

## STRESZCZENIE

Wszystkie komórki eukariotyczne mają co najmniej trzy różne polimerazy RNA (Pol), wieloskładnikowe kompleksy, które są składane w cytoplazmie, a następnie transportowane do jądra. Pol I syntezuje prekursory rRNA, Pol II produkuje głównie mRNA, zaś Pol III generuje tRNA, 5S rRNA i inne, małe niekodujące RNA. Jednostki transkrypcyjne Pol III są relatywnie krótkie, 75-300 nukleotydów, posiadają też wewnętrzne sekwencje promotorowe, nazywane A- i B-box. W poprzednich badaniach prowadzonych w naszym laboratorium zidentyfikowano dwa ważne białka związane z kontrolą Pol III: Maf1 – generalny i globalny represor transkrypcji z udziałem Pol III oraz Rbs1 – czynnik uczestniczący w składaniu kompleksu Pol III. Wyniki prezentowane w tej rozprawie, wskazują na następujące, nowe aspekty regulacji Pol III: 1) kontrolę elongacji i terminacji transkrypcji Pol III niezależną od Maf1, 2) dodatkową funkcję białka Rbs1, związaną z wiązaniem RNA i 3) ubikwitylację i proteasomalną degradację największej podjednostki Pol III.

Pierwsza część rozprawy prezentuje wyniki wielkoskalowej analizy nowopowstających drożdżowych transkryptów związanych z Pol III wykonanej metodą CRAC. Analiza otrzymanych danych ujawniła nierównomierny, niezależny od Maf1, rozkład Pol III na jednostkach transkrypcyjnych. Lokalne spowolnienie elongacji transkrypcji i przejściowe zatrzymywanie się polimerazy obserwowano w rejonach sekwencji A- i B- box. Wynik ten sugeruje kontrolę elongacji Pol III przez generalny czynnik transkrypcyjny TFIIC, który wiąże się do tych sekwencji. Dla wielu genów tRNA zaobserwowano wydłużone odczyty na końcu 3', wynikające z przeczytywania (read-through) kanonicznych terminatorów poli(T). Długości sekwencji ulegających transkrypcji położonych za sygnałem terminacji były niezależne od Maf1, lecz skorelowane z efektywnością sekwencji terminatora.

Białko Rbs1, zidentyfikowane jako czynnik uczestniczący w składaniu Pol III, zawiera domenę R3H, która potencjalnie wiąże jednoniciowe kwasy nukleinowe. Ta cecha sugeruje dodatkową funkcję Rbs1. Druga część rozprawy prezentuje wyniki analizy CRAC, potwierdzające zdolność białka Rbs1 do wiązania RNA. Analiza wyników wskazuje, że białko Rbs1 preferencyjnie wiąże mRNA zawierające sekwencje poli(A) w rejonach regulatorowych (UTR) 5' lub 3'. Rola Rbs1 w regulacji translacji wybranych mRNA jest przedmiotem projektu realizowanego obecnie w laboratorium.

Ostatnia część rozprawy poświęcona jest represji transkrypcji tRNA w kontekście degradacji Pol III. Gwałtowny spadek transkrypcji genów tRNA obserwowano w komórkach drożdży traktowanych kwasem mykofonelowym (MPA), który hamuje syntezę *de novo* nukleotydów guaninowych. Temu drastycznemu zahamowaniu aktywności Pol III

towarzyszyła jednak tylko częściowa dysocjacja polimerazy od chromatyny. Dodatkowo, przedłużenie inkubacji z MPA powodowało zniesienie represji syntezy tRNA w wyniku indukcji *IMD2*, dehydrogenazy monofosforanu inozyny. Jest to kolejny dowód na zatrzymanie się Pol III na matrycy DNA (tzw. *polymerase stalling*), dotąd nie opisane w literaturze. Nowością naukową jest także udokumentowanie zachodzącej w warunkach represji transkrypcji, degradacji największej podjednostki katalitycznej Pol III, białka C160. Dotychczas poznane zostały procesy kontrolowanej degradacji największych podjednostek Pol I i Pol II. W ramach realizacji pracy doktorskiej po raz pierwszy wykryto bezpośrednio ubikwitylowane formy białka C160 oraz wykazano jego proteasomalną degradację.

## SUMMARY

All eukaryotic cells have at least three different RNA polymerases (Pol) - multimeric protein complexes that are assembled in the cytoplasm and then transported to the nucleus. Pol I synthesizes a large precursor of the ribosomal RNA (rRNA), Pol II produces mainly mRNAs, and Pol III generates tRNAs, 5S rRNA and other small noncoding RNAs. Pol III transcription units are relatively short, 75–300 nucleotides, and possess intragenic promoters termed A- or B-boxes. Previous studies from our laboratory identified two important proteins involved in Pol III control: Maf1, a general and global repressor of Pol III transcription, and Rbs1, a Pol III assembly factor. Results reported in this thesis indicate the following, novel aspects of Pol III regulation: 1) the Maf1-independent control of elongation and termination of Pol III transcription, 2) an additional function of the Rbs1 protein related to RNA binding, and 3) ubiquitylation and proteasomal degradation of the largest Pol III subunit.

The first part of the thesis presents results of a genome-wide CRAC analysis of yeast nascent transcripts attached to Pol III under permissive and restrictive growth conditions. Data analysis revealed uneven Maf1-independent polymerase distribution across transcription units. Local slow-down of elongation or transient pausing of the polymerase was suggested in the regions corresponding to A- and B boxes. Perhaps the general Pol III factor, TFIIC, which binds to these regulatory elements, may slow down the Pol III elongation rate. Moreover, many tRNA genes were found to generate long, 3'-extended forms due to read-through at the canonical poly(T) terminators. The degree of read-through was Maf1-independent but correlated with the terminator strength.

The sequence of the Rbs1 protein, identified as a Pol III assembly factor, contains the R3H domain, which potentially binds single-stranded nucleic acids. This feature suggested that Rbs1 may have another function. The second part of the thesis reports results of the CRAC analysis, confirming the RNA binding ability of the Rbs1 protein. Rbs1 preferentially binds mRNAs containing poly(A) sequences in their regulatory regions, 5' or 3' UTRs. Hypothetical role of Rbs1 in control of translation of selected mRNA targets is a subject of ongoing project in the laboratory.

The last part of the thesis explores the mechanism of Pol III repression focusing on control of Pol III degradation. A rapid decrease of Pol III mediated transcription of tRNA genes was observed upon treatment of yeast with mycophenolic acid (MPA), a well-known drug that inhibits *de novo* synthesis of guanine nucleotides. Inhibition by MPA was, however, correlated with Pol III pausing, rather than Pol III dissociation from chromatin. Additionally, prolonged incubation with MPA led to induction of *IMD2* gene encoding inosine monophosphate

dehydrogenase; and bypassing inhibition of tRNA synthesis. Interestingly, Pol III repression by various stress conditions, including MPA treatment and metabolic shift from fermentation to respiration led to decreased steady state levels of Pol III subunits. The largest catalytic subunit C160, is subjected to controlled degradation. C160 shares substantial homology with the respective largest subunits of Pol I and Pol II, known before to be ubiquitylated and degraded in proteasome. Here, for the first time ubiquitylated forms of C160 were detected directly and proteasomal degradation of the C160 protein was demonstrated.