

Streszczenie

Proteazy wewnątrz błonowe katalizują reakcję hydrolizy wiązania peptydowego w obrębie helisy transbłonowej substratu. Enzymy te biorą udział w wielu różnych procesach komórkowych, w tym w licznych szlakach sygnalizacyjnych. Preseniliny należą do aspartylowych proteaz wewnątrz błonowych i wykazują *in vivo* aktywność w obrębie kompleksu γ -sekreazy, który składa się z czterech integralnych białek błonowych: zawierającej centrum aktywne preseniliny, APH-1 (ang. anterior pharynx-defective 1), PEN-2 (ang. presenilin enhancer 2) i nikastryny. Aktywność γ -sekreazy bezpośrednio odpowiada za powstawanie neurotoksycznego β -Amyloidu, tak więc γ -sekreaza jest ściśle związana z etiologią choroby Alzheimera. Znanych jest około stu substratów γ -sekreazy u zwierząt, wśród substratów jest m.in. receptor Notch, który jest kluczowy w procesach rozwojowych zwierząt. Preseniliny i γ -sekreaza są najdokładniej opisane w przypadku ssaków, prowadzone były już także wstępne badania dotyczące funkcji presenilin w organizmach roślinnych. Presenilina u mchu *Physcomitrella patens* okazała się być odpowiedzialna za organizację cytoszkieletu w sposób niezależny od aktywności proteolitycznej γ -sekreazy. W protoplastach *Arabidopsis thaliana* pokazano lokalizację homologów podjednostek γ -sekreazy w obrębie systemu błon wewnętrznych, a także bezpośrednie oddziaływania pomiędzy roślinnymi presenilinami a APH-1, PEN-2, nikastryną. Linia *A. thaliana* pozbawiona obu funkcjonalnych presenilin wykazywała anomalie rozwojowe w warunkach deficytu światła.

Przeprowadzone w niniejszej pracy eksperymenty miały na celu analizę składu podjednostkowego i aktywności kompleksu γ -sekreazy *A. thaliana* oraz identyfikację białek oddziałujących z podjednostkami kompleksu. Weryfikację aktywności roślinnej γ -sekreazy zrealizowano poprzez porównanie produktów proteolizy Białka Prekursorowego β -Amyloidu (APP) w protoplastach typu dzikiego oraz pozbawionych funkcjonalnych presenilin (*ps1/ps2*). Genotyp protoplastów okazał się nie mieć wpływu na powstające produkty proteolizy APP, zaobserwowano także powstawanie z niewielką wydajnością β -amyloidu, również w sposób niezależny od genotypu protoplastów. Metody takie jak TAP-tagging i koimmunoprecypitacja zostały wykorzystane do analizy składu kompleksu i identyfikacji białek oddziałujących z preseniliną 2 i PEN-2. Jako białka potencjalnie oddziałujące wyizolowano m.in. retikulony oraz białka zaangażowane w kontrolę jakości białek w retikulum endoplazmatycznym, w tym potencjalne substraty γ -sekreazy. Do badania interakcji pomiędzy podjednostkami γ -sekreazy a innymi białkami wykorzystano również metodę FRET-FLIM. Umożliwiło to zidentyfikowanie białka z domeną TIR (TIRP) oraz białka z rodziny R-SNARE, jako oddziałujących z presenilinami.

Streszczenie

Co więcej wykazano pośredni charakter interakcji pomiędzy presenilinami a retikulonem RTNLB1, następnie dowiedziono zdolności TIRP do oddziaływania z zarówno RTNLB1, jak i z presenilinami. Bezpośrednia interakcja presenilina/TIRP zależała od fragmentu TIRP z domeną TIR. Dalsze eksperymenty wykazały, że preseniliny nie oddziałują ze wszystkimi białkami z domeną TIR i pokrewnymi do TIRP. Analiza BN PAGE podjednostek γ -sekreazy nadekspymowanych w protoplastach sugeruje, że w komórkach roślinnych kompleks może osiągać masę ok. 700 kDa.

Wyniki otrzymane podczas przygotowywania rozprawy doktorskiej poszerzają dostępną wiedzę na temat interakcji międzybiałkowych, w które zaangażowane są roślinne preseniliny i inne podjednostki γ -sekreazy. Molekularni partnerzy presenilin, a także PEN-2, APH-1 oraz nikastryny mogą pełnić w komórce roślinnej funkcje związane z transportem pęcherzykowym oraz odpowiedzią na stesy biotyczne, być może poprzez zaangażowanie w kontrolę jakości białek w obrębie ER. Zidentyfikowane zostały również białka, które mogą być potencjalnymi substratami roślinnej γ -sekreazy. Przeprowadzone eksperymenty koimmunoprecypitacji, BN PAGE oraz TAP tagging sugerują niekonstytutywną obecność kompleksu γ -sekreazy w komórkach *A. thaliana*.

Streszczenie
