



**System drożdżowy do przeszukiwania inhibitorów głównej
proteazy SARS-CoV-2**

Wojciech Grabiński

Rozprawa doktorska

Promotor: dr hab. Andonis Karachitos

**Zakład Bioenergetyki,
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii,
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Poznań, 2025**



Yeast system for screening SARS-CoV-2 main protease inhibitors

Wojciech Grabiński

Doctoral thesis

Supervisor: dr hab. Andonis Karachitos

**Department of Bioenergetics,
Institute of Molecular Biology and Biotechnology,
Adam Mickiewicz University in Poznań
Poznań, 2025**

Pragnę podziękować:

*promotorowi dr. hab. Andonisowi Karachitosowi,
za każdą radę, żart, szczerą opinię, wsparcie oraz za stanowienie przykładu
niekończącej się naukowej ciekawości, wytrwałości i kreatywności,*

*prof. dr hab. Hannie Kmicie za pomoc w rozwiązywaniu
wszystkich pojawiających się problemów,*

*dr Annie Kicińskiej, za cenne uwagi,
wsparcie i owocną współpracę,*

*dr Ewie Kosickiej, Patrycji Gonerze, dr. hab. Ninie Antos-Krzemińskiej,
Adriannie Budzińskiej, Krzysztofowi Wójcickiemu oraz pozostałym
pracownikom Zakładu Bioenergetyki za pomoc,
otwartość i wspólnie spędzony czas,*

*rodzicom, bratu, babciom, dziadkowi oraz przyjaciołom,
za wsparcie i zrozumienie.*

*Na końcu pragnę podziękować najważniejszej osobie,
mojej żonie Martynie, bez której powstanie tej pracy nie byłoby możliwe.*

Spis treści

Życiorys	5
Aktywność naukowa i osiągnięcia	7
Artykuły wchodzące w skład rozprawy doktorskiej	7
Osiągnięcia w ramach rozprawy doktorskiej	8
Pozostałe artykuły opublikowane w trakcie kształcenia w Szkole Doktorskiej	9
Pozostałe aktywności doktoranta	10
Wykaz skrótów.....	14
Streszczenie	15
Abstract	16
Opis wyników rozprawy doktorskiej	17
Cele pracy.....	17
Wstęp	18
Główne tezy i osiągnięcia rozprawy doktorskiej	21
Podsumowanie	33
Bibliografia.....	35
Źródła finansowania badań w ramach przygotowywania rozprawy doktorskiej	39
Załączane publikacje oraz oświadczenia doktoranta i współautorów.....	40

Życiorys

W 2014 ukończyłem I Liceum Ogólnokształcące im. Adama Asnyka w Kaliszu, gdzie uczyłem się w klasie o profilu biologiczno-chemicznym. Tego samego roku rozpocząłem studia na kierunku biotechnologia na Wydziale Biologii UAM w Poznaniu, które skończyłem w 2017 roku broniąc pracę licencjacką pt. „Wpływ znacznika auktotroficznego LEU2 na przeżywalność komórek drożdżowego modelu choroby Huntingtona” pod opieką prof. dr hab. Hanny Kmity. W trakcie okresu wakacyjnego poprzedzającego rozpoczęcie studiów magisterskich, odbyłem 3 miesięczny staż w Międzyzakładowej Pracowni Biologii Molekularnej Instytutu Ochrony Roślin. W październiku 2017 kontynuowałem swoją edukację na Wydziale Biologii UAM rozpoczynając studia magisterskie na kierunku biotechnologia. W trakcie tego okresu, spędziłem semestr na Uniwersytecie Jaen w Hiszpanii w ramach programu Erasmus+, gdzie studiowałem kierunek biotechnologia y biomedicina (pol. biotechnologia i biomedycyna). Po powrocie do kraju, obroniłem pracę magisterską pt. „Zróznicowanie izoform białka VDAC u ślimaków wodnych i lądowych”, której promotorką była prof. dr hab. Hanna Kmita. Ponadto po ukończeniu studiów magisterskich odbyłem 3 miesięczny staż w Laboratorium Badań Markerów Genetycznych u Koni Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

W latach 2015-2019 aktywnie działałem w Kole Naukowym Przyrodników UAM – Sekcji Medycyny Regeneracyjnej i Badań nad Nowotworami, w ramach której organizowałem oraz prowadziłem warsztaty popularnonaukowe w trakcie takich wydarzeń jak Noc Naukowców, Poznański Festiwal Nauki i Sztuki czy Noc Biologów.

W październiku 2019 rozpocząłem kształcenie w Szkole Doktorskiej Nauk Przyrodniczych UAM (poprzednia nazwa to Szkoła Doktorska UAM). Początkowo temat mojej rozprawy doktorskiej nosił tytuł „Białko yVDAC2 jako narzędzie przetrwania przez komórki drożdży *Saccharomyces cerevisiae* stresu środowiskowego” i realizowałem go pod opieką prof. dr hab. Hanny Kmity, a promotorem pomocniczym był dr hab. Andonis Karachitos. Jednakże po wybuchu pandemii SARS-CoV-2 zmieniłem tematykę swoich badań na „System drożdżowy do przeszukiwania inhibitorów głównej proteazy SARS-CoV-2”, a moim promotorem jest dr hab. Andonis Karachitos. W trakcie nauki w szkole doktorskiej byłem także kierownikiem grantu otrzymanego w ramach konkursu ID-UB 017 Minigranty Doktoranckie pt. „Analiza wpływu stresu oksydacyjnego spowodowanego brakiem funkcjonalnych dysmutaz

SOD1 i/lub SOD2 na poziom białka yVDAC2 w mitochondriach drożdży *Saccharomyces cerevisiae*”. Ponadto uczestniczyłem w projekcie finansowanym przez Rektora Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu w ramach konkursu Badania nad COVID-19, nr 6/2020 „System drożdżowy do przeszukiwania inhibitorów głównej proteazy SARS-CoV-2”. Oprócz tego otrzymałem grant wyjazdowy FEBS YSF na konferencje Young Scientists’ Forum (YSF 2022) 6-9.07.2022 odbywający się w Vimeiro, oraz The Biochemistry Global Summit, 9-14.07.2022 w Lizbonie.

Zarówno podczas studiów, jak i w szkole doktorskiej, prezentowałem lub byłem współautorem w sumie 17 posterów konferencyjnych oraz 4 wystąpień ustnych. Szczegółowe informacje przedstawiłem w podrozdziale „Aktywność naukowa i osiągnięcia”.

Aktywność naukowa i osiągnięcia

Artykuły wchodzące w skład rozprawy doktorskiej

1. Grabiński, W., Kicińska, A., Kosicka, E., Baranek-Grabińska, M., Hejenkowska, E. D., Budzik, J., Śliska, P., Śliwińska, W., & Karachitos, A. (2023). Meisoindigo: An Effective Inhibitor of SARS-CoV-2 Main Protease Revealed by Yeast System, bioRxiv 2023.09.03.555867; <https://doi.org/10.1101/2023.09.03.555867>

preprint opublikowany w bioRxiv,
przygotowany do wysłania do czasopisma naukowego

2. Grabiński, W., Kicińska, A., Funtowicz, K., Skrzypczak, T., Karachitos, A. (2025). SARS-CoV-2 main protease causes mitochondrial dysfunction in a yeast model

Praca zostanie złożona do czasopisma *Scientific Reports*

3. Grabiński, W., Karachitos, A., & Kicińska, A. (2024). Backstage Heroes—Yeast in COVID-19 Research. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(23), 12661. <https://doi.org/10.3390/ijms252312661>

Impact Factor (2023): **4,9**
Punkty MNiSW (2024): **140**

Osiągnięcia w ramach rozprawy doktorskiej

- Skonstruowanie i zoptymalizowanie systemu drożdżowego do przeszukiwania inhibitorów głównej proteazy SARS-CoV-2 (M^{pro}).
- Wytypowanie leków działających jako inhibitory M^{pro} na podstawie przeprowadzonego badania przesiewowego, w tym zidentyfikowanie meisindigo jako związku o wcześniej nieudokumentowanej aktywności wobec M^{pro}.
- Przeprowadzenie szczegółowej analizy aktywności enzymatycznej M^{pro}.
- Określenie wpływu M^{pro} na funkcjonalność mitochondriów, stres oksydacyjny i poziom oddychania komórkowego.
- Opracowanie przeglądu literatury, który kompleksowo opisuje szerokie wykorzystanie drożdży w badaniach nad SARS-CoV-2.

Pozostałe artykuły opublikowane w trakcie kształcenia w Szkole Doktorskiej

1. Baranek-Grabińska, M., **Grabiński, W.**, Musso, D., Karachitos, A., & Kmita, H. (2024). Developing a Novel and Optimized Yeast Model for Human VDAC Research. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(23), 13010. <https://doi.org/10.3390/ijms252313010>

Impact Factor (2023): **4,9**
Punkty MNiSW (2024): **140**

2. Karachitos, A., **Grabiński, W.**, Baranek, M., & Kmita, H. (2021). Redox-Sensitive VDAC: A Possible Function as an Environmental Stress Sensor Revealed by Bioinformatic Analysis. *Frontiers in Physiology*, 12, 750627. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.750627>

Impact Factor (2021): **4,755**
Punkty MNiSW (2021): **100**

3. Bartylak, T., Kulpa, A., Grobys, D., Kepel, M., Kepel, A., Kmita, H., Gawlak, M., **Grabiński, W.**, Roszkowska, M., & Kaczmarek, Ł. (2019). Variability of *Echiniscus tristis* Gąsiorek & Kristensen, 2018-is morphology sufficient for taxonomic differentiation of Echiniscidae? *Zootaxa*, 4701(1), zootaxa.4701.1. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4701.1.1>

Impact Factor (2019): **0.949**
Punkty MNiSW (2019): **70**

Pozostałe aktywności doktoranta

Wystąpienia konferencyjne

- Prezentacja posteru konferencyjnego „Pathophysiological effects of the main protease (M^{pro}) of SARS-CoV-2 on mitochondria” na V Kongresie BIO 2023, 13-16.09.2023, (**Grabiński W.**, Funtowicz K., Karachitos A.)
- Współautor wystąpienia ustnego „The role of human VDAC paralogs under oxidative stress induced by the absence of superoxide dismutases“ na V Kongresie BIO 2023 13-16.09.2023, Szczecin (Baranek-Grabińska M., Karachitos A., **Grabiński W.**, Skrzypczak T., Kmita H.)
- Współautor wystąpienia ustnego „An Effective Inhibitor of SARS-CoV-2 Main Protease Revealed by Yeast System” na V Kongresie BIO 2023 13-16.09.2023, Szczecin (**Grabiński W.**, Kicińska A., Kosicka E., Baranek-Grabińska M., Hejenkowska E., Budzik J., Śliska P., Śliwińska W., Karachitos A.)
- Prezentacja posteru konferencyjnego „Identification of novel inhibitors of the main protease of SARS-CoV-2 using a yeast-based system” na 10. Międzyuczelnianym Sympozjum Biotechnologicznym „Symbioza” 12-14.05.2023, Warszawa (**Grabiński W.**, Kosicka E., Kicińska A., Baranek-Grabińska M., Śliska P., Hejenkowska E., Budzik J., Śliwińska W., Karachitos A.)
- Współautor posteru konferencyjnego „Analysis of functional differences between human VDAC3 isoforms” 18th Congress of the Polish Biophysical Society (PTBF) Warszawa 6-9.09.2022. (Hejenkowska E., Baranek M., **Grabiński W.**, Kmita H., Karachitos A.)
- Prezentacja posteru konferencyjnego „A yeast-based screening assay identifies drug that inhibits SARS-CoV-2 main protease” The Biochemistry Global Summit, 9-14.07.2022 Lizbona, Portugalia. Został on opublikowany jako doniesienie konferencyjne w FEBS Open Bio; 12:156, 2022. (**Grabiński W.**, Kosicka E., Baranek M., Śliska P., Hejenkowska E., Budzik J., Karachitos A.)
- Prezentacja posteru konferencyjnego „A yeast-based screening assay identifies drug that inhibits SARS-CoV-2 main protease” IUBMB-FEBS-PABMB Young Scientists’ Forum (YSF 2022) 6-9.07.2022 Vimeiro, Portugalia. (**Grabiński W.**, Kosicka E., Baranek M., Śliska P., Hejenkowska E., Budzik J., Karachitos A.)

- Współautor posteru konferencyjnego „Filarial worms and mammalian spermatozoa are likely to sense environmental stress in a similar way” The Biochemistry Global Summit, 9-14.07.2022 Lizbona, Portugalia. Został on opublikowany jako doniesienie konferencyjne w FEBS Open Bio ; 12:207, 2022. (Baranek M., Karachitos A., **Grabiński W.**, Kmita H.)
- Współautor posteru konferencyjnego „Filarial worms and mammalian spermatozoa are likely to sense environmental stress in a similar way” IUBMB-FEBS-PABMB Young Scientists’ Forum (YSF 2022) 6-9.07.2022 Vimeiro, Portugalia. (Baranek M., Karachitos A., **Grabiński W.**, Kmita H.)
- Wystąpienie ustne „The yeast *Saccharomyces cerevisiae* VDAC depleted mutants – phenotype update” w ramach konferencji 9th Mitochondrion 2021, 27.01.2021 (On-line) (**Grabiński W.**, Baranek M., Karachitos A., Kmita H.)
- Współautor wystąpienia ustnego „Functional analysis of mutation in VDAC3 encoding gene”, w ramach konferencji 9th Mitochondrion 2021, 27.01.2021 (On-line) (Baranek M., Walkowiak A., Hejenkowska E., **Grabiński W.**, Kmita H., Karachitos A.)
- Współautor posteru konferencyjnego „ $\Delta sod1\Delta por1$ *Saccharomyces cerevisiae* double mutant phenotype and human VDAC isoforms” w ramach konferencji 8th Mitochondrion 2020, Warszawa, 05.02.2020 (Baranek M., **Grabiński W.**, Kmita H., Karachitos A.)

Przed rozpoczęciem kształcenia w szkole doktorskiej:

- Prezentacja posteru konferencyjnego pt. „Overexpression of predicted snail VDAC isoforms in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells”, na V International Conference on Research and Education Challenges for Contemporary Live Sciences 8-13.04.2019, Poznań (**Grabiński W.**, Pieńkowska J., Kmita H., Kosicka E.)
- Współautor posteru konferencyjnego pt. „One or two *Echiniscus* species? Is morphology enough for taxonomic differentiation of Heterotardigrada?” na V International Conference on Research and Education Challenges for Contemporary Live Sciences 8-13.04.2019, Poznań (Bartylak T., Kulpa A., Grobys D., Kepel M., Kepel A., Kmita H., Gawlak M., **Grabiński W.**, Roszkowska M., Kaczmarek Ł.)
- Współautor posteru konferencyjnego pt. „Is the $\Delta sod1\Delta por1$ *Saccharomyces cerevisiae* double mutant phenotype suppressed by human VDAC isoforms?” na V International

Conference on Research and Education Challenges for Contemporary Life Sciences, 8-13.04.2019, Poznań (Baranek M., **Grabiński W.**, Kmita H., Karachitos A.)

- Współautor posteru konferencyjnego pt. „The phenotype of yeast *Saccharomyces cerevisiae* double mutants depleted of the copper-and zinc-containing superoxide dismutase (CuZnSOD) and voltage dependent anion channel (VDAC) encoding genes” na Kongresie BIO 2018, 18-21.09.2018, Gdańsk (Baranek M., **Grabiński W.**, Kmita H., Karachitos A.)

- Współautor posteru konferencyjnego pt. „The role of human VDAC1 in Huntington Disease pathogenesis: conclusions from the yeast model studies” na International Conference Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application, 15-18.05.2018, Rzeszów (Grobys D., Karachitos A., **Grabiński W.**, Baranek M., Kmita H.)

- Współautor posteru konferencyjnego pt. „Human VDAC1 and Huntington disease pathogenesis: conclusions from the yeast model studies” na 6th Mitochondrion – Bioenergetics Update 08.12.2017, Poznań (Grobys D., Karachitos A., **Grabiński W.**, Baranek M., Kmita H.)

- Współautor posteru konferencyjnego pt. „Estimation of LEU2 expression effect on cell viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* model of Huntington disease" na IVth International Conference on Research and Education. 07.04.2017, Poznań (Grobys D., **Grabiński W.**, Karachitos A., Kmita H.)

- Prezentacja posteru konferencyjnego pt. „Wpływ znacznika auktroficznego LEU2 na przeżywalność komórek drożdżowego modelu choroby Huntingтона" na konferencji „Zrozumieć naukę" 30.09.2017, Łódź (**Grabiński W.**, Baranek M., Grobys D., Karachitos A., Kmita H.)

- Współautor posteru konferencyjnego pt. „Weryfikacja funkcjonalna komórek *Saccharomyces cerevisiae* stanowiących model drożdżowy choroby Huntingтона" na konferencji „Zrozumieć naukę" 30.09.2017, Łódź (Baranek M., **Grabiński W.**, Grobys D., Karachitos A., Kmita H.)

