbardziej zaskakujący wynik otrzymano na bazie analiz jakościowych wskazując, że rybosomy z defektywnym kompleksem białek P wykazują zaburzenia w precyzji dekodowania informacji genetycznej. Analizy te wykonano na bazie systemu dwóch lucyferaz jako układ reporterowy („Dual Luciferase Assay Reporter System”). Wykazano, że zakłócenie architektury kompleksu wpływa w szczególności na proces dekodowania, tj. wprowadzenie błędnego aminokwasu „misincorporation”, supresji kodonu stop „read-through” czy przesunięcie ramki odczytu o 1 nukleotyd w kierunku 3’, tzw. +1 „frameshifting”. Wyniki analiz oparte na systemie reporterowych lucyferaz, poparte są obserwacjami wskazującymi, że mutant drożdżowy pozbawiony białek P jest nadwrażliwy na antybiotyki z grupy aminoglikozydów, które upośledzają proces dekodowania. Pokazuje to synergistyczny efekt między defektem dekodowania wynikającym z niedoboru białek P a stosowanym aminoglikozydem. Analizy te, co istotne, pokazują korelację między liczbą kopii białek P na rybosomie i wpływem na dokładność tłumaczenia informacji genetycznej przez rybosom. Zubożenie rybosomu o jeden dimer P1-P2, to jedynie umiarkowany defekt dekodowania, podczas gdy już brak dwóch dimerów powodowało znaczny wzrost częstotliwość mylenia się rybosomu. Ponadto, analizy działania maszynerii translacyjnej wskazały, że mutant drożdżowy z zaburzeniami w architekturze kompleksu białek P nabywa oporności na sordarin; specyficzny antybiotyk działający na grzyby, rzucając nieco więcej światła na molekularny aspekt działania tego antybiotyku.

Podsumowując, w niniejszej rozprawie doktorskiej wykazano, że multiplikacja białek P, a przede wszystkim obecność pięciu charakterystycznych C-terminalnych fragmentów białek P1/P2 i białka uL10, odgrywa istotną rolę w procesie dekodowania informacji genetycznej przez rybosom. Zatem, można stwierdzić, że główną rolą multiplikacji białek P jest funkcjonalne sprzężenie z jakościowym aspektem działania rybosomu, tj. dekodowaniem informacji genetycznej. Ponadto, badania te niosą w sobie aspekt aplikacyjny, ponieważ wskazują, że kompleks białek P może odgrywać istotną rolę w oddziaływaniu sordarinu z rybosomem. Wynik ten, otwiera drogę do poznania podstaw molekularnych działania sordarinu na maszynerię translacyjną, a tym samym opracowanie efektywnych anti-grzybiczych antybiotyków.

