

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Wydział Biologii
Instytut Biologii Eksperymentalnej
Zakład Fizjologii Roślin

AKTYWNOŚĆ OPIEKUŃCZA CHLOROPLASTOWEJ PROTEAZY ATDEG2

mgr Przemysław Jagodziki

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem
prof. dr. hab. Grzegorza Jackowskiego

Poznań 2019

Serdeczne podziękowania składam:

Mojemu Promotorowi, Panu prof. dr. hab. Grzegorzowi Jackowskiemu za opiekę naukową, konstruktywne i cenne uwagi merytoryczne oraz nieocenioną pomoc udzieloną w trakcie przygotowywania pracy doktorskiej,

Pani prof. UAM dr hab. Agnieszce Ludwików za pomoc w wyborze ścieżki zawodowej oraz za podzielenie się doświadczeniem i pomoc w obszarze klonowania i uzyskania roślin transgenicznych,

Pani dr Lucynie Misztal za podzielenie się doświadczeniem i pomoc w uzyskaniu białek rekombinowanych,

Panu dr. hab. Tomaszowi Wyce za poświęcony czas podczas wykonywania analiz aktywności fotosyntetycznej, pomoc oraz cenne rady dotyczące prowadzenia doświadczeń,

Pracownikom i Doktorantom Zakładu Fizjologii Roślin, w szczególności dr Małgorzacie Adamiec i dr. hab. Robertowi Lucińskiemu za pomoc w wykonywaniu analiz, cenne rady, życzliwość oraz stworzenie przyjaznej atmosfery,

w sposób szczególny Mojej Żonie Karolinie za bycie dla mnie oparciem, za cierpliwość i wytrwałość oraz wiarę w moje możliwości,

Wszystkim, którzy wspierali moje dążenia naukowe.

1	STRESZCZENIE.....	7
2	ABSTRACT.....	8
3	WSTĘP.....	9
3.1	POJĘCIE BIAŁEK OPIEKUŃCZYCH	9
3.2	KLASYFIKACJA, BUDOWA, MECHANIZM DZIAŁANIA I FUNKCJE BIAŁEK OPIEKUŃCZYCH	11
3.2.1	Holdazy.....	13
3.2.2	Foldazy.....	17
3.2.3	Dezagregazy	33
3.3	CHLOROPLASTOWE BIAŁKA OPIEKUŃCZE <i>A. THALIANA</i>	36
3.3.1	sHsp.....	36
3.3.2	Hsp40.....	37
3.3.3	Hsp60.....	37
3.3.4	Hsp70.....	38
3.3.5	Hsp90.....	38
3.3.6	Hsp100.....	39
3.3.7	Inne.....	40
3.4	PRZEBIEG ONTOGENEZY <i>A. THALIANA</i>	51
4	CEL PRACY	54
4.1	CEL STRATEGICZNY.....	54
4.2	ZADANIA BADAWCZE.....	54
5	MATERIAŁY I METODY	58
5.1	MATERIAŁ ROŚLINNY I WARUNKI HODOWLI ROŚLIN.....	58
5.1.1	Materiał roślinny	58
5.1.2	Hodowla roślin w ziemi	59
5.1.3	Hodowla roślin na podłożu MS	59
5.2	IZOLACJA PROTOPLASTÓW ORAZ IZOLACJA, LIZA I FRAKCJONOWANIE CHLOROPLASTÓW.....	60
5.2.1	Izolacja protoplastów z komórek mięksiszowych liścia <i>A. thaliana</i>	60
5.2.2	Izolacja, liza i frakcjonowanie chloroplastów z liści <i>A. thaliana</i>	60
5.3	MATERIAŁ BAKTERYJNY I WARUNKI HODOWLI BAKTERII	61
5.3.1	Szczepy <i>E. coli</i>	61
5.3.2	Szczep <i>A. tumefaciens</i>	62

5.3.3	Pożywka LB do hodowli bakterii.....	62
5.3.4	Antybiotyki	62
5.3.5	Hodowla <i>E. coli</i>	63
5.3.6	Hodowla <i>A. tumefaciens</i>	63
5.4	IZOLACJA RNA I DNA.....	63
5.4.1	Izolacja RNA całkowitego z roślin	63
5.4.2	Izolacja DNA genomowego z roślin	63
5.4.3	Izolacja DNA wektorów	64
5.4.4	Izolacja fragmentów DNA z żelu agarozowego	65
5.5	ELEKTROFOREZA RNA I DNA	65
5.6	SYNTEZA I MODYFIKACJA DNA.....	65
5.6.1	Startery.....	65
5.6.2	Amplifikacja fragmentów DNA metodą PCR	68
5.6.3	Reakcja odwrotnej transkrypcji (RT-PCR).....	69
5.6.4	Synteza chemiczna fragmentów DNA	70
5.6.5	Mutageneza ukierunkowana.....	70
5.7	KŁONOWANIE DNA.....	72
5.7.1	Wektor pENTR™/SD/D-TOPO™	72
5.7.2	Wektor Champion™ pET300/NT-DEST	73
5.7.3	Wektor pEarleyGate 103	74
5.7.4	Klonowanie do wektora wejściowego.....	76
5.7.5	Klonowanie do wektora docelowego.....	76
5.7.6	Trawienie restrykcyjne	79
5.7.7	Sekwencjonowanie DNA	79
5.8	TRANSFORMACJA I TRANSFEKCJA MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO.....	79
5.8.1	Transformacja <i>E. coli</i>	79
5.8.2	Transformacja <i>A. tumefaciens</i>	80
5.8.3	Transformacja <i>A. thaliana</i> przez agroinfiltrację	80
5.8.4	Transfekcja protoplastów komórek miękiszowych liścia <i>A. thaliana</i>	82
5.9	IZOLACJA I OCZYSZCZANIE BIAŁEK REKOMBINOWANYCH	82
5.9.1	Nadekspresja białek rekombinowanych w komórkach <i>E. coli</i>	82
5.9.2	Dezintegracja komórek bakteryjnych <i>E. coli</i>	83
5.9.3	Oczyszczanie białek rekombinowanych z użyciem złoża niklowego	84
5.9.4	Izolacja białek rekombinowanych z żelu poliakrylamidowego	84

5.10	ELEKTROFOREZA BIAŁEK	85
5.10.1	Jednokierunkowa elektroforeza białek w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)	85
5.10.2	Dwukierunkowa diagonalna elektroforeza białek (D2D SDS-PAGE)	86
5.10.3	Techniki wizualizacji białek w żelach poliakrylamidowych	87
5.10.4	Analiza żeli po SDS-PAGE wybarwionych CBB R-250	88
5.10.5	Analiza żeli po D2D SDS-PAGE wybarwionych metodą Blue Silver	88
5.11	TECHNIKA IMMUNOBLOT	89
5.11.1	Ektrotransfer białek na błonę PVDF	89
5.11.2	Immunodetekcja białek.....	89
5.11.3	Przeciwciała	90
5.11.4	Analiza błon PVDF po zastosowaniu techniki immunoblot.....	92
5.12	OZNACZANIE ILOŚCIOWE RNA, DNA I BIAŁEK.....	92
5.12.1	Ilościowe oznaczanie stężenia RNA i DNA metodą spektrofotometryczną	92
5.12.2	Ilościowe oznaczanie stężenia białka metodą Bradford	92
5.13	OZNACZANIE AKTYWNOŚCI OPIEKUŃCZEJ BIAŁEK REKOMBINOWANYCH	92
5.14	OZNACZANIE AKTYWNOŚCI PROTEOLITYCZNEJ BIAŁEK REKOMBINOWANYCH	93
5.15	OZNACZANIE AKTYWNOŚCI REDUKTAZY DWUSIARCZKOWEJ Z UŻYCIEM INSULINY.....	93
5.16	ANALIZY FENOTYPOWE	94
5.16.1	Analiza chronologii przebiegu faz i podfaz ontogenezy <i>A. thaliana</i>	94
5.16.2	Analizy morfologiczne liści	95
5.16.3	Analizy morfologiczne organów generatywnych	95
5.16.4	Analizy wymiany gazowej.....	95
5.17	TECHNIKI MIKROSKOPOWE	97
5.17.1	Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM).....	97
5.17.2	Mikroskopia konfokalna	97
5.18	ANALIZY STATYSTYCZNE	97
5.19	ODCZYNNIKI	98
5.19.1	Enzymy i zestawy odczynników do reakcji enzymatycznych	98
5.19.2	Zestawy odczynników do izolacji i oczyszczania RNA lub DNA oraz zestawy do klonowania	99
5.19.3	Pozostałe odczynniki i zestawy	99

6	WYNIKI	100
6.1	USTALENIE, KTÓRA DOMENA W STRUKTURZE PIERWSZORZĘDOWEJ AtDeg2 JEST ODPOWIEDZIALNA ZA AKTYWNOŚĆ OPIEKUŃCZĄ TEGO BIAŁKA.....	100
6.1.1	Uzyskanie różnych wersji rekombinowanych AtDeg2	100
6.1.2	Analiza aktywności opiekuńczej wersji rekombinowanych AtDeg2.....	111
6.2	POSZUKIWANIE FIZJOLOGICZNYCH SUBSTRATÓW DLA HOLDAZOWEJ AKTYWNOŚCI OPIEKUŃCZEJ ATDEG2.....	117
6.2.1	Analiza aktywności proteolitycznej wersji rekombinowanych AtDeg2.....	117
6.2.2	Uzyskanie transformantów <i>35S:AtDEG2^{ΔPDZ1}-GFP</i>	120
6.2.3	Identyfikacja fizjologicznych substratów dla holdazowej aktywności opiekuńczej AtDeg2.....	126
6.3	UTWORZENIE KATALOGU CECH FENOTYPOWYCH <i>A. THALIANA</i> , W KTÓRYCH REGULACJI KSZTAŁTOWANIA SIĘ UCZESTNICZY ATDEG2 <i>IN VIVO</i> POPRZECZ SWOJĄ AKTYWNOŚĆ OPIEKUŃCZĄ LUB OPIEKUŃCZĄ I PROTEOLITYCZNĄ JEDNOCZEŚNIE	132
6.3.1	Uzyskanie transformantów <i>35S:AtDEG2^{S268G}-GFP</i>	132
6.3.2	Porównawcza analiza fenotypowa roślin <i>A. thaliana</i>	137
7	DYSKUSJA	148
8	PODSUMOWANIE WYNIKÓW	161
9	WNIOSKI	162
10	LITERATURA	163

1 STRESZCZENIE

Na podstawie analiz *in vitro* potwierdzono pojedyncze doniesienie, pochodzące z innego laboratorium, że chloroplastowe białko AtDeg2 oprócz aktywności proteazy dysponuje także aktywnością białka opiekuńczego typu holdazy. Dowiedziono, ponadto, że AtDeg2 wykazuje *in vitro* także aktywność opiekuńczą dezagregazy. Za aktywność opiekuńczą holdazy i dezagregazy AtDeg2 *in vitro* w głównej mierze odpowiedzialne są domeny PDZ1 i PDZ2 oraz częściowo domena proteazowa. Wykazano, że *in vivo*, w warunkach ekspozycji roślin na światło o wysokim natężeniu AtDeg2 dysponuje aktywnością holdazy, dla której substratem jest podjednostka γ_1 chloroplastowej syntazy ATP. Aktywność ta wyraża się zahamowaniem homoagregacji zmienionych oksydacyjnie cząsteczek podjednostki γ_1 syntazy ATP poprzez niedopuszczenie do powstania mostków dwusiarczkowych między tymi cząsteczkami. W odniesieniu do cech fenotypowych dowiedziono, że w warunkach bezstresowych AtDeg2 przez swoją aktywność opiekuńczą bierze udział w regulacji szerokości nasion, a przez swoją aktywność opiekuńczą i proteolityczną jednocześnie uczestniczy w regulacji momentu rozprostowania się liścieni, liczby węzłów na pędzie kwiatostanowym i jego rozgałęzieniach oraz długości nasion.