Nagrody i granty

- Grant wyjazdowy **FEBS YSF** na konferencje Young Scientists' Forum (YSF 2022) 6-9.07.2022 Vimeiro, oraz The Biochemistry Global Summit, 9-14.07.2022 Lizbona, Portugalia
- Grant w konkursie ID-UB 017 Minigranty Doktoranckie „Analiza wpływu stresu oksydacyjnego spowodowanego brakiem funkcjonalnych dysmutaz SOD1 i/lub SOD2 na poziom białka yVDAC2 w mitochondriach drożdży *Saccharomyces cerevisiae*”

Przed rozpoczęciem kształcenia w szkole doktorskiej

- Stypendium rektora UAM drugiego stopnia dla najlepszych studentów w roku akademickim 2017/2018 oraz 2018/2019

Szkolenia

- Udział w szkoleniu: „Najnowsze metody statystyczne wykorzystywane we współczesnych badaniach biologicznych” - szkolenie przeprowadził dr hab. Szymon Drobnik z UJ

Udział w projektach naukowych

- System drożdżowy do przeszukiwania inhibitorów głównej proteazy SARS-CoV-2”, nr 6/2020, w ramach konkursu na badania nad COVID-19 finansowanego przez Rektora Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, kierownik dr hab. Andonis Karachitos

Przed rozpoczęciem kształcenia w szkole doktorskiej

- Udział w projekcie naukowym finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki pt. „Mitochondrialne markery skutecznej anhydrobiozy u przedstawicieli niesporczaków wodnych i lądowych” (nr 2016/21/B/NZ4/00131) kierownik prof. dr hab. Hanna Kmita
- Udział w projekcie naukowym finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki pt. "Kanał VDAC jako cel działania huntingtyny w rozwoju choroby Huntingtona" (nr 2011/01/B/NZ3/00359) kierownik prof. dr hab. Hanna Kmita

Wykaz skrótów

- 3CL^{pro} – 3-chymotrypsin-like protease (*pol. proteaza 3- chymotrypsyno-podobna*)
- ACE2 – angiotensin converting enzyme 2 (*pol. konwertaza angiotensyny 2*)
- BMV – brome mosaic virus (*pol. wirus mozaiki stokłosy*)
- BPV – bovine papillomavirus (*pol. wirus brodawczaka bydła*)
- CFP – cyan fluorescent protein (*pol. cyjanowe białko fluorescencji*)
- DMS – deep mutational scanning (*pol. głębokie skanowanie mutacyjne*)
- EGFP – enhanced green fluorescence protein (*pol. wzmocnione białko zielonej fluorescencji*)
- GFP – green fluorescent protein (*pol. białko zielonej fluorescencji*)
- HCMV – human cytomegalovirus (*pol. ludzki wirus cytomegalii*)
- HIV-1 – human immunodeficiency virus 1 (*pol. ludzki wirus niedoboru odporności*)
- HPV – human papillomavirus (*pol. wirus brodawczaka ludzkiego*)
- FDA – U.S. Food and Drug Administration (*pol. Amerykańska agencja ds. Żywności i Leków*)
- FRET – fluorescence resonance energy transfer (*pol. rezonansowy transfer energii fluorescencji*)
- M^{pro} – main protease (*pol. główna proteaza*)
- NSP – non-structural protein (*pol. białko niestrukturalne*)
- ORF – open reading frame (*pol. otwarta ramka odczytu*)
- pp1a – polyprotein 1a (*pol. poliproteina 1a*)
- pp1ab – polyprotein 1ab (*pol. poliproteina 1ab*)
- RBD – receptor binding domain (*pol. domena wiążąca receptor*)
- RFT – reaktywne formy tlenu
- SARS-CoV – severe acute respiratory syndrome coronavirus (*pol. koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego*)
- SARS-CoV-2 – severe acute respiratory syndrome coronavirus – 2 (*pol. drugi koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego*)
- TAR – transcription-associated recombination (*pol. rekombinacja sprzężona z transformacją*)
- Y2H – yeast two-hybrid system (*pol. dwuhybrydowy system drożdżowy*)
- YAC – yeast artificial chromosome (*pol. sztuczny chromosom drożdżowy*)
- YFP – yellow fluorescent protein (*pol. białko żółtej fluorescencji*)
- YSD – yeast surface display (*pol. prezentowanie na powierzchni ściany komórkowej drożdży*)

Streszczenie

Pandemia COVID-19, wywołana wirusem *Betacoronavirus pandemicum* (SARS-CoV-2) doprowadziła do śmierci milionów ludzi na całym świecie. Jednym z białek niezbędnych do funkcjonowania SARS-CoV-2 jest jego główna proteaza (M^{pro}), co czyni ją jednym z ważniejszych celów dla potencjalnych leków. Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było opracowanie bezpiecznego, ekonomicznie przystępnego i szybkiego systemu przesiewowego, opartego na drożdżach *Saccharomyces cerevisiae*, do badania aktywności M^{pro} oraz poszukiwania jej inhibitorów. System ten umożliwia kontrolowaną ekspresję genu kodującego M^{pro} , który został umieszczony pod kontrolą promotora *GALI*. Zaproponowany system pozwala na określenie aktywności M^{pro} zarówno poprzez jego toksyczny wpływ na wzrost komórek drożdży, jak i pomiar zmian poziomu fluorescencji. System wykazał czułość na znane inhibitory M^{pro} , ale także umożliwił identyfikację nowych, wcześniej nieopisanych inhibitorów, takich jak meisoindigo. Dodatkowo, przeprowadzone badania wskazały na związek między aktywnością M^{pro} a funkcjonowaniem mitochondriów. Zaobserwowano, że M^{pro} jest szczególnie toksyczne w warunkach wymagających od komórek aktywnych mitochondriów. Na podstawie pomiarów poziomu oddychania komórkowego oraz obserwacji mikroskopowych wykazano, że M^{pro} obniża zużycie tlenu, zakłóca potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej oraz powoduje deformację struktury mitochondriów. Ponadto, w ramach pracy przedstawiono przegląd literatury dotyczącej szerokiego wykorzystania drożdży w badaniach nad SARS-CoV-2, obejmujących analizę aktywności M^{pro} , badanie oddziaływań między białkami wirusa a białkami gospodarza, produkcję szczepionek oraz tworzenie replikonów SARS-CoV-2. Niniejsza rozprawa doktorska prezentuje skuteczny system drożdżowy umożliwiający wykrywanie inhibitorów M^{pro} , oraz dostarcza nowej wiedzy na temat wpływu M^{pro} na kluczowe struktury subkomórkowe, takie jak mitochondria, pogłębiając zrozumienie mechanizmów działania SARS-CoV-2.

Abstract

The COVID-19 pandemic, caused by the *Betacoronavirus pandemicum* virus (SARS-CoV-2), has resulted in the death of millions of people worldwide. One of the proteins required for SARS-CoV-2 to function is its main protease (M^{pro}), making it one of the most important targets for potential drugs. The aim of this thesis was to develop a safe, inexpensive and rapid screening system based on the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to study M^{pro} activity and search for its inhibitors. This system allows the controlled expression of the M^{pro} gene under the control of the *GALI* promoter. The proposed system allows for the determination of M^{pro} activity both through its toxic effect on yeast cell growth and through measurement of changes in fluorescence level. The system showed sensitivity to known M^{pro} inhibitors, but also allowed the identification of new, previously undescribed inhibitors, such as meisoindigo. In addition, the results indicated a relationship between M^{pro} activity and mitochondrial function. M^{pro} was observed to be particularly toxic under conditions that require active mitochondria in cells. Based on measurements of cellular respiration levels and microscopic observations, M^{pro} was shown to reduce oxygen consumption, disrupt the inner mitochondrial membrane potential, and cause deformation of mitochondrial structure. In addition, this thesis presents a literature review of the extensive use of yeast in SARS-CoV-2 research, including the analysis of M^{pro} activity, the study between viral- host protein interactions, vaccine production, and the formation of SARS-CoV-2 replicons. This dissertation presents an effective yeast system for the detection of M^{pro} inhibitors and provides new insights into the effects of M^{pro} on key subcellular structures such as mitochondria, expanding our understanding of the mechanisms of SARS-CoV-2 action.

Opis wyników rozprawy doktorskiej

Cele pracy

W niniejszej pracy zaprezentowano konstrukcję wszechstronnego systemu ekspresyjnego opartego na drożdżach *Saccharomyces cerevisiae*, który umożliwia badanie głównej proteazy (M^{pro}) wirusa SARS-CoV-2 (*Betacoronavirus pandemicum*). M^{pro}, kluczowe białko wirusa, odpowiada za procesy niezbędne do jego replikacji i jest jednym z najważniejszych celów dla potencjalnych leków przeciw COVID-19. System opiera się na stabilnej integracji genu kodującego M^{pro} w genomie drożdży za pomocą technologii CRISPR/Cas9. Gen kodujący białko fuzyjne EGFP-SAVLQ-Mpro został wprowadzony pod kontrolę promotora *GALI*, którego aktywność jest regulowana przez obecność galaktozy w pożywce. Dodatkowo, w celu zwiększenia czułości testów przesiewowych, usunięto gen odpowiedzialny za wielolekową oporność drożdży (*PDR5*).

Projekt badawczy miał na celu:

1. Opracowanie stabilnego, bezpiecznego i łatwego w obsłudze modelu badawczego, umożliwiającego kontrolowaną ekspresję i analizę aktywności enzymatycznej M^{pro} w żywych komórkach.
2. Wykorzystanie opracowanego systemu do analizy leków zatwierdzonych przez FDA w celu identyfikacji nowych inhibitorów M^{pro}, oraz ocena ich skuteczności w blokowaniu aktywności enzymatycznej proteazy.
3. Analizę toksyczności M^{pro} i jego wpływu na mitochondria, w tym na potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej, tempo oddychania i produkcję reaktywnych form tlenu (RFT). Ocenę zmian w strukturze i funkcji mitochondriów w warunkach hodowli wymagających intensywnej aktywności mitochondriów.
4. Przegląd zastosowań drożdży w badaniach nad SARS-CoV-2.

Wstęp

Pandemia COVID 19 (*ang. coronavirus disease 2019*) trwająca od 2019 roku, wywarła głęboki wpływ na ludzkość. Choroba wywoływana przez szczep SARS-CoV-2 (*ang. severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*), należącego do wirusa *Betacoronavirus pandemicum*, była odpowiedzialna za śmierć milionów ludzi na całym świecie. Spowodowała ona również kryzys w systemach ochrony zdrowia oraz poważne konsekwencje gospodarcze na skalę globalną^{1,2}.

SARS-CoV-2 to jednoniciowy wirus RNA o dodatniej polarności (+ssRNA) i genomie liczącym około 29,9 tysiąca nukleotydów³. Około 2/3 genomu obejmuje nakładające się ramki odczytu ORF1a oraz ORF1b, kodujące 16 białek niestrukturalnych (*nsp, ang. non structural proteins*). Pozostała 1/3 genomu koduje 4 białka strukturalne: białko szczytowe (S, *ang. spike*), białko błonowe (M, *ang. membrane*), nukleokapsydu (N, *ang. nucleocapsid*) i białko osłonki (E, *ang. envelope*), a także zestaw białek pomocniczych⁴. W wyniku translacji ORF1a oraz ORF1b powstają poliproteiny ppla i pplab, które są autoproteolitycznie rozcinane przez proteazy cysteinowe: papaino-podobną proteazę (PL^{pro}, *nsp3, ang. papain-like protease*) oraz 3-chymotrypsyno-podobną proteazę zwaną też główną proteazą (3CL^{pro}, M^{pro}, *nsp5, ang. 3-chymotrypsin-like/main protease*)^{4,5}.

M^{pro} jest białkiem, które przyjmuje aktywną formę jako homodimer. Każdy protomer o masie około 33,8 kDa składa się z 3 domen⁶. M^{pro} odgrywa kluczową rolę w cyklu replikacyjnym wirusa, rozcinając poliproteinę pplab w 11 specyficznych miejscach. Charakterystyczną cechą tej proteazy jest rozpoznawanie sekwencji Leu-Gln↓(Ser/Ala/Gly)⁷. Sekwencja M^{pro} SARS-CoV-2 wykazuje 96% podobieństwa do homologicznej proteazy SARS-CoV (*ang. severe acute respiratory syndrome coronavirus*)⁸. Unikalną cechą M^{pro} jest silnie zakonserwowana struktura białka przy jednoczesnym braku homologicznej proteazy u człowieka. Fakt ten, w połączeniu z jej kluczową rolą w cyklu replikacyjnym wirusa, czyni M^{pro} wyjątkowo atrakcyjnym celem dla projektowania leków przeciwko SARS-CoV-2⁹. Obecność inhibitora M^{pro}, nirmatrelviru, w składzie leku Paxlovid, szeroko stosowanego w terapii COVID-19, podkreśla znaczenie tej proteazy w opracowywaniu strategii terapeutycznych. Ponadto, kolejne inhibitory M^{pro}, takie jak atilotelvir, simnotrelvir czy olgotrelvir są obecnie testowane w badaniach klinicznych¹⁰, co wskazuje na rosnące zainteresowanie tym białkiem.

Saccharomyces cerevisiae to jednokomórkowe organizmy eukariotyczne, które od wielu lat odgrywają kluczową rolę w badaniach naukowych i biotechnologii¹¹. Były one pierwszym organizmem eukariotycznym, którego genom został w pełni zsekwencjonowany już w 1996 roku, co otworzyło nowe możliwości w genetyce i biologii molekularnej¹². Choć drożdże są szeroko znane ze swojego zastosowania w przemyśle spożywczym, takim jak winiarstwo, piwowarstwo czy piekarnictwo, ich znaczenie wykracza daleko poza te dziedziny¹³. Drożdże odgrywają również istotną rolę w prowadzeniu badań naukowych i w przemyśle farmaceutycznym, gdzie wykorzystywane są do produkcji około 1/6 farmaceutyków dopuszczonych do użytku przez ludzi m.in. insuliny, glukagonu, czy szczepionek np. przeciwko HPV^{14,15}.

S. cerevisiae uznawane są za jeden z najczęściej wykorzystywanych organizmów modelowych w badaniach naukowych¹⁶. Posiadają wiele cech, które czynią je wygodnym i wszechstronnym narzędziem badawczym. Drożdże są tanie i łatwe w hodowli, wymagają jedynie prostych pożywek, a ich szybki czas generacji pozwala na skrócenie czasu trwania eksperymentu^{11,17}. Dodatkowymi atutami *S. cerevisiae* jest ich genetyczne podobieństwo do genomu człowieka, oraz zdolność do skutecznego wprowadzania modyfikacji potranslacyjnych białek^{18,19}. Użycie ich nie generuje również problemów natury etycznej²⁰.

Drożdże charakteryzują się również łatwością wprowadzania modyfikacji genetycznych, co można osiągnąć między innymi za pomocą technologii CRISPR/Cas9¹⁵. Wykazują także zdolność do efektywnej sekrecji oraz heterologicznej produkcji białek, co czyni je niezastąpionymi w badaniach biomedycznych i biotechnologii¹⁵.

S. cerevisiae z powodzeniem znajdują zastosowanie w badaniach nad wirusami. Warto zaznaczyć, że istnieją wirusy zarówno roślinne jak i zwierzęce, które są zdolne do replikacji w komórkach drożdży²¹. Wśród nich możemy wymienić m.in. wirus brodawczaka bydłęcego (BPV, ang. *bovine papillomavirus*), wirus brodawczaka ludzkiego (HPV, ang. *human papillomavirus*), wirus mozaiki stokłosa (BMV, ang. *brome mosaic virus*) oraz wirus krzaczastej karłowatości pomidora (TBSV, ang. *tomato bushy stunt virus*)^{21,22}. Drożdże są również przydatne w badaniach nad lokalizacją białek wirusowych w komórkach, analizą wpływu wirusów na cykl komórki gospodarza oraz badaniem wpływu indukowanej przez wirusy śmierci komórkowej²⁰. Ich wykorzystanie w badaniach umożliwia również identyfikację cząsteczek o działaniu przeciwwirusowym. Przykładem są systemy drożdżowe zaprojektowane do przesiewu leków przeciwko proteazom wirusów takich jak SARS-CoV,

HCMV (*ang. human cytomegalovirus*) czy HIV-1 (*ang. human immunodeficiency virus 1*)²³. Pomimo licznych zalet, takich jak prostota obsługi, możliwość genetycznej modyfikacji i szybkość eksperymentów, drożdże posiadają także pewne ograniczenia w kontekście badań nad wirusami. Jednym z nich jest brak możliwości dokładnego odzwierciedlenia złożonych interakcji, które zachodzą w organizmach wielokomórkowych²².

W niniejszej pracy przedstawiono system wykorzystujący *S.cerevisiae* do przeszukiwania inhibitorów M^{pro} SARS-CoV-2. Opracowany model umożliwia wykrywanie cząsteczek hamujących aktywność M^{pro} na podstawie analizy zdolności komórek do wzrostu oraz pomiaru zmian poziomu fluorescencji, co pozwala na szybkie i efektywne przesiewanie potencjalnych inhibitorów. W ramach pracy doktorskiej zaprezentowano również propozycję nowego inhibitora M^{pro}, który do roku 2024 nie był nigdzie opisany²⁴ (Publikacja 1). Obserwacje uzyskane podczas konstrukcji i optymalizacji systemu drożdżowego stały się punktem wyjścia do dalszych badań. Skupiono się na analizie zależności między aktywnością promotora *GALI* a zastosowanym źródłem węgla, co pozwoliło lepiej zrozumieć mechanizmy regulacji ekspresji genów w tym systemie. W kolejnym etapie badań zbadano wpływ M^{pro} na funkcjonowanie mitochondriów *S. cerevisiae*, ujawniając mechanizmy toksyczności proteazy w komórkach drożdży (Publikacja 2). W ostatniej pracy podsumowano szerokie zastosowanie drożdży różnych gatunków w badaniach nad SARS-CoV-2, ze szczególnym uwzględnieniem badań skoncentrowanych na M^{pro}. Omówiono metody badawcze, wyniki oraz potencjalne kierunki dalszych badań w kontekście SARS-CoV-2, podkreślając znaczenie drożdży jako uniwersalnego modelu badawczego (Publikacja 3).

Niniejsza rozprawa doktorska przedstawia rozwój zaawansowanego systemu badawczego opartego na drożdżach *S. cerevisiae*, który umożliwia skuteczne wyszukiwanie inhibitorów M^{pro} wirusa SARS-CoV-2. Opracowany system drożdżowy stanowi wszechstronne i ekonomiczne narzędzie badawcze, które także wspiera badania nad mechanizmami patogenezы SARS-CoV-2. Wyniki uzyskane w ramach tej pracy mogą przyczynić się do rozwoju skutecznych terapii przeciwwirusowych oraz do dalszych badań nad interakcjami wirusów z komórkami gospodarza, w szczególności w kontekście mitochondriów.

Główne tezy i osiągnięcia rozprawy doktorskiej

1. Skonstruowany system jako narzędzie do poszukiwania inhibitorów M^{pro}

Publikacja nr 1. Grabiński, W., Kicińska, A., Kosicka, E., Baranek-Grabińska, M., Hejenkowska, E. D., Budzik, J., Śliska, P., Śliwińska, W., & Karachitos, A., 2023, Meisoindigo: An Effective Inhibitor of SARS-CoV-2 Main Protease Revealed by Yeast System, bioRxiv 2023.09.03.555867; <https://doi.org/10.1101/2023.09.03.555867>

Celem pracy było opracowanie systemu umożliwiającego bezpieczne, szybkie i tanie przeszukiwanie potencjalnych leków ukierunkowanych na SARS-CoV-2. M^{pro}, ze względu na swój konserwatywny charakter, oraz kluczową rolę w cyklu życiowym SARS-CoV-2, została wybrana jako obiecujący cel terapeutyczny. Wykorzystano powszechnie stosowany organizm modelowy, drożdże *S. cerevisiae*, do stworzenia systemu umożliwiającego identyfikację inhibitorów M^{pro}.

