



UNIwersYTET
WARszawSKI

Wydział Biologii
Instytut Genetyki i Biotechnologii



Warszawa 14.02.2022

Dr hab. Michał Małecki
Instytut Genetyki i Biotechnologii
Uniwersytet Warszawski

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Róży Szatkowskiej zatytułowanej „The Effects of RNA polymerase III Activity on Carbon Metabolism in the Saccharomyces Cerevisiae Model Organism”.

Pani Róża Szatkowska uzyskała tytuł magistra Biotechnologii o specjalności Biotechnologia Molekularna 25.06.2014 r. Tytuł magistra został nadany przez Wydział Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Następnie kandydatka rozpoczęła studia doktoranckie na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. Kandydatka ubiega się o nadanie stopnia doktora po raz pierwszy. Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Róży Szatkowskiej została wykonana w Laboratorium Systemów i Biologii Syntetycznej na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. Prace badawcze zostały przeprowadzone pod kierunkiem dr hab. inż. Małgorzaty Adamczyk.

Badania przeprowadzone w ramach przedstawionej mi rozprawy dotyczyły charakterystyki zmian strategii metabolicznych indukowanych przez modulację aktywności polimerazy trzeciej. Polimeraza trzecia odpowiada za produkcję kluczowych dla funkcjonowania komórki niekodujących RNA takich jak tRNA, Rnazy P, 5SRNA, U6 snRNA czy 7SL RNA. Poziom dostępnych tRNA czy 5SRNA może wpływać na wydajność translacji, natomiast poziom U6 snRNA będzie miał wpływ na splicing, a 7SL RNA na prawidłowy poziom i lokalizację białek w komórce. Translacja jest procesem kluczowym dla funkcjonowania, a białka są najliczniejszym strukturalnym i funkcjonalnym elementem komórki. Dodatkowo większość energii produkowanej przez szybko dzielącą się komórkę drożdżową jest zużywana właśnie na produkcję białek. Poprzez modulację aktywności polimerazy trzeciej można więc pośrednio wpływać na proces produkcji białek, a co za tym idzie na ekonomię energetyczną całej komórki. Produkcja tRNA przez polimerazę trzecią musi więc być regulowana w zależności od warunków, a komórki rosnące wolno lub poddane stresowi środowiskowemu zmniejszają aktywność polimerazy III. Jedynym jak do tej pory poznanym regulatorem aktywności polimerazy trzeciej jest jej represor białko Maf1, które jest konserwowane u wszystkich eukariota. Wcześniejsze prace wykazały że genetyczne manipulacje prowadzące do zwiększenia lub zmniejszenia aktywności polimerazy trzeciej prowadzą do zmiany w strategii metabolizmu źródła węgla i właśnie dokładne opisanie tych zmian oraz próba zaproponowania mechanizmu odpowiedzialnego za ich indukcję autorka postawiła sobie za cel.

Aby założony cel osiągnąć autorka używa dwu dobrze scharakteryzowanych mutantów drożdży piekarniczych. Szczep z delecją wspomnianego już genu *MAF1* którego produkt jest supresorem aktywności polimerazy

trzeciej jest tutaj wykorzystany jako model zwiększonej aktywności polimerazy. Szczep *rpc128-1007* z mutacją punktową w podjednostce Ret1 polimerazy trzeciej, który został zidentyfikowany jako supresor fenotypu delekcji *MAF1*, został tutaj użyty jako model zmniejszonej aktywności polimerazy trzeciej. Jeśli chodzi o metabolizm cukrów to szczep z delecją genu *MAF1* wykazuje słaby wzrost na niefermentowalnym źródle węgla - glicerolu, natomiast szczep z mutacją polimerazy trzeciej radzi sobie słabiej na glukozie - podłożu fermentowalnym. Na niefermentowalnym źródle węgla komórki drożdży uzyskują energię głównie w procesie oddychania, natomiast drożdże rosnące na glukozie uzyskują energię na drodze fermentacji. Fenotypy badanych szczepów sugerują więc, że manipulacja aktywnością polimerazy trzeciej prowadzi do zmian w strategii metabolizmu energetycznego komórki.

W celu charakterystyki metabolizmu badanych szczepów autorka zastosowała imponujący zestaw adekwatnych metod biologii molekularnej i genetyki. Przede wszystkim przeprowadzono ilościową analizę proteomu badanych szczepów. Następnie przeanalizowano aktywności wybranych enzymów szlaku metabolizmu węgla, wyznaczono ilości wybranych metabolitów czy określono kinetykę przebiegu kluczowych procesów. Z pomocą metod *Western blot* czy *real time PCR* zbadano poziomy RNA i białek wybranych regulatorów. Z użyciem znakowanych izotopem analogów źródeł węgla przeprowadzono analizę przepływu metabolitów w ścieżce metabolizmu węgla. Dodatkowo przedstawiono analizę interakcji białek metodami mikroskopii fluorescencyjnej.

