

Elwira Smakowska

STRESZCZENIE

ANALIZA FUNKCJONALNA MITOCHONDRIALNEJ PROTEAZY AtFtsH4 ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM BADAŃ PROTEOMICZNYCH

Upłynęło już ponad 125 lat, od kiedy szwajcarski anatom i fizjolog Rudolph Albert von Kölliker odkrył mitochondria w mięśniach skrzydeł owadów. Od tego czasu liczni naukowcy zmagają się z poznaniem dokładnej budowy oraz funkcji tych szczególnych elementów komórki eukariotycznej. Prawidłowe funkcjonowanie mitochondriów wymaga zmian w kompozycji proteomu mitochondrialnego w odpowiedzi na zmieniające się warunki rozwojowe i środowiskowe. Kontrola jakościowa i ilościowa białek mitochondrialnych sprawowana jest przede wszystkim dzięki selektywnej, zależnej od ATP proteolizie, przeprowadzanej między innymi przez proteazy AAA (*ang. ATPases associated with various cellular activities*), zwane również białkami typu FtsH. Enzymy te wykazują dwie aktywności – proteolityczną oraz aktywność białka opiekuńczego.

W niniejszej rozprawie doktorskiej dokonano szerokiej analizy funkcjonalnej mitochondrialnej, zależnej od ATP proteazy z *Arabidopsis*, zwanej AtFtsH4. Proteaza ta tworzy kompleksy zakotwiczone w wewnętrznej błonie mitochondrialnej z domenami katalitycznymi skierowanymi do przestrzeni międzybłonowej. Nasze badania pokazały, że brak proteazy AtFtsH4 wywołuje podobne aberracje morfologiczne i rozwojowe w roślinach *Arabidopsis* rosnących w warunkach fotoperiodu dnia krótkiego i optymalnej temperaturze (SD, 22°C), jak również w fotoperiodzie dnia długiego, jednakże w umiarkowanie podwyższonej temperaturze (LD, 30°C). Warunki te nazwano warunkami indukującymi fenotyp. Intensywność i dynamika zmian morfologiczno-rozwojowych w mutantach korelowała ze zmianami w profilu ekspresji proteazy AtFtsH4 w roślinach typu dzikiego, zarówno na poziomie transkryptu, jak i białka. Wprowadzenie pełnej kopii cDNA proteazy AtFtsH4 do mutantu odwracało wspomniane zmiany fenotypowe. Badanie aktywności promotora genu kodującego AtFtsH4 pokazały, że jest on

najbardziej aktywny w młodych organach wegetatywnych oraz generatywnych oraz iż jego aktywacja następuje pod wpływem długotrwałego stresu podwyższonej temperatury. Należy podkreślić, że krótki stres podwyższonej temperatury, który indukuje ekspresję typowych białek szoku cieplnego, nie doprowadza do wzrostu ekspresji AtFtsH4 na poziomie białka.

Wcześniejsze badania oparte na określeniu poziomu RFT oraz poziomu białek oksydacyjnie modyfikowanych wskazywały na obecność stresu oksydacyjnego w komórkach mutantu *ftsh4*. W pracy tej stosując odpowiednie markery stresu oksydacyjnego (poziom transkryptów *AOX1a*, *UPOX*; poziom niskocząsteczkowych antyoksydantów) udowodniono, że stres ten zwiększa się wraz z rozwojem *ftsh4* osiągając największą wartość w fazie generatywnej.

