

Streszczenie

Wyniki opisane w niniejszej pracy oraz otrzymane równoległe w zespole składają się na zrozumienie funkcji białka Rbs1 w komórce drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Obecny stan wiedzy pozwala zakwalifikować Rbs1 jako ewolucyjnie konserwowane białko eukariotyczne, skłonne do agregacji, zaangażowane w kontrolę metabolizmu RNA, cyklu komórkowego oraz składanie wieloskładnikowych kompleksów polimeraz RNA.

Niniejsza praca obejmuje badania dotyczące wybranych aspektów dotyczących białka Rbs1. Jej rozpoczęcie przypada na rok 2013, kiedy gen kodujący Rbs1 wyizolowany został jako wielokopijny supresor mutacji punktowej *rpc128-1007* w genie kodującym podjednostkę polimerazy III RNA (Pol III), a białko Rbs1 było scharakteryzowane w literaturze jako posiadające domenę R3H oraz potencjalną domenę prionową.

Pierwsza część pracy jest poświęcona identyfikacji homologów białka Rbs1 u wyższych eukariontów. Analizy bioinformatyczne wykazały podobieństwo Rbs1 do białek wiążących RNA, zawierających domenę R3H i należących do wspólnej rodziny. W białkach tej rodziny bezpośrednio za domeną R3H znajduje się domena SUZ, również zaangażowana w wiązanie RNA. Dopasowania sekwencji Rbs1 i modelu sekwencji SUZ pozwoliły na identyfikację domeny SUZ również w białku Rbs1. Domena SUZ jest położona w sąsiedztwie domeny R3H zlokalizowanej w N-końcowej, ustrukturyzowanej części Rbs1. W większości nieustrukturyzowana C-końcowa część Rbs1 zawiera potencjalną domenę prionową i liczne sekwencje o niskim poziomie skomplikowania (LCR – ang. *Low Complexity Regions*).

Wyniki badań eksperymentalnych opisane w tej pracy połączyły dotychczasowe doniesienia o Rbs1 nadając im głębszy sens. Wykazałam, że funkcjonalna domena R3H jest konieczna do supresji mutantu *rpc128-1007*, w którym zaburzone jest składanie kompleksu (Pol III). Dalsza charakterystyka fizjologii tego interesującego mutantu doprowadziła do wniosku, że jest on zahamowany w fazie G1 cyklu komórkowego. Poprzez konstrukcję i analizę funkcjonalną podwójnego mutantu *rpc128-1007 maf1Δ* udało się rozdzielić defekt składania i obniżenie aktywności Pol III, a w konsekwencji wykazać, że pierwotną przyczyną zahamowania cyklu komórkowego w mutancie *rpc128-1007* jest defekt składania kompleksu polimerazy.

Stwierdziłam, że nadprodukcja Rbs1 w kontrolnym szczepie dzikim powoduje osłabienie tempa wzrostu hodowli w warunkach standardowych oraz obniża globalny poziom translacji w sposób zależny od wiązania RNA. Ponadto wykazałam, że białko Rbs1 oddziałuje z rybosomami a osłabienie tempa wzrostu jest skorelowane z agregacją białka Rbs1.

W ostatniej części rozprawy pokazano, że z udziałem potencjalnej domeny prionowej białko Rbs1 tworzy pojedyncze, okrągłe skupiska w cytoplazmie. Agregaty obserwuje się już w fazie logarytmicznej lecz ilość komórek z agregatami wzrasta w stacjonarnej fazie wzrostu. Skupiska te są tworami dynamicznymi, zanikającymi po dodaniu glukozy do hodowli w fazie stacjonarnej a ich lokalizacja w

największym stopniu pokrywa się z granulami fazy stacjonarnej. Agregacja Rbs1 wzrasta w warunkach stresu termicznego, lecz jest także odwracalna. Pokazano również, że potencjalna domena prionowa odpowiada za agregację białka Rbs1 w odpowiedzi na stres wywołany zwiększonym stężeniem jonów cynku i to najprawdopodobniej dzięki agregatom białka Rbs1 komórki są bardziej odporne na jony cynku obecne w pożywce.

Summary

This thesis as well as other results obtained simultaneously in our laboratory aim to elucidate the function of Rbs1 protein in yeasts. Current state of the knowledge allows us to qualify Rbs1 as evolutionarily conserved eukaryotic protein that is prone to form aggregates and it is involved in control of RNA metabolism, cell cycle and assembly of multisubunit RNA polymerase complexes. The results presented herein cover selected aspects of Rbs1 protein.

At the time I have started my PhD in 2013 gene encoding Rbs1 was found as multicopy suppressor of point mutation *rpc128-1007* in gene encoding RNA polymerase III (Pol III) subunit. Rbs1 was characterized as the yeast protein containing RNA binding R3H domain as well as putative prion domain.

First part of the thesis addresses the question whether the homologues of Rbs1 are present in higher eukaryotes. Bioinformatic analysis showed that Rbs1 is similar to RNA binding proteins containing R3H domain, which belong to one family. This initial analysis revealed the conservation of the another RNA-binding domain, SUZ, located downstream to the R3H domain. Alignment of Rbs1 to SUZ sequence model showed that Rbs1 also contains SUZ domain in proximity to R3H domain in structured N-terminus of Rbs1 protein. C terminal part of Rbs1 is mostly unstructured with putative prion domain and numerous low complexity regions (LCRs).

The experiments described in this thesis connected previous data about Rbs1, putting it in a broader perspective. First, I have shown that functional R3H domain is crucial for suppression of *rpc128-1007* Pol III assembly mutant which is assembly deficient. Further analysis of this interesting mutant led to the conclusion that it is delayed in G1 phase of the cell cycle and this delay was overcome by overproduction of Rbs1. Thanks to construction and analysis of double mutant *rpc128-1007 maf1Δ* I was able to separate the impairment of assembly and low level of Pol III activity. This enabled me to demonstrate that the primary cause of cell cycle inhibition in the *rpc128-1007* mutant is a defect in the assembly of the polymerase complex. I thus concluded that Rbs1 is involved in coordination of Pol III assembly and cell cycle.

Next, I have shown that overproduction of Rbs1 in standard conditions slows growth rate and decreases global level of translation in RNA binding dependent manner.

In the last part I investigated aggregation of Rbs1 protein. Rbs1 forms single, round foci in the cytoplasm. Rbs1 aggregation is mostly dependent on prion domain. Number of cells with Rbs1 foci rises in stationary phase and their localisation in living cells mostly correlates with positions of stationary phase granules. Rbs1 foci are non-amyloid dynamic granules, and they disappear after glucose addition to cells in stationary phase. The aggregation of Rbs1 could be also induced by elevated temperature. Increased amount of Rbs1 foci is also observed in response to stress induced by high concentration of zinc ions. Likely the elevated resistance to the zinc is attributed to Rbs1 aggregation.