

Streszczenie pracy doktorskiej – mgr Małgorzata Kwaśniak

Dialog pomiędzy mitochondriami i jądrem w odpowiedzi na zmieniające się warunki rozwojowe oraz środowiskowe, jak również w odpowiedzi na stres zachodzący wewnątrz mitochondriów jest kluczowy dla biogenezy kompleksów mitochondrialnych. U roślin wszystkie mitochondrialne kompleksy fosforylacji oksydacyjnej (OXPHOS), z wyjątkiem kompleksu II, oraz rybosomy mitochondrialne (mitorybosomy) składają się z podjednostek kodowanych zarówno w genomie mitochondrialnym, jak i jądrowym. Dotychczasowe badania nie pozwalały na jednoznaczne stwierdzenie, na jakim poziomie dochodzi do koordynacji ekspresji genomu mitochondrialnego i jądrowego w czasie biogenezy tych kompleksów u roślin. Pewna liczba doniesień sugerowała, że taka koordynacja zachodzi na etapie transkrypcyjnym, podczas gdy globalne analizy przeprowadzone u *Arabidopsis* wskazywały, że główną rolę w tej koordynacji odgrywa kontrola na etapie potranslacyjnym. Przedstawione w niniejszej pracy wyniki potwierdzają, że u roślin koordynacja ekspresji genomu mitochondrialnego i jądrowego w czasie biogenezy kompleksów OXPHOS i mitorybosomów zachodzi na etapie potranslacyjnym oraz sugerują, że translacja mitochondrialnych transkryptów może być modulowana poprzez zmiany w populacji mitochondrialnych rybosomów.

W celu określenia poziomu/mechanizmu koordynującego ekspresję genomu mitochondrialnego i jądrowego wykorzystano mutanty *Arabidopsis thaliana* z wyciszoną ekspresją genu *RPS10*, kodującego białko S10, będące składnikiem małej podjednostki mitorybosomów. Przeprowadzone badania pokazały, że u mutantów *rps10* dochodzi do zaburzenia biogenezy mitorybosomów. Nieoczekiwanie wykazano, że pomimo znacznie obniżonego poziomu transkryptu genu *RPS10* poziom białka S10 był porównywalny w mutantach *rps10* z jego poziomem w roślinach typu dzikiego. Rezultat ten sugerował, że obniżony poziom transkryptu *RPS10* indukuje mechanizm zwrotny w celu wyrównania poziomu białka S10 i prowadzi do zwiększonej biogenezy mitorybosomów. Niemniej jednak pomimo zintensyfikowanej biogenezy obu podjednostek mitorybosomalnych zaobserwowano ich niezbalansowaną akumulację, przejawiającą się nadmiarem dużych do małych podjednostek mitorybosomalnych w mutantach *rps10*. Przypuszcza się, że bezpośrednią przyczyną nadmiaru dużych podjednostek była degradacja niestabilnych, nie w pełni złożonych małych podjednostek mitorybosomalnych na skutek niewystarczającej ilości białka S10.

Kompensacja defektu w biogenezie mitorybosomów, która doprowadzała do ich zintensyfikowanej biogenezy, obejmowała zmiany na różnych etapach ekspresji genomu mitochondrialnego. W mutantach *rps10* wykazano amplifikację całego genomu mitochondrialnego, jak również podwyższony poziom transkryptów genów mitochondrialnych wchodzących w skład kompleksów OXPHOS i mitorybosomów. Nie wykazano natomiast istotnych zmian w poziomie transkryptów genów jądrowych kodujących podjednostki tych kompleksów. Badania wydajności translacji mitochondrialnej poprzez analizę frakcji polisomalnej w mutantach *rps10* pokazały, że w przypadku mitochondrialnych transkryptów OXPHOS zarówno procent transkryptów związanych z rybosomami, jak również liczba rybosomów przypadających na te transkrypty była znacząco zredukowana. Zupełnie odwrotny efekt zaobserwowano w przypadku mitochondrialnych transkryptów rybosomalnych, których wydajność translacyjna była wyraźnie zwiększona. Z kolei analizy wydajności translacji transkryptów OXPHOS i mitorybosomalnych kodowanych jądrowo nie wykazały znaczących zmian w mutantach *rps10*. Zaburzenie w mitochondrialnej translacji prowadzące do intensywniejszej syntezy białek mitorybosomalnych i zredukowanej translacji białek OXPHOS zostało również potwierdzone za pomocą metody *in organello*. Ponadto, badania na poziomie białka pokazały, że w mutantach *rps10* zredukowanie poziomu podjednostek kompleksów OXPHOS: I, III oraz IV, kodowanych zarówno mitochondrialnie jak i jądrowo, było podobne. Z kolei w przypadku kompleksu V zaobserwowano wyraźną dysproporcję w ilości podjednostek kodowanych mitochondrialnie i jądrowo, aczkolwiek analiza stechiometrii tych podjednostek w obrębie tego kompleksu była zachowana. Wyniki te sugerują, że koordynacja składników kompleksów mitochondrialnych występuje na etapie składania kompleksów, przy czym nadmiar niezasocjowanych w kompleksy podjednostek jest najprawdopodobniej degradowany przez mitochondrialne proteazy zależne od ATP, których poziom ekspresji w mutantach *rps10* był wyraźnie podwyższony.

Najbardziej innowacyjnym odkryciem tej pracy jest wykazanie, że na skutek zaburzonej biogenezy zmienione mitorybosomy *rps10* syntetyzują białka mitochondrialnie z różną wydajnością. Wynik ten sugeruje, że translacja w roślinnych mitochondriach może być regulowana przez zróżnicowanie w populacji mitorybosomów. Jest to pierwszy udokumentowany przypadek pokazujący, że mitorybosomy roślinne mogą kontrolować ekspresję genów poprzez selektywną translację określonych grup transkryptów. Rezultaty przedstawione w poniższej pracy nie tylko wskazują na nadrzędność regulacji translacyjnej w ekspresji genów mitochondrialnych u roślin, ale również potwierdzają, że koordynacja

ekspresji genomu mitochondrialnego i jądrowego zachodzi na etapie potranslacyjnym, najprawdopodobniej na etapie składania kompleksów.

Abstract

Crosstalk between mitochondrial and nuclear genomes in response to changing developmental and environmental conditions and also in response to stress occurring within the mitochondria is crucial for biogenesis of mitochondrial complexes. In plants, all mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) complexes, except complex II, as well as mitochondrial ribosomes (mitoribosomes) comprise of subunits encoded by both the mitochondrial and the nuclear genomes. So far, studies have failed to exactly define the level of coordination between expression of mitochondrial and nuclear genomes in plants. Some reports indicate that this coordination occurs at the transcriptional level, whereas the global analysis of *Arabidopsis* showed that posttranslational regulation plays a major role in this coordination. The results presented in this work confirm that during biogenesis of OXPHOS and mitoribosomal complexes in plants the coordination of expression between mitochondrial and nuclear genomes occurs at the posttranslational level. Moreover, it suggests that translation of mitochondrial transcripts can be differentially affected by alterations in mitochondrial ribosomes.

In order to determine the level/mechanism coordinating the expression of nuclear and mitochondrial genomes, the *Arabidopsis thaliana* mutants with silenced expression of *RPS10* gene encoding S10 protein, a component of the small subunit of mitoribosomes, were used. Studies showed perturbations in biogenesis of mitoribosomes in *rps10* mutants. Unexpectedly, although *RPS10* transcript abundance was reduced, S10 protein levels were similar in wild type and *rps10* mutants. These results suggest that the decreased *RPS10* transcript abundance induced a feedback mechanism to maintain S10 protein levels and led to increased production of both mitoribosomal subunits. However, the upregulation in biogenesis of large and small subunits of mitoribosomes was imbalanced due to the S10-deficient small subunits being unstable and therefore prone to degradation, resulting in an excess of large subunits.

The compensation of defect in biogenesis of mitoribosomes which led to their intensified biogenesis results in alterations at different level of mitochondrial genome expression. Analysis showed amplification of the whole mitochondrial genome in *rps10* cells, which was then reflected in an elevated level of transcripts of the mitochondrial OXPHOS

and ribosomal genes. The level of nuclear-encoded transcripts of mitoribosomes and OXPHOS complexes seemed to be less affected. Examination of mitochondrial translation activity by analysis of polysomal fractions in the *RPS10*-silenced lines showed that OXPHOS components generally had fewer ribosomes per mitochondrial transcripts as well as a lower proportion of these transcripts bound to ribosomes. By contrast, most mitoribosome components were more translationally active. Nuclear-encoded subunits of both OXPHOS and mitoribosomes were generally unchanged. *In organello* protein synthesis provides independent evidence for aberrant mitochondrial translation which led to overaccumulation of mitoribosomal proteins and reduction of OXPHOS proteins in *rps10*. Moreover, at the steady state protein level the reduction of both mitochondrially- and nuclear-encoded components of OXPHOS complexes I, III and IV was similar. In turn, despite the observed disproportion of mitochondrially- and nuclear-encoded subunits of complex V, the stoichiometry of the complex V subunits was virtually identical in *rps10* mutants to that in wild-type mitochondria. These data suggest that coordination of expression of the nuclear and mitochondrial genomes occurs at the complex assembly level and the excess of non-assembled complex subunits is likely to be degraded by the mitochondrial ATP-dependent proteases, which were upregulated in the *rps10* mutants.

The most innovative finding of these studies is to demonstrate that in consequence of the perturbation in biogenesis the altered mitoribosomes have differential effects on translation of individual mitochondrial proteins. This result suggests that translation in plant mitochondria can be regulated by heterogeneity in mitoribosome population. This is the first documented case showing that plant mitoribosomes may control gene expression by selective translation of a specific group of transcripts. Altogether, this work provides important evidence not only for the predominance of translational regulation in plant mitochondrial gene expression but also confirms that coordination of nuclear and mitochondrial genomes is achieved at the posttranslational level, probably at the level of protein complex assembly.