Skonstruowano szczepy drożdży umożliwiające kontrolowaną ekspresję genu kodującego białko fuzyjne. W jego konstrukcji główna proteaza została połączona z białkiem fluorescencyjnym EGFP (ang. *enhanced green fluorescence protein*) za pomocą sekwencji rozpoznawanej przez M^{pro}. Ekspresję genu kontrolowano promotorem *GALI*, indukowanym przez dodanie galaktozy do podłoża hodowlanego. Dodatkowo skonstruowano szczep kontrolny, w którym M^{pro} połączono z EGFP za pomocą sekwencji nierozpoznawanej przez enzym, co pozwoliło na ocenę specyficzności działania inhibitorów.

Zdolność opracowanego systemu do wykrywania inhibitorów M^{pro} potwierdzono przy użyciu znanego inhibitora GC376. Następnie przeprowadzono przesiew biblioteki leków w poszukiwaniu nowych potencjalnych inhibitorów M^{pro}. Wyselekcjonowane związki poddano dalszym testom zarówno na pożywkach stałych, jak i płynnych. Związki wykazujące najsilniejszy efekt zostały dodatkowo zweryfikowane w testach *in-vitro* z wykorzystaniem techniki FRET, co umożliwiło precyzyjną ocenę ich działania.

a. Konstrukcja systemu do przeszukiwania inhibitorów.

Kluczowym celem projektu było opracowanie systemu umożliwiającego stabilną i kontrolowaną ekspresję genu kodującego M^{pro}. Zaprojektowany system wykorzystuje toksyczny wpływ M^{pro} na wzrost komórek drożdży. Osiągnięto to poprzez wprowadzenie genu

kodującego białko fuzyjne EGFP-SAVLQ-M^{pro} do chromosomu 2 drożdży przy użyciu technologii CRISPR/Cas9. Gen umieszczono pod kontrolą promotora *GALI*, co umożliwiło precyzyjną kontrolę ekspresji za pomocą galaktozy (Rysunek 1 w Publikacji 1). Dodatkowo, delecja genu *GALI* uniemożliwiła drożdżom wykorzystywanie galaktozy jako źródła węgla, co zapewniło utrzymanie się tego czynnika indukującego na stałym poziomie. Aby zwiększyć skuteczność badań przesiewowych, usunięto gen *PDR5*, odpowiedzialny za wielolekową oporność. System pozwala na wykrywanie inhibitorów M^{pro} poprzez ocenę wzrostu komórek drożdży oraz zmian w poziomie fluorescencji.

Białko fuzyjne EGFP oraz M^{pro} zaprojektowano tak, aby M^{pro} autokatalitycznie rozcinało sekwencję SAVLQ, uwalniając EGFP i przyjmując natywną strukturę, co umożliwia jego pełną aktywność i toksyczne działanie wobec komórek drożdży. W obecności inhibitora wzrost drożdży nie jest zaburzony, a poziom fluorescencji wzrasta. Wprowadzono również kontrolny wariant EGFP-D4K-M^{pro}, w którym sekwencja SAVLQ, rozpoznawana przez M^{pro} została zastąpiona łącznikiem D4K rozpoznawanym przez enterokinazę (nieobecną w komórkach drożdży). Ta modyfikacja obniżyła aktywność M^{pro}, skutkując brakiem toksyczności i zwiększeniem fluorescencji (Rysunek 2 w Publikacji 1).

Kolejnym krokiem było wybranie odpowiedniego podłoża hodowlanego. Pożywki z glukozą zostały wykluczone ze względu na represję kataboliczną, która utrudniała indukcję i kontrolę poziomu ekspresji genu kodującego. Pożywki wzbogacone glicerolem pozwoliły na obserwację fenotypu toksyczności M^{pro} (Rysunek 2c w Publikacji 1), jednak długi czas wzrostu (około tygodnia) i brak skuteczności testowanych leków wykluczyły ich użycie. Ostatecznie zastosowanie sacharozy jako źródła węgla rozwiązało te problemy, umożliwiając szybki wzrost drożdży oraz skuteczne wykrywanie inhibitorów M^{pro} w czasie nieprzekraczającym 48 godzin.

Do walidacji systemu wykorzystano GC376, znany inhibitor M^{pro}, który skutecznie zahamował aktywność proteazy, przywracając wzrost drożdży (Rysunek 3 w Publikacji 1). Badaniom przesiewowym poddano ponad 1900 leków zaaprobowanych przez FDA (*ang.* U.S. Food and Drug Administration). Szczegółowy opis procedury znajduje się w rozdziale „Materiały i Metody” Publikacji 1, a schemat przeprowadzenia testu przedstawiono na Rysunku 1.

b. Przeszukiwanie biblioteki leków i testy *in-vitro*.

W ramach przeszukiwania leków wytypowano 10 związków o potencjalnym działaniu jako inhibitory M^{pro}. W celu potwierdzenia wyników, przeprowadzono testy wzrostu na pożywce płynnej. Szczególną uwagę zwrócił meisoindigo, pochodna *Indigo naturalis*, wykorzystywana jako lek przeciwnowotworowy. Związek ten, dotychczas nieopisywany w kontekście aktywności przeciw SARS-CoV-2, skutecznie przywracał wzrost komórek drożdży (Rysunek 3c oraz 4 w Publikacji 1). Wyniki te zostały potwierdzone przez analizę poziomu fluorescencji, która wykazała wzrost w obecności meisoindigo (Rysunek 6 w Publikacji 1).

Kolejnym związkiem wykazującym wysoką skuteczność na pożywce stałej był ixazomib. Jednakże, w testach na pożywce płynnej jego efekt hamujący okazał znacznie słabszy. Testom na pożywce płynnej poddano również nirmatrelvir, składnik leku Paxlovid, który przywracał wzrost komórek drożdży w obecności toksycznej ekspresji M^{pro} (Rysunek 4 w Publikacji 1).

Dla dalszej weryfikacji skuteczności meisoindigo przeprowadzono testy *in vitro* z wykorzystaniem techniki FRET, która umożliwia ocenę aktywności enzymatycznej poprzez pomiar zmian fluorescencji po rozszczepieniu syntetycznego substratu. W tym podejściu zastosowano dobrze znany substrat Mca-AVLQ↓SGFR-K(Dnp)-K, gdzie "↓" oznacza miejsce rozcięcia przez M^{pro} w warunkach *in vitro*. Wyniki wykazały, że w przeciwieństwie do GC376, meisoindigo nie wywołało znaczącego efektu hamującego M^{pro}. Meisoindigo, ze względu na swój intensywny czerwony kolor może powodować tłumienie sygnału fluorescencji lub wprowadzać zakłócenia w odczycie (Rysunek 5b w Publikacji 1). Jednakże, późniejsza publikacja Gao i współautorów (2024), która pojawiła się po udostępnieniu naszych wyników w preprincie, dostarcza dalszych dowodów na to, że meisoindigo rzeczywiście jest inhibitorem M^{pro}²⁴. W badaniach tych zastosowano szereg metod, w tym testy FRET, modelowanie molekularne, testy cytotoksyczności oraz eksperymenty przeciwwirusowe na liniach komórkowych zakażonych SARS-CoV-2. Te dane są potwierdzeniem, że opracowany w ramach niniejszej pracy system przesiewowy skutecznie zidentyfikował meisoindigo jako potencjalny inhibitor M^{pro}, choć wyniki testów FRET w naszej pracy wskazywały na brak aktywności, najprawdopodobniej ze względu na konieczność optymalizacji tej techniki.

Podsumowując, w ramach niniejszej pracy opracowano drożdżowy system do przeszukiwania inhibitorów M^{pro}, charakteryzujący się krótkim czasem wykrywania

potencjalnych leków. System ten nie wymaga laboratoriów o wysokim poziomie bezpieczeństwa, co czyni go dostępnym także dla ośrodków o ograniczonych zasobach finansowych. Wykorzystuje toksyczny efekt M^{pro} na komórki drożdży i pozwala na wykrycie inhibitorów poprzez testy wzrostowe oraz analizę poziomu fluorescencji. Wyniki sugerują, że system drożdżowy jest wartościowym narzędziem w poszukiwaniu nowych leków przeciw SARS-CoV-2.

2. Toksyczny wpływ M^{pro} na komórki drożdży związany jest z dysfunkcją mitochondriów.

Publikacja nr 2. Grabiński, W., Kicińska, A., Funtowicz, K., Skrzypczak, T., Karachitos, A. (2025). SARS-CoV-2 main protease causes mitochondrial dysfunction in a yeast model.

Wyniki przedstawione w ramach Publikacji 1 wskazały na istotne różnice w toksyczności M^{pro} i wzroście drożdży w zależności od użytego źródła węgla. Szczególnie zauważono, że toksyczność M^{pro} była bardziej nasiloną w obecności niefermentującego źródła węgla, takiego jak glicerol, w porównaniu z fermentującą sacharozą. Obserwacje te postawiły pytanie, czy za różnice w toksyczności odpowiadają same właściwości metaboliczne komórek w zależności od źródła węgla, czy też są one związane z różnicami w poziomie ekspresji genów pod kontrolą promotora *GALI*, aktywowanego przez podanie galaktozy?

Aby odpowiedzieć na to pytanie, postanowiono skonstruować nowy model drożdżowy, umożliwiający precyzyjne zbadanie wpływu różnych źródeł węgla na aktywność promotora *GALI* oraz na toksyczność M^{pro}. W tym celu zastosowano układ badawczy pozwalający na ocenę zarówno aktywności promotora w różnych warunkach metabolicznych, jak i wpływu toksycznego M^{pro} w zależności od zastosowanego podłoża hodowlanego.

Otrzymane wyniki pozwoliły na wytypowanie zarówno pożywek najwydajniej aktywujących promotor *GALI*, jak i tych, na których efekt toksyczny M^{pro} był najsilniejszy. W szczególności zauważono, że metabolizm komórek związany z intensywną aktywnością mitochondriów może zwiększać podatność na działanie proteazy. Zaobserwowany związek pomiędzy osłabieniem wzrostu drożdży a aktywnością M^{pro} w warunkach wymuszających aktywność mitochondriów skłoniło do przeprowadzenia szczegółowych badań mechanizmów odpowiedzialnych za te efekty. W tym celu zmierzono szybkość zużycia tlenu przez komórki hodowane na różnych podłożach, aby ocenić wpływ aktywnej M^{pro} na mitochondria. Określono produkcję reaktywnych form tlenu (RFT) w mitochondriach, stosując sondę MitoSOX, a także przeanalizowano morfologię mitochondriów i ich potencjał błonowy.

a. Wpływ źródła węgla na aktywność promotora *GALI* oraz toksyczność M^{pro} wobec komórek *S. cerevisiae*

Pierwszym celem badania było określenie aktywności promotora *GALI* w zależności od zastosowanego źródła węgla. W tym celu skonstruowano szczep drożdży, w którym gen

kodujący białko fluorescencyjne EGFP został wprowadzony pod kontrolę promotora *GALI*. Podobnie jak w Publikacji 1, do precyzyjnej modyfikacji genomu wykorzystano technologię CRISPR/Cas9, co umożliwiło stabilną i kontrolowaną ekspresję EGFP w obecności galaktozy (Rysunek 1 w Publikacji 2).

Otrzymany szczep został następnie użyty do przeprowadzenia kropelkowego testu wzrostowego na pożywkach zawierających różne źródła węgla wzbogaconych o galaktozę, w tym: etanol z glicerolem, glicerol, glukoza, mleczan i sacharoza. Jako kontrolę wykorzystano komórki hodowane na pożywce zawierającej glukozę bez dodatku galaktozy, co pozwoliło na ocenę bazowego poziomu fluorescencji EGFP w warunkach represji katabolicznej. Wyniki analizy fluorescencji wskazały, że najwyższy poziom aktywności promotora *GALI* zaobserwowano w komórkach hodowanych na pożywce z sacharozą oraz glicerolem (Rysunek 2 w Publikacji 2). Co ciekawe, aktywność promotora *GALI* została zarejestrowana także w komórkach hodowanych na podłożu z glukozą z dodatkiem galaktozy, pomimo jej znanego efektu represji katabolicznej. W tym przypadku poziom fluorescencji był jednak stosunkowo niski.

Prawdopodobnym wytłumaczeniem tej obserwacji jest mechanizm aktywacji promotora *GALI* w warunkach ograniczenia dostępności glukozy. Możliwe, że represja kataboliczna wywołana obecnością glukozy zostaje osłabiona w momencie, gdy jej stężenie w pożywce spada do poziomu krytycznego, co umożliwia indukcję promotora *GALI* przez obecność galaktozy. Mechanizm ten jest zgodny z wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi, które wskazują na zależność między stężeniem glukozy a aktywnością genów związanych z metabolizmem alternatywnych źródeł węgla²⁵.

W kolejnym etapie badania opisany powyżej układ poszerzono o szczepy drożdżowe opracowane w ramach systemu przeznaczonego do poszukiwania inhibitorów M^{pro}. Do tych badań wykorzystano dwa szczepy drożdży: jeden, w którym pod promotor *GALI* wprowadzono gen kodujący białko fuzyjne EGFP-SAVLQ-Mpro (szczep toksyczny dla komórek, enzym jest aktywny) lub EGFP-D4K-Mpro (szczep kontrolny, z ograniczoną aktywnością enzymatyczną). Taki zestaw szczepów pozwolił na porównanie toksyczności M^{pro} w warunkach fermentacyjnych oraz wymagających aktywnego metabolizmu mitochondrialnego.

Przeprowadzono eksperymenty hodowlane na pożywkach zawierających różne źródła węgla: fermentacyjne (glukoza, sacharoza) oraz niefermentacyjne (etanol, połączenie etanolu z glicerolem, mleczan). Wyniki jasno wskazały, że wzrost komórek drożdżowych z aktywnym

M^{pro} (EGFP-SAVLQ-Mpro) był zauważalnie osłabiony w warunkach fermentacyjnych w porównaniu do szczepów kontrolnych (EGFP-D4K-Mpro). Efekt ten był jednak znacznie bardziej nasilony w przypadku pożywek wymagających aktywnego metabolizmu mitochondrialnego, takich jak te zawierające etanol, glicerol czy mleczan. W tych warunkach wzrost komórek drożdżowych z aktywnym M^{pro} był znacząco zredukowany, co wskazuje, że toksyczność proteazy jest szczególnie dotkliwa w komórkach opierających swój metabolizm na mitochondriach (Rysunek 4 w Publikacji 2). Chociaż EGFP-D4K-Mpro zaprojektowano jako szczep kontrolny, w warunkach wymagających aktywnego metabolizmu mitochondrialnego, takich jak hodowla na glicerolu czy mleczanie, zaobserwowano również osłabienie wzrostu komórek. Sugeruje to, że szczep ten może wykazywać pewien poziom toksyczności, potencjalnie związany z ograniczoną aktywnością proteazy M^{pro}, która mimo zastosowania łącznika D4K może nie być całkowicie nieaktywna. Jednakże, w porównaniu do szczepu EGFP-SAVLQ-Mpro, efekt toksyczny był znacznie słabszy (Rysunek 4 w Publikacji 2).

b. Wpływ M^{pro} na funkcjonowanie mitochondriów.

W dalszym etapie badań, przeprowadzono eksperymenty mające na celu określenie wpływu aktywności M^{pro} na funkcjonowanie mitochondriów. Do analizy wykorzystano dwa szczepy drożdżowe: nietoksyczny EGFP-D4K-Mpro, w którym proteaza nie wykazuje pełnej aktywności, oraz toksyczny EGFP-SAVLQ-Mpro, w którym proteaza jest aktywna.

Pierwszym krokiem były pomiary oddychania komórkowego przy użyciu elektrody Clarka, co pozwoliło na określenie szybkości zużycia tlenu. Wyniki pokazały, że szczep EGFP-D4K-Mpro charakteryzował się znacząco wyższym tempem oddychania w porównaniu do szczepu EGFP-SAVLQ-Mpro, wskazując, że aktywna proteaza negatywnie wpływa na zdolność komórek do przeprowadzania efektywnej fosforylacji oksydacyjnej. Dodatkowo, za pomocą sondy MitoSOX zmierzono poziom anionorodnika ponadtlenkowego (O₂⁻). W przeliczeniu na pojedynczą komórkę wyniki wskazywały na wyższy poziom O₂⁻ w szczepie EGFP-D4K-Mpro. Jednak, po normalizacji danych względem poziomu oddychania, różnice te przestawały być istotne statystycznie. Wynik ten sugeruje, że niższa produkcja RFT w szczepie EGFP-SAVLQ-Mpro wynika głównie z obniżonego poziomu oddychania mitochondrialnego, a nie z efektywności samego procesu generowania O₂⁻ (Rysunek 5 w Publikacji 2).

Kolejnym etapem badań była analiza struktury i funkcji mitochondriów z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej. Komórki wybarwiono TMRM, który pozwala na ocenę potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej, oraz śledzono lokalizację białka fuzyjnego EGFP. W szczepie EGFP-D4K-Mpro mitochondria wykazywały jednorodną strukturę i zachowany potencjał błony, co wskazuje na ich prawidłowe funkcjonowanie. Z kolei EGFP było równomiernie rozmieszczone w obrębie komórki. Natomiast w przypadku szczepu EGFP-SAVLQ-Mpro zaobserwowano wyraźne zaburzenia w funkcjonowaniu mitochondriów. Potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej był obniżony, co uwidoczniło się jako nieregularne, lokalne obniżenie intensywności sygnału TMRM. Mitochondria wykazywały fragmentację i nieprawidłową strukturę. Dodatkowo, sygnał EGFP w niektórych komórkach był osłabiony lub całkowicie nieobecny, co może świadczyć o zaburzeniach związanych z aktywną translacją Mpro w komórce (Rysunek 6 w Publikacji 2).

Podsumowując, w ramach niniejszej pracy opisano zależność między źródłem węgla a aktywnością promotora *GALI*. Ponadto, określono wpływ rodzaju źródła węgla na stopień, w jakim aktywne M^{pro} zaburza wzrost komórek. Te obserwacje były punktem wyjściem do eksperymentów, których wyniki wskazały, że M^{pro} w swojej toksycznej działalności doprowadza do dysfunkcji mitochondriów. Wyniki te stanowiły podstawę dla dalszych eksperymentów, które wykazały, że toksyczne działanie M^{pro} prowadzi do poważnych zaburzeń w funkcjonowaniu mitochondriów. Dysfunkcje te obejmują obniżenie poziomu oddychania komórkowego, zmniejszenie potencjału błony mitochondrialnej oraz wyraźne zmiany w strukturze mitochondriów, co podkreśla kluczową rolę metabolizmu mitochondrialnego w odpowiedzi komórek na toksyczność M^{pro}.

