

Tytuł: Zlokalizowana translacja kodowanych jądrowo białek mitochondrialnych u *Danio pręgowanego*

Streszczenie

Mitochondria stanowią ważny ośrodek bioenergetyczny, metaboliczny i sygnalizacyjny w komórce. Biogeneza białek mitochondrialnych jest kluczowym procesem, który determinuje funkcję tych organelli. Zdecydowana większość genów kodujących białka mitochondrialne zapisana jest w jądrowym DNA. Ich biosynteza zachodzi na rybosomach cytoplazmatycznych skąd w formie prekursorów (potranslacyjnie) transportowane są do mitochondriów przy pomocy zewnątrz błonowego kompleksu białkowego TOM (ang. *Translocase of the Outer Membrane*). Literatura naukowa wskazuje, że rybosomy zlokalizowane w bliskiej odległości od mitochondriów wzbogacone są w cząsteczki mRNA kodowane przez genom jądrowy i niosące informację o białkach mitochondrialnych. Doniesienia sugerują współistnienie kotranslacyjnego mechanizmu syntezy białek mitochondrialnych zbliżonego do tego, który występuje na powierzchni ziarnistej siateczki śródplazmatycznej. Niemniej jednak, zarówno kotranslacyjny import białek mitochondrialnych, jak i ich zlokalizowana translacja nie zostały dobrze poznane u wyższych organizmów eukariotycznych.

W ramach niniejszego projektu, opracowano metodę wykorzystującą frakcjonowanie oraz wysokoprzepustowe sekwencjonowanie do badania lokalizacji cząsteczek mRNA umiejscowionych na powierzchni mitochondriów izolowanych z pięciodniowych larw *Danio pręgowanego*. Analizy biochemiczne wykazały czystość otrzymanego preparatu mitochondrialnego oraz obecność frakcji rybosomów cytoplazmatycznych na powierzchni mitochondriów. Uzyskane preparaty mitochondrialne wraz z towarzyszącymi rybosomami (MARS) oraz frakcją mikrosomalną poddano analizie transkryptomicznej metodą RNA-seq. Dodatkowo, w celu określenia zmian zachodzących we wzorcu lokalizacji cząsteczek mRNA w wyniku zaburzonego mechanizmu importu mitochondrialnego, przeprowadzono analizy tożsamyh frakcji subkomórkowych izolowanych z mutantu *Danio pręgowanego* pod względem genu *mia40a*. Produkt tego genu jest niezbędny do niezaburzonego importu mitochondrialnego oraz biogenezy grupy białek mitochondrialnych bogatych w cysteinę.

Na etapie analizy danych, w obrębie frakcji MARS zauważono niewielkie wzbogacenie transkryptów kodujących białka mitochondrialne wywodzące się z genomu jądrowego, co może sugerować, iż import większość białek do mitochondrium zachodzi potranslacyjnie. Mechanizm kotranslacyjnej biosyntezy białek zdaje się odgrywać marginalną rolę w biogenezie mitochondriów i wydają się być istotny tylko dla tych białek, których transkrypty wzbogacone są we frakcji MARS. Niedobór białka Mia40, odpowiedzialnego za import jednej z klas mitochondrialnych prekursorów białkowych, skutkowało lokalizowaniem się transkryptów na powierzchni mitochondriów, prawdopodobnie jako potranskrypcyjna odpowiedź kompensująca nieprawidłowości w biogenezie mitochondriów. Podsumowując, uzyskane wyniki wykazały istotność *in vivo* zlokalizowanej translacji po ingerencji w ścieżkę potranslacyjną (szlak MIA). Dodatkowo, lokalizacja mRNA oraz translacja specyficzna dla miejsca może być istotna dla szerokiej grupy białek związanych z cytoszkieletem komórkowym i zaangażowanych w utrzymanie dynamiki mitochondriów. Ponadto, przeprowadzone badania ujawniły szeroką grupę kodowanych jądrowo białek, których transkrypty zlokalizowane są na powierzchni mitochondriów a ich biologiczne znaczenie nie zostało jeszcze zbadane.

Promotor: Prof. dr hab. Agnieszka Chacińska

Promotor pomocniczy: Dr. Cecilia Lanny Winata



10/02/2020

Sreedevi Sugunan

Thesis title: Localized translation of nuclear-encoded mitochondrial proteins in zebrafish

Summary

The mitochondria constitute an important bioenergetic, metabolic, and signaling hub for the cell. The biogenesis of mitochondrial proteins is an important process that determines the organelle's function. The majority of mitochondrial proteins are encoded by the nuclear DNA, synthesized by cytosolic ribosomes and imported through translocase of the outer mitochondrial membrane (TOM) complex. Mitochondrial precursor proteins are mainly known to be imported post-translationally, that is, after their complete synthesis by cytosolic ribosomes. To date, various studies have shown the presence of cytosolic ribosomes and the enrichment of nuclear-encoded mRNAs coding for mitochondrial proteins in the vicinity of mitochondria, which suggests the existence of a co-translational mode of mitochondrial protein synthesis similar to that occurring on the surface of the rough endoplasmic reticulum. However, co-translational import or localized translation is unexplored in higher eukaryotes.


In this project, I established a method to study the localization of mRNAs on the surface of mitochondria isolated from 5dpf zebrafish larvae by fractionation-sequencing. Biochemical analyses revealed the purity of mitochondrial preparation obtained by this method and the presence of cytosolic ribosomes on the mitochondrial surface. The isolated mitochondria with associated ribosomes (MARS), together with microsomal fractions, were subjected to transcriptome profiling by RNA-seq. To gain insight into how the pattern of mRNA localization could be altered in the context of mitochondrial import deficiency, parallel analyses were performed in the corresponding sub-cellular fractions isolated from zebrafish mutant for the *mia40a* gene which is essential for the import and biogenesis of cysteine-rich mitochondrial proteins.

Following successful fractionation-sequencing, I observed sparse enrichment of nuclear-encoded mitochondrial transcripts in the MARS fraction, suggesting that the majority of protein import to mitochondria occurs post-translationally. The co-translational import seemed to play only a minimal role in the biogenesis of mitochondria and appeared to be relevant for only those proteins whose mRNAs are exclusively enriched in the MARS fraction. Interestingly, I found that the deficiency of Mia40, a protein responsible for the import of a subclass of mitochondrial

precursor proteins, triggered mRNA localization on the surface of mitochondria, likely as a post-transcriptional response to compensate for the defect in mitochondrial biogenesis. Altogether, my results exposed the in-vivo importance of localized translation upon intervening in a post-translational pathway (MIA pathway). Additionally, I propose that the mRNA localization and site-specific translation might be relevant for a variety of cytoskeletal or cytoskeletal-associated proteins implicated in mitochondrial dynamics. My study also revealed the localization of mRNAs of a wide array of nuclear-localized proteins on the mitochondrial surface whose biological relevance is yet to be explored.

Supervisor: Prof. dr hab. Agnieszka Chacińska

Co-supervisor: Dr. Cecilia Lanny Winata


10/02/2020
Sreedevi Sugunan