2 ABSTRACT

The results of our *in vitro* studies confirm a single report (coming from another lab) showing that a chloroplast protein AtDeg2, besides being a protease displayed a chaperone activity as well (holdase type). In addition, it was shown by us that AtDeg2 exhibited an efficient disaggregase chaperone activity *in vitro*. It was demonstrated that PDZ1 and PDZ2 domains were required for both types of AtDeg2 chaperone activity *in vitro* and that protease domain contributed to these activities. Moreover it was found that AtDeg2 had holdase chaperone activity *in vivo*, involving the inhibition of the formation of homoaggregates of γ_1 -subunit of ATP synthase (mediated by disulphide bridges) in chloroplasts of plants grown under high irradiance conditions. Based on comparative phenotypic screens of four genotypes of *A. thaliana* grown in comfortable conditions we found that AtDeg2 was involved in regulation of normal seed width through its chaperone activity as well as in regulation of the time it takes for cotyledons to fully open, for accomplishment of normal inflorescence branching and for normal seed length through both protease and chaperone activities.

3 WSTĘP

3.1 POJĘCIE BIAŁEK OPIEKUŃCZYCH

Białka pełnią kluczową rolę we wszystkich procesach biologicznych w komórce, a ich funkcjonowanie w głównej mierze zależy od ich prawidłowej struktury przestrzennej (konformacji). Niewłaściwie zwinięte (sfaldowane) białko nie tylko traci swoją aktywność biologiczną, ale może też ulegać agregacji, co może prowadzić do efektów cytotoksycznych (Mokry i wsp., 2015). Hipoteza termodynamiczna Anfinsena zakłada, że struktura pierwszorzędowa białka zawiera wszystkie istotne informacje potrzebne do przyjęcia przez białko struktury trzeciorzędowej i żadne dodatkowe składniki nie są potrzebne (Anfinsen, 1972; Anfinsen, 1973).

Proces fałdowania białek (kształtowania się ich struktury trzeciorzędowej) jest możliwy dzięki rotacji sąsiadujących ze sobą jednostek peptydowych wokół wiązania pojedynczego między węglem α i grupą N-H (kąt rotacji wokół tego wiązania określa się ϕ) oraz wiązania pojedynczego między węglem α i grupą karbonylową (kąt rotacji wokół tego wiązania określa się ψ). Określone kombinacje kątów ϕ i ψ w obrębie reszt aminokwasowych położonych blisko siebie w strukturze pierwszorzędowej białka definiują typ struktury drugorzędowej stabilizowanej przez wiązania wodorowe pomiędzy grupami N-H i C=O (α -helisa, β -harmonijka, zwrot β , pętla Ω). Z kolei sposób ułożenia w przestrzeni elementów struktury drugorzędowej określa strukturę trzeciorzędową białka stabilizowaną przez wiązania niekowalencyjne (wodorowe, jonowe i hydrofobowe) oraz kowalencyjne (mostki dwusiarczkowe) pomiędzy grupami bocznymi reszt aminokwasowych oddalonych od siebie w strukturze pierwszorzędowej białka (Pauling i wsp., 1951; Ramachandran i Sasisekharan, 1968).

Według hipotezy termodynamicznej Anfinsena proces fałdowania białek przebiega spontanicznie, a oddziaływanie pomiędzy grupami bocznymi poszczególnych reszt aminokwasowych prowadzi do ułożenia hydrofobowych odcinków łańcucha polipeptydowego wewnątrz struktury trzeciorzędowej białka (lub w podwójnej warstwie lipidowej błony komórkowej) z jednoczesną ekspozycją odcinków hydrofilowych na zewnątrz do środowiska wodnego i osiągnięcia przez białko konformacji najbardziej korzystnej energetycznie (Dill i wsp., 2008; Baldwin, 2012;

Díaz-Villanueva i wsp., 2015). Drogę, jaką przechodzi białko od momentu zakończenia translacji do momentu osiągnięcia końcowej struktury trzeciorzędowej, można zobrazować za pomocą tzw. krajobrazu energetycznego procesu fałdowania – przypominającego lejek (stąd określany jest również jako lejek energetyczny), który jest zależnością energii swobodnej od współrzędnej Q opisującej stan sfałdowania białka. Im bardziej w „dół” lejka energetycznego, tym niższa energia swobodna i tym bardziej stabilna struktura białka, choć występują również lokalne minima energii, które odpowiadają kinetycznym stanom pośrednim (Leopold i wsp., 1992; Czuryło, 2002; Finkelstein, 2018). Droga do osiągnięcia konformacji najbardziej korzystnej energetycznie obejmuje zasadniczo cztery stany pośrednie w kolejności od stanu najbardziej nieuporządkowanego do najbardziej uporządkowanego, a więc o najniższej energii swobodnej. Są to: stan kłębka statystycznego, pre-stopionej globuli, stopionej globuli oraz stan uporządkowany. Białko w każdym z tych stanów może pełnić określone funkcje (Górka i Bonarek, 2013). U eukariontów 25-30% proteomu stanowią białka inherentnie nieuporządkowane, które częściowo lub całkowicie są pozbawione stabilnej struktury trzeciorzędowej, a jednak są kluczowe dla pełnienia wielu istotnych funkcji np. w różnych szlakach regulacyjnych, czy też w procesach składania dużych kompleksów białkowych. Mogą one z łatwością przyjmować różne stany konformacyjne w zależności od warunków środowiska, na skutek oddziaływania z innymi białkami bądź w efekcie różnych modyfikacji potranslacyjnych (Dziedzic-Letka i Ożyhar, 2012).

O ile hipoteza samodzielnie fałdującego się białka została wielokrotnie potwierdzona *in vitro*, o tyle w warunkach stłoczenia cząsteczkowego panującego w komórce, gdzie stężenie białek i różnych makromolekuł sięga 300 mg/ml, proces fałdowania białka jest znacznie utrudniony i wymaga udziału wyspecjalizowanych białek nazywanych białkami opiekuńczymi (Díaz-Villanueva i wsp., 2015; Finkelstein, 2018; Kaiser i Liu, 2018). Rola białek opiekuńczych polega na ochronie świeżo powstałego białka (lub znajdującego się *in statu nascendi*) przed niepożądanymi oddziaływaniami i umożliwieniu mu w ten sposób „samodzielnego” osiągnięcia właściwej struktury trzeciorzędowej w warunkach stłoczenia cząsteczkowego zgodnie z hipotezą termodynamiczną (Finkelstein, 2018). Poza udziałem w fałdowaniu nowo powstałych/powstających białek, białka opiekuńcze uczestniczą w rozfałdowywaniu

oraz oligomeryzacji/deoligomeryzacji białek „podopiecznych”, nie wchodząc do struktur powstających w wyniku tych procesów (Ellis, 1990; Hoffman i wsp., 2010; Balchin i wsp., 2016). Należy zwrócić uwagę, że powstawanie wiązań dwusiarczkowych jako część procesu fałdowania (tzw. oksydacyjne fałdowanie białek) jest katalizowane przez białka niezaliczane do białek opiekuńczych; dowiedziono jednak, że niektóre z białek uczestniczących w oksydacyjnym fałdowaniu mogą być też nosicielami aktywności opiekuńczej.

Określenie „białko opiekuńcze” zostało po raz pierwszy użyte przez Laskey’a i wsp. w 1978 r. dla opisanie funkcji, jaką pełni nukleoplazmina w procesie składania nukleosomów. Nukleoplazmina wiąże się do białek histonowych, stabilizując ich strukturę podczas ich oddziaływania z DNA, jednak ostatecznie nie jest elementem nukleosomów. Funkcja nukleoplazminy została określona przez Laskey’a i wsp. (1978) następująco: „Sugerujemy, że rolą oczyszczonego przez nas białka jest rola 'białka opiekuńczego', które zapobiega nieprawidłowym oddziaływaniom pomiędzy histonami a DNA”.

3.2 KLASYFIKACJA, BUDOWA, MECHANIZM DZIAŁANIA I FUNKCJE BIAŁEK OPIEKUŃCZYCH

Białka opiekuńcze od początku identyfikowano z białkami szoku cieplnego (Hsp, ang. *heat-shock proteins*), gdyż wiele z nich ulega wzmożonej ekspresji w warunkach ekspozycji na wysoką temperaturę (Díaz-Villanueva i wsp., 2015; Trösch i wsp., 2015). Ponadto większość białek z grupy Hsp wykazuje aktywność białka opiekuńczego (Park i Seo, 2015). W związku z powyższym najpowszechniejszym kryterium podziału białek opiekuńczych jest kryterium masy cząsteczkowej stosowany dla białek Hsp. W ten sposób ze względu na przybliżoną wartość masy cząsteczkowej (kDa) wyróżniono sześć rodzin białek opiekuńczych: sHsp, Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90 i Hsp100 (Tabela 1) (Díaz-Villanueva i wsp., 2015; Balchin i wsp., 2016; Johnston i wsp., 2018).

Białka opiekuńcze mogą być również klasyfikowane pod względem lokalizacji wewnątrzkomórkowej, zależności od ATP czy sposobu działania na substrat.