3. Drożdże jako skuteczna platforma badawcza w kontekście SARS-CoV-2.

Publikacja nr 3. Grabiński, W., Karachitos, A., & Kicińska, A. (2024). Backstage Heroes—Yeast in COVID-19 Research. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(23), 12661. <https://doi.org/10.3390/ijms252312661>

Trzecia publikacja skupia się na podsumowaniu i analizie zastosowania drożdży oraz technik opartych na nich jako wszechstronnej platformy badawczej w kontekście SARS-CoV-2. Opisano, w jaki sposób różne gatunki drożdży oraz ich unikalne właściwości były wykorzystywane w badaniach nad wirusem.

Wśród kluczowych narzędzi wykorzystujących drożdże znalazły się technika YSD (*ang. yeast surface display*), technika pozwalająca na eksponowanie białek rekombinowanych na powierzchni ściany komórkowej *S. cerevisiae*. Narzędzie to umożliwia selekcję białek, przeciwciał i nanoprzeciwciał o pożądanym właściwościach. Kolejną techniką jest drożdżowy system dwuhybrydowy Y2H (*ang. yeast - two hybrid system*), system badawczy pozwalający analizować oddziaływania między białkami. Znajduje on zastosowanie w badaniu oddziaływań białek wirusa SARS-CoV-2 z białkami ludzkimi. Ważnym narzędziem jest także sztuczny chromosom drożdżowy YAC (*ang. yeast artificial chromosome*), który umożliwia klonowanie długich fragmentów DNA, w tym całych genomów wirusowych takich jak SARS-CoV-2. Schematy przedstawiające zasadę działania opisanych technik zostały zaprezentowane na Rysunku 1 w Publikacji 3.

Publikacja podkreśla szerokie zastosowanie drożdży w badaniach nad SARS-CoV-2, obejmujące konstrukcję i analizę szczepionek, badanie wpływu białek wirusowych, takich jak M^{pro} na białka ludzkie i drożdżowe, a także tworzenie bibliotek przeciwciał i nanoprzeciwciał. Praca stanowi kompleksowe opracowanie na temat możliwości wykorzystania drożdży w badaniach wirusologicznych, podkreślając ich istotną rolę w rozwoju narzędzi diagnostycznych, terapeutycznych i badawczych w kontekście SARS-CoV-2.

a. Zastosowanie systemów drożdżowych do analizy aktywności M^{pro} i identyfikacji inhibitorów

Drożdże, dzięki swojej wszechstronności i prostocie genetycznej, stały się ważnym narzędziem w badaniach nad SARS-CoV-2, w tym w analizie aktywności M^{pro} oraz

poszukiwaniu jej potencjalnych inhibitorów. Wykorzystanie drożdży pozwala na przeprowadzenie zarówno zaawansowanych badań mutagenicznych, jak i opracowanie układów przesiewowych do identyfikacji nowych związków o działaniu hamującym replikację wirusa. Publikacja 3 omawia różne podejścia badawcze oparte na drożdżach, które znacząco przyczyniły się do pogłębienia wiedzy o M^{pro}.

W jednym z podejść badacze wykorzystali zaawansowaną analizę wpływu mutacji DMS (*ang. deep mutational scanning*), aby zrozumieć wpływ pojedynczych mutacji na aktywność M^{pro}. Takie podejście umożliwiło wskazanie regionów proteazy charakteryzujących się wysoką zmiennością, które mogą być mniej odpowiednie jako cele terapeutyczne, oraz identyfikację kluczowych obszarów dla jej funkcjonowania. Grupa Daniela Bolona zaproponowała 3 różne systemy badawcze, które analizowały aktywność M^{pro} w modelu drożdżowym.

Pierwszy system opierał się na pomiarze spadku fluorescencji wynikającego z przecięcia pary białek YFP-CFP połączonych sekwencją rozpoznawaną przez M^{pro}. Drugi układ monitorował aktywność M^{pro} poprzez określanie zmian poziomu fluorescencji GFP. W tym przypadku M^{pro} rozcinała czynnik transkrypcyjny regulujący ekspresję genu kodującego GFP. Trzeci system wykorzystywał toksyczny wpływ M^{pro} na komórki drożdży, badając, w jaki sposób różne warianty wpływają na ich wzrost (Rysunek 3 w Publikacji 3). Wyniki uzyskane w tych systemach następnie skorelowano, co pozwoliło na identyfikację 24 miejsc o niskiej tolerancji na mutacje, które są kluczowe dla funkcjonowania M^{pro}.

Podejście łączące DMS z badaniem toksycznych właściwości M^{pro} zaproponował również Iketani wraz ze współautorami. W innym badaniu autorzy przeprowadzili nadekspresję genów kodujących M^{pro} oraz inne białka wirusowe, aby określić ich toksyczność wobec komórek drożdży. W wyniku przeprowadzonych badań wskazali na toksyczny efekt M^{pro}, białka S i helikazy.

Drożdże zostały również wykorzystane do skonstruowania systemów służących do przeszukiwania potencjalnych inhibitorów M^{pro}. Obok systemu opisanego w Publikacji 1, przedstawiono alternatywne podejście wykorzystujące toksyny bakteryjne. W tym systemie oparto się na zależności toksyna – antytoksyna. Białko MazF (toksyczna endorybonukleaza) połączono łącznikiem rozpoznawanym przez M^{pro} z białkiem MazE (antytoksyną), które hamuje działanie MazF. Aktywne M^{pro} rozcinało łącznik między MazF i MazE, uwalniając toksyczne MazF i skutkując osłabieniem wzrostu komórek drożdży. W obecności inhibitora M^{pro}

nie dochodziło do rozcięcia, co pozwalało na prawidłowy wzrost komórek. Komórki drożdży zostały dodatkowo oznakowane białkiem mCherry, co umożliwiało analizę zmian poziomu fluorescencji.

b. Pozostałe zastosowania drożdży w badaniach nad SARS-CoV-2

Jednym z popularnych obszarów badawczych były oddziaływania między białkami SARS-CoV-2 a białkami gospodarza. Szczególną uwagę poświęcono zależnościom między domeną wiążącą receptor RBD (*ang.* receptor-binding domain) białka S a receptorami ACE2 (*ang.* angiotensin converting enzyme 2) na powierzchni komórek gospodarza. Wiele z tych badań wykorzystało technikę YSD, w której różne warianty RBD prezentowano na powierzchni komórek drożdży. Pozwoliło to na zgłębienie wpływu poszczególnych mutacji w obrębie RBD na powinowactwo do ACE2, co umożliwiło identyfikację kluczowych obszarów w obrębie RBD mogących stanowić cele dla leków i szczepionek.

W innym podejściu YSD posłużyło do opracowania wariantu ACE2, który byłby rozpuszczalny, enzymatycznie nieaktywny i mógłby służyć jako „pułapka”, wiążąc się z białkiem S z wysokim powinowactwem. Badania te podkreśliły potencjał tej techniki w projektowaniu terapeutycznych receptorów pułapkowych.

YSD wykorzystano do tworzenia bibliotek przeciwciał i nanoprzeciwciał, co pozwoliło na selekcję skutecznych cząsteczek o wysokim powinowactwie do wirionów. Ciekawym przykładem zastosowania YSD było opracowanie jednego z testów antygenowych przeciwko białku nukleokapsydu SARS-CoV-2. W tym przypadku YSD umożliwiło przeszukiwanie bibliotek w celu identyfikacji par przeciwciał o optymalnym powinowactwie, które stanowiły podstawę tego testu diagnostycznego.

Dodatkowo, technika Y2H została zastosowana do tworzenia narzędzi badawczych pozwalających na analizę sieci interakcji między białkami ludzkimi a białkami wirusowymi. Badania te przyczyniły się do lepszego zrozumienia, w jaki sposób wirus SARS-CoV-2 wpływa na funkcjonowanie komórek gospodarza oraz jakie interakcje mogą stanowić cele terapeutyczne.

Drożdże odegrały znaczącą rolę w rozwoju szczepionek przeciwko SARS-CoV-2. Antygeny wyprodukowane w *Pichia pastoris* znalazły zastosowanie jako składnik szczepionek Corbevax i Indovac, które były szeroko stosowane w walce z pandemią. Ponadto badania

wskazują na potencjał drożdży prezentujących na swojej powierzchni RBD białka S, jako potencjalnych szczepionek, co podkreśla ich wszechstronność jako platformy produkcyjnej i badawczej. Częsteczki beta-glukanów obecne w *S. cerevisiae* mogą także pełnić funkcję nośnika w szczepionkach, co dodatkowo rozszerza możliwości ich zastosowania.

Drożdże znalazły również zastosowanie w zaawansowanych technikach genetycznych, takich jak TAR (*ang. transformation-associated recombination*) oraz sztuczne chromosomy drożdżowe. Te narzędzia zostały wykorzystane do złożenia genomu SARS-CoV-2, który następnie przepisano na RNA w procesie transkrypcji *in vitro*. Otrzymane RNA wykorzystano do elektroporacji linii komórkowej BHK-21, co umożliwiło izolację wirusa zdolnego do infekowania komórek. To podejście pozwoliło na szybkie badanie wirusa w warunkach laboratoryjnych.

W innych badaniach, opartych na technologiach drożdżowych, otrzymano replikony SARS-CoV-2. Są to samopowielające się cząsteczki pozbawione białek strukturalnych, co oznacza, że nie są zdolne do infekowania komórek. Replikony stanowią istotne narzędzie badawcze, umożliwiając prowadzenie eksperymentów nad wirusem bez konieczności posiadania laboratoriów o wysokim poziomie bezpieczeństwa biologicznego. To rozwiązanie znacząco poszerza dostępność badań nad SARS-CoV-2.

Podsumowując, trzecia publikacja przedstawia szeroki zakres zastosowań drożdży w badaniach nad SARS-CoV-2. Omówione w niej przykłady ukazują wszechstronność drożdży jako organizmów modelowych, które znalazły zastosowanie zarówno w badaniach podstawowych, takich jak analiza oddziaływań między białkami wirusa a białkami gospodarza, jak i w opracowywaniu narzędzi diagnostycznych oraz terapeutycznych, w tym szczepionek.

Podsumowanie

Niniejsza praca doktorska składa się z trzech publikacji – dwóch prac eksperymentalnych oraz jednej pracy przeglądowej. Pierwsza z prac eksperymentalnych została udostępniona jako preprint w serwisie bioRxiv, druga jest przygotowana do wysłania do czasopisma, natomiast praca przeglądowa została opublikowana w 2024 roku w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences*. Tematyka poruszana w tych publikacjach w pełni realizuje założenia przedstawione w Indywidualnym Planie Badawczym, a w niektórych aspektach je poszerza.

Głównym celem badawczym niniejszej rozprawy doktorskiej, zgodnie z Indywidualnym Planem Badawczym, było stworzenie niepatogennego, szybkiego i niewymagającego dużych nakładów finansowych systemu drożdżowego, pozwalającego na zbadanie aktywności M^{pro} poprzez pomiar wzrostu komórek drożdży. Cel ten został osiągnięty i opisany w Publikacji 1. W ramach realizacji Indywidualnego Planu Badawczego postawiono także dwa kluczowe pytania: (1) czy skonstruowany system będzie czuły na znane inhibitory M^{pro} (takie jak np. GC 376) oraz (2) czy przeprowadzenie testu przesiewowego pozwoli na wyizolowanie nowych, nieopisanych dotąd skutecznych inhibitorów M^{pro}? Wyniki uzyskane w ramach tego projektu pozwoliły udzielić twierdzącej odpowiedzi na oba pytania. Opracowany system wykazał wysoką wrażliwość zarówno na GC376, jak i na inne leki, takie jak nirmatrelvir. Co więcej, w trakcie badań przesiewowych zidentyfikowano meisoindigo – związek, który wcześniej nie był znany jako potencjalny inhibitor M^{pro}. Wyniki te zostały potwierdzone w 2024 roku w publikacji Gao i współpracowników²⁴.

Oprócz zrealizowania zadań postawionych w ramach Indywidualnego Planu Badawczego, praca nad systemem drożdżowym stała się punktem wyjścia do dalszych badań, które pozwoliły na szczegółowe opisanie wpływu M^{pro} na funkcjonowanie mitochondriów. Uzyskane wyniki wykazały, M^{pro} jest szczególnie toksyczne w warunkach hodowli komórek drożdży na pożywkach wymagających aktywnego metabolizmu tlenowego z udziałem mitochondriów. Dalsze eksperymenty ujawniły, że M^{pro} prowadzi do obniżenia zużycia tlenu przez komórki, osłabienia potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej, a także do zaburzeń w morfologii mitochondriów. Wyniki te zostały szczegółowo opisane w Publikacji 2.

Co istotne, dysfunkcje mitochondriów mają również potencjalne powiązania z objawami long COVID. W literaturze opisano, że SARS-CoV-2 wpływa na mitochondria,

powodując zmniejszenie wydajności fosforylacji oksydacyjnej oraz naruszenie integralności mitochondriów. Zmiany te mogą prowadzić do przewlekłych objawów, takich jak zmęczenie, osłabienie mięśni czy zaburzenia poznawcze, co stanowi charakterystyczne cechy long COVID^{26,27}.

Dodatkowo, aby usystematyzować i podsumować wiedzę na temat wykorzystania drożdży w badaniach nad SARS-CoV-2, w tym ze szczególnym uwzględnieniem badań nad M^{pro}, opublikowano pracę przeglądową (Publikacja 3). Publikacja ta stanowi cenne źródło informacji o szerokim zastosowaniu drożdży w badaniach nad wirusem, od analizy interakcji białkowych, przez tworzenie narzędzi diagnostycznych, aż po rozwój potencjalnych terapii.

Podjęte badania i ich wyniki w znaczący sposób poszerzają wiedzę dotyczącą biologii M^{pro} oraz potencjału drożdży jako modelu badawczego w kontekście SARS-CoV-2, podkreślając ich wszechstronność i znaczenie w nauce.

Bibliografia

1. Ely, E.W., Brown, L.M., and Fineberg, H.V. (2024). Long Covid Defined. *New England Journal of Medicine* 391, 1746–1753. <https://doi.org/10.1056/NEJMs2408466>.
2. Kaye, A.D., Okeagu, C.N., Pham, A.D., Silva, R.A., Hurley, J.J., Arron, B.L., Sarfraz, N., Lee, H.N., Ghali, G.E., Gamble, J.W., et al. (2021). Economic impact of COVID-19 pandemic on healthcare facilities and systems: International perspectives. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology* 35, 293–306. <https://doi.org/10.1016/j.bpa.2020.11.009>.
3. Brant, A.C., Tian, W., Majerciak, V., Yang, W., and Zheng, Z.-M. (2021). SARS-CoV-2: from its discovery to genome structure, transcription, and replication. *Cell Biosci* 11, 136. <https://doi.org/10.1186/s13578-021-00643-z>.
4. Steiner, S., Kratzel, A., Barut, G.T., Lang, R.M., Aguiar Moreira, E., Thomann, L., Kelly, J.N., and Thiel, V. (2024). SARS-CoV-2 biology and host interactions. *Nat Rev Microbiol* 22, 206–225. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-01003-z>.
5. Abbasian, M.H., Mahmanzar, M., Rahimian, K., Mahdavi, B., Tokhanbigli, S., Moradi, B., Sisakht, M.M., and Deng, Y. (2023). Global landscape of SARS-CoV-2 mutations and conserved regions. *Journal of Translational Medicine* 21, 152. <https://doi.org/10.1186/s12967-023-03996-w>.
6. Duan, Y., Wang, H., Yuan, Z., and Yang, H. (2023). Structural biology of SARS-CoV-2 Mpro and drug discovery. *Current Opinion in Structural Biology* 82, 102667. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2023.102667>.
7. She, Z., Yao, Y., Wang, C., Li, Y., Xiong, X., and Liu, Y. (2023). Mpro-targeted anti-SARS-CoV-2 inhibitor-based drugs. *J Chem Res* 47, 17475198231184799. <https://doi.org/10.1177/17475198231184799>.
8. Arya, R., Kumari, S., Pandey, B., Mistry, H., Bihani, S.C., Das, A., Prashar, V., Gupta, G.D., Panicker, L., and Kumar, M. (2021). Structural insights into SARS-CoV-2 proteins. *Journal of Molecular Biology* 433, 166725. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.11.024>.

9. Peng, J.-Q., Xiao, Y.-Q., Long, J., Zhang, S.-S., Zhu, Y.-Y., and Gu, S.-X. (2024). Design, synthesis, and biological evaluation of dithiocarbamate derivatives as SARS-CoV-2 Mpro inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 114, 130011. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2024.130011>.
10. Zagórska, A., Czopek, A., Fryc, M., and Jończyk, J. (2024). Inhibitors of SARS-CoV-2 Main Protease (Mpro) as Anti-Coronavirus Agents. *Biomolecules* 14, 797. <https://doi.org/10.3390/biom14070797>.
11. Vanderwaeren, L., Dok, R., Voordeckers, K., Nuyts, S., and Verstrepen, K.J. (2022). *Saccharomyces cerevisiae* as a Model System for Eukaryotic Cell Biology, from Cell Cycle Control to DNA Damage Response. *International Journal of Molecular Sciences* 23, 11665. <https://doi.org/10.3390/ijms231911665>.
12. Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., et al. (1996). Life with 6000 Genes. *Science* 274, 546–567. <https://doi.org/10.1126/science.274.5287.546>.
13. Parapouli, M., Vasileiadis, A., Afendra, A.-S., and Hatziloukas, E. (2020). *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS Microbiol* 6, 1–31. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2020001>.
14. Kulagina, N., Besseau, S., Godon, C., Goldman, G.H., Papon, N., and Courdavault, V. (2021). Yeasts as Biopharmaceutical Production Platforms. *Front. Fungal Biol.* 2. <https://doi.org/10.3389/ffunb.2021.733492>.
15. Zhao, M., Ma, J., Zhang, L., and Qi, H. (2024). Engineering strategies for enhanced heterologous protein production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact* 23, 32. <https://doi.org/10.1186/s12934-024-02299-z>.
16. Karathia, H., Vilaprinyo, E., Sorribas, A., and Alves, R. (2011). *Saccharomyces cerevisiae* as a Model Organism: A Comparative Study. *PLoS One* 6, e16015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016015>.
17. Betlem, K., Hoksbergen, S., Mansouri, N., Down, M., Losada-Pérez, P., Eersels, K., van Grinsven, B., Cleij, T.J., Kelly, P., Sawtell, D., et al. (2018). Real-time analysis of microbial

- growth by means of the Heat-Transfer Method (HTM) using *Saccharomyces cerevisiae* as model organism. *Physics in Medicine* 6, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.phmed.2018.05.001>.
18. Yang, S., Song, L., Wang, J., Zhao, J., Tang, H., and Bao, X. (2024). Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for efficient production of recombinant proteins. *Engineering Microbiology* 4, 100122. <https://doi.org/10.1016/j.engmic.2023.100122>.
 19. Kachroo, A.H., Vandeloo, M., Greco, B.M., and Abdullah, M. (2022). Humanized yeast to model human biology, disease and evolution. *Disease Models & Mechanisms* 15, dmm049309. <https://doi.org/10.1242/dmm.049309>.
 20. Allaf, M.M., and Trick, C.G. (2021). Yeast Cell as a Bio-Model for Measuring the Toxicity of Fish-Killing Flagellates. *Toxins* 13, 821. <https://doi.org/10.3390/toxins13110821>.
 21. Zhao, R.Y. (2017). Yeast for virus research. *Microb Cell* 4, 311–330. <https://doi.org/10.15698/mic2017.10.592>.
 22. Sahaya Glingston, R., Yadav, J., Rajpoot, J., Joshi, N., and Nagotu, S. (2021). Contribution of yeast models to virus research. *Appl Microbiol Biotechnol* 105, 4855–4878. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11331-w>.
 23. Srivastava, V., Kumar, R., and Ahmad, A. (2024). Yeast-Based Screening of Anti-Viral Molecules. *Microorganisms* 12, 578. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12030578>.
 24. Gao, Q., Liu, S., Zhou, Y., Fan, J., Ke, S., Zhou, Y., Fan, K., Wang, Y., Zhou, Y., Xia, Z., et al. (2024). Discovery of meisoindigo derivatives as noncovalent and orally available Mpro inhibitors: their therapeutic implications in the treatment of COVID-19. *European Journal of Medicinal Chemistry* 273, 116498. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2024.116498>.
 25. Escalante-Chong, R., Savir, Y., Carroll, S.M., Ingraham, J.B., Wang, J., Marx, C.J., and Springer, M. (2015). Galactose metabolic genes in yeast respond to a ratio of galactose and glucose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 1636–1641. <https://doi.org/10.1073/pnas.1418058112>.
 26. Molnar, T., Lehoczki, A., Fekete, M., Varnai, R., Zavori, L., Erdo-Bonyar, S., Simon, D., Berki, T., Csecsei, P., and Ezer, E. (2024). Mitochondrial dysfunction in long COVID:

mechanisms, consequences, and potential therapeutic approaches. *GeroScience* 46, 5267–5286. <https://doi.org/10.1007/s11357-024-01165-5>.

27. Szögi, T., Borsos, B.N., Masic, D., Radics, B., Bella, Z., Bánfi, A., Ördög, N., Zsiros, C., Kiricsi, Á., Pankotai-Bodó, G., et al. (2024). Novel biomarkers of mitochondrial dysfunction in Long COVID patients. *GeroScience*. <https://doi.org/10.1007/s11357-024-01398-4>.

Źródła finansowania badań w ramach przygotowywania rozprawy doktorskiej

- Subwencja Badawcza Zakładu Bioenergetyki UAM
- Grant NCN numer 2017/26/D/NZ1/00075. Identyfikacja i analiza funkcjonalna mutacji w genie kodującym białko VDAC3 w plemnikach ze zmniejszoną ruchliwością. SONATA 13 (2018-2021), kierownik: dr hab. Andonis Karachitos
- Grant NCN numer 2016/21/B/NZ4/00131. Mitochondrial markers of successful anhydrobiosis for representatives of aquatic and terrestrial tardigrades. OPUS 11 (2017-2022), kierownik: prof. dr hab. Hanna Kmita
- Grant „System drożdżowy do przeszukiwania inhibitorów głównej proteazy SARS-CoV-2”, w ramach konkursu na badania nad COVID-19 finansowanego przez Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, pod kierownictwem dr hab. Andonisa Karachitosa

**Załączane publikacje oraz oświadczenia doktoranta
i współautorów**

Publikacja 1

Grabiński, W., Kicińska, A., Kosicka, E., Baranek-Grabińska, M., Hejenkowska, E. D., Budzik, J., Śliska, P., Śliwińska, W., & Karachitos, A. (2023). Meisoindigo: An Effective Inhibitor of SARS-CoV-2 Main Protease Revealed by Yeast System, bioRxiv 2023.09.03.555867;

<https://doi.org/10.1101/2023.09.03.555867>

27.01.2025, Poznań

Wojciech Grabiński

wojgra@amu.edu.pl

Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii

Zakład Bioenergetyki

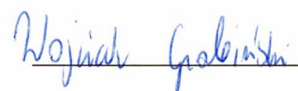
Wydział Biologii UAM

ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6

61-614 Poznań

Oświadczenie

Oświadczam, że w publikacji **Grabiński, W.**, Kicińska, A., Kosicka, E., Baranek-Grabińska, M., Hejenkowska, E. D., Budzik, J., Śliska, P., Śliwińska, W., & Karachitos, A. (2023). „Meisoindigo: An Effective Inhibitor of SARS-CoV-2 Main Protease Revealed by Yeast System" bioRxiv 2023.09.03.555867; <https://doi.org/10.1101/2023.09.03.555867>, mój udział polegał na tworzeniu koncepcji i założeń badań, tworzeniu szczepów do drożdżowego systemu ekspresyjnego, przeszukiwaniu leków hamujących główną proteazę wirusa SARS-CoV-2 w systemie drożdżowym, pomiarze aktywności głównej proteazy wirusa SARS-CoV-2 w testach *in vitro*, pomiarze poziomów fluorescencji w komórkach drożdży, analizie otrzymanych wyników i rewizji manuskryptu.



Wojciech Grabiński



Promotor: dr hab. Andonis Karachitos

Poznań 27.01.2025 r.

dr Anna Kicińska

anias@amu.edu.pl

Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii

Zakład Bioenergetyki

Wydział Biologii UAM

ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6

61-614 Poznań

Oświadczenie

Oświadczam, że w publikacji **Grabiński, W.**, Kicińska, A., Kosicka, E., Baranek-Grabińska, M., Hejenkowska, E. D., Budzik, J., Śliska, P., Śliwińska, W., & Karachitos, A. (2023). „Meisoindigo: An Effective Inhibitor of SARS-CoV-2 Main Protease Revealed by Yeast System" bioRxiv 2023.09.03.555867; <https://doi.org/10.1101/2023.09.03.555867>, mój udział polegał na tworzeniu koncepcji badawczej, przeprowadzeniu badań, opracowywaniu i walidacji metodologii, rewizji i edycji manuskryptu.

Anna Kicińska

Podpis

Poznań, 27.01.2025

Ewa Kosicka
Zakład Bioenergetyki
ewa.kosicka@amu.edu.pl

Oświadczenie

Oświadczam, że w publikacji **Grabiński, W.**, Kicińska, A., Kosicka, E., Baranek-Grabińska, M., Hejenkowska, E. D., Budzik, J., Śliska, P., Śliwińska, W., & Karachitos, A. (2023). „Meisoindigo: An Effective Inhibitor of SARS-CoV-2 Main Protease Revealed by Yeast System" bioRxiv 2023.09.03.555867; <https://doi.org/10.1101/2023.09.03.555867>, mój udział polegał na opracowaniu, optymalizacji i nadzorowaniu metody przeszukiwania leków.

Ewa Kosicka

Podpis

Poznań 27.01.2025

Martyna Baranek-Grabińska

marbar11@amu.edu.pl

Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii

Zakład Bioenergetyki

Wydział Biologii UAM

ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6

61-614 Poznań

Oświadczenie

Oświadczam, że w publikacji **Grabiński, W.**, Kicińska, A., Kosicka, E., Baranek-Grabińska, M., Hejenkowska, E. D., Budzik, J., Śliska, P., Śliwińska, W., & Karachitos, A. (2023). „Meisoindigo: An Effective Inhibitor of SARS-CoV-2 Main Protease Revealed by Yeast System" bioRxiv 2023.09.03.555867; <https://doi.org/10.1101/2023.09.03.555867>, mój udział polegał na przeszukiwaniu biblioteki leków.

Martyna Baranek-Grabińska

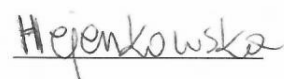
Podpis

Ewelina Hejenkowska

University of Virginia, stp3bt@virgina.edu

Oświadczenie

Oświadczam, że w publikacji **Grabiński, W.**, Kicińska, A., Kosicka, E., Baranek-Grabińska, M., Hejenkowska, E. D., Budzik, J., Śliska, P., Śliwińska, W., & Karachitos, A. (2023). „Meisoindigo: An Effective Inhibitor of SARS-CoV-2 Main Protease Revealed by Yeast System" bioRxiv 2023.09.03.555867; <https://doi.org/10.1101/2023.09.03.555867>, mój udział polegał na przeszukiwaniu leków.



Podpis

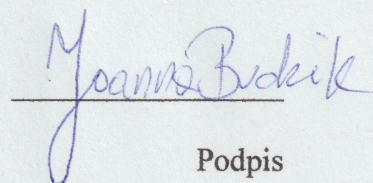
Poznań, 20.01.2025

Joanna Budzik

joannaabudzik@gmail.com

Oświadczenie

Oświadczam, że w publikacji **Grabiński, W.**, Kicińska, A., Kosicka, E., Baranek-Grabińska, M., Hejenkowska, E. D., Budzik, J., Śliska, P., Śliwińska, W., & Karachitos, A. (2023). „Meisoindigo: An Effective Inhibitor of SARS-CoV-2 Main Protease Revealed by Yeast System" bioRxiv 2023.09.03.555867; <https://doi.org/10.1101/2023.09.03.555867>, mój udział polegał na przeszukiwaniu leków.



Podpis

Poznań, 21.01.2025

Paulina Śliska

spaulina98@gmail.com

Oświadczenie

Oświadczam, że w publikacji **Grabiński, W.**, Kicińska, A., Kosicka, E., Baranek-Grabińska, M., Hejenkowska, E. D., Budzik, J., Śliska, P., Śliwińska, W., & Karachitos, A. (2023). „Meisoindigo: An Effective Inhibitor of SARS-CoV-2 Main Protease Revealed by Yeast System" bioRxiv 2023.09.03.555867; <https://doi.org/10.1101/2023.09.03.555867>, mój udział polegał na przeszukiwaniu leków.



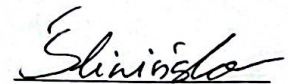
Podpis

Poznań, 17.01.2025

Weronika Śliwińska
sliwinskaweronika16@gmail.com

Oświadczenie

Oświadczam, że w publikacji **Grabiński, W., Kicińska, A., Kosicka, E., Baranek-Grabińska, M., Hejenkowska, E. D., Budzik, J., Śliska, P., Śliwińska, W., & Karachitos, A. (2023). „Meisoindigo: An Effective Inhibitor of SARS-CoV-2 Main Protease Revealed by Yeast System”** bioRxiv 2023.09.03.555867; <https://doi.org/10.1101/2023.09.03.555867>, mój udział polegał na konstrukcji szczepów i przeprowadzeniu analizy fluorescencji.



Podpis



dr hab. Andonis Karachitos

Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Zakład Bioenergetyki
Wydział Biologii UAM
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań

Poznań, 27.01.2025 r.

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w publikacji: **Grabiński, W.**, Kicińska, A., Kosicka, E., Baranek-Grabińska, M., Hejenkowska, E. D., Budzik, J., Śliska, P., Śliwińska, W., & Karachitos, A. (2023). „Meisoindigo: An Effective Inhibitor of SARS-CoV-2 Main Protease Revealed by Yeast System" bioRxiv 2023.09.03.555867; <https://doi.org/10.1101/2023.09.03.555867>, mój udział polegał na tworzeniu koncepcji i założeń badań, organizacji badań, mentoringu i prowadzenia zespołu badawczego, tworzeniu elementów wizualnych do publikacji wyników, współtworzeniu pierwszej wersji manuskryptu i dopracowaniu wersji końcowej manuskryptu.

Z poważaniem,

Andonis Karachitos

SARS-CoV-2 main protease causes mitochondrial dysfunction in a yeast model

Wojciech Grabiński¹, Anna Kicińska¹, Karolina Funtowicz¹, Tomasz Skrzypczak², Andonis Karachitos^{1*}

¹Department of Bioenergetics, Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University, Poznań, Poland.

²Center for Advanced Technology, Adam Mickiewicz University, Poznań, Poland.

*Correspondence: Andonis Karachitos, andonis@amu.edu.pl

Abstract

Saccharomyces cerevisiae has proven to be an invaluable model organism for studying mitochondrial function due to its genetic tractability and the high conservation of mitochondrial processes among eukaryotes, including humans. Yeast are easy to culture and genetically manipulate, allowing rapid generation of mutant strains and detailed dissection of mitochondrial pathways. In addition, the ability of yeast to survive without functional mitochondria allows the study of mutations that are lethal in organisms dependent on aerobic metabolism. Taking advantage of these benefits, we investigated the toxicity of SARS-CoV-2 main protease (Mpro) expression in yeast under conditions that enforce mitochondrially-dependent aerobic metabolism. Our results show that Mpro expression is highly toxic and significantly impairs yeast growth. Pronounced changes in morphology and mitochondrial function are observed, indicating that mitochondrial pathways are exceptionally sensitive to Mpro activity. These results suggest that mitochondrial pathways in yeast are particularly susceptible to Mpro and provide insights that may be relevant for understanding the effects of Mpro in more complex eukaryotic systems.

Introduction

Yeast as model organisms were used in multiple studies leading to key discoveries in the field of cell and molecular biology, genetics and medicine. The most prominent examples include cell cycle regulation, eukaryotic transcription, telomere structure, vesicle trafficking, and autophagy ^{1,2}. What is more, as essential biological processes are functionally conserved, yeast model studies have direct implications for medical research ³.

Apart from clear advantages, like rapid growth in relatively simple, inexpensive media, straight-forward genetic manipulation, lack of biosafety and ethical issues, yeast are useful because of their relatively small genome, lacking many gene duplications which exist in other eukaryotes, availability of deletion, overexpression and GFP-tagged libraries. Yeast also provide a cellular environment more relevant than immortalized cell lines often carrying metabolic and genetic abnormalities. Due to their ability to grow solely depending on fermentation as well as on media sustaining respiration, yeast are especially suitable for mitochondrial studies.

Increasing data suggest that mitochondria in cells infected with the SARS-CoV-2 are central to understanding COVID pathogenesis. Multiple mitochondrial changes, both structural and functional, have been found to have far-reaching consequences. These include 'hijacking' mitochondria, reprogramming metabolism, decreased OXPHOS, increased ROS production, elevated mitochondrial iron levels, loss of mitochondrial integrity, cell death, disturbed autophagy, reduced mitochondrial antiviral response (MAVS) and class 1 IFN response (see ⁴⁻⁶). 20 out of 27 viral proteins have been implicated in these processes and have been shown to interact with host mitochondria ^{7,8}.

SARS-CoV-2 main protease (Mpro) also known as 3-chymotrypsin-like protease (3CLpro) is a dimeric cysteine protease, responsible for cleavage of the viral polyproteins pp1a and pp1b, required for viral replication and transcription ⁹. The enzyme shows no homology to human proteases and thus is an interesting drug target. As viral proteases cleave host proteins to

hinder host immune responses and promote viral replication, numerous host cellular proteins have been predicted to be targeted by Mpro both by computational and experimental methods¹⁰. Among others, Mpro activity have been shown to influence host transcription and translation, apoptosis, DNA-damage response, lipid metabolism, vesicle trafficking, and innate immune response^{10,11}.

In our study we used newly developed yeast system¹² to explore the SARS-CoV-2 main protease (Mpro) expression effect on mitochondria. We show for the first time that the SARS-CoV-2 main protease (Mpro) causes severe mitochondrial function deterioration, growth arrest on non-fermentative carbon sources and significant respiratory rate inhibition.

Results

The role of different carbon sources in the optimization of the expression of the inducible EGFP gene under the control of the *GAL1* promoter in *S. cerevisiae*

A unique platform for gene expression studies in *S. cerevisiae* was developed using CRISPR/Cas9 technology¹³. A stable *EGFP* gene expression system was created by precise genome editing to integrate the *EGFP* reporter gene under the control of the *GAL1* promoter with simultaneous deletion of the *GAL1* gene, as shown in Figure 1. Under these conditions, galactose metabolism in yeast cells is blocked so that galactose in the culture medium acts solely as an inducer of expression.

The resulting system allows stable and precise induction of gene expression in the presence of galactose, providing a useful platform for further gene regulation studies in a yeast model. By integrating the *EGFP* reporter gene directly into the native *GAL1* locus, with all its regulatory elements, it ensures precise expression in a natural genomic context. Unlike plasmid-based systems, it allows the use of rich media, such as YP with carbon source, avoiding the limitations of synthetic media, which often result in slow growth and metabolic stress.

As yeast metabolism is notably modified by carbon sources available, the system was validated using the whole array of both fermentative and non-fermentative media. *EGFP* fluorescence was measured to assess *GAL1* promoter activity and expression efficiency (Figure 2A). Under control conditions (YPD medium without galactose), fluorescence levels were insignificant, confirming the lack of promoter induction in the presence of glucose as the sole carbon source. In contrast, an evident activation of the *GAL1* promoter and an increase in the fluorescence signal was observed in all tested media with added galactose.

As shown in Figure 2B, detailed analysis of the quantitative data allows comparison of the level of fluorescence of cells growing in media containing various carbon sources (i.e. sucrose, lactate, glycerol, ethanol or combination of glycerol and ethanol) and galactose. To eliminate

the effect of differences in culture growth rates with various media, data are normalized to optical density (OD₆₀₀).

The results of the measurements show that the highest level of fluorescence was obtained in YPG (glycerol, 10938 ± 1232) and YPS (sucrose, 10442 ± 763.7). In contrast, in the presence of glycerol and ethanol (YPEG medium), the fluorescence signal was moderate (7888 ± 2413), which may be due to the simultaneous effects of the two carbon sources on yeast metabolism. The lowest induction of the *GAL1* promoter among the galactose media tested was observed for YPL (lactate, 7267 ± 457.8).

Importantly, a clear activation of the *GAL1* promoter was observed even in the medium containing glucose (the strongest catabolic repressor), demonstrating the high flexibility of this expression system. Significant differences between YPD + Gal and YPS + Gal, YPG + Gal conditions were confirmed, highlighting the importance of careful carbon source selection in the design of efficient expression systems. In contrast, no significant differences were found between the YPS + Gal, YPG + Gal media, suggesting similar efficacy of these substrates in the induction of *GAL1* promoter controlled expression.

The developed *GAL1* promoter-based expression system shows great flexibility regarding the carbon source used, including the presence of glucose, a well-known catabolic repressor. The results clearly indicate that sucrose and glycerol may be good alternatives.

SARS-CoV-2 Mpro protease activity as *S. cerevisiae* yeast growth inhibitor under fermentative and respiratory conditions

Our expression system was used to assess the influence of SARS-CoV-2 Mpro on yeast in different conditions. Genes encoding the EGFP protein linked to the Mpro through two different linkers, SAVLQ and DDDDK (D4K), were introduced, as we previously described ¹². As shown in Figure 3, the two linkers differ in their effects on Mpro functionality and yeast cell growth. The SAVLQ linker is specifically recognized and cleaved by Mpro, resulting in autocatalytic

release of the protease with native structure and full activity. Active Mpro is toxic to yeast, resulting in impaired cell growth (Figure 3). In contrast, the D4K linker causes EGFP to remain attached to N-terminus of Mpro, which is believed to limit protease activity. As a result, the growth of yeast expressing EGFP-D4K-Mpro is comparable to that of control yeast expressing EGFP alone.

To evaluate the effect of Mpro expression under fermentative and respiratory conditions, different carbon sources were used. These included glucose (YPD) and sucrose (YPS)¹⁴, which promote rapid fermentation and limited mitochondrial activity, as well as, glycerol (YPG)^{15,16}, a mixture of glycerol and ethanol (YPEG), or lactate (YPL)¹⁷ that force cells to activate respiratory pathways. This approach enabled us to assess whether high mitochondrial activity correlates with cytotoxic effects of Mpro.

Figure 4A compares the growth of three strains, allowing a direct assessment of the effect of Mpro expression on yeast cell viability. No toxicity is observed on YPD media without galactose. This result was confirmed with cultures grown on YPD plates without galactose (Figure 4B). There are no significant differences between the strains (EGFP, EGFP-SAVLQ-Mpro and EGFP-D4K-Mpro) and thus the introduction of the construct alone does not have a negative effect on the cells.

Under strictly fermentative conditions (YPD+Gal, YPS+Gal), the growth of the EGFP-SAVLQ-Mpro strain was significantly reduced compared to both the EGFP control strain and the EGFP-D4K-Mpro variant. This difference was particularly pronounced after galactose induction in YPD and YPS, suggesting that active Mpro (formed by cleavage of the SAVLQ linker) negatively affects cell metabolism under conditions where fermentation predominates.

A more pronounced toxicity of the Mpro was observed under conditions requiring intensive cellular respiration (YPG, YPEG and YPL media). There, the growth values of the strain with EGFP-SAVLQ-Mpro often decreased by several orders of magnitude compared to the control, clearly indicating that Mpro most strongly interferes with the growth of cells that use

mitochondrial metabolism as their main energy source (Figure 4A). This relationship is perfectly illustrated in Figure 4B, where no colonies of the strain with SAVLQ are observed on plates supplemented with galactose, whereas strains expressing EGFP alone or EGFP-D4K-Mpro form numerous and well-formed colonies.

Interestingly, expression of the EGFP-D₄K-Mpro construct also significantly affects yeast growth under respiratory conditions, although not as severely as the SAVLQ variant. The data presented in Figure 4A suggest that EGFP-D₄K-Mpro partially retains the activity of Mpro, which can disrupt cellular processes, particularly those related to mitochondrial function. As a result, although the toxic effect is not as drastic as in the SAVLQ variant (where the protease is fully activated), a significant reduction in colony formation can still be observed under conditions where cells depend on aerobic respiration as its primary source of ATP, ultimately leading to reduced viability and growth of yeast cells.

The results described here indicate that the presence of SAVLQ in the construct, specifically recognized by Mpro, causes full protease activation and inhibition of yeast cell growth, especially when mitochondrial pathways play a dominant role in energy transduction.

Active Mpro causes mitochondrial dysfunction

To study the direct effects of active Mpro protease on mitochondria, a series of experiments were performed to analyze the intensity of cellular respiration, the morphology of the mitochondria and mitochondrial membrane potential. The results are shown in Figures 5 and 6, comparing two yeast strains: one with less active Mpro protease (EGFP-D4K-Mpro) and the other with fully active enzyme (EGFP-SAVLQ-Mpro), grown on YPG medium.

The rate of cellular oxygen consumption (Figure 5A) and the level of generated reactive oxygen species, specifically the superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) (Figure 5B) were accessed. The EGFP-D4K-Mpro strain (red line) had a significantly higher respiration rate, which translated into a stronger and faster decrease in oxygen concentration than the EGFP-SAVLQ-Mpro strain (black line).

Quantitative analysis (right panel in Figure 5A) showed a significant difference in respiration rate in the EGFP-D4K-Mpro strain (approximately 40 nmol O₂ / min / 1 OD₆₀₀) compared to the Mpro protease-active EGFP-SAVLQ-Mpro strain (approximately 20 nmol O₂ / min / 1 OD₆₀₀), demonstrating that the presence of the active form of Mpro limits aerobic metabolism in yeast cells.

In parallel, O₂^{•-} production was monitored using the MitoSOX probe to track ROS in mitochondria. The left panel of Figure 5B (superoxide / OD₆₀₀) shows the amount of superoxide generated per the same number of cells. A higher level of O₂^{•-} (about 6 × 10⁴ fluorescence units) was observed in the EGFP-D4K-Mpro strain than in the EGFP-SAVLQ-Mpro strain (about 4.5 × 10⁴), with a statistically significant difference. However, when superoxide anion production was normalized to respiration rate (right panel of Figure 5B), the difference was not statistically significant. This suggests that the lower O₂^{•-} production in the EGFP-SAVLQ-Mpro strain is primarily due to the reduced respiration rate and not necessarily to the altered efficiency of ROS generation.

Confocal microscopy was subsequently used to access mitochondrial morphology, mitochondrial membrane potential (TMRM dye) and distribution of fusion proteins (EGFP signal) in studied strains (Figure 6). In the EGFP-D4K-Mpro strain (top panels), the EGFP signal is evenly distributed throughout the cells and the TMRM staining is intense and homogeneous, indicating preserved mitochondrial potential and no apparent abnormalities in mitochondrial morphology. In the EGFP-SAVLQ-Mpro strain (lower panels), the EGFP signal is sometimes weaker or absent in some cells, while the intensity of the TMRM staining decreases locally. Green arrows in the TMRM panel indicate mitochondrial fragments with abnormal structure. In the merged images (right panels), white arrows indicate cells in which EGFP is undetectable while mitochondria appear normal. In conclusion: in cells with no active expression of Mpro, the mitochondria remain functional. In contrast, the abnormalities observed in the population as a whole are clearly associated with cells in which active protease is visible.

Both the analysis of respiratory parameters (Figure 5) and confocal images (Figure 6) indicate that the highly active Mpro protease in yeast can lead to a decrease in respiratory activity and induce malfunction in mitochondria, manifested by a reduced membrane potential and changes in the morphology of these organelles. On the contrary, in a variant with an inactive form of Mpro (D4K), oxygen metabolism and mitochondrial structure are preserved, suggesting that the Mpro protease - in a situation where it can self-cleave and fully activate - becomes a factor that induces mitochondrial dysfunction. These results provide evidence for the toxic effects of Mpro in yeast cells and further confirm that mitochondria are a sensitive target for the active enzyme.

Discussion

Our results indicate that Mpro SARS-CoV-2 is toxic to yeast cells, especially under conditions that require intense mitochondrial activity. We first investigated whether different carbon sources affect the expression levels of genes controlled by the *GAL1* promoter in the yeast system. For this purpose, we constructed a yeast strain expressing free EGFP, which allowed us to verify whether the observed differences were due to the effect of the medium on the activity of the *GAL1* promoter. These results allowed us to conclude that certain carbon sources both fermentable, such as sucrose, and a non-fermentable source, such as glycerol, are equivalent and provide comparable expression levels for studies using an inducible expression system based on the *GAL1* promoter.

A major advantage of our system is the ability to use rich media, instead of synthetic media, which are often required for plasmid-based systems to maintain selective pressure. Synthetic media, although well defined, present various challenges, including slower growth rates and metabolic stress, that can confound results. For example, as highlighted in other studies, yeast growth on glycerol, synthetic media often leads to long lag phases and requires supplementation with peptone, amino acids, or redox-stabilizing agents like acetoin to improve growth rates and metabolic balance ^{18,19}. Media composition thus significantly influences yeast metabolism and can complicate experimental reproducibility.

The literature indicates that glucose induces repression of the *GAL1* promoter ²⁰, which was an important reference point in the study. We observed that the EGFP signal was observed even in YPD medium containing galactose, although its intensity was relatively low. This suggests that with the consumption of glucose from the medium, the catabolic repression is reversed ²¹, and the galactose present in the media (not metabolized as yeasts lack *GAL1* gene, Δgal) acts as expression inducer. Other carbon sources, such as fermentable sucrose or glycerol, which requires aerobic metabolism, did not interfere with *GAL1* promoter activation, indicating their potential for further study.

A key determinant of the toxicity of the Mpro protease was the specific recognition and processing of the SAVLQ linker, leading to the release of the native protease structure. The first N-terminal amino acid, Ser1, stabilizes the active site of the enzyme, which is essential for efficient catalysis ²². Modifications in this region, such as the addition of GPLGS residues, resulted in a significant decrease in enzymatic activity, whereas changes at the C-terminus were less important for protease function. Although the study focused on Mpro SARS-CoV, the structure of Mpro SARS-CoV-2 shows considerable similarity to its counterpart in SARS-CoV, with preservation of the key catalytic cysteine-histidine diad ²³. Despite minor sequence differences, the mechanism of action of both proteases remains similar ²⁴. This is consistent with the findings of Flynn et al. (2022) ²⁵, who demonstrated that the restoration of the native N-terminus in a yeast expression system was crucial for the enzymatic activity and associated cellular toxicity of Mpro.

The high expression level and catalytic activity of Mpro, resulting from the reconstitution of its native structure, is most likely the main reason for the observed toxicity of the protease in yeast. It has been shown that the toxicity of the Mpro protease to yeast cells is caused by its ability to non-specifically cleave endogenous host proteins ^{26,27}. According to a study by Alalam and colleagues (2021) ²⁷, Mpro protease recognizes the sequence [A/S/T]LQ[A/S/G], indicating the presence of 136 potential cleavage sites in the yeast proteome. Using these data, we identified 23 proteins essential for mitochondrial function that contain potential cleavage sites for Mpro (Table S1).

Similar studies have been performed on human proteins. Predictions indicate that the Mpro protease may interfere with protein trafficking to mitochondria. For example, tRNA methyltransferase 1 (TRMT1) is expected to be cleaved by Mpro, resulting in removal of the zinc finger and the nuclear localization signal, leading to exclusive mitochondrial localization of TRMT1 ⁷. A subtiligase and N-terminomics approach was used experimentally to identify human substrates of SARS-CoV-2 proteases (Mpro and PLpro) ²⁸. Analysis of cell lysates with purified SARS-CoV-2 proteases revealed that, among various proteins, mitochondrial proteins

were also identified as potential substrates of Mpro and PLpro. These include key proteins associated with mitochondrial ribosomes and enzymes involved in energy metabolism.

The study by Cao et al. (2022)²⁹ provided a complementary perspective by using a mammalian cell-based system to study the toxicity and enzymatic activity of Mpro. This approach provided a more physiologically representative environment for studying the effects of Mpro on human cellular processes. The native N-terminal structure of Mpro, specifically Ser1, was shown to be critical for its catalytic activity and associated cellular toxicity. In addition, it was shown that N-terminal modifications, e.g. the addition of methionine, led to a significant reduction in toxicity, highlighting the importance of maintaining the native structure. Interestingly, the study shows that Mpro expression in host cells correlates with apoptosis. The study does not clearly indicate that mitochondria mediate the apoptosis induced by Mpro. Therefore, further research is needed to determine if mitochondria are directly involved in apoptosis induced by Mpro, as apoptosis is often associated with mitochondrial pathways in general cellular contexts. Previous studies provide evidence that SARS-CoV-2 virus affects mitochondrial function in host cells, which may have important implications for the progression of COVID-19. By inhibiting OXPHOS⁴, SARS-CoV-2 redirects cellular metabolism from mitochondrial respiration to glycolysis and the pentose phosphate pathway, providing substrates necessary for viral replication. The expression of nuclear genes related to mitochondrial function is severely modified during SARS-CoV-2 infection³⁰. SARS-CoV-2 modification of mitochondrial function may also play a key role in the development of symptoms associated with long COVID³¹. Persistent structural damage and dysregulation of mitochondrial bioenergetics and thus compromised energy production could underlie the symptoms, including chronic fatigue, muscle weakness, and cognitive disturbances³¹. Moreover, electron microscopic studies have shown abnormalities in the structure of mitochondria in patients with long COVID, suggesting a role for mitochondria in the pathogenesis of this syndrome³². Although viral proteins were previously implicated in modifying the host mitochondrial function⁴, our results indicate that the additional role of active Mpro should be considered.

Conclusions

In this work, we have used a yeast model system to study the effects of SARS-CoV-2 Mpro protease activity, focusing on its effects under both fermentative and respiratory conditions. Our data show that Mpro severely impairs yeast growth in media that force cells to rely on mitochondrial respiration. Under these conditions, yeast expressing active Mpro exhibit reduced oxygen consumption, decreased mitochondrial membrane potential, and obvious abnormalities in mitochondrial morphology. In contrast, strains expressing a proteolytically inactive Mpro variant remain largely unaffected and retain normal mitochondrial function.

These findings suggest that Mpro targets or disrupts yeast mitochondrial pathways, likely by cleaving host proteins critical for respiratory metabolism. The observed toxicity correlates with reconstitution of the native structure of Mpro, highlighting the importance of the N-terminal region of the protease for its enzymatic function. Our results thus suggest that SARS-CoV-2 Mpro exerts a significant negative impact on yeast mitochondrial function, consistent with emerging evidence that viral proteases can subvert host energy metabolism.

Given that many aspects of mitochondrial physiology and proteostasis are highly conserved among eukaryotes, our yeast system serves as a powerful model to study the toxic effects of Mpro at the molecular level. Future research using this platform may deepen our understanding of how Mpro compromises mitochondrial integrity and function, thereby providing important insights into the pathophysiological mechanisms underlying COVID-19.

Methods

Plasmids

The plasmids pML104-GAL1 and pBSK(+)-Mpro(D4K) were described previously ¹². A codon-optimized gene encoding EGFP, flanked by sequences downstream (249 nt) and upstream (253 nt) of *GAL1* (pBSK(+)-EGFP plasmid), was constructed using the In-Fusion Snap Assembly (Takara) method. This procedure involved site-directed mutagenesis with the primers Del_D4KMpro_F (5'-TGTACAAATAAGTATACTTCTTTTTTTTACTTT-3') and Del_D4KMpro_R (5'-ATACTTATTTGTACAATTCATCCATACCATG-3'), using the pBSK(+)-Mpro(D4K) plasmid as a template.

Strains

All strains used in the study are described in Table 1. The EGFP strain was generated using CRISPR/Cas9 technology with the pML104-GAL1 plasmid. The repair DNA was produced by PCR using primers GAL1A (5'-ACGAATCAAATTAACAACCATAGGA-3') and GAL1D (5'-ATGTCAAGAATAGGTATCCAAAACG-3'). The yeast transformation procedure was conducted as described in the Yeastmaker™ Yeast Transformation System 2 (Takara) user manual for a small-scale transformation. Transformed cells were grown on SD-ura medium at 28°C. For each application of CRISPR/Cas9, the pML104 vector was removed from yeast cells by culturing them in SDC + 5-FOA medium.

Media and cell culture

Yeast were cultured in various media with different carbon sources to observe growth during fermentation or mitochondrial respiration. The compositions and purposes of these media are detailed in Table 2. All media were supplemented with 1% D-galactose when necessary. For

yeast genetic engineering, SD-ura or SDC + 5-FOA media were used. Solid media were prepared by adding 2% agar.

Yeast growth assay

All yeast strains were grown in liquid YPD medium. Cultures were adjusted to an $OD_{600} = 1$. Serial dilutions of the cell suspensions were prepared to achieve 10-fold, 100-fold, and 1000-fold dilutions. Each dilution was then transferred onto solid media plates using the drop plate method. Colony Forming Unit Density (CFUD) was used to assess the growth of yeast cells under various experimental conditions, following the methodology described in the study by Gałgańska et al. (2010)³³. The plates were incubated at 28°C for 3 days, after which they were scanned. The images were converted to grayscale and all colonies from the 100-fold dilution were analyzed densitometrically (the total pixel density) using ImageJ software.

Quantitative fluorescence analysis

Yeast expressing EGFP were grown on various solid media. Cells were harvested from the plates using an inoculation loop and resuspended in water. The suspensions were then adjusted to an $OD_{600} = 10$. For fluorescence intensity analysis, 100 μ L of each cell suspension was transferred to a 96-well flat-bottom plate. EGFP (ex. 485 nm, em. 532 nm) fluorescence was measured using The Spark® multimode microplate reader (TECAN) at room temperature.

Cellular respiration measurements

Yeast cells were grown in YPG medium to an $OD_{600} = 1$. To induce gene expression under the *GAL1* promoter, galactose was added to a final concentration of 1%, and the culture was incubated for 4 hours. The cells were washed twice with double distilled water (ddH₂O) and resuspended in 100 μ L of YPG medium. The cell density was re-measured at OD_{600} . Oxygen

uptake rates were then measured for the same amount of cells using a Clark electrode (Hansatech Instruments) in 1 mL of YPG medium ³⁴.

Staining with TMRM

The method was adapted from the published protocol ³⁵, replacing 5% glucose with 5% sucrose in the buffer. The cell culture was centrifuged and the pellet was washed with a buffer containing 10 mM HEPES (pH 7.0) and 5% sucrose. After removing the supernatant, the pellet was resuspended in the same buffer containing 50 nM TMRM (ThermoFisher Scientific, #T668). Cells were stained in the dark for 15 minutes. The pellet was then washed twice with the same buffer and resuspended in 1 mL of the solution. Finally, 5 μ L of the cell suspension was mixed with 25 μ L of buffer and dispensed into glass-bottom wells for imaging (Greiner Bio-One, CellView).

Microscopy

Confocal microscope Leica Stellaris 8 with white laser and HyD S detectors was used to obtain GFP and TMRM fluorescence images in yeast cells. Leica PL APO 63x/1.20 W CORR CS2 objective was used. Imaging settings were applied that allowed to visualize GFP and TMRM according to a strain characteristic. Images were done in 512x512 resolution as z-stacks, then converted to Maximum Projection images.

Tables

Table 1. List of *Saccharomyces cerevisiae* strains used in this work.