Otrzymane przez autorkę pracy wyniki potwierdzają, że modulacja aktywności polimerazy trzeciej prowadzi do zmian w metabolizmie węgla. Metabolizm węgla jest regulowany przez sygnały środowiskowe, głównie dostępność źródła węgla, w tym przypadku glukozy. Zmiana aktywności polimerazy trzeciej powoduje, że komórki modułują swój metabolizm niezależnie od środowiska, innymi słowy zostaje aktywowany jakiś wewnątrzkomórkowy sygnał indukujący obserwowaną zmianę, który jest dominujący względem sygnałów środowiskowych. W szczególności autorka zaobserwowała, że u drożdży wykorzystujących glukozę jako główne źródło węgla zwiększenie aktywności polimerazy trzeciej powoduje dodatkową indukcję glikolizy, akumulację cukrów zapasowych – glikogenu i trehalozy, a także zwiększenie aktywności szlaku pentozofosforanowego. Tymczasem zmniejszenie aktywności polimerazy powoduje inhibicję glikolizy i mniejszą akumulację cukrów zapasowych, koreluje to też ze słabszym tempem wzrostu takiego szczepu na podłożu z glukozą. Autorka zauważa także znacznie zwiększoną aktywność ścieżek biosyntezy aminokwasów w szczepie ze zmutowaną polimerazą trzecią i celnie identyfikuje źródło tej indukcji –czynnik transkrypcyjny Gcn4, który jest jednym z głównych kontrolerów metabolizmu aminokwasów w komórce. Autorka wykazuje, że szczep z delecją *MAF1*, a co za tym idzie z bardziej aktywną polimerazą, ma obniżoną aktywność cyklu kwasów trikarboksylowych. Jest to szczególnie widoczne na niefermentowalnym źródle węgla. Autorka sugeruje, że ta inhibicja jest głównym powodem słabego wzrostu szczepu z delecją *MAF1* na glicerolu, a mutacja *rpc128-1007* polimerazy trzeciej powoduje rewersję tego fenotypu przez przywrócenie prawidłowego funkcjonowania cyklu kwasów trikarboksylowych.

Reasumując, autorka osiągnęła założone cele pracy i przedstawiła wnikliwą analizę metabolizmu węgla w komórkach z różną aktywnością polimerazy trzeciej. Wiele eksperymentów wykonanych przez autorkę miało na celu identyfikację ścieżek, które pośredniczą w generowaniu zmian metabolicznych w badanych mutantach. W tym kontekście najważniejszym odkryciem jest identyfikacja indukcji Gcn4. W obu szczepach ze zmienioną aktywnością polimerazy zaobserwowano indukcję tego czynnika, ale jest ona szczególnie mocna w szczepie z obniżoną aktywnością polimerazy trzeciej. Z kolei indukcja Gcn4, który jest czynnikiem transkrypcyjnym, jest w stanie wytłumaczyć wiele ze zmian obserwowanych w mutancie ze zmniejszoną aktywnością polimerazy. Oprócz związku z Gcn4 autorka zidentyfikowała także ciekawe powiązania z innymi czynnikami zaangażowanymi w modulację metabolizmu węgla, mam tu na myśli zmiany w aktywności kinazy białkowej

zależnej od cAMP (PKA) zaobserwowane w obu szczepach, a także odkrycie interakcji między białkiem Maf1 a czynnikami powiązаныmi z translacją i regulacją drożdżowej kinazy SNF1 aktywowanej poziomem AMP. Ścieżki metaboliczne a także strategie metabolizmu energetycznego są konserwowane wśród eukariota, podobnie jak regulacja polimerazy trzeciej, dlatego mechanizmy zidentyfikowane przez autorkę będzie można z dużym prawdopodobieństwem odnieść do innych organizmów. Co istotniejsze zaburzenia metabolizmu energetycznego ale też defekty aktywności polimerazy trzeciej leżą u podstaw wielu jednostek chorobowych. W dyskusji autorka zwraca uwagę, że dużo aspektów metabolizmu szczepu z delecją genu *MAF1* przypomina metabolizm komórek rakowych. Komórki rakowe także mogą mieć zwiększony poziom RNA-transportujących i często charakteryzują się podwyższoną glikolizą i uniezależnieniem od sygnałów środowiskowych. Te podobieństwa a także fakt, że efekt ten może być „odwrócony” przez inhibicję polimerazy dodają dodatkowego znaczenia otrzymanym wynikom. W moim odczuciu temat poruszony i wyniki otrzymane w pracy są istotne zarówno z perspektywy biologii podstawowej jak i mogą być pomocne w zrozumieniu podstaw fenotypów chorób związanych z defektami aktywności polimerazy trzeciej.

