

TYTUŁ PRACY DOKTORSKIEJ:

" WPŁYW ZMIAN W MITOCHONDRIALNEJ TRANSLACJI NA GLOBALNY
TRANSKRYPTOM, ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM ZMIAN W EKSPRESJI
GENOMU CHLOROPLASTOWEGO ORAZ KOMUNIKACJI POMIĘDZY
CHLOROPLASTAMI I JĄDREM"

STRESZCZENIE

Komunikacja pomiędzy jądrem, mitochondriami i chloroplastami ma kluczowe znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania komórek roślinnych. W niniejszej pracy podjęto badania mające na celu zrozumienie komunikacji pomiędzy tymi organellami w obliczu zaburzeń w translacji mitochondrialnej.

Materiał badawczy w niniejszej pracy stanowiły mutanty *Arabidopsis thaliana* z wyciszoną ekspresją genu *RPS10*, kodującego białko S10, będące składnikiem małej podjednostki rybosomów mitochondrialnych. Cechą charakterystyczną mutantów *rps10* jest występowanie zmienionej, heterogennej populacji mityribosomów. Wykazano, że takie zaburzenie w biogenezie mityribosomów prowadzi do zmian w mitochondrialnej translacji, przejawiających się zwiększoną syntezą białek mityribosomalnych i zmniejszoną translacją białek kompleksów fosforylacji oksydacyjnej (OXPHOS).

Analiza danych z mikromacierzy (ATH1, firmy Affymetrix) mutantów *rps10* pokazała, że wyciszenie ekspresji genu *RPS10* powoduje globalne zmiany w poziomie transkryptów genów jądrowych. Wyselekcjonowano 2314 i 4955 genów różnicujących odpowiednio dla fenotypu P2 i P3 mutantów *rps10* w porównaniu do roślin typu dzikiego, z których aż 1488 genów było wspólnie zmienionych u obydwu fenotypów. Analiza tej wspólnej grupy genów przy użyciu programu MapMan z zastosowaniem korekcji statystycznej Benjamina-Hochberga ujawniła istotne zmiany w 7 grupach funkcyjnych: "mitochondrialny łańcuch transportu elektronów/synteza ATP", "stres biotyczny", "stres biotyczny/białka PR", "ściana komórkowa", "regulacja transkrypcji - czynniki transkrypcyjne typu bHLH", "metabolizm lipidów", jak również "przesyłanie sygnałów - receptory kinazowe".

Szczegółowa analiza funkcji produktów genów związanych z odpowiedzią na stres biotyczny, które były aktywowane w mutantach *rps10*, bez rzeczywistego ataku patogenu, sugerowała, że indukcja odpowiedzi na stres biotyczny jest związana z akumulacją kwasu salicylowego (SA). Sugestia ta została potwierdzona eksperymentalnie. U mutantów *rps10* stwierdzono podwyższony poziom SA za pomocą chromatografii cieczowej połączonej ze

spektrometrią mas. Najprawdopodobniej podwyższony poziom SA odgrywa również ważną rolę w zaobserwowanej zwiększonej odporności roślin *rps10* na stres suszy oraz zwiększonej wrażliwości na stres ciągłej ciemności, indukujący starzenie. Sugeruje się, że zwiększony poziom SA u mutantów *rps10* mógł być także powiązany z zaburzeniami w biogenezie aparatów szparkowych, prowadząc do zwiększonej liczby zamkniętych aparatów szparkowych. To z kolei mogło mieć znaczenie nie tylko dla mechanizmu obronnego, chroniącego przed wniknięciem potencjalnych patogenów, ale również przyczyniało się do zmniejszenia transpiracji, a tym samym do generowania zapasów wody w komórce, co z kolei dłużej utrzymywało roślinę przy życiu. Postuluje się, że zaburzenia w mitochondriach spowodowane wyciszeniem genu *RPS10* prowadziły do wzrostu poziomu SA, a w konsekwencji do aktywacji ekspresji genów stresu biotycznego. Najprawdopodobniej w przekazywaniu tego sygnału były zaangażowane reaktywne formy tlenu.

Porównawcza analiza transkryptomu mutantów *rps10* z 26 transkryptomami różnych mutantów mitochondrialnych wykazała największe podobieństwo globalnych zmian z mutantem, który ma zaburzoną zarówno cytochromową, jak i alternatywną drogę oddychania w mitochondriach (*aox1a:rpoTmp*). Wyselekcjonowano 709 genów wspólnych, których ekspresja była zmieniona zarówno w mutantach *rps10*, jak i *aox1a:rpoTmp*, z czego aż 97% wykazało identyczny kierunek zmian w ekspresji. Dalsze badania wykazały, że u mutantów *rps10*, podobnie jak u *aox1a:rpoTmp* zarówno cytochromowa, jak i alternatywna droga mitochondrialnego oddychania były obniżone. Zmniejszona aktywność drogi cytochromowej u mutantów *rps10* wynikała ze zmniejszonej ilości kompleksów OXPHOS, na skutek zmian w translacji mitochondrialnej. Z kolei badanie przyczyn spadku aktywności drogi alternatywnej u mutantów *rps10* wskazuje, że nie jest on związany ze zmniejszonym poziomem transkryptu i białka alternatywnej oksydazy (AOX). Przeciwnie, zaobserwowano zwiększoną ekspresję AOX na obu tych poziomach, co najprawdopodobniej wynika z efektów kompensacyjnych uruchamianych w odpowiedzi na stres panujący w komórce. Udokumentowano również, że obniżona aktywność alternatywnej oksydazy w mutantach *rps10* nie wynika z jej formy utlenienia. Zaobserwowano bowiem nadmiar formy aktywnej (zredukowanej) u tych roślin. Wykazano, że nadmiar formy aktywnej AOX u mutantów *rps10* nie był skorelowany również z ilością jej aktywatora w mitochondriach - pirogronianem. Na podstawie przeprowadzonych badań sugeruje się, że jedną z przyczyn redukcji aktywności AOX w mutantach *rps10* jest zaburzenie w imporcie pirogronianu do mitochondriów. Powyższe wyniki wskazują na translacyjny mechanizm regulacji aktywności drogi cytochromowej i potranslacyjny mechanizm regulacji aktywności alternatywnej drogi oddychania w mutantach *rps10*.

Analiza danych transkryptomowych wykazała, że oprócz mitochondriów (3,7%), najwięcej produktów wspólnych genów u mutantów *rps10* i *aox1a:rpoTmp* kierowanych było do

chloroplastów (3,48%). Wśród nich największą grupę funkcyjną stanowiły geny, których białka są zaangażowane w regulację transkrypcji. Badania przeprowadzone na poziomie transkryptów wykazały zmiany w chloroplastowym aparacie transkrypcyjnym (polimerazie NEP, polimerazie PEP, białkach pTAC, czynnikach sigma). Biorąc pod uwagę te wyniki, wysunięto hipotezę, że "spadek aktywności obu dróg: cytochromowej i alternatywnej w mitochondriach doprowadza do obniżenia aktywności transkrypcji chloroplastowej". Potwierdzeniem tej hipotezy okazały się wyniki badań przeprowadzone w warunkach "in vitro", wskazujące, że jednoczesne zahamowanie aktywności kompleksu IV mitochondrialnego łańcucha oddechowego i alternatywnej oksydazy w roślinach typu dzikiego doprowadza do efektu obserwowanego w mutantach *rps10* i *aox1a:rpoTmp*, czyli do obniżenia poziomu transkryptów genów chloroplastowych. W związku z tym postuluje się, że równoległe zmniejszenie aktywności kompleksu IV i AOX jest sygnałem do obniżenia efektywności transkrypcji chloroplastowej u *Arabidopsis thaliana*. Wykazano również, że zmiany w aktywności transkrypcyjnej prowadzą do obniżenia poziomu mRNA genów chloroplastowych kodowanych w chloroplastach, zarówno zależnych od chloroplastowo-kodowanej polimerazy PEP, jak i jądrowo-kodowanej polimerazy NEP. Wykazano, że zaobserwowane spadki w poziomie mRNA nie wynikają ze zmian w liczbie kopii genów chloroplastowych u mutantów *rps10*. W konsekwencji wykazano, że obniżony poziom mRNA genów chloroplastowych miał wpływ na zmniejszenie syntezy i poziomu białek chloroplastowych u tych roślin. Wykazano również, że zmiany w transkrypcji chloroplastowej inicjują odpowiedź wsteczną z chloroplastów do jądra, wpływając na poziom transkryptów genów fotosyntetycznych kodowanych jądrowo.