Strain	Genotype	Description	Source
EGFP	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 pdr5Δ0::KanMX6 gal1Δ0::yEGFP</i>	The expression of EGFP	This work
EGFP-D4K-Mpro	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 pdr5Δ0::KanMX6 gal1Δ0::yEGFP_(DDDDK)yMpro</i>	Contains a linker sequence (D4K) between EGFP and Mpro that is not recognized by Mpro, causing the fusion protein to remain intact and resulting in Mpro lacking proteolytic activity. This strain does not exhibit any toxic effects, as shown by unrestricted yeast growth.	¹²
EGFP-SAVLQ-Mpro	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 pdr5Δ0::KanMX6 gal1Δ0::yEGFP_(SAVLQ)yMpro</i>	Contains a specific sequence (SAVLQ) between EGFP and Mpro, which is recognized and autocatalytically cleaved by Mpro. This leads to the release of Mpro in its native form, facilitating its proteolytic activity and resulting in a toxic effect, as evidenced by restricted yeast growth.	¹²

Table 2. Composition and purpose of media used for yeast cultures.

Medium	Composition	Condition/ Purpose
YPD	1% yeast extract, 2% peptone, 2% D-glucose	Fermentation
YPS	1% yeast extract, 2% peptone, 2% sucrose	Fermentation
YPG	1% yeast extract, 2% peptone, 3% glycerol, pH 5.5	Respiration
YPEG	1% yeast extract, 2% peptone, 3% glycerol, 3% ethanol, pH 5.5	Respiration
YPL	1% yeast extract, 2% peptone, 2% lactic acid, pH 5.5	Respiration
SD-ura	0.67% yeast nitrogen base without amino acids, yeast synthetic drop-out medium supplement without uracil, 2% D-glucose	Genetic Engineering
SDC + 5-FOA	0.67% yeast nitrogen base without amino acids, yeast complete synthetic drop-out medium supplement, 1 mg/ml 5-fluoroorotic acid, 2% D-glucose	Genetic Engineering

Figures

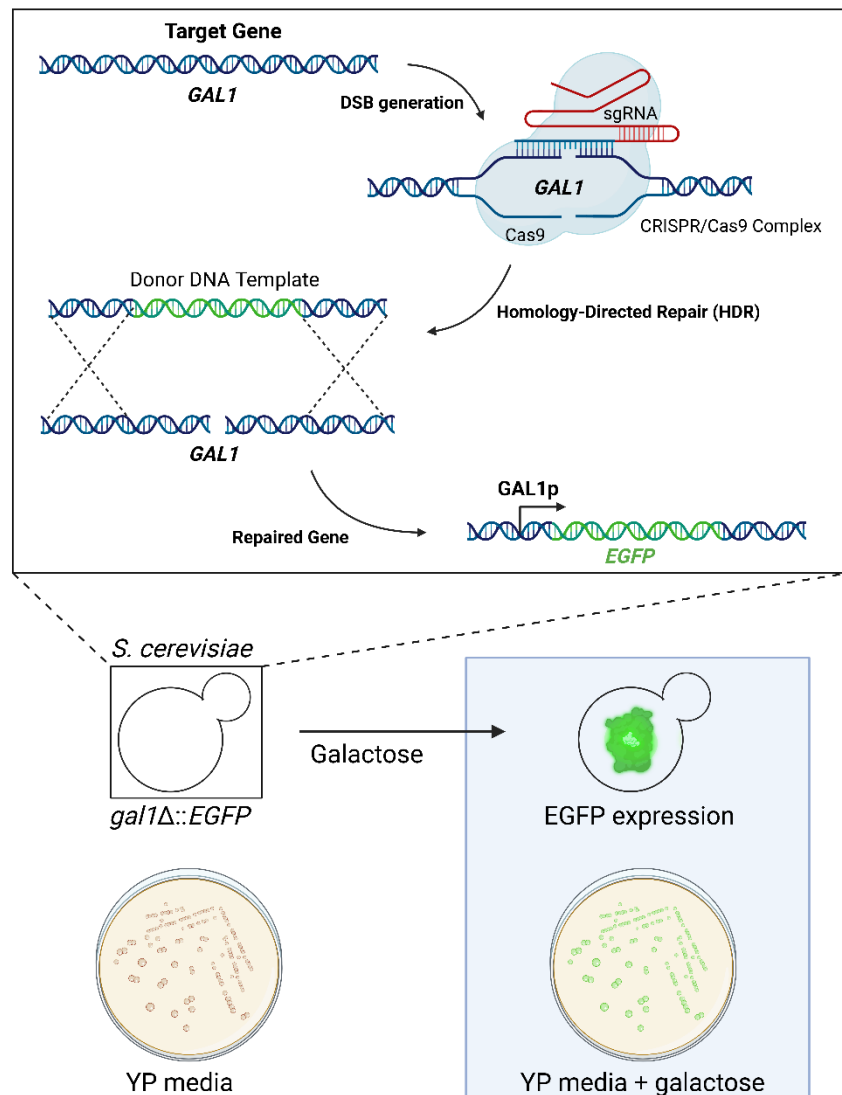


Figure 1. CRISPR/Cas9-mediated knock-in and inducible gene expression using the GAL1 promoter.

The *GAL1* gene editing technique uses the CRISPR/Cas9 system, and a process known as gene repair using the homologous recombination (HDR) mechanism. The initial step involves the identification of the *GAL1* target gene to be modified. The CRISPR/Cas9 complex, which is composed of a Cas9 nuclease and single guide RNA (sgRNA), has the ability to recognize and precisely locate the target site in the DNA, resulting in the formation of a double-strand break (DSB). In the presence of a DNA donor template, which contains homologous sequences and additional elements such as EGFP, the damaged site is repaired via an HDR mechanism. As a result, the *EGFP* gene is introduced (a knock-in mechanism). This gene is under the control of the inducible *GAL1* promoter. Concurrently, the *GAL1* gene is deleted, enabling comprehensive regulation of the expressed gene through the optimized induction conditions.

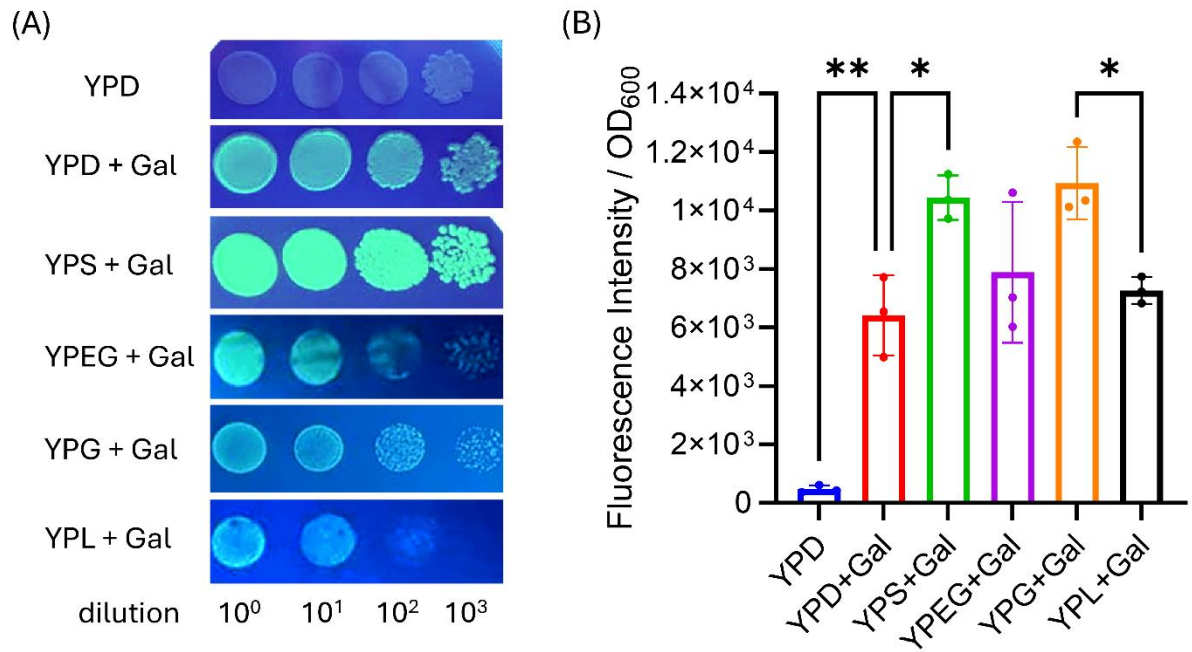


Figure 2. Activity of the *GAL1* promoter depending on the carbon source used in the medium and the presence of an inducing factor.

Effect of carbon source on EGFP expression under *GAL1* promoter. (A) Representative plates from a drop assay exposed to UV light using a transilluminator. (B) Analysis of green fluorescence of cells of the EGFP strain grown on different types of media. Statistical analysis was performed using two-way ANOVA. Tukey's multiple comparisons test was used to compare the means, with significant differences between conditions indicated as follows: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

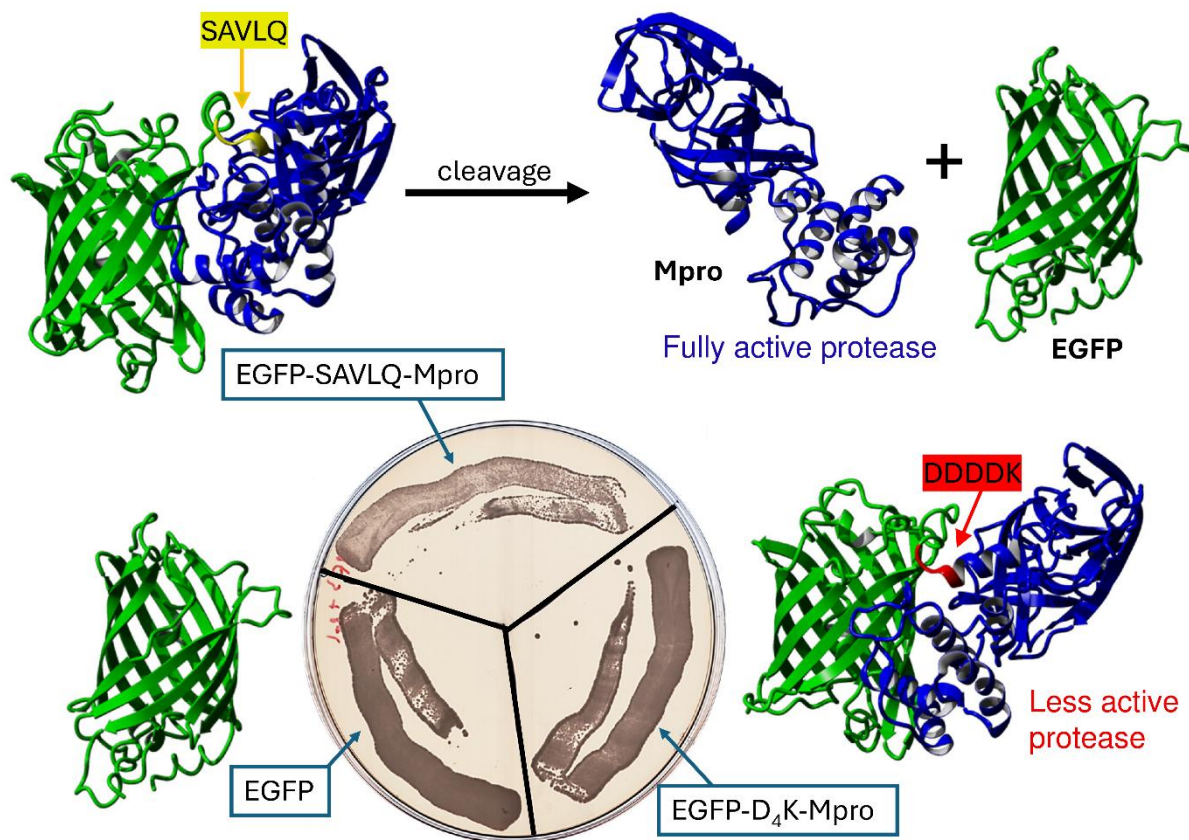


Figure 3. EGFP fusion protein structures with Mpro and their impact on yeast growth.

The EGFP-SAVLQ-Mpro construct contains a specific sequence between EGFP and Mpro (yellow arrow) that is recognized and autocatalytically cleaved by Mpro, leading to the release of Mpro in its native form, which facilitates its proteolytic activity and results in a toxic effect, evidenced by the restricted growth of yeast (YPS medium). Conversely, the EGFP-D4K-Mpro construct has a linker sequence (red arrow) of the same length between EGFP and Mpro that is not recognized by Mpro, causing the fusion protein to remain intact and resulting in Mpro lacking proteolytic activity. The expression of EGFP alone, as well as EGFP-D4K-Mpro, unlike EGFP-SAVLQ-Mpro, does not exhibit any toxic effects, as evidenced by the unrestricted growth of yeast. All 3D structures of the fusion proteins were modeled using ColabFold ³⁶.

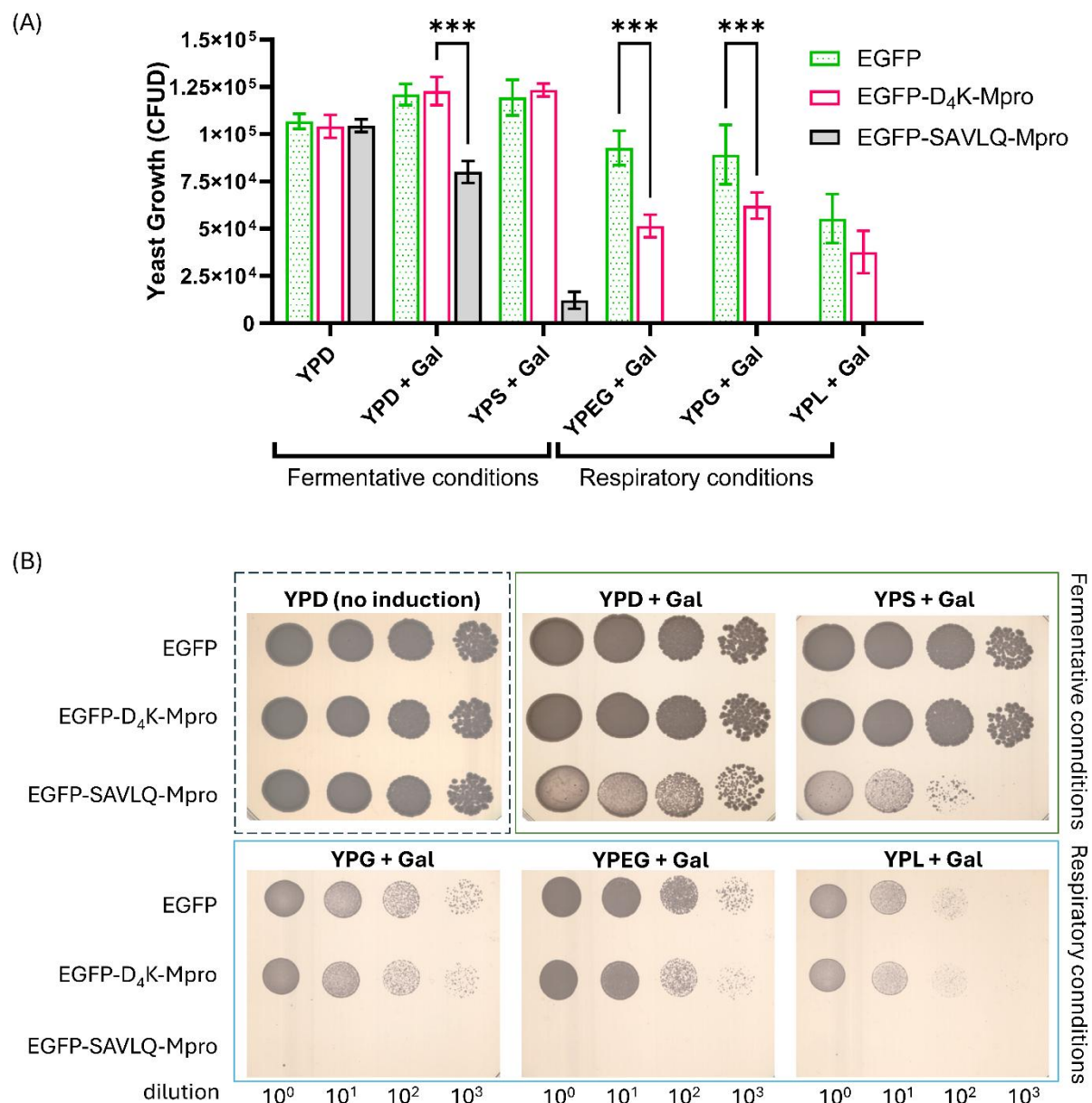


Figure 4. Growth assays of yeast strains under various conditions.

(A) Differences in yeast growth depending on the carbon source, reflecting the yeast metabolism (fermentation or mitochondrial respiration). (B) Drop assay demonstrating the growth of the studied yeast strains in the absence of induction and Mpro gene expression, as controlled by the *GAL1* promoter and under Mpro gene expression conditions (in the presence of galactose) on media containing different fermentable and non-fermentable carbon sources. Statistical analysis was performed using two-way ANOVA. Tukey's multiple comparisons test was used to compare the means within each condition. Significant differences between constructs are indicated as *** $P < 0.001$.

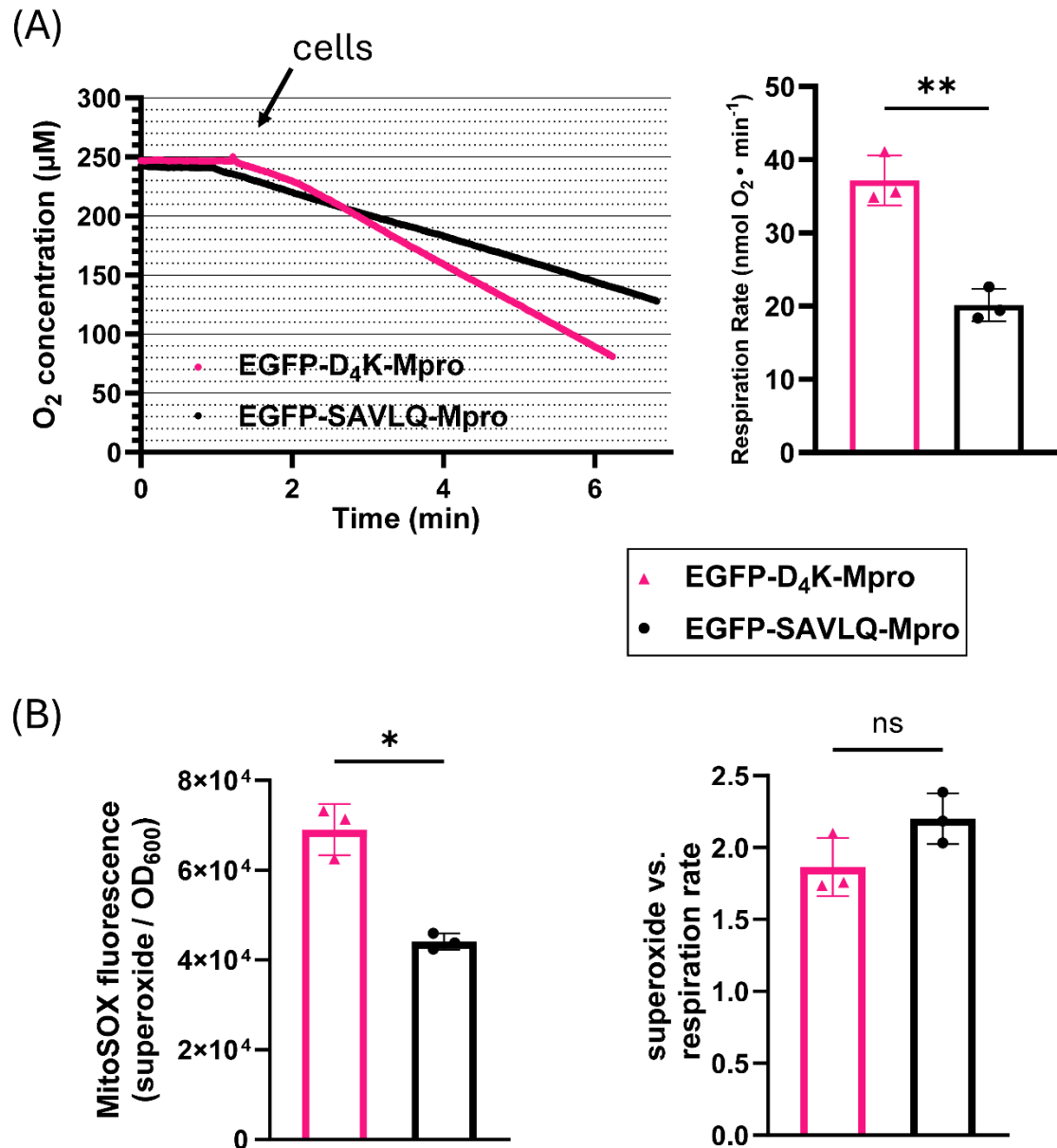


Figure 5. Effect of Mpro on cellular respiration and superoxide production.

(A) Graph showing the oxygen consumption lines of the studied yeast strains expressing active (EGFP-SALQ-) and inactive (EGFP-D4K-) Mpro and the effect of Mpro activity on respiration rate. (B) Superoxide anion production per the same number of cells (superoxide/OD₆₀₀) and normalizes the level of superoxide production relative to consumed oxygen (superoxide vs. respiration rate). Statistical significance was assessed using an unpaired t-test, with significance levels indicated as follows: *P < 0.05, **P < 0.01. Comparisons that were not statistically significant are indicated as ns (P > 0.05).

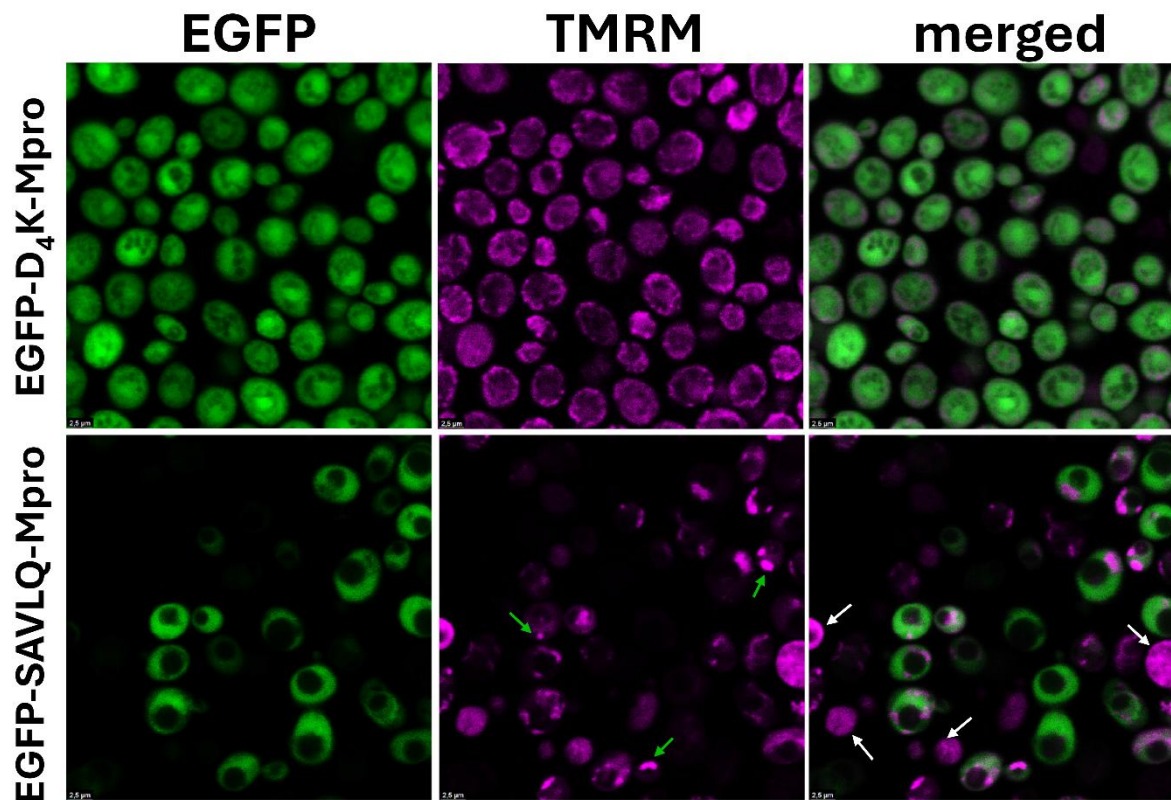


Figure 6. Analysis of mitochondrial membrane potential and EGFP expression.

Confocal microscopy images displaying EGFP protein and TMRM staining in EGFP-D4K-Mpro and EGFP-SAVLQ-Mpro strains. Green arrows indicate areas with abnormalities in mitochondrial morphology. White arrows highlight mitochondria in cells where fusion protein expression was not visible.

References

1. Gaikani, H. K., Stolar, M., Kriti, D., Nislow, C. & Giaever, G. From beer to breadboards: yeast as a force for biological innovation. *Genome Biol* **25**, 10 (2024).
2. Vanderwaeren, L., Dok, R., Voordeckers, K., Nuyts, S. & Verstrepen, K. J. *Saccharomyces cerevisiae* as a Model System for Eukaryotic Cell Biology, from Cell Cycle Control to DNA Damage Response. *Int J Mol Sci* **23**, 11665 (2022).
3. Mager, W. H. & Winderickx, J. Yeast as a model for medical and medicinal research. *Trends Pharmacol Sci* **26**, 265–273 (2005).
4. Guarnieri, J. W. *et al.* SARS-CoV-2 mitochondrial metabolic and epigenomic reprogramming in COVID-19. *Pharmacol Res* **204**, 107170 (2024).
5. Prasun, P. COVID-19: A Mitochondrial Perspective. *DNA Cell Biol* **40**, 713–719 (2021).
6. Singh, K. K., Chaubey, G., Chen, J. Y. & Suravajhala, P. Decoding SARS-CoV-2 hijacking of host mitochondria in COVID-19 pathogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* **319**, C258–C267 (2020).
7. Gordon, D. E. *et al.* A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature* **583**, 459–468 (2020).
8. Stukalov, A. *et al.* Multilevel proteomics reveals host perturbations by SARS-CoV-2 and SARS-CoV. *Nature* **594**, 246–252 (2021).
9. Ullrich, S. & Nitsche, C. The SARS-CoV-2 main protease as drug target. *Bioorg Med Chem Lett* **30**, 127377 (2020).
10. Melano, I., Lo, Y.-C. & Su, W.-C. Characterization of host substrates of SARS-CoV-2 main protease. *Front Microbiol* **14**, 1251705 (2023).
11. Scott, B. M., Lacasse, V., Blom, D. G., Tonner, P. D. & Blom, N. S. Predicted coronavirus Nsp5 protease cleavage sites in the human proteome. *BMC Genomic Data* **23**, (2022).
12. Grabiński, W. *et al.* Meisoindigo: An Effective Inhibitor of SARS-CoV-2 Main Protease Revealed by Yeast System. *bioRxiv* 2023.09.03.555867 (2023)
doi:10.1101/2023.09.03.555867.

13. Laughery, M. F. & Wyrick, J. J. Simple CRISPR-Cas9 Genome Editing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Protoc Mol Biol* **129**, e110 (2019).
14. Randez-Gil, F., Sanz, P., Entian, K. D. & Prieto, J. A. Carbon source-dependent phosphorylation of hexokinase PII and its role in the glucose-signaling response in yeast. *Mol Cell Biol* **18**, 2940–2948 (1998).
15. Gancedo, C., Gancedo, J. M. & Sols, A. Glycerol metabolism in yeasts. Pathways of utilization and production. *Eur J Biochem* **5**, 165–172 (1968).
16. Klein, M., Swinnen, S., Thevelein, J. M. & Nevoigt, E. Glycerol metabolism and transport in yeast and fungi: established knowledge and ambiguities. *Environmental Microbiology* **19**, 878–893 (2017).
17. Dejean, L., Beauvoit, B., Guérin, B. & Rigoulet, M. Growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* on a non-fermentable substrate: control of energetic yield by the amount of mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **1457**, 45–56 (2000).
18. Swinnen, S. *et al.* Re-evaluation of glycerol utilization in *Saccharomyces cerevisiae*: characterization of an isolate that grows on glycerol without supporting supplements. *Biotechnol Biofuels* **6**, 157 (2013).
19. Merico, A., Ragni, E., Galafassi, S., Popolo, L. & Compagno, C. Generation of an evolved *Saccharomyces cerevisiae* strain with a high freeze tolerance and an improved ability to grow on glycerol. *J Ind Microbiol Biotechnol* **38**, 1037–1044 (2011).
20. Lamphier, M. S. & Ptashne, M. Multiple mechanisms mediate glucose repression of the yeast GAL1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5922–5926 (1992).
21. Escalante-Chong, R. *et al.* Galactose metabolic genes in yeast respond to a ratio of galactose and glucose. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 1636–1641 (2015).
22. Xue, X. *et al.* Production of authentic SARS-CoV M(pro) with enhanced activity: application as a novel tag-cleavage endopeptidase for protein overproduction. *J Mol Biol* **366**, 965–975 (2007).

23. Parmar, M. *et al.* Structural differences in 3C-like protease (Mpro) from SARS-CoV and SARS-CoV-2: molecular insights revealed by Molecular Dynamics Simulations. *Struct Chem* 1–18 (2022) doi:10.1007/s11224-022-02089-6.
24. Yaghi, R. M., Andrews, C. L., Wylie, D. C. & Iverson, B. L. High-Resolution Substrate Specificity Profiling of SARS-CoV-2 Mpro; Comparison to SARS-CoV Mpro. *ACS Chem Biol* **19**, 1474–1483 (2024).
25. Flynn, J. M. *et al.* Comprehensive fitness landscape of SARS-CoV-2 Mpro reveals insights into viral resistance mechanisms. *Elife* **11**, e77433 (2022).
26. Ou, J. *et al.* A yeast-based system to study SARS-CoV-2 Mpro structure and to identify nirmatrelvir resistant mutations. *PLOS Pathogens* **19**, e1011592 (2023).
27. Alalam, H. *et al.* A Genetic Trap in Yeast for Inhibitors of SARS-CoV-2 Main Protease. *mSystems* **6**, e0108721 (2021).
28. Luo, S. Y. *et al.* Identification of Human Host Substrates of the SARS-CoV-2 Mpro and PLpro Using Subtiligase N-Terminomics. *ACS Infect Dis* **9**, 749–761 (2023).
29. Cao, W. *et al.* Evaluation of SARS-CoV-2 Main Protease Inhibitors Using a Novel Cell-Based Assay. *ACS Cent Sci* **8**, 192–204 (2022).
30. Guarnieri, J. W. *et al.* Core mitochondrial genes are down-regulated during SARS-CoV-2 infection of rodent and human hosts. *Sci Transl Med* **15**, eabq1533 (2023).
31. Molnar, T. *et al.* Mitochondrial dysfunction in long COVID: mechanisms, consequences, and potential therapeutic approaches. *GeroScience* **46**, 5267–5286 (2024).
32. Szögi, T. *et al.* Novel biomarkers of mitochondrial dysfunction in Long COVID patients. *Geroscience* (2024) doi:10.1007/s11357-024-01398-4.
33. Gałgańska, H. *et al.* Viability of *Saccharomyces cerevisiae* cells following exposure to H₂O₂ and protective effect of minocycline depend on the presence of VDAC. *Eur J Pharmacol* **643**, 42–47 (2010).
34. Karachitos, A. *et al.* Human VDAC isoforms differ in their capability to interact with minocycline and to contribute to its cytoprotective activity. *Mitochondrion* **28**, 38–48 (2016).

35. Hughes, A. L., Hughes, C. E., Henderson, K. A., Yazvenko, N. & Gottschling, D. E.
Selective sorting and destruction of mitochondrial membrane proteins in aged yeast.
eLife **5**, e13943 (2016).
36. Mirdita, M. *et al.* ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nat Methods* **19**,
679–682 (2022).

27.01.2025, Poznań

Wojciech Grabiński

wojgra@amu.edu.pl

Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii

Zakład Bioenergetyki

Wydział Biologii UAM

ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6

61-614 Poznań

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w manuskrypcie: **Grabiński, W.**, Kicińska, A., Funtowicz, K., Skrzypczak, T., Karachitos, A. (2025). „SARS-CoV-2 main protease causes mitochondrial dysfunction in a yeast model”, polegał na tworzeniu koncepcji i założeń badań, tworzeniu szczepu do modelu drożdżowego, przeprowadzeniu testów przeżywalności, pomiarów oksygraficznych, pomiarów poziomu anionorodnika nadadtlenkowego, wybarwianiu mitochondriów do wizualizacji, analizie otrzymanych wyników i rewizji manuskryptu.

Wojciech Grabiński

Wojciech Grabiński

Karachitos

Promotor: dr hab. Andonis Karachitos

Poznań 27.01.2025 r.

dr Anna Kicińska

anias@amu.edu.pl

Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii

Zakład Bioenergetyki

Wydział Biologii UAM

ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6

61-614 Poznań

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w manuskrypcie: **Grabiński, W.**, Kicińska, A., Funtowicz, K., Skrzypczak, T., Karachitos, A. (2025). „SARS-CoV-2 main protease causes mitochondrial dysfunction in a yeast model”, polegał na tworzeniu koncepcji badawczej, przygotowaniu i rewizji manuskryptu.



Podpis

Poznań, 23.01.2025

Karolina Funtowicz

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

karfun@st.amu.edu.pl

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w manuskrypcie: **Grabiński, W.**, Kicińska, A., Funtowicz, K., Skrzypczak, T., Karachitos, A. (2025). „SARS-CoV-2 main protease causes mitochondrial dysfunction in a yeast model”, polegał na przeprowadzeniu: badań określających poziom ekspresji genu *GAL1* w zależności od różnych źródeł węgla, oraz wykonaniu testów wzrostowych i pomiarów zużycia tlenu przez komórki drożdży.

Karolina Funtowicz

Podpis

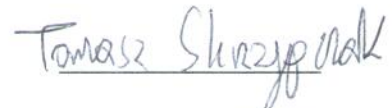
Poznań, 23/01/2025

Tomasz Skrzypczak

Centrum Zaawansowanych Technologii UAM; tskrzyp@amu.edu.pl

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w manuskrypcie: **Grabiński, W.**, Kicińska, A., Funtowicz, K., Skrzypczak, T., Karachitos, A. (2025). „SARS-CoV-2 main protease causes mitochondrial dysfunction in a yeast model”, polegał na opracowaniu metody i wykonaniu analizy zmian w morfologii i sprzężenia energetycznego mitochondriów. Analiza została wykonana przy pomocy obrazowania z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego.



Podpis



dr hab. Andonis Karachitos

Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Zakład Bioenergetyki
Wydział Biologii UAM
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań

Poznań, 27.01.2025 r.

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w publikacji: **Grabiński, W.**, Kicińska, A., Funtowicz, K., Skrzypczak, T., Karachitos, A. (2025). „SARS-CoV-2 main protease causes mitochondrial dysfunction in a yeast model”, mój udział polegał na tworzeniu koncepcji i założeń badań, organizacji badań, mentoringu i prowadzenia zespołu badawczego, tworzeniu elementów wizualnych do publikacji wyników, współtworzeniu pierwszej wersji manuskryptu i dopracowaniu wersji końcowej manuskryptu.

Z poważaniem,

Andonis Karachitos

Publikacja 3

Grabiński, W., Karachitos, A., & Kicińska, A. (2024). Backstage Heroes—Yeast in COVID-19 Research. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(23), 12661.

<https://doi.org/10.3390/ijms252312661>

27.01.2025, Poznań

Wojciech Grabiński

wojgra@amu.edu.pl

Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii

Zakład Bioenergetyki

Wydział Biologii UAM

ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6

61-614 Poznań

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w publikacji Grabiński, W., Karachitos, A., Kicińska, A. (2024). „Backstage heroes - yeast in COVID-19 research”. International Journal of Molecular Sciences, 25(23), 12661. <https://doi.org/10.3390/ijms252312661> polegał na przeszukiwaniu literatury naukowej, przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu, rewizji i edycji treści manuskryptu.



Wojciech Grabiński



Promotor: dr hab. Andonis Karachitos



dr hab. Andonis Karachitos

Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Zakład Bioenergetyki
Wydział Biologii UAM
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań

Poznań, 27.01.2025 r.

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w publikacji **Grabiński, W., Karachitos, A., Kicińska, A. (2024).** „Backstage heroes - yeast in COVID-19 research”. International Journal of Molecular Sciences, 25(23), 12661. <https://doi.org/10.3390/ijms252312661>, mój udział polegał na tworzeniu koncepcji pracy, tworzeniu elementów wizualnych do publikacji wyników i rewizji manuskryptu.

Z poważaniem,

Andonis Karachitos

Poznań 27.01.2025r.

dr Anna Kicińska

anias@amu.edu.pl

Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii

Zakład Bioenergetyki

Wydział Biologii UAM

ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6

61-614 Poznań

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w publikacji Grabiński, W., Karachitos, A., Kicińska, A. (2024). „Backstage heroes - yeast in COVID-19 research”. International Journal of Molecular Sciences, 25(23), 12661. <https://doi.org/10.3390/ijms252312661> polegał na tworzeniu koncepcji pracy, przygotowaniu i rewizji manuskryptu.



Podpis