Rozprawa doktorska została napisana w języku angielskim, z zastosowaniem klasycznego układu podziału tekstu na: wstęp, materiały i metody, wyniki, dyskusję oraz spis literatury. Dodatkowo wyodrębnione zostały pomocne sekcje określające główne cele projektu badawczego oraz podsumowujące otrzymane wyniki. Wstęp został poprzedzony streszczeniem w języku polskim i angielskim. Zamieszczony wykaz skrótów tabel i rycin pomaga w szybkim poruszaniu się po tekście. Piśmiennictwo użyte w rozprawie nie budzi moich zastrzeżeń. Praca pod względem edytorskim przygotowana została starannie. Zastrzeżenia może budzić wybór szarej czcionki do opisu rycin, który powoduje, że te sekcje trudniej się czyta. Ryciny są jednak przygotowane starannie i dobrze dopełniają tekst. W moim przekonaniu tekstowi brakuje trochę więcej zwięzłości, jednak generalnie autorka wywiązała się dobrze z zadania opisu stanu wiedzy, swoich wyników a także ich dyskusji. Rozdział „wstęp” stanowi dobre wprowadzenie do tematyki badań. Autorka przedstawia w nim aktualny stan wiedzy dotyczący analizowanych mutantów polimerazy trzeciej. Następnie autorka opisuje najważniejsze ścieżki sygnalizacyjne zaangażowane w metabolizm glukozy. Opis skupia się na procesach które są istotne w kontekście przeprowadzonych w projekcie badań ścieżce kinazy PKA oraz kinazy SNF1. Metabolizm energetyczny drożdży to temat badany od dziesięcioleci, w czasie których zebrano bardzo dużą ilość informacji o tym procesie. Autorka w swojej rozprawie udowadnia, że z tematem zapoznana jest bardzo dobrze. Jednak w mojej opinii w tym rozdziale zabrakło trochę zwięzłości. Praca zyskałaby na atrakcyjności, gdyby autorka w bardziej jasny i syntetyczny sposób wyjaśniła interakcje między różnymi ścieżkami regulacji metabolizmu węgla. Z drugiej strony miałem wrażenie, że ścieżka sygnałowa przez kinazę TOR i jej wpływ na metabolizm węgla mógłby być lepiej opisany.

Rozdział „Materiały i Metody” zawiera poprawny opis metod i materiałów badawczych zastosowanych w pracy. Zastosowana metodyka badań jest odpowiednia, a zakres stosowanych metod bardzo szeroki, od biochemii poprzez genetykę, metabolomikę, proteomikę, analizę danych aż do technik mikroskopowych. Opanowanie przez autorkę wszystkich wymienionych technik jest bardzo imponujące i dodatkowo wpływa na wysoką ocenę pracy. Należy też zauważyć dużą ilość szczepów drożdżowych skonstruowanych przez autorkę w trakcie wykonywania projektu.

W rozdziale „Wyniki” autorka szczegółowo opisuje przeprowadzone eksperymenty. Oprócz technicznego opisu eksperymentów i ich wyników autorka włączyła tu także elementy dyskusji i dość szerokie wyjaśnienia motywacji przeprowadzenia poszczególnych testów. Jest to jak najbardziej uzasadnione ze względu na szerokość podejmowanego tematu. W centrum całej pracy znajduje się analiza proteomiczna, na podstawie której wyciągane są wnioski i stawiane hipotezy badawcze, które autorka sprawdza eksperymentalnie. Drugim najważniejszym eksperymentem jest moim zdaniem analiza przepływu metabolitów w ścieżce metabolizmu

węgla. Badanie to zostało przeprowadzone w ramach kolaboracji z naukowcami z *Institute of Metabolism and Systems Research, University of Birmingham*, a współpraca finansowana była dzięki prestiżowemu *EMBO Short-Term Fellowship*. Ta udana międzynarodowa współpraca dobrze świadczy o zdolności autorki do kolaboracji z innymi naukowcami. Generalnie wykonane eksperymenty układają się w logiczny ciąg, technicznie praca jest wykonana dobrze i starannie, a odpowiednie kontrole są opisane. Najważniejsze odkrycia i konkluzje osiągnięte w ramach projektu są wymienione przez autorkę w rozdziale podsumowującym pracę i można je streścić w kilku punktach:

- Modulacja aktywności polimerazy trzeciej prowadzi do zmian metabolizmu komórki, zmiany te są niezależne od środowiska można więc stwierdzić, że sygnał wewnątrzkomórkowy generowany przez zwiększenie lub zmniejszenie aktywności polimerazy jest dominujący względem sygnałów środowiskowych.
- Delecja *MAF1* powoduje zwiększenie aktywności ścieżki glikolizy, a także szlaku pentozofosforanowego i ścieżek akumulacji glikogenu i trehalozy oraz glicerolu.
- Mutacja *rpc128-1007* powoduje obniżenie aktywności ścieżki glikolizy i zmniejszenie relatywnej ilości enzymów glikolitycznych.
- W obydwu badanych mutantach dochodzi do aktywacji czynnika transkrypcyjnego Gcn4.
- Zmiany proteomu obserwowane w mutancie polimerazy *rpc128-1007* mogą być w dużej mierze wytłumaczone przez aktywność Gcn4.
- W przypadku obydwu badanych mutantów zauważono obniżoną aktywność cyklu kwasów trikarboksylowych na fermentowalnym źródle węgla. Metabolity z cyklu kwasów trikarboksylowych są za to przekierowane do syntezy aminokwasów.
- W obydwu badanych szczepach zaobserwowano podwyższony poziom acetyl koenzymu A i wywnioskowano, że jest to wynikiem zwiększenia aktywności reakcji anaplerotycznych cyklu kwasów trikarboksylowych.
- Fenotyp wzrostowy szczepu z delecją *MAF1* na pożywce z glicerolem w podwyższonej temperaturze jest rezultatem obniżonej aktywności cyklu kwasów trikarboksylowych i przekierowania metabolitów w stronę syntezy alaniny. Natomiast supresja tego fenotypu przez mutację polimerazy trzeciej następuje dzięki zwiększeniu aktywności cyklu kwasów trikarboksylowych w takim szczepie.
- Opisano zmiany aktywności kinazy PKA, w szczepie z mutacją polimerazy zaobserwowano aktywację PKA niezależnie od źródła węgla, natomiast w szczepie z delecją *MAF1* zaobserwowano zmniejszoną aktywność PKA na podłożu z glicerolem. Co ciekawe redukcja aktywności PKA poprzez nadekspresję jej inhibitora białka Bcy1 miała odwrotny efekt na akumulację glicerolu i trehalozy w badanych szczepach.
- W obydwu szczepach zaobserwowano zmniejszoną ilość białka Pho85, co sugeruje zmiany w homeostazie fosforu.
- Zasugerowano, że samo białko Maf1 może regulować metabolizm cukrów, gdy zlokalizowane jest w cytoplazmie, świadczyć o tym może wykryta fizyczna interakcja tego białka z czynnikami zaangażowanymi z represją glukozową.

W rozdziale „Dyskusja” autorka w ciekawy sposób podsumowuje otrzymane wyniki oraz wyciąga z nich logiczne wnioski. Najważniejsze konkluzje pokrywają się z przytoczonymi już przeze mnie punktami. Mnie szczególnie zainteresowała przedyskutowana możliwość post-transkrypcyjnej regulacji stabilności lub translacji niektórych RNA w badanych mutantach. Dodatkowo krótko, lecz bardzo klarownie omówiona jest możliwość zastosowania regulatorów aktywności polimerazy trzeciej w terapii nowotworowej. Podsumowując autorka udowadnia swoją szeroką wiedzę na temat regulacji metabolizmu, a także zdolność łączenia faktów i wyciągania logicznych wniosków.

Znacząca część wyników otrzymanych w pracy została opublikowana w powszechnie znanych czasopismach o międzynarodowym zasięgu: *PLOS One* oraz *Biochemical Journal*. W pierwszym przypadku autorka jest jednym z dwu autorów publikacji razem ze swoim promotorem, natomiast w publikacji w *Biochemical Journal*, Pani Róża jest pierwszym autorem. Biorąc pod uwagę, że część wyników opisanych w rozprawie doktorskiej nie znalazła się w składzie publikacji, można się spodziewać, że opisana tutaj praca zaowocuje następnymi artykułami. Dodatkowo wyniki otrzymane w pracy zaowocowały zgłoszeniem patentowym dotyczącym metod otrzymywania trehalozy. Należy dodać, że autorka jest też współautorem pracy opublikowanej w *BMC Microbiology* dotyczącej innego tematu. Potwierdza to szeroki zakres zainteresowań naukowych i zdolności autorki do kolaboracji z innymi naukowcami. Dorobek naukowy autorki oceniam jako bardzo dobry.