Tabela 1. Klasyfikacja białek opiekuńczych

Rodzina	Mechanizm działania	Zależność od ATP	Przedstawiciele, lokalizacja wewnątrzkomórkowa, literatura
Hsp100 (Clp) (100-110 kDa)	Foldazy (defoldazy)	+	<i>E. coli</i> : ClpA, ClpX, ClpY – cytozol (Guenther i Kędzierska-Mieszkowska, 2011) <i>A. thaliana</i> : ClpC1, ClpC2 – chloroplasty (Shanklin i wsp., 1995) ClpD – chloroplasty (Kiyosue i wsp., 1993) ClpX – mitochondria (Adam i wsp., 2001)
	Dezagregazy		<i>E. coli</i> : ClpB – cytozol (Guenther i Kędzierska-Mieszkowska, 2011) <i>S. cerevisiae</i> : Hsp104 – cytozol (Guenther i Kędzierska-Mieszkowska, 2011) Hsp78 – mitochondria (Guenther i Kędzierska-Mieszkowska, 2011) <i>A. thaliana</i> : ClpB1 – cytozol (Guenther i Kędzierska-Mieszkowska, 2011) ClpB3 – chloroplasty (Myouga i wsp., 2006) ClpB4 – mitochondria (Lee i wsp., 2007)
Hsp90 (HptG) (81-99 kDa)	Foldazy	+	<i>E. coli</i> : HtpG – cytozol (Guenther i Kędzierska-Mieszkowska, 2011) <i>S. cerevisiae</i> : Hsp83 – cytozol/jądro kom. (Guenther i Kędzierska-Mieszkowska, 2011) <i>A. thaliana</i> : Hsp90.1-4 – cytosol/jądro kom. (Krishna i Gloor, 2001) Hsp90.5 – chloroplasty (Krishna i Gloor, 2001) Hsp90.6 – mitochondria (Krishna i Gloor, 2001) Hsp90.7 – ER (Krishna i Gloor, 2001) <i>H. sapiens</i> : Hsp90α, Hsp90β – cytozol (Jakob i Buchner, 1994) Grp94 – ER (Guenther i Kędzierska-Mieszkowska, 2011)
Hsp70 (DnaK) (65-80 kDa)	Foldazy	+	<i>E. coli</i> : DnaK – cytozol (Guenther i Kędzierska-Mieszkowska, 2011) <i>S. cerevisiae</i> : Ssa1-4, Ssb1, Ssb2 – cytozol (Guenther i Kędzierska-Mieszkowska, 2011) Kar2 – ER (Guenther i Kędzierska-Mieszkowska, 2011) Ssc1 – mitochondria (Guenther i Kędzierska-Mieszkowska, 2011) <i>A. thaliana</i> : Hsc70-1, Hs70-2, Hsc70-3, Hsp70, Hsp70b – cytozol (Sung i wsp., 2001) mtHsc70-1, cpHsc70-2 – mitochondria (Sung i wsp., 2001) cpHsc70-1, cpHsc70-2 – chloroplasty (Su i Li, 2008) BiP-1, BiP-2, BiP-3 – ER (Sung i wsp., 2001) <i>H. sapiens</i> : Hsp70 – cytozol/jądro kom. (Guenther i Kędzierska-Mieszkowska, 2011) Hsp75 – mitochondria (Guenther i Kędzierska-Mieszkowska, 2011) BiP – ER (Guenther i Kędzierska-Mieszkowska, 2011)
Hsp60 (GroEL) (55-64 kDa)	Foldazy	+	<i>E. coli</i> : GroEL – cytozol (Guenther i Kędzierska-Mieszkowska, 2011) <i>S. cerevisiae</i> : Hsp60 – mitochondria (Reading i wsp., 1989) <i>A. thaliana</i> : CCT – cytosol (Hill i Hemmingsen, 2001) Cpn60 (1-3) – mitochondria (Hill i Hemmingsen, 2001) Cpn60α1-2, Cpn60β1-4, – chloroplasty (Hill i Hemmingsen, 2001) <i>H. sapiens</i> : Hsp60 – mitochondria (Guenther i Kędzierska-Mieszkowska, 2011) CCT (TRiC) – cytozol (Guenther i Kędzierska-Mieszkowska, 2011)
Hsp40 (DnaJ) (35-54 kDa)	Holdazy	-	<i>E. coli</i> : DnaJ – cytozol (Guenther i Kędzierska-Mieszkowska, 2011) <i>S. cerevisiae</i> : Ydj1 – cytozol/jądro kom. (Guenther i Kędzierska-Mieszkowska, 2011) <i>A. thaliana</i> : EIP9 – cytosol/jądro kom. (Pulido i, Leister, 2018) GRL3/THRUMIN1 – cytosol (Pulido i, Leister, 2018) DjlD2/PAM16, DjlD3/PAM16L – mitochondria (Pulido i, Leister, 2018) AtJ8, AtJ11, AtJ20 – chloroplasty (Chen i wsp., 2010) BSD2 – chloroplasty (Vitlin Gruber i Feiz, 2018) <i>H. sapiens</i> : Hsp40 – cytozol/mitochondria (Guenther i Kędzierska-Mieszkowska, 2011) Hsp47 – ER (Guenther i Kędzierska-Mieszkowska, 2011)
sHsp (10-34 kDa)	Holdazy	-	<i>E. coli</i> : GroES, IbpA, IbpB – cytozol (Guenther i Kędzierska-Mieszkowska, 2011) <i>S. cerevisiae</i> : Hsp27 – cytozol (Guenther i Kędzierska-Mieszkowska, 2011) <i>A. thaliana</i> : Hsp17.6, Hsp18.2, Hsp17.6-II, Hsp17.6A – cytosol/jądro kom. (Scharf i wsp., 2001)

			Hsp21 – chloroplasty (Scharf i wsp., 2001) Cpn10/20 – chloroplasty (Trösch i wsp., 2015) Hsp22.0-ER – ER (Scharf i wsp., 2001) Hsp23.6-mito – mitochondria (Scharf i wsp., 2001) Cpn10 – mitochondria (Hill i Hemmingsen, 2001)
			<i>H. sapiens</i> : αA-krystaliny, αB-krystaliny – cytozol (Guenther i Kędzierska-Mieszkowska, 2011) Hsp27 (Hsp25) – cytozol/jądro kom. (Guenther i Kędzierska-Mieszkowska, 2011) Hsp10 – mitochondria/cytozol (Guenther i Kędzierska-Mieszkowska, 2010)
Inne	Foldazy (defoldazy)	+	<i>E. coli</i> : Lon – cytozol (Donch i Greenberg, 1968) FtsH – peryplazma (Ogura i wsp., 1991)
			<i>A. thaliana</i> : AtFtsH3, 4, 10 – mitochondria (Sakamoto i wsp., 2003) AtFtsH1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 12 – chloroplasty (Sakamoto i wsp., 2003) AtFtsH11 – mitochondria/chloroplasty (Urantowska i wsp., 2005) AtLon1 – mitochondria/chloroplasty (Daras i wsp., 2014) AtLon2 – peroksysomy (Farmer i wsp., 2013) AtLon3 – lokalizacja wewnątrzkomórkowa nieznana AtLon4 – mitochondria/chloroplasty (Ostersetzer i wsp., 2007)
	Foldazy, holdazy	-	<i>E. coli</i> : DegP – peryplazma (Lipińska i wsp., 1988; Strauch i Beckwith, 1988)
	Foldazy		<i>E. coli</i> : TF – cytozol (Guthrie i Wickner, 1990) DegQ – peryplazma (Waller i Sauer, 1996) PPI – peryplazma (Takahashi i wsp., 1989)
			<i>H. sapiens</i> : PDI – ER (Pemberton i Kay, 2005)
			<i>A. thaliana</i> : PDI, PPI, CNX, CRT – ER (Gupta i Tuteja, 2011) AtDeg1 – chloroplasty (Chassin i wsp., 2002)
	Holdazy		<i>A. thaliana</i> : AtDeg2 – chloroplasty (Haussühl i wsp., 2001)
	Dezagregazy		<i>A. thaliana</i> : cpSRP43 – chloroplasty (Cline i Henry, 1996)

Ze względu na lokalizację wewnątrzkomórkową białka opiekuńcze można podzielić na cytozolowe, jądrowe, chloroplastowe i mitochondrialne białka opiekuńcze, a także białka opiekuńcze siateczki śródplazmatycznej (ER) czy peroksysomów (Kotak i wsp., 2007; Niforou i wsp., 2014).

Z kolei stosując kryterium zależności od ATP, można podzielić białka opiekuńcze na takie, które do swojej aktywności wymagają hydrolizy ATP oraz takie, które są aktywne bez udziału ATP.

Opierając się na mechanizmie działania białek opiekuńczych, można je podzielić na trzy grupy: holdazy, foldazy i dezagregazy (Díaz-Villanueva i wsp., 2015; Kumar i wsp., 2015; Mokry i wsp., 2015).

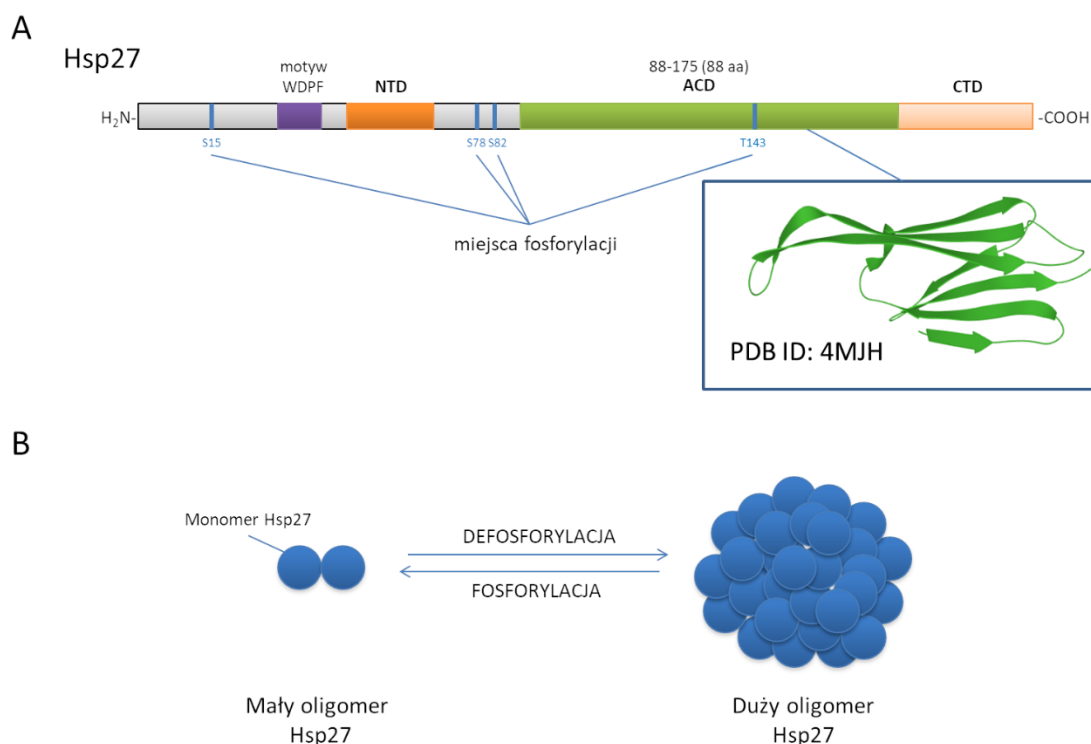
3.2.1 HOLDAZY

Holdazy są białkami, które w sposób niezależny od ATP rozpoznają i wiążą się do białek nienatywnych (niesfałdowanych bądź zdenaturowanych), zapobiegając ich

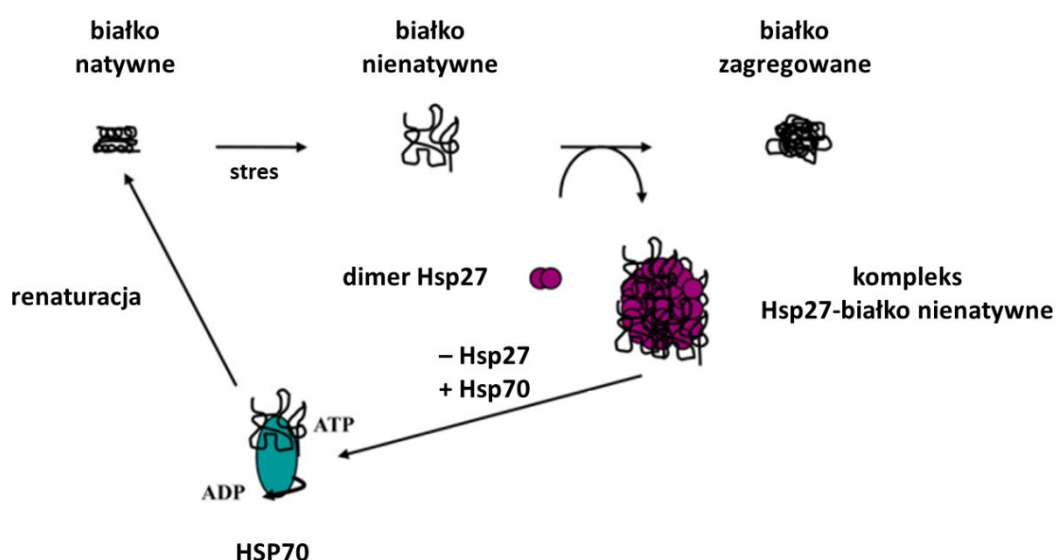
denaturacji (w przypadku białek nowo syntetyzowanych jeszcze niesfałdowanych) i agregacji. Holdazy są reprezentowane głównie przez białka należące do rodziny sHsp i Hsp40 (Díaz-Villanueva i wsp., 2015; Mokry i wsp., 2015; Suss i Reichmann, 2015).

