

Mitochondria to złożone i dynamiczne organella odpowiedzialne za wiele krytycznych procesów komórkowych. Organizmy wykształciły specyficzne mechanizmy, znane jako mitochondrialny system kontroli jakości (mtQC), które zapewniają prawidłowe funkcjonowanie organelli, a tym samym homeostazę komórkową. Jednym z mechanizmów kontroli jakości odpowiedzialnym za usuwanie uszkodzonych lub starzejących się mitochondriów jest proces mitofagii, będący formą selektywnej autofagii. W procesie tym błony autofagosomalne otaczają uszkodzone obszary mitochondriów lub całe organella i dostarczają „ładunek” do lizosomów (u zwierząt) lub wakuoli (u drożdży i roślin) w celu degradacji. Pomimo ewolucyjnego zachowania komponentów mitofagii pomiędzy królestwami zwierząt, roślin i grzybów, mechanizmy molekularne mitofagii u roślin są nadal w dużej mierze nieznane.

W obrębie organelli, proteazy mitochondrialne są jednym z centralnych składników mtQC. Nasze badania wykazały, że u roślin *Arabidopsis thaliana* brak proteazy FTSH4 wewnętrznej błony mitochondrialnej prowadzi do powstania zmienionych morfologicznie mitochondriów, tzw. mitochondriów olbrzymich. Podobne obserwacje poczyniono u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* pozbawionych proteazy Yme1, która jest homologiem roślinnej FTSH4. Obecność olbrzymich mitochondriów w mutancie *yme1* oraz odkrycie udziału Yme1 w mitofagii u drożdży skłoniło nas do wysunięcia postulatu, że u roślin *A. thaliana* pozbawionych proteazy FTSH4 usuwanie olbrzymich mitochondriów jest zaburzone lub zahamowane. Rozpoznawanie mitochondriów przez maszynę autofagii może odbywać się poprzez interakcję jednego z białek zewnętrznej lub wewnętrznej błony mitochondrialnej z białkiem ATG8, które jest centralnym białkiem efektorowym autofagii. U *S. cerevisiae* funkcję mitochondrialnego receptora pełni białko ATG32, które jest cięte na drodze ograniczonej proteolizy przez proteazę Yme1 po indukcji mitofagii. Bardzo mało wiadomo o białkach pełniących podobną funkcję na powierzchni mitochondriów roślinnych. Nasze wstępne dane proteomiczne sugerują, że jednym z kandydatów białek receptorowych jest białko błony zewnętrznej OMP85, które prawdopodobnie jest cięte przez FTSH4. Analiza *in silico* wskazuje również, że OMP85 posiada konserwatywny motyw oddziałujący z ATG8, co sugeruje jego interakcję z ATG8 i udział w tworzeniu mitofagosomów. Na podstawie obecnej wiedzy o mitofagii u innych organizmów i naszych wstępnych danych, proponujemy, że u roślin *A. thaliana* proteaza FTSH4 jest zaangażowana w mitofagię poprzez proteolityczne cięcie specyficznego białka mitochondrialnego funkcjonującego jako receptor mitofagii, a OMP85 jest jednym z kandydatów na białkowy receptor. Ostatnio opublikowane dane wskazują, że FTSH4 również posiada motyw oddziałujący z ATG8. FTSH4 może być zatem markerem degradacji mitochondrialnej oddziałującym z ATG8 w przypadku poważnych uszkodzeń mitochondrialnych.

Celem tego projektu jest wykazanie, czy i w jaki sposób proteaza FTSH4 uczestniczy w procesie mitofagii, i przez to poznanie funkcjonalnego związku między mitochondrialnym systemem proteolitycznym a selektywną autofagią u roślin. Uważamy, że w warunkach silnego stresu proteaza FTSH4 funkcjonuje na drodze „ograniczonej” proteolizy i odcina fragment białkowy receptora mitofagii, pośrednicząc w ten sposób w mitofagii u roślin. Nie możemy jednak wykluczyć drugiego scenariusza i dlatego obie opcje będą testowane. W projekcie proponujemy zastosowanie komplementarnych metod opartych na mikroskopii, biochemii i biologii molekularnej w celu wykazania udziału proteazy FTSH4 w procesie mitofagii u roślin. W badaniach planujemy zastosować mikroskopy konfokalny i transmisyjny elektronowy w celu uwidocznienia formowania mitofagosomów w roślinach typu dzikiego i mutantach *ftsh4*. Planujemy również zastosować badanie *in vivo* interakcji białko-białko, dzięki któremu chcemy określić interakcje pomiędzy FTSH4 a receptorami mitofagii oraz receptorami mitochondrialnymi oddziałującymi z ATG8. Z kolei wykorzystując podejście proteomiczne oparte na spektrometrii masowej, planujemy scharakteryzować skład białkowy wyizolowanych frakcji mitofagosomów z roślin typu dzikiego i mutantów *ftsh4*. Ostatecznie, chcemy określić udział kolejnego elementu systemu kontroli jakości mitochondriów, szlaku ubiquityna-proteasom, w utrzymaniu homeostazy komórkowej w warunkach potencjalnie wadliwej mitofagii u *ftsh4* w porównaniu do typu dzikiego.

Biorąc pod uwagę, że wiedza na temat mitofagii u roślin jest nadal wyjątkowo uboga oraz brakuje informacji na temat zaangażowania roślinnego mitochondrialnego systemu proteolitycznego w procesie mitofagii, proponowane podejścia pomogą zrozumieć mechanizmy leżące u podstaw selektywnej autofagii u roślin. Nasze badania dostarczą również nowego wglądu w dwa kluczowe elementy systemu kontroli jakości mitochondriów, które zapewniają równocześnie prawidłowe funkcjonowanie komórki.