Poniżej wymienię kilka zagadnień do których chciałbym, aby autorka się odniosła:

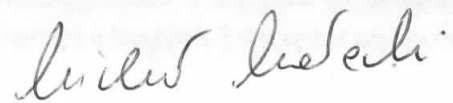
1. Chciałbym zwrócić uwagę na moim zdaniem niekompletną analizę proteomu. Autorka skupia się na analizie białek, których poziom w badanych mutantach jest statystycznie istotnie wyższy lub niższy względem szczepu dzikiego, ale tylko na tych, które zostały zidentyfikowane jako zmieniające poziom w obu badanych szczepach. Takie kryterium jest usprawiedliwione faktem, że autorka skupia się na procesach, które korelują ze zmieniającą się aktywnością polimerazy trzeciej. Jednak brakowało mi omówienia zmian charakterystycznych dla poszczególnych mutantów.

2. Projekt skupia się na badaniu konsekwencji modulacji aktywności polimerazy trzeciej na metabolizm węgla (glikolizę i cykl kwasów trikarboksylowych). Autorka logicznie zakłada, że za obserwowane zmiany odpowiadają czynniki kontrolujące metabolizm węgla takie jak kinaza PKA czy SNF, jednak nie jest przekonująco wyjaśnione jaki sygnał może generować obserwowane zmiany. Bezpośrednim skutkiem zaburzenia aktywności polimerazy trzeciej jest zmiana poziomu tRNA, czy autorka mogłaby przedyskutować hipotetyczny mechanizm łączący aktywność polimerazy trzeciej z metabolizmem węgla? Czy obserwowane zmiany mogą wywodzić się z zaburzeń translacji spowodowanych deregulacją poziomów tRNA? Badania z laboratorium Jeffa Collera pokazują, że ilość dostępnego tRNA może wpływać na efektywność translacji, a ta jest skorelowana ze stabilnością transkryptów. Dodatkowo badania laboratorium Rachel Green pokazują, że nieefektywna translacja i kolizje rybosomów mogą generować odpowiedź stresową poprzez aktywowanie kinazy Gcn2, która jest też regulatorem translacji czynnika transkrypcyjnego Gcn4.

3. Jestem ciekaw, czy są dane na temat zdolności do oddychania tlenowego badanych szczepów takie jak zużycie tlenu czy zmiany potencjału błony mitochondrialnej. Wolniejszy wzrost mutantu polimerazy trzeciej na podłożu z glukozą może sugerować, że szczep ten w większym stopniu niż kontrola używa oddychania tlenowego do produkcji energii na podłożu fermentowalnym. Z drugiej strony, nowe badania z laboratorium Markusa Ralsera wskazują, że drożdże z zahamowaną zdolnością oddychania mogą akumulować żelazo w mitochondriach, co prowadzi do zahamowania aktywności cyklu kwasów trikarboksylowych. Autorka zaobserwowała zahamowanie aktywności cyklu kwasów trikarboksylowych w obydwu badanych mutantach, czy może to być spowodowane zaburzeniami oddechowych funkcji mitochondriów?

Podsumowując, rozprawę doktorską Pani magister Róży Szatkowskiej oceniam wysoko. Praca powiększa obszar wiedzy na temat konsekwencji zaburzeń aktywności polimerazy trzeciej i będzie miała duże znaczenie dla dalszych badań w tym obszarze. Atutem pracy jest jej multidyscyplinarność, duża ilość otrzymanych wartościowych wyników i szerokie spojrzenie na omawiany temat. Szczególnie dane proteomiczne uzyskane

w wyniku projektu będą użyteczne do rozwoju badań nad konsekwencjami zaburzeń aktywności polimerazy. Praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego konsekwencji modulacji aktywności polimerazy trzeciej dla komórki eukariotycznej. Praca potwierdza i dokładnie opisuje wpływ aktywności polimerazy trzeciej na metabolizm węgla a otrzymane wyniki sugerują, że manipulacja aktywnością polimerazy może być celem terapii przeciwnowotworowych. Biorąc to wszystko pod uwagę stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny praca spełnia kryteria stawiane pracom doktorskim i zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie magister Róży Szatkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Uniwersytet Warszawski
Wydział Biologii
Instytut Genetyki i Biotechnologii

dr hab. Michał Matecki