

Renata Skibior-Błaszczyk

POSZUKIWANIE PROTEAZ ISTOTNYCH DLA FUNKCJONALNOŚCI I MORFOLOGII ROŚLINNYCH MITOCHONDRIÓW

Streszczenie

Funkcjonowanie mitochondriów zależy od składu i jakości proteomu mitochondrialnego, a ten z kolei jest kontrolowany przez wewnętrzny system proteolityczny. Mitoproteazy tworzące ten system dzielimy na proteazy wykazujące aktywność zależną i niezależną od ATP. Nasza wiedza dotycząca roślinnych, niezależnych od ATP proteaz jest szczególnie uboga.

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań mających na celu identyfikację niezależnych od ATP proteaz istotnych dla funkcjonalności mitochondriów, a w konsekwencji dla wzrostu i rozwoju roślin. Na podstawie homologów u drożdży zidentyfikowano i scharakteryzowano 6 nieznanych dotychczas niezależnych od ATP proteaz: homologa drożdżowej proteazy Oct1 (AtOCT1), Oma1 (AtOMA1), Icp55 (AtICP55), Atp23 (AtATP23), Imp2 (AtIMP2) oraz Imp1 (AtIMP1a). Wykazano, że wszystkie badane proteazy zlokalizowane są w mitochondriach Arabidopsis. Za pomocą techniki frakcjonowania mitochondriów pokazano, że zgodnie z lokalizacją odpowiedników drożdżowych, AtATP23 znajduje się we frakcji rozpuszczalnej, a AtOMA1 i AtIMP1a we frakcji błonowej. Natomiast AtOCT1, w przeciwieństwie do homologa drożdżowego, zlokalizowany jest we frakcji błonowej. Spośród badanych proteaz tylko dwie (AtOMA1, AtICP55) były zdolne do zastąpienia odpowiedników drożdżowych w odpowiednich testach funkcjonalnej komplementacji. Z wyjątkiem AtOMA1, brak pozostałych odkrytych roślinnych, niezależnych od ATP proteaz nie wpływał na wzrost i rozwój roślin w warunkach optymalnych, a na poziomie molekularnym na działanie kompleksów fosforylacji oksydacyjnej (OXPHOS). Brak proteazy AtOMA1 powodował znaczne obniżenie aktywności kompleksu V w warunkach optymalnych dla wzrostu roślin. Podwyższenie temperatury w czasie wzrostu hodowli roślin skutkowało dalszym obniżeniem aktywności kompleksu V, przy niewielkim spadku ilości tego kompleksu w linii pozbawionej proteazy AtOMA1. Dodatkowo, w tych warunkach mutanty *oma1-1* wykazywały zmiany funkcjonalności pozostałych badanych kompleksów OXPHOS. Wyniki sugerują, że proteaza AtOMA1 przede

wszystkim reguluje aktywność kompleksu V. Sposób tej regulacji może przypuszczalnie zachodzić na drodze kontroli proteolitycznej AtOMA1 w stosunku do specyficznego dla roślin czynnika biorącego udział w funkcjonalności kompleksu V.

W niniejszej pracy prowadzono również badania nad wpływem dwóch proteaz, niezależnej od ATP AtATP23 i zależnej od ATP FTSH4, na metabolizmie fosfolipidów u *Arabidopsis*. Proteazy te zostały wybrane do badań na podstawie przesłanek literaturowych dotyczących homologicznych białek kontrolujących metabolizm fosfolipidów u drożdży i ssaków. Jednakże, wyniki pokazały, że tylko FTSH4 wpływa na zmiany profilu lipidowego u *Arabidopsis*. Wykorzystując nowoczesną technologię Shotgun lipidomics szczegółowo zbadano zmiany w profilu lipidowym w mitochondriach u roślin pozbawionych proteazy FTSH4 w stosunku do mitochondriów roślin typu dzikiego. Jednym z ważniejszych uzyskanych wyników był spadek ilości kardiolipiny (CL) oraz wzrost fosfatydyloglicerolu (PG) i diacyloglicerolu (DAG) w mitochondriach mutantów. Jednocześnie, za pomocą mikroskopii konfokalnej wykazano, że brak proteazy FTSH4 doprowadza do powstania heterogennej populacji mitochondriów, zawierającej obok charakterystycznych dla roślin małych, punktowych mitochondriów, mitochondria olbrzymie. Ze względu na występującą korelację pomiędzy obniżoną ilością kardiolipiny a powstaniem olbrzymich mitochondriów sugerujemy udział proteazy FTSH4 w regulacji metabolizmu fosfolipidów, a w konsekwencji morfologii i dynamiki mitochondriów u *Arabidopsis*.