Pełniejszy obraz zmian na poziomie molekularnym, jakie zachodzą w mitochondriach roślin *ftsh4* rosnących w warunkach indukujących powstanie fenotypu, otrzymano w wyniku badań porównawczych typu „omika”. Analizie poddano mitochondrialne proteomy oraz oksyproteomy mutantów *ftsh4* w odniesieniu do roślin typu dzikiego. W badaniach tych wykorzystano dwukierunkową fluorescencyjną elektroforezę różnicową (2D-DIGE) oraz elektroforezę dwukierunkową połączoną z analizą Western Blot z wykorzystaniem przeciwciał rozpoznających białka karbonylowane. Analizy te pokazały, że pozbawienie roślin proteazy AtFtsH4 wpływa na najważniejsze procesy metaboliczne zachodzące w mitochondriach. Wykazano obniżenie zarówno ilości jak i aktywności dwóch kompleksów OXPHOS – kompleksu I oraz V. Ponadto kilka białek będących podjednostkami tych kompleksów zidentyfikowano, jako bardziej karbonylowane w mutancie *ftsh4* w odniesieniu do WT. Badania te sugerują również zmiany w kompleksie II systemu OXPHOS. Podjednostkę dehydrogenazy bursztynianowej (SDH1-1) będącą składową kompleksu II, zidentyfikowano w większej ilości i o nieznacznie większym poziomie utlenienia aniżeli dla WT. Zatem brak AtFtsH4 zaburza funkcjonowanie kompleksu I, II i V. Również funkcjonalność cyklu TCA oraz mitochondrialnej fotorespiracji wykazała znaczne zaburzenia powstałe w wyniku zmian w poziomie białek tych szlaków oraz ich intensywnej karbonylacji. W konsekwencji zaburzenia w prawidłowym funkcjonowaniu OXPHOS i cyklu TCA spowodowały uruchomienie alternatywnych dróg transportu elektronów oraz alternatywnych szlaków metabolizmu aminokwasów przenoszących elektrony na łańcuch transportu elektronów. Powyżej wymienionym zmianom towarzyszyła akumulacja szeregu białek opiekuńczych oraz związanych z odpowiedzią na stres.

Z badań wynika, że nie ma jednego źródła obserwowanego stresu oksydacyjnego w roślinach *Arabidopsis* pozbawionych proteazy AtFtsH4 na etapie rozwoju, w którym przeprowadzono badania. Otrzymane wyniki wskazują, że jednym z nich jest łańcuch transportu elektronów. Drugim obniżona efektywność systemu antyoksydacyjnego. Okazało się bowiem, że manganowa dysmutaza ponadtlenkowa (MSD1), będącą kluczowym enzymem biorącym udział w usuwaniu reaktywnych form tlenu (RFT) jest intensywnie karbonylowana w mutancie *ftsh4*, co najprawdopodobniej doprowadza do jej dezaktywacji. Ponadto, nasze badania sugerują również zmiany w przepuszczalności błony mitochondrialnej dla RFT.

Oprócz charakterystyki rodzaju i skali zmian, jakie zachodzą w roślinach pozbawionych proteazy AtFtsH4, nie mniej ważnym celem pracy była identyfikacja substratu/substratów dla tego białka. W toku badań wyselekcjonowano kilka białek, wśród nich AtFtsH10 oraz PHB, jako potencjalne substraty dla AtFtsH4. Weryfikacja za pomocą koimmunoprecypitacji, testów stabilności oraz poziomu tych białek w roślinach ekspresjonujących zmutowane wersje AtFtsH4, czyli AtFtsH4 posiadającą aktywną jedynie domenę proteolityczną (*ftsh4*-FtsH4^P) bądź AtFtsH4 z aktywną jedynie domeną białka opiekuńczego (*ftsh4*-FtsH4^{CH}) wskazują, że AtFtsH10 jest substratem proteolitycznym proteazy AtFtsH4.

Podsumowując, w rozprawie tej z użyciem szerokiego warsztatu technik genetycznych i proteomicznych, pokazano, że brak proteazy AtFtsH4 doprowadza do powstania rozległego i narastającego stresu oksydacyjnego, którego skutkiem jest zaburzenie funkcjonowania większości szlaków metabolicznych w mitochondriach. Narastający stres oksydacyjny spowodowany jest defektami zarówno szlaków produkujących RFT jak i drogi ich usuwania, jednakże dokładny mechanizm uruchamiający ten stres nie jest całkowicie zrozumiały. Ponadto badania opisane w tej rozprawie wskazują, że proteaza AtFtsH10 jest proteolitycznym substratem proteazy AtFtsH4. Wynik ten jest szczególnie ciekawy w kontekście wzajemnych zależności pomiędzy mitochondrialnymi zależnymi od ATP proteazami oraz z uwagi na fakt, że jest to pierwszy zidentyfikowany substrat dla roślinnej proteazy ATP zależnej.