Masa cząsteczkowa białek sHSP mieści się w przedziale 10-35 kDa. Stanowią one najobszerniejszą i najbardziej zróżnicowaną rodzinę białek opiekuńczych (Waters, 2013; Datta i wsp., 2017). Cechą charakterystyczną wszystkich sHSP jest zakonserwowana C-końcowa domena α -krystaliny (ACD) składająca się z 80-90 reszt aminokwasowych tworzących dziewięć β -nici (Rysunek 1A). Ponadto obecne są również domeny istotne w tworzeniu i/lub stabilizowaniu struktury oligomerycznej takie jak domena N-końcowa (NTD) i C-końcowa (CTD) oraz motyw WDPF (Garrido i wsp., 2012). Na strukturę domeny ACD mają wpływ takie czynniki jak pH, temperatura, jony wapnia i siła jonowa (Jee, 2016). Białka sHsp wykazują silne powinowactwo do nienatywnych białek i poprzez ekspozycję powierzchni hydrofobowych mogą wiązać substraty niemal o tej samej masie cząsteczkowej (Waters, 2013). Większość sHSP tworzy olbrzymie homo- lub heterooligomery, które mogą składać się nawet z pięćdziesięciu podjednostek np. Hsp27 może funkcjonować jako oligomer o masie sięgającej nawet 1000 kDa (Garrido i wsp., 2012).

Aktywność sHsp jest ściśle regulowana przez potranslacyjne modyfikacje, jak np. fosforylacja. Na przykładzie białek Hsp27, α B-krystaliny i Hsp20 wykazano, że ulegają one gwałtownej i przejściowej fosforylacji w warunkach stresowych, co wpływa na stopień oligomeryzacji tych białek. Podczas gdy fosforylacja sprzyja formowaniu się małych oligomerów, defosforylacja promuje tworzenie się dużych struktur oligomerycznych (Rysunek 1B). Taka regulacja stopnia oligomeryzacji wydaje się być kluczowa dla aktywności opiekuńczej, gdyż może prowadzić do tworzenia się różnych struktur homo- i heterooligomerych (każda o różnych właściwościach wiążących) do opiekowania się całą gamą różnych substratów. O ile wiązanie zdenaturowanych białek przez białka sHSP nie wymaga udziału ATP, o tyle uwolnienie związanego substratu w celu jego poprawnego sfałdowania wymaga już współdziałania z białkami opiekuńczymi zależnymi od ATP, na co wskazują badania nad Hsp27 u *E. coli* i *S. cerevisiae* (Rysunek 2) (Garrido i wsp., 2012).



Rysunek 1. Struktura białka Hsp27 należącego do rodziny sHsp. Rozkład domen w strukturze pierwszorzędowej Hsp27, struktura trzeciorzędowa domeny ACD Hsp27 (PDB ID: 4MJH) **(A)** oraz oligomeryzacja/deoligomeryzacja Hsp27 w odpowiedzi na zmiany stopnia fosforylacji **(B)**. Na podstawie Katsogiannou i wsp., 2014. Wizualizację struktury krystalicznej uzyskano za pomocą programu LiteMol Viewer.



Rysunek 2. Mechanizm działania białka Hsp27 należącego do rodziny sHsp. Na podstawie Garrido i wsp., 2012.

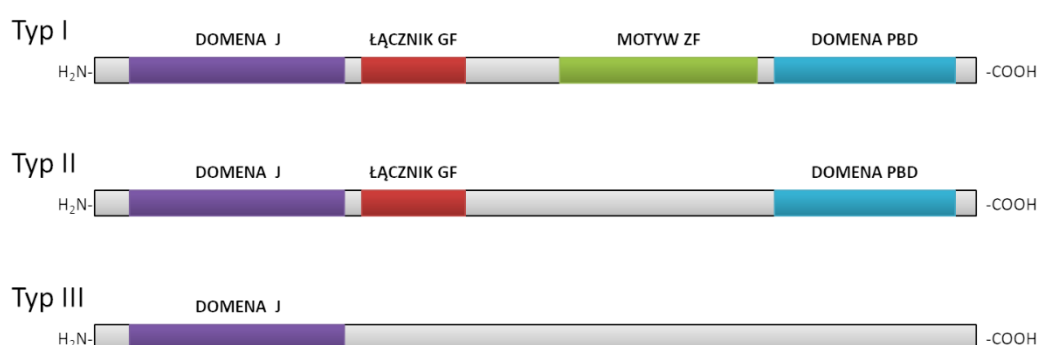
Niektóre białka sHsp funkcjonują jako tzw. współdziałające białka opiekuńcze. Współdziałające białka opiekuńcze to białka współpracujące z białkami opiekuńczymi, takimi jak Hsp60, Hsp70 czy Hsp90 w procesie fałdowania innych polipeptydów, ale same pozbawione są miejsca wiązania substratu. Należą do nich takie białka jak GrpE, Bag1, białko oddziałujące z Hsc70 (HIP), białko organizujące Hsp70/Hsp90 (HOP), białko oddziałujące z końcem karboksylowym Hsp70 (CHIP), białko cyklu komórkowego 37 (Cdc37, znane również jako p50), cyklofilina 40 (CYP40) czy też białko p23 (Caplan, 2003; Díaz-Villanueva i wsp., 2015). Klasycznym przykładem białka współdziałającego z rodziny sHsp jest bakteryjne białko Hsp10 (GroES), które tworzy heptameryczny pierścień z podjednostek o masie ok. 10 kDa i oddziałuje z należącym do rodziny Hsp60 białkiem GroEL, umożliwiając zamknięcie substratu wewnątrz jego struktury (Balchin i wsp., 2016). Proces ten jest szerzej opisany w podrozdziale 3.2.2.

Rolę współdziałających białek opiekuńczych pełnią również holdazy należące do rodziny Hsp40 (określane również jako białka J lub DnaJ) współpracujące z białkami opiekuńczymi z rodziny Hsp70. Domeną odpowiedzialną za oddziaływanie z Hsp70, a zarazem definiującą tę grupę białek jest stanowiąca ok. 70 aminokwasów i zlokalizowana zwykle na N-końcu białka tzw. domena J. Domena J składa się z czterech α -helis (I – IV) oraz pętli zlokalizowanej pomiędzy α -helisą II i III. W obrębie pętli znajduje się silnie zakonserwowany motyw histydynowo-prolinowo-asparaginianowy (HPD) kluczowy dla funkcji pełnionej przez domenę J, jaką jest katalizowanie hydrolizy ATP związanego z Hsp70 (mutacja punktowa w obrębie tego motywu powoduje całkowitą utratę tej funkcji) (Kampinga i Craig, 2010; Alderson i wsp., 2016). Poza domeną J Hsp40 mogą zawierać inne domeny zachowane ewolucyjnie. Na tej podstawie można wyróżnić trzy typy Hsp40: typu I – podobne do DnaJ (*E. coli*) zawierające kolejno domenę J, region bogaty w reszty glicynowe i fenyloalaninowe (łącznie GF), motyw palca cynkowego (ZF) i domenę wiążącą peptyd (PBD); typu II – zawierające kolejno domenę J, łącznik GF i domenę PBD; typu III – obejmujące pozostałe Hsp40 (Rysunek 3) (Qiu i wsp., 2006; Alderson i wsp., 2016).

Mechanizm działania systemu Hsp70/Hsp40 został przedstawiony podczas opisywania rodziny Hsp70 w podrozdziale 3.2.2.

Mimo że białka Hsp40 najczęściej określane są mianem współdziałających białek opiekuńczych (a więc białek pozbawionych miejsca wiązania substratu), wiele białek

Hsp40 (jak np. białka DnaJ w bakteriach) wykazuje zdolność wiązania nienatywnych białek, a więc zdolność typową dla klasycznych białek opiekuńczych. Poza współtworzeniem systemu Hsp70/Hsp40, Hsp40 mogą pełnić również funkcję regulującą, wpływając na aktywność innych białek opiekuńczych np. Hsp90 (Qiu i wsp., 2006).



Rysunek 3. Rozkład domen w strukturze pierwszorzędowej różnych typów białek należących do rodziny Hsp40. Na podstawie Alderson i wsp., 2016.

3.2.2 FOLDAZY

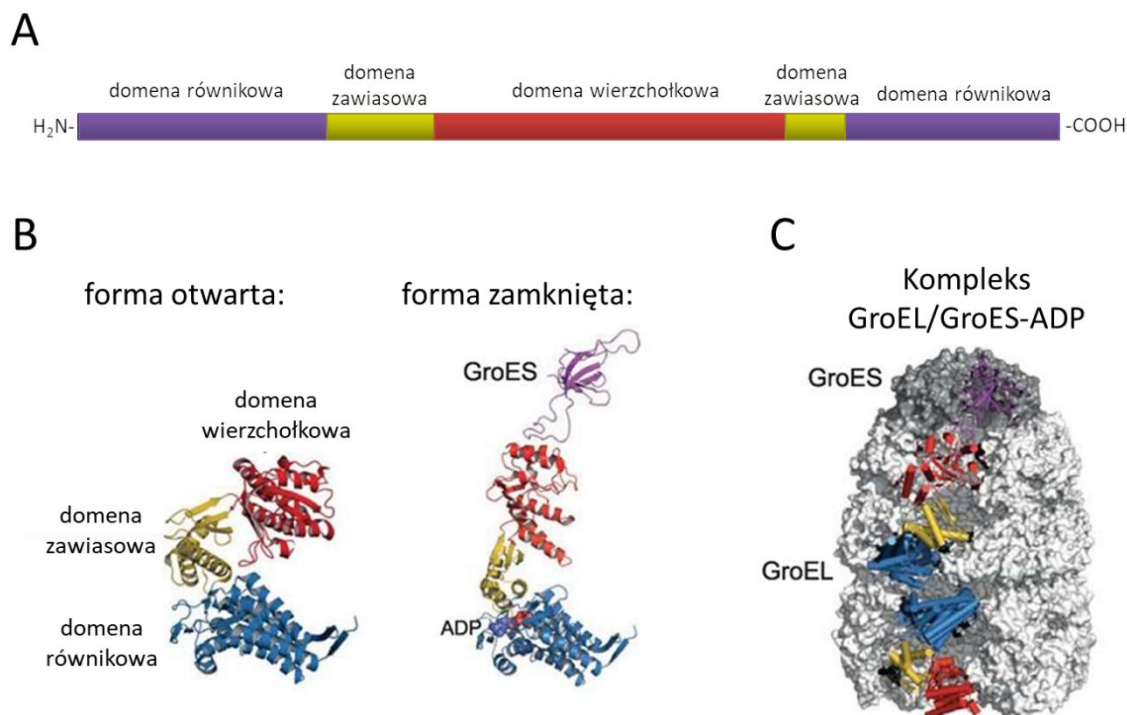
Związane z holdazami białka mogą być przekazywane foldazom, które pomagają im przyjąć właściwą strukturę trzeciorzędową. Foldazy określane są również jako defoldazy, gdyż ich rola polega w niektórych przypadkach na aktywnym rozfałdowaniu białek – dopiero po tym etapie, już bez aktywnego udziału foldaz, następuje ponowne fałdowanie rozfałdowanych białek bądź ich degradacja (Priya i wsp., 2013). Foldazy są głównie reprezentowane przez Hsp60, Hsp70 i Hsp90.

Białka Hsp60 (określane również jako chaperoniny) zawierają w swojej strukturze pierwszorzędowej trzy domeny białkowe: wierzchołkową, zawiasową i równikową (Rysunek 4A). Cechą charakterystyczną białek Hsp60 jest tworzenie olbrzymich wielodomenowych cylindrycznych kompleksów o masie sięgającej nawet 1 MDa. Fałdowanie białek zachodzi wewnątrz tych kompleksów, gdzie każda pojedyncza cząsteczka nienatywnego białka ma stworzone odpowiednie warunki do uzyskania

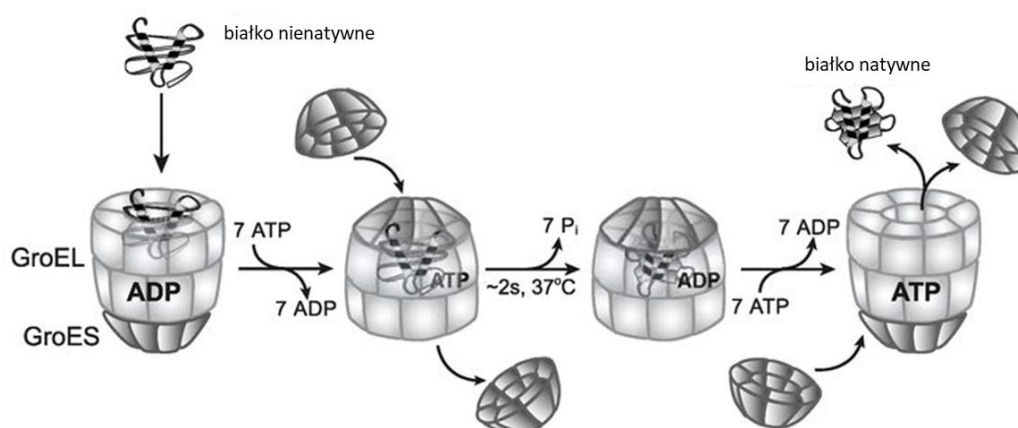
właściwej konformacji. Z tego powodu Hsp60 określane są czasami jako molekularne komory do fałdowania białek (Balchin i wsp., 2016). Białka Hsp60 występują we wszystkich domenach świata ożywionego i mogą być podzielone na dwie grupy.

Przedstawiciele grupy I występują w bakteriach (GroEL), chloroplastach (Cpn60) i mitochondriach (Hsp60) (Trösch i wsp., 2015; Balchin i wsp., 2016). Najlepiej poznane dotąd białko Hsp60 to białko GroEL (ok. 57 kDa), które wchodzi w interakcję z 250-cioma białkami, z czego dla 85-ciu z nich potwierdzono, że są jego substratami (Hartl i Hayer-Hartl, 2009). Domena wierzchołkowa GroEL odpowiada za wiązanie substratu (poprzez ekspozycję hydrofobowych reszt aminokwasowych) oraz oddziaływanie ze współdziałającym białkiem opiekuńczym GroES, domena zawiasowa łączy domenę wierzchołkową i równikową, a domena równikowa stanowi domenę ATPazową (Saibil, 2013; Balchin i wsp., 2016). GroEL tworzy kompleksy składające się z dwóch heptametrycznych pierścieni, a do pełnienia swojej funkcji wymaga udziału współdziałającego białka opiekuńczego GroES tworzącego „wieko” umożliwiające zamknięcie substratu wewnątrz komory GroEL (Rysunek 4B i C) (Trösch i wsp., 2015).

Po związaniu substratu przez jeden z pierścieni GroEL następuje związanie także ATP i GroES, co prowadzi do przejścia białka GroEL z formy otwartej do zamkniętej (Rysunek 4B), powodując przemieszczenie substratu z miejsca wiązania (tj. z domen wierzchołkowych GroEL) do wnętrza struktury cylindrycznej zamykanej przez GroES. W tym samym momencie dochodzi do rozległych zmian konformacyjnych GroEL prowadzących do zwiększenia wewnętrznej przestrzeni struktury cylindrycznej i zmiany jej właściwości hydrofobowych na hydrofilowe. Zostają w ten sposób utworzone odpowiednie warunki do przyjęcia właściwej struktury trzeciorzędowej przez substrat (jego masa cząsteczkowa nie może przekraczać 60 kDa). Proces fałdowania zachodzi do momentu hydrolizy związanego ATP do ADP. Związanie ATP do przeciwległego pierścienia GroEL powoduje oddysocjowanie ADP i GroES, po czym następuje uwolnienie substratu (Rysunek 5) (Balchin i wsp., 2016; Johnston i wsp., 2018). Ze względu na wysokie podobieństwo struktury pierwszorzędowej białek z rodziny Hsp60 zakłada się, że cykl katalityczny chloroplastowego systemu Cpn60 i mitochondrialnego systemu Hsp60 jest podobny (Wang i wsp., 2004).



Rysunek 4. Struktura białka GroEL należącego do rodziny Hsp60 i kompleksu GroEL/GroES. Rozkład domen w strukturze pierwszorzędowej GroEL (**A**), struktura trzeciorzędowa monomeru GroEL (**B**) oraz struktura krystaliczna kompleksu GroEL/GroES (**C**). Strukturę trzeciorzędową monomeru GroEL przedstawiono jako model wstęgowy formy otwartej i zamkniętej (tzn. związanej z GroES). Strukturę krystaliczną kompleksu GroEL/GroES (PDB ID: 1PFQ) przedstawiono jako model czaszowy a dwa monomery GroEL jako model cylindryczno-płytkowy. W panelach A, B i C obowiązuje ujednolicona kolorystyka domen struktury pierwszorzędowej. Na podstawie Balchin i wsp., 2016.



Rysunek 5. Mechanizm działania systemu GroEL/GroES. Na podstawie Balchin i wsp., 2016.

Białka GroEL zaangażowane są w fałdowanie ok. 10% białek proteomu *E. coli*. Chociaż zapobieganie agregacji jest główną funkcją białka GroEL, ostatnie badania pokazują, że kompleks GroEL/GroES może znaczenie przyspieszyć fałdowanie niektórych białek poprzez „wygładzenie” ich krajobrazu energetycznego, pozwalając im uniknąć pułapek kinetycznych w drodze do osiągnięcia struktury natywnej. Niemniej jednak dokładny sposób, w jaki GroEL/GroES przyspiesza fałdowanie białka, nie jest jeszcze jasny (Balchin i wsp., 2016). Mitochondrialne białko Hsp60 bierze udział w apoptozie i regulacji cyklu komórkowego, a także uczestniczy w odpowiedzi immunologicznej w warunkach stresowych (Xanthoudakis i wsp. 1999).

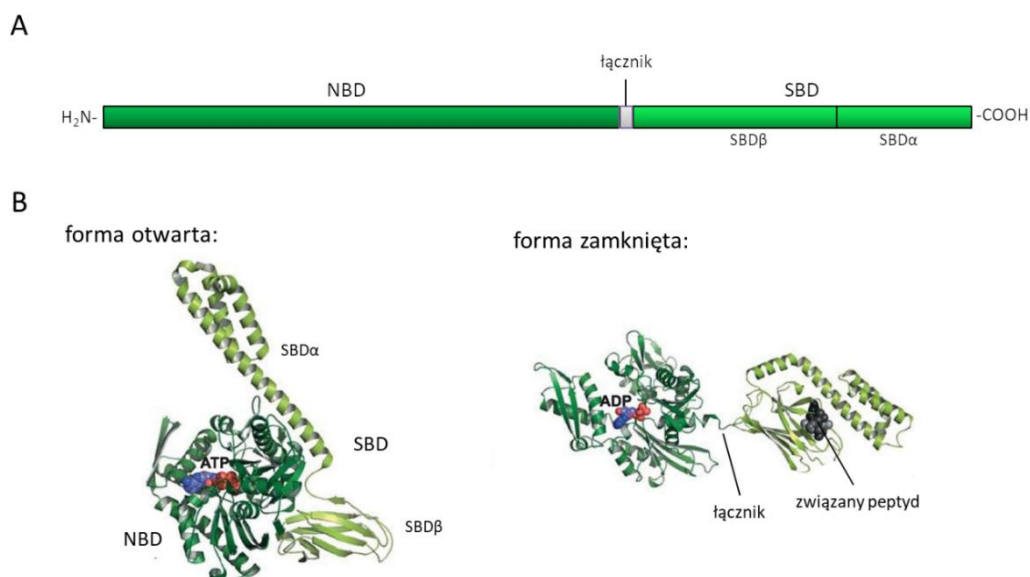
Grupę II chaperonin tworzą termosom występujący u archeonów oraz kompleks CCT określany również jako TRiC występujący w cytozolu eukariontów. Układ domen w strukturze pierwszorzędowej chaperonin grupy II jest podobny jak w przypadku GroEL. Termosom składa się z dwóch okta- lub nonamerycznych pierścieni, natomiast kompleks CCT funkcjonuje jako homo- lub heterooligomer zbudowany z dwóch oktamerycznych pierścieni, tworząc do dziewięciu różnych izoform (Hartl i Hayer-Hartl, 2009; Jeng i wsp, 2015). Mechanizm działania chaperonin należących do grupy II jest podobny do GroEL/GroES, choć rolę GroES przejmuje dodatkowa domena białkowa obecna w Hsp60 grupy II, a cały proces fałdowania zachodzi wolniej (Balchin i wsp., 2016; Johnston i wsp., 2018).

Chaperoniny CCT uczestniczą w fałdowaniu ok. 10% białek proteomu komórki, włączając w to białka aktynowe i tubulinowe cytoszkieletu (Balchin i wsp., 2016), a ich nadekspresja w komórkach *E. coli* zwiększa tolerancję komórki na stres solny i stres osmotyczny (Wang i wsp., 2004).

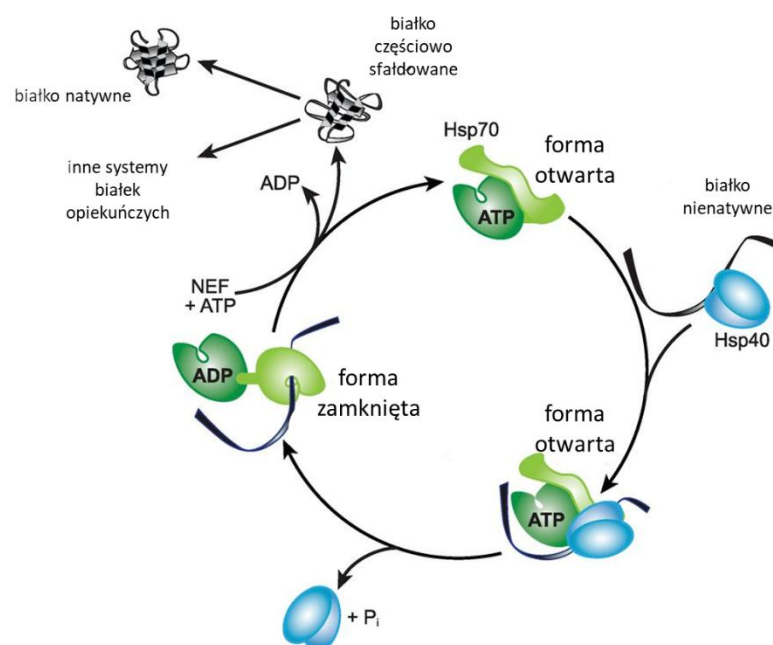
Funkcję foldaz pełnią również białka z rodziny Hsp70 (określane jako DnaK u bakterii oraz Hsc70 u wyższych eukariontów), ale w zupełnie odmienny sposób, gdyż proces fałdowania zachodzi na zewnątrz, a nie jak w przypadku Hsp60 wewnątrz kompleksu białkowego (Hartl i Hayer-Hartl, 2009; Díaz-Villanueva i wsp., 2015). Hsp70 stanowią rodzinę silnie zakonserwowaną ewolucyjnie i występującą obficie w komórkach bakteryjnych i eukariotycznych, stanowiąc w warunkach bezstresowych 0,5-2% całkowitego białka (Goloubinoff, 2017). W strukturze pierwszorzędowej Hsp70 od strony N-końca znajduje się domena wiążąca nukleotyd (NBD) odpowiedzialna za aktywność ATPazową, natomiast od strony C-końca znajduje się domena wiążąca

substrat (SBD), w której obrębie obecna jest poddomena wiążąca peptyd SBD β o strukturze β -kanapki oraz poddomena SBD α określana jako α -helikalne „wieko”. Pomiędzy domenami NBD i SBD występuje łącznik (Rysunek 6A i B) (Johnston i wsp., 2018). Hsp70 za pomocą poddomeny SBD β Hsp70 wiąże się z charakterystycznym motywem występującym u większości białek co 36 aminokwasów. Motyw ten stanowi 4-5 hydrofobowych reszt aminokwasowych zawierających grupę aminową i jest eksponowany u białek nienatywnych (niesfałdowanych, częściowo sfałdowanych bądź niewłaściwie sfałdowanych) (Jeng i wsp., 2015; Trösch i wsp., 2015). Za pomocą domeny NBD zachodzi wiązanie i hydroliza ATP, co prowadzi do znacznych zmian konformacyjnych, które wpływają na oddziaływanie z substratem. Hsp70 związany z ATP charakteryzuje się niskim, a Hsp70 związany z ADP silnym powinowactwem do substratu. Modyfikacje potranslacyjne takie jak fosforylacja i/lub acetylacja, a także obecność substratu i współdziałającego białka opiekuńczego Hsp40 sprzyjają dimeryzacji Hsp70 oraz wiązaniu substratu (Lackie i wsp., 2017). Cytosolowe Hsp70 posiadają także motyw Glu-Glu-Val-Asp (MEEVD) odpowiedzialny za oddziaływanie ze współdziałającymi białkami opiekuńczymi zawierającymi domeny TPR (tj. domeny stanowiące trzy lub większą liczbę powtórzeń 34 reszt aminokwasowych) (Lackie i wsp., 2017; Schopf i wsp., 2017).

Hsp70 rzadko funkcjonują samodzielnie. Zwykle współpracują ze współdziałającymi białkami opiekuńczymi takimi jak czynnik wymiany nukleotydów (NEF) oraz Hsp40, tworząc razem system Hsp70/Hsp40 (Johnston i wsp., 2018). Mechanizm działania kompleksu Hsp70/Hsp40 został dość dobrze poznany u *E. coli* (Rysunek 7), gdzie w pierwszej kolejności ATP i α -helikalne „wieko” wiążą się do domeny NBD białka DnaK (bakteryjny Hsp70). Prowadzi to do przejścia z zamkniętej w otwartą formę białka DnaK charakteryzującą się niskim powinowactwem do substratu. Na tym etapie dochodzi do wiązania substratu (białka-klienta) za pomocą DnaJ (bakteryjny Hsp40). DnaJ wiąże się za pośrednictwem domeny J do domeny NBD DnaK i przekazuje związany substrat do szczeliny wiążącej substrat w domenie SBD DnaK. Następnie hydroliza ATP do ADP prowadzi do oddysocjowania α -helikalnego „wieka” od domeny NBD i zamknięcia przez nie szczeliny wiążącej substrat. W tym samym czasie zwiększa się powinowactwo DnaK do substratu i następuje całkowite



Rysunek 6. Struktura białka DnaK należącego do rodziny Hsp70. Rozkład domen w strukturze pierwszorzędowej DnaK (**A**) oraz struktura trzeciorzędowa formy otwartej i formy zamkniętej DnaK (**B**). Strukturę trzeciorzędową DnaK przedstawiono jako model wstęgowy. W przypadku formy otwartej (PDB ID 4B9Q) α -helikalne „wieko” domeny SBD oddziałuje z domeną NBD, zaś w przypadku formy zamkniętej (PDB ID: 2KHO) domeny SBD i NBD nie oddziałują już ze sobą, a α -helikalne „wieko” zamyka miejsce wiążące substrat. Na podstawie Balchin i wsp., 2016.



Rysunek 7. Mechanizm działania systemu Hsp70/Hsp40 (DnaK/DnaJ). Na podstawie Balchin i wsp., 2016.

przekazanie substratu z DnaJ do DnaK. Ze względu na niską aktywność ATPazową DnaK etap ten jest wspomagany przez DnaJ, który przyspiesza hydrolizę ATP ponad tysiąckrotnie. Uwolnienie ADP jest katalizowane przez czynnik NEF, po czym następuje ponowne związanie ATP i otwarcie α -helikalnego „wieka”, czemu towarzyszy uwolnienie białka-klienta. Jeśli uwolnione białko jeszcze nie uzyskało właściwej konformacji, może być ponownie przejęte przez system DnaK/DnaJ. Cykle wiązania i hydrolizy ATP są powtarzane, aż do momentu uzyskania przez białko-klienta struktury natywnej bądź przejęciu go przez inny system białek opiekuńczych (Wyżewski i wsp., 2014; Lackie i wsp., 2017; Johnston i wsp., 2018).

Hsp70 występują w cytozolu i we wszystkich przedziałach komórkowych dysponujących ATP (jak np. mitochondria czy chloroplasty) i w zależności od ATP sposób uczestniczą we wczesnych etapach fałdowania nowo powstających polipeptydów, w składaniu oligomerów, transporcie transbłonowym oraz w renaturacji lub degradacji białek zdenaturowanych (Alderson i wsp., 2016; Goloubinoff, 2017). Hsp70 mogą współpracować z systemem Hsp100/sHsp (ClpB u bakterii) w dezagregacji dużych agregatów białkowych, z systemem Hsp60 w procesie fałdowania białek lub z systemem Hsp90 w procesie fałdowania białek i w transdukcji sygnału (Trösch i wsp., 2015).

Kolejną rodziną foldaz jest Hsp90. Hsp90 są obecne w cytozolu (HSP90 α i HSP90 β u ssaków) w ER (Grp94), w mitochondriach (TAP1) i w chloroplastach (Jeng i wsp., 2015; Srisutthisamphan i wsp., 2018).

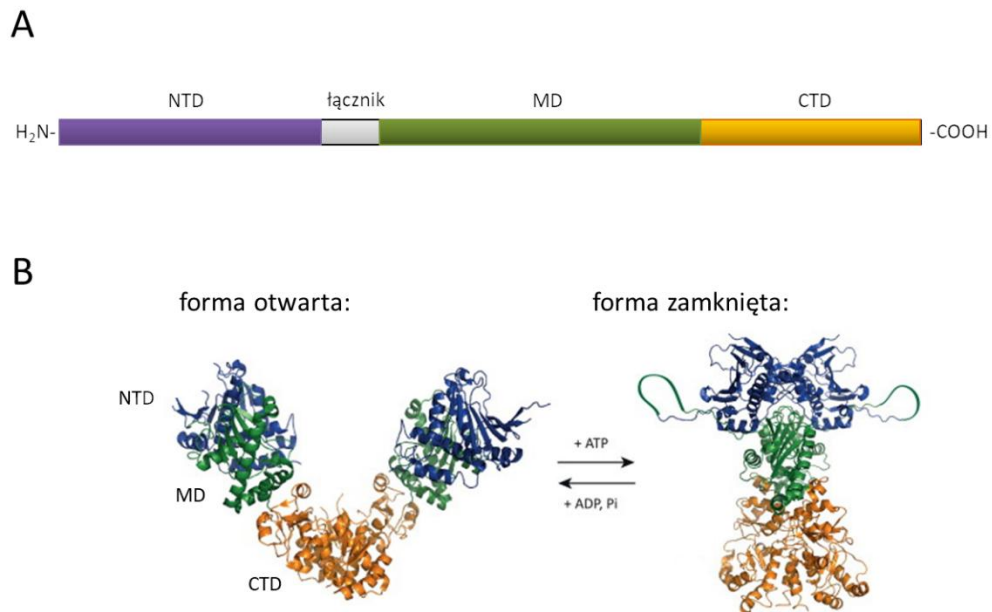
W strukturze pierwszorzędowej Hsp90 wyróżnia się trzy domeny: N-kończową wiążącą nukleotyd (NTD), środkową (MD) i C-kończową (CTD) (Rysunek 8A). Domena NTD stanowi miejsce wiązania ATP, którego hydroliza zachodzi z udziałem domeny MD, która jest jednocześnie miejscem wiązania substratu. Domena CTD odgrywa istotną rolę w procesie dimeryzacji i odpowiada za oddziaływanie ze współdziałającymi białkami opiekuńczymi poprzez motyw MEEVD (Schopf i wsp., 2017). Motyw ten nie jest obecny u Hsp90 bakteryjnych oraz Hsp90 zlokalizowanych w mitochondriach, chloroplastach i ER (Oh i wp., 2014). Pomiedzy domenami NTD i MD znajduje się długi, elastyczny i często obdarzony silnym ładunkiem łącznik, który jest kluczowy dla funkcjonowania cytozolowego Hsp90 (Schopf i wsp., 2017). Hsp90 funkcjonuje

w formie homodimerów, a przy braku związanego nukleotydu występuje w formie otwartej o strukturze przypominającej literę „V” (Rysunek 8B).

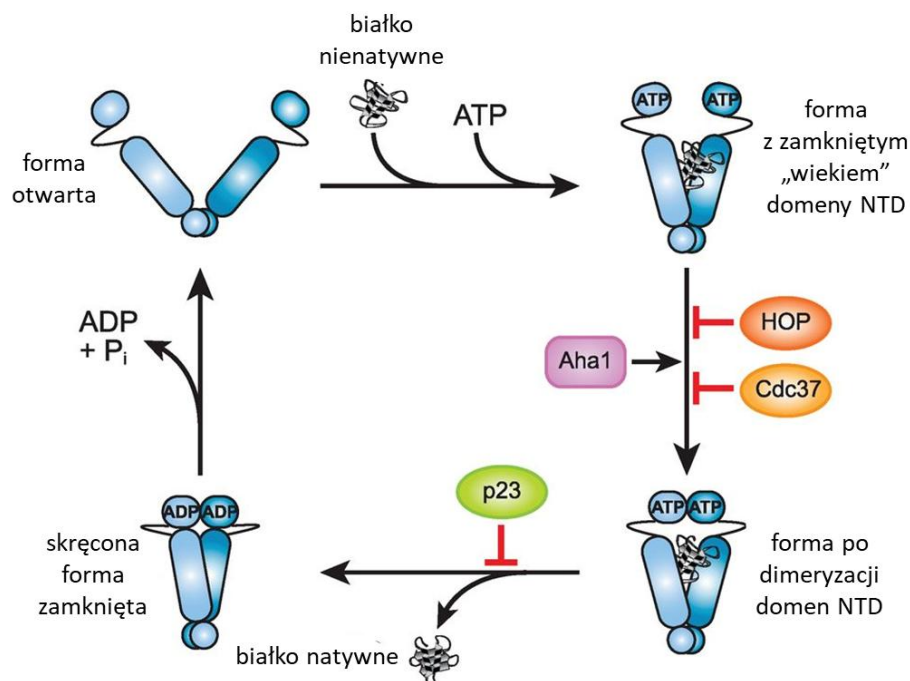
Spośród białek należących do rodziny Hsp90 najlepiej poznano mechanizm działania cytozolowego białka Hsp90. Hydrolizie ATP towarzyszą znaczące zmiany konformacyjne Hsp90, które wpływają na oddziaływanie z substratem podobnie jak w przypadku Hsp60 i Hsp70 (Trösch i wsp., 2015; Johnston i wsp., 2018). Substrat jest dostarczany przez system Hsp70/Hsp40. Po związaniu ATP krótki fragment domeny NTD, tzw. „wieko”, ulega zamknięciu, umieszczając ATP w kieszeni wiążącej nukleotyd. Następuje dimeryzacja domen NTD, umożliwiając w ten sposób związanie substratu do domeny MD. Bliskie sąsiedztwo domen NTD i MD prowadzi do skręcenia ze sobą obu monomerów i przejścia w formę zamkniętą białka. Kolejnym etapem jest hydroliza ATP do ADP za pomocą domeny MD, oddysocjowanie domen NTD i uwolnienie sfałdowanego białka, a następnie ADP. W efekcie Hsp90 występuje ponownie w formie otwartej i może zaopiekować się kolejnym substratem (Rysunek 9) (Balchin i wsp., 2016; Johnston i wsp., 2018).

Zidentyfikowano ponad 20 współdziałających białek opiekuńczych, które mają wpływ na aktywność ATPazy oraz zmiany konformacyjne Hsp90 (Lackie i wsp., 2017; Johnston i wsp., 2018), np. współdziałające białko opiekuńcze HOP pośredniczy w przekazywaniu substratu z Hsp70 do Hsp90, a Cdc37 odpowiada za oddziaływanie z substratami. Aktywator aktywności ATPazy Hsp90 1 (Aha1) wiąże się do domen MD i NTD Hsp90, ułatwiając przejście do formy zamkniętej i przyspieszając hydrolizę ATP. Białko p23 natomiast hamuje hydrolizę ATP, stabilizując formę zamkniętą Hsp90, ułatwiając przy tym fałdowanie substratu (Balchin i wsp., 2016; Li i wsp., 2018).

Poprzez swoją aktywność foldazy Hsp90 uczestniczy w transdukcji sygnału, kontroli cyklu komórkowego i wewnątrzkomórkowym transporcie białek (Wang i wsp., 2004; Srisutthisamphan i wsp., 2018). Hsp90 są absolutnie niezbędne w komórkach eukariotycznych, natomiast w bakteriach ich rolę mogą przejmować inne białka opiekuńcze takie jak Hsp60, a u niektórych bakterii i archeonów Hsp90 w ogóle nie występują (Oh i wsp., 2014).



Rysunek 8. Struktura białka należącego do rodziny Hsp90. Rozkład domen w strukturze pierwszorzędowej Hsp90 z drożdży (**A**) oraz model wstępny struktury trzeciorzędowej formy otwartej bakteryjnego Hsp90 (PDB ID: 2IQQ) oraz formy zamkniętej Hsp90 drożdży (PDB ID: 2CG9) (**B**). Na podstawie Balchin i wsp., 2016.



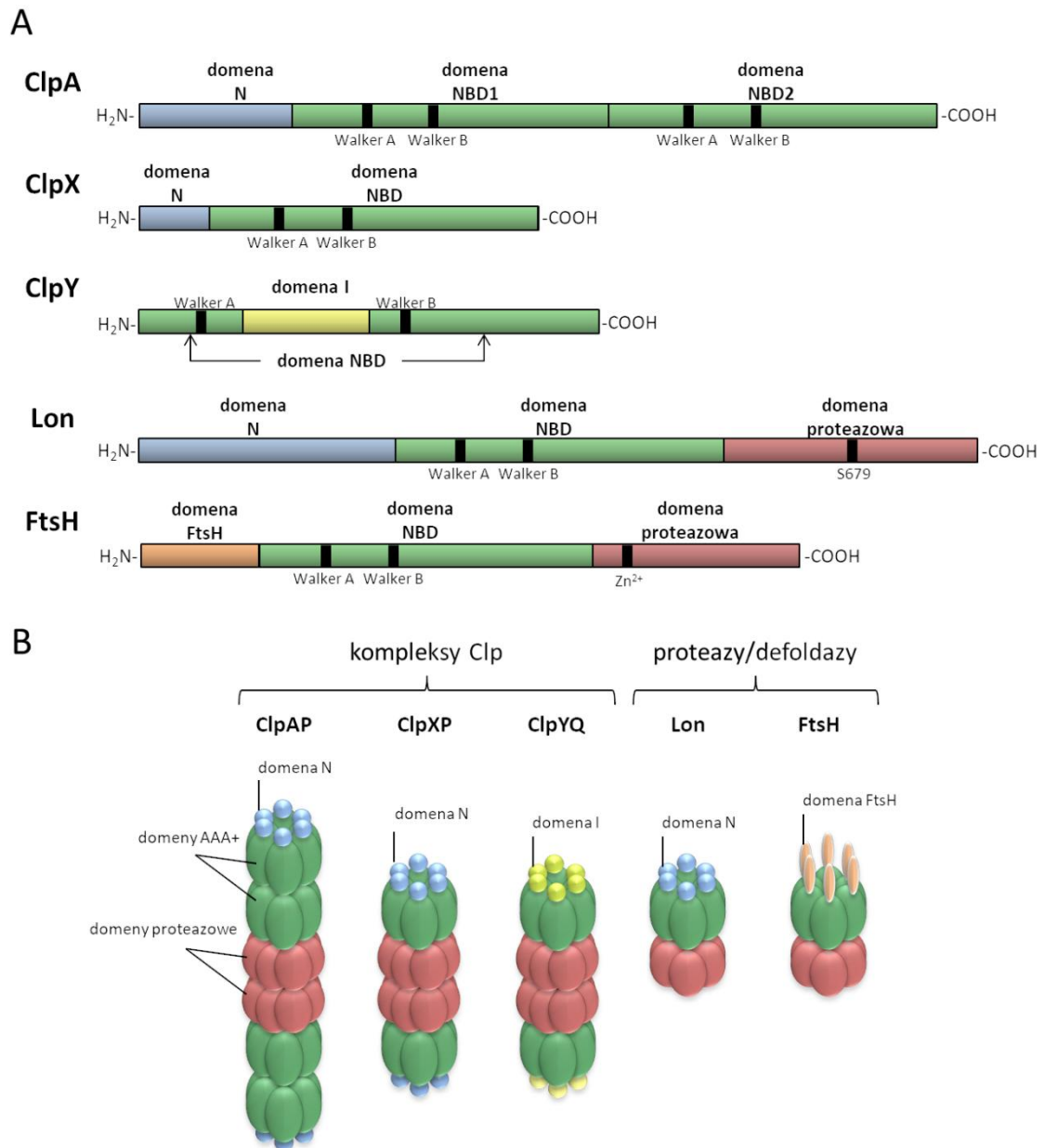
Rysunek 9. Mechanizm działania białek należących Hsp90. Na podstawie Balchin i wsp., 2016.

Aktywnością foldazową dysponują również niektóre białka z nadrodziny AAA+, do których zaliczane są proteazy AAA+ (Lon i FtsH) oraz niektórzy przedstawiciele z rodziny Hsp100 (ClpA, ClpX czy ClpY). Rozfałdowywanie białka jest integralną częścią procesu degradacji białek prowadzonym przez proteazy AAA+. Ze względu na niewielkie rozmiary wejścia do komory proteolitycznej proteazy AAA+ po związaniu substratu muszą go najpierw rozfałdować (Gur i wsp., 2012, Kirstein i wsp. 2009), z tego powodu aktywność opiekuńcza tej grupy białek często określana jest jako aktywność defoldazowa, a nie foldazowa.

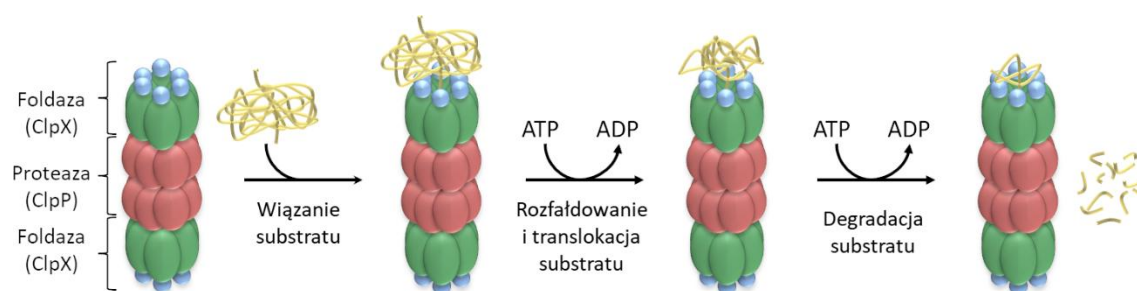
Cechą charakterystyczną białek należących do nadrodziny AAA+ jest obecność domeny AAA+ z charakterystycznymi motywami takimi jak: Walker A i Walker B, sensory 1 i 2 oraz palec argininowy (Saibil, 2013). Domena AAA+ jest istotna dla wiązania i hydrolizy ATP, oligomeryzacji oraz jest odpowiedzialna za aktywność defoldazową (Leonhard i wsp., 1999; Doyle i wsp., 2013; Johnston i wsp., 2018). Ze względu na liczbę domen AAA+ białka AAA+ dzieli się dwie klasy: klasę I z dwoma tandemowymi domenami AAA+: NBD1 i NBD2 oraz klasę II z jedną domeną AAA+ (określaną po prostu jako NBD). W przypadku *E. coli* do klasy I należy ClpA, a do klasy II ClpX i ClpY oraz białka Lon i FtsH (Saibil, 2013) (Rysunek 10A). Częsteczką białek FtsH i Lon *E. coli* zawiera poza domeną AAA+ także domenę proteazową, te białka są zatem defoldazami/proteazami, natomiast białka ClpA, X i Y tworzą nadcząsteczkowe struktury (nazywane kompleksami Clp) z proteazami ClpP lub ClpQ. FtsH i Lon *E. coli* tworzą heksameryczne pierścienie, zaś ClpAP, ClpXP i ClpYQ są oligomerami składającymi się z połączonych ze sobą pierścieni w taki sposób, że dwa heksamery pełniące rolę defoldazy flankują tetradekamer, który pełni rolę proteazy (Rysunek 10B) (Kirstein i wsp., 2009).

Ogólny mechanizm działania foldaz z rodziny Hsp100 oraz proteaz/defoldaz Lon i FtsH jest dość podobny, mianowicie po rozpoznaniu substratu (najczęściej przez określone motywy domeny NBD lub przez dodatkowe białka adaptorowe) dochodzi – z wykorzystaniem energii pochodzącej z hydrolizy ATP – do rozfałdowania substratu do formy nadającej się do wprowadzenia do komory katalitycznej utworzonej przez sześć domen proteazowych (FtsH i Lon) lub czternaście kopii ClpP/ClpQ (kompleks Clp) (Rysunek 11). W zależności od rodzaju substratu i proteazy AAA+ całkowite

rozfałdowanie i degradacja substratu może wymagać od kilku do nawet kilkuset cykli wiązania i hydrolizy ATP (Gur i wsp., 2012; Doyle i wsp., 2013).



Rysunek 10. Struktura białek AAA+ – Clp, FtsH, Lon. Rozkład domen w strukturze pierwszorzędowej białek ClpA, ClpX, ClpY, Lon i FtsH (**A**) oraz struktura oligomeryczna kompleksów Clp i białek Lon i FtsH (**B**). Na podstawie Kirstein i wsp., 2009 oraz Alexopoulos i wsp., 2012.



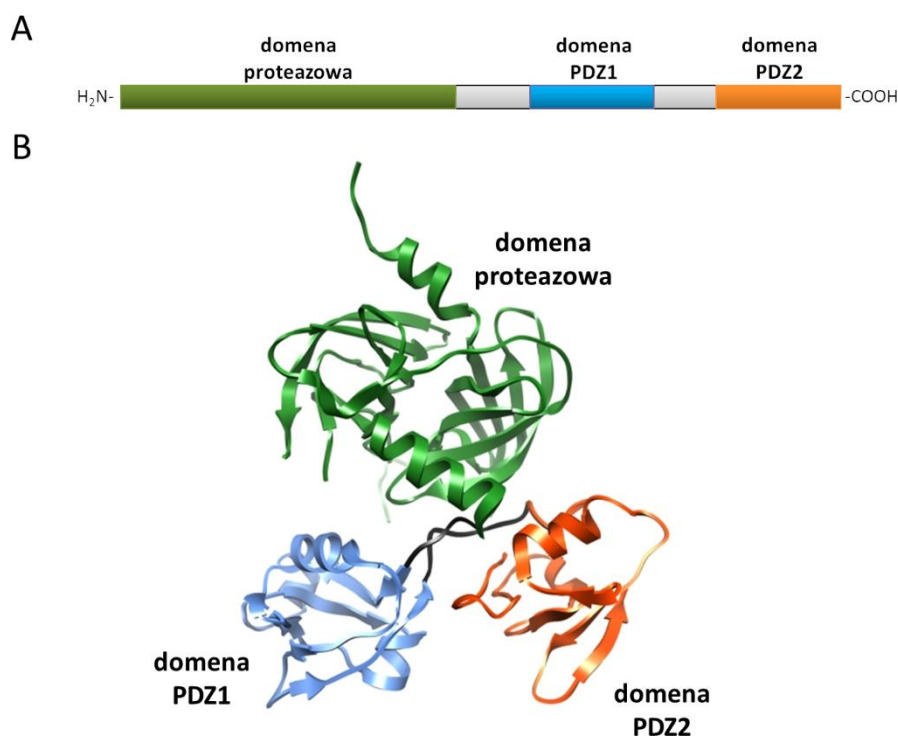
Rysunek 11. Mechanizm działania proteaz AAA+ na przykładzie kompleksu ClpXP. Na podstawie Kirstein i wsp., 2009 oraz Alexopoulos i wsp., 2012.

Proteazy/defoldazy Lon u *E. coli* przede wszystkim odpowiedzialne są za usuwanie nieprawidłowo sfałdowanych białek cytoplazmatycznych, ale są zaangażowane również w obrót metaboliczny białek regulatorowych. Proteazy/defoldazy FtsH u *E. coli*, jako że są białkami błonowymi, odpowiadają za obrót metaboliczny białek błonowych, choć katalizują degradację także białek cytoplazmatycznych. Poprzez degradację białek własnych i wirusowych FtsH pełni kluczową rolę dla utrzymania homeostazy komórkowej (Kirstein i wsp., 2009; Baranek i wsp., 2011). Kompleksy proteolityczne z rodziny Hsp100 poza degradacją nieprawidłowo sfałdowanych białek biorą udział w wielu procesach regulacyjnych. Dla ClpP wykazano, że bierze udział w regulowaniu takich procesów, jak podział komórek, tolerancja na stres, wirulencja, różnicowanie morfologiczne i odporność na antybiotyki (Culp i Wright, 2017).

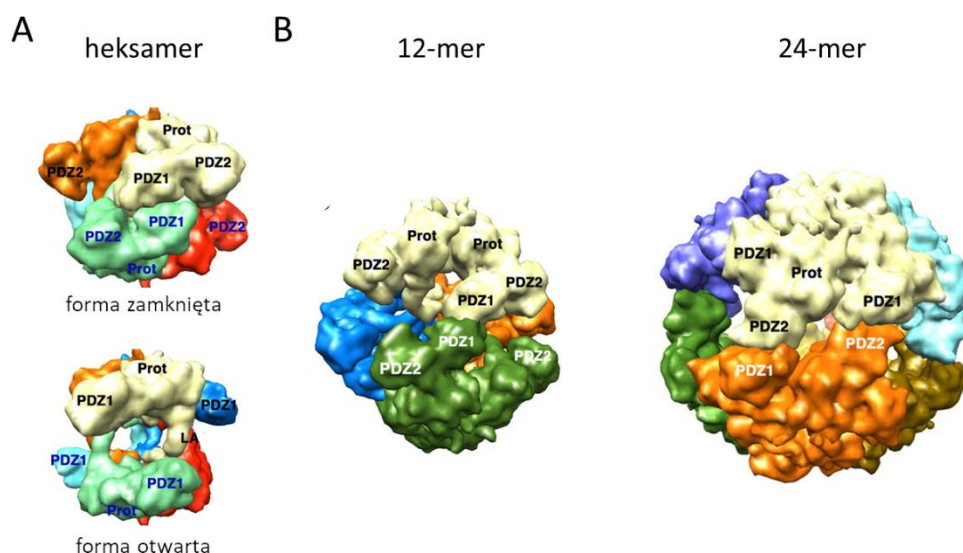
Aktywność opiekuńcza o charakterze foldazy została zidentyfikowana również w przypadku proteaz funkcjonujących niezależnie od ATP, np. u niektórych proteaz z grupy Deg. Proteazy Deg (początkowo określane jako DegP) są endopeptydazami serynowymi występującymi we wszystkich domenach świata ożywionego, włączając archeony, bakterie i eukarionty (Schuhmann i wsp., 2012). Zostały po raz pierwszy wykryte i zbadane u *E. coli* jako białka, które poprzez hydrolizę uszkodzonych wysoką temperaturą białek peryplazmatycznych umożliwiają wzrost bakterii w temperaturze powyżej 42°C (Lipińska i wsp., 1988; Strauch i Beckwith, 1988). Według bazy MEROPS

(wersja 12.0) proteazy Deg należą do klanu PA, rodziny chymotrypsyny (S1) i podrodziny peptydazy DegP *E. coli* (S1C), którą cechuje obecność domeny katalitycznej typu chymotrypsyny z triadą HDS (His-Asp-Ser) stanowiącą centrum katalityczne białka. Większość proteaz Deg zawiera w swojej strukturze od 1 do 4 domen PDZ [nazwa tych domen pochodzi od pierwszych liter nazw białek, dla których zostały po raz pierwszy opisane tj.: PSD-95 (ang. *post synaptic density protein*), Dlg i ZO-1 (Ponting, 1997)], odpowiedzialnych za oddziaływanie typu białko-białko i zawierających motywy odpowiadające za rozpoznawanie C-końca substratów białkowych. Do najlepiej zbadanych proteaz Deg należą DegP, DegQ i DegS u *E. coli* oraz HtrA1-4 i Tysnd1 u ssaków (Schuhmann i wsp., 2012).

Zarówno DegP, jak i DegQ wykazuje *in vitro* aktywność proteazy i białka opiekuńczego, wykazano bowiem, że DegP i DegQ dysponują aktywnością typu holdazy i foldazy (Spiess i wsp., 1999; Bai i wsp., 2011; Malet i wsp., 2012). Proteazy DegP i DegQ oprócz domeny proteazowej zawierają po dwie domeny PDZ (Rysunek 12A i B). Domeny PDZ u tych proteaz są dość elastyczne, domeny proteazowe zaś uczestniczą w tworzeniu trimery – podstawowej jednostki strukturalnej charakterystycznej dla wszystkich białek z grupy Deg (Clausen i wsp., 2002). Dimeryzacja trimerów prowadzi do powstania struktury heksamerycznej, która u DegP dzięki elastyczności domen PDZ występuje w formie otwartej oraz zamkniętej (Rysunek 13A). W formie otwartej domeny PDZ umożliwiają dostęp do wnętrza heksamerycznej „klatki”, w formie zamkniętej dostęp ten jest przez nie blokowany (Ortega i wsp., 2009). Struktura heksameryczna jest prawdopodobnie formą nieaktywną białka DegP, a struktury 12-, 15-, 18-, 24- i 30-meru stanowią aktywną formę białka (zarówno proteolitycznie, jak i opiekuńczo), którą DegP przyjmuje w obecności substratu (Rysunek 13B). Przejście z formy nieaktywnej w aktywną zachodzi drogą allosteryczną i jest możliwe przez oddziaływanie między sąsiednimi trimerami poprzez domeny PDZ1 i PDZ2 (Jiang i wsp., 2008; Krojer i wsp., 2008; Kim i wsp., 2011). Podobnie DegQ zmienia swój stan oligomeryczny z nieaktywnej formy heksamerycznej w zależności od stężenia substratu na aktywny 12- bądź 24-mer (Sawa i wsp., 2011).



Rysunek 12. Struktura proteazy DegP należącej do grupy Deg. Rozkład domen w strukturze pierwszorzędowej DegP (**A**) oraz struktura trzeciorzędowa monomeru DegP (PDB ID: 1KY9) (**B**). Na podstawie Ortega i wsp., 2009.



Rysunek 13. Struktury oligomeryczne proteazy DegP należącej do grupy Deg. Nieaktywna struktura heksameryczna otwarta i zamknięta DegP (PDB ID: 1KY9) (**A**) oraz aktywne struktury 12- (PDB ID: 2ZLE) i 24-meru (PDB ID: 3CS0) DegP (**B**). W panelu A rozróżniono kolorystycznie poszczególne monomery, w panelu B zaś poszczególne trimery. Prot/PDZ1/PDZ2 – domena proteazowa/PDZ1/PDZ2; LA – pętla LA. Na podstawie Ortega i wsp., 2009.

U DegP do wykształcenia się aktywności proteolitycznej wymagana jest obecność reszty seryny w miejscu katalitycznym białka (S210) oraz domeny PDZ1, natomiast do wykształcenia się aktywności typu foldazy, ani S210 ani żadna z domen PDZ nie jest wymagana (Spiess i wsp., 1999; Iwanczyk i wsp., 2007). Substytucja S210A nie pozbawia DegP także jego aktywności holdazowej (Skórko-Glonek i wsp., 2007). Mutacja punktowa w miejscu katalitycznym białka nie miała również wpływu na aktywność holdazową i foldazową DegQ, ale w przeciwieństwie do DegP delekcja jednej lub obu domen PDZ prowadziła do pozbawienia DegQ jego aktywności foldazowej *in vitro* (Bai i wsp., 2011; Malet i wsp., 2012). Za aktywność opiekuńczą u DegQ odpowiedzialne są zatem domeny PDZ, a u DegP domena proteazowa (ale nie miejsce S210) (Jiang i wsp., 2008; Bai i wsp., 2011; Malet i wsp., 2012). W przypadku DegP aktywność proteolityczna, jak i opiekuńcza w dużym stopniu zależy od temperatury w taki sposób, że DegP w niskich temperaturach (<28 °C) działa głównie jako białko opiekuńcze, natomiast w wysokich temperaturach (>28°C) głównie jako proteaza (Spiess i wsp., 1999; Ortega i wsp., 2009). Jednak nie jest to regułą, gdyż niektóre źle sfałdowane białka peryplazmatyczne mogą być degradowane przez DegP także w temperaturze 25°C (Skórko-Glonek i wsp., 2008; Subrini i Betton, 2009).

Fizjologicznego znaczenia aktywności opiekuńczej DegP nadaje fakt, że nadekspresja nieaktywnego proteolitycznie DegP (z mutacją S210A) u mutantów insercyjnych *degP* jest wystarczająca do przywrócenia zdolności bakterii do wzrostu w wysokich temperaturach (Spiess i wsp., 1999). Wzmożona ekspresja proteaz Deg u *E. coli* zachodzi w różnych warunkach stresowych takich jak wysoka temperatura, stres oksydacyjny czy obecność czynników redukujących, a ich rola polega głównie na usuwaniu nieodwracalnie uszkodzonych białek peryplazmy (Skórko-Glonek i wsp., 1999).

Aktywność foldazy zidentyfikowano także u białek PDI oraz PPI, które odpowiadają za tworzenie i modyfikację rozmieszczenia wiązań dwusiarczkowych w procesie fałdowania białek (tzw. oksydacyjne fałdowanie białek).

Izomeraza dwusiarczkowa (PDI) jest multifunkcyjnym białkiem siateczki śródplazmatycznej u eukariontów i peryplazmy u bakterii. Cai i wsp. w 1994 po raz pierwszy wykazali, że PDI dysponuje aktywnością polegającą na renaturacji białek pozbawionych mostków dwusiarczkowych, działając jako foldaza niezależna od ATP.

Ujawniono także, że PDI wykazuje wyższe powinowactwo do białek niewłaściwie sfałdowanych aniżeli do białek natywnych (Khan i wsp., 2016). Aktywność foldazowa jest zależna zarówno od stanu redoks, jak i od stężenia PDI. W stanie utlