

Potencjał regulatorowy krótkich RNA oddziałujących z rybosomami (rancRNA) w *Saccharomyces cerevisiae* w warunkach stresu abiotycznego

Mgr Anna Wasilewska-Burczyk

Niekodujące RNA odgrywają kluczową rolę w regulacji ekspresji genów na wielu etapach życia komórki. W 2012 roku odkryto nowy mechanizm regulacji biosyntezy białka polegający na bezpośrednim wiązaniu krótkich RNA z rybosomami u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Te krótkie RNA, nazwane rancRNA (ang. *ribosome-associated noncoding RNAs*), powstają w warunkach stresowych poprzez cięcie znanych niekodujących RNA, takich jak snoRNA, rRNA czy tRNA.

Celem badań podjętych w niniejszej pracy było pogłębienie wiedzy na temat rancRNA, ze szczególnym uwzględnieniem dwóch klas rancRNA: tRF – krótkie RNA powstające z tRNA (ang. *tRNA-derived fragments*) oraz sdRNA – krótkie RNA powstające ze snoRNA (ang. *snoRNA-derived RNAs*). W rozprawie analizowano interakcje tRF oraz sdRNA z frakcjami rybosomalnymi u drożdży *S. cerevisiae*. W celu zbadania wpływu modyfikacji obecnych w rancRNA na ich poziom akumulacji wykorzystano białko AlkB/AlkB-D135S.

W pierwszym etapie pracy skupiono się na identyfikacji jak najszerszego spektrum rancRNA oddziałujących z rybosomami *S. cerevisiae* w warunkach umiarkowanego stresu abiotycznego z użyciem wysokoprzepustowego sekwencjonowania. W pierwszej kolejności wykonano hodowlę drożdży w trzech warunkach: optymalnych (kontrola) oraz 2 warunkach stresowych, w których obserwowano najwyższą heterogeniczność rybosomów, tj. wstrząs hiperosmotyczny i głód cukrowy. W celu "zamrożenia" maszynerii translacyjnej, komórki poddawano inkubacji z cykloheksimidem, inhibitorem biosyntezy białka w organizmach eukariotycznych, a następnie lizie w ochronnych warunkach niskiej temperatury. Lizaty poddawano ultrawiroowaniu w gradiencie sacharozy (profilowanie polisomowe), podczas którego uzyskano 3 frakcje rybosomowe: polisomy, monosomy, podjednostki oraz 1 frakcję nierybosomową (wolne RNA). Z każdej frakcji wyizolowano RNA, a następnie przeprowadzono selekcję względem wielkości z wykorzystaniem rozdzału w żelu poliakrylamidowym i następującej po nim elucji, w celu uzyskania krótkich RNA o długości ~20-50 nt. Krótkie RNA rozdzielano na dwie frakcje, z których jedną poddano demetylacji z udziałem demetylaz tRNA AlkB (enzym AlkB produkowano w bakteryjnym systemie ekspresyjnym). Tak przygotowane RNA poddano ocenie jakościowej i ilościowej z wykorzystaniem elektroforezy

kapilarnej, a następnie wysokoprzepustowemu sekwencjonowaniu na platformie Illumina. Przygotowano 48 bibliotek do sekwencjonowania rancRNA (rancRNA-seq): 2 powtórzenia biologiczne x 4 frakcje z profilu polisomowego x 3 warunki hodowli drożdży x 2 warunki demetylacji = 48 bibliotek cDNA. Następnie przeprowadzono standardową analizę bioinformatyczną wyników sekwencjonowania. To pozwoliło na zidentyfikowanie 2028 różnych tRF oraz 961 różnych sdRNA. Zastosowanie sekwencjonowania wysokoprzepustowego umożliwia kompleksową analizę asocjacji rancRNA z podjednostkami rybosomowymi, monosomami oraz polisomami.

W kolejnym etapie zbadano czy stres wpływa na asocjację tRF i sdRNA z frakcjami rybosomalnymi: podjednostki rybosomowe, monosomy, polisomy. Szczegółowa analiza frakcji rybosomalnych w stresach abiotycznych względem warunków optymalnych umożliwiła wykazanie zmian akumulacji tRF oraz sdRNA w poszczególnych frakcjach.

Następnym krokiem było zbadanie wpływu modyfikacji m^3C , m^1A , m^1G oraz m^3T na wykrywany poziom tRF i sdRNA w bibliotekach rancRNA. To umożliwiło wyróżnienie 1231 tRF i 456 sdRNA w bibliotekach AlkB⁺ oraz 954 tRF i 493 sdRNA w bibliotekach AlkB⁻. Wykazano niejednorodny wpływ białek AlkB/AlkB-D135S na poszczególne rancRNA. Porównanie wyników sekwencjonowania standardowego z wynikami uzyskanymi po zastosowaniu białek AlkB/AlkB-D135S, umożliwia rzetelną ocenę efektywności zastosowania demetylacji RNA w wykrywaniu rancRNA asocjujących z rybosomami.

Wyniki prezentowane w niniejszej rozprawie doktorskiej zostały opublikowane w jednym recenzowanym artykule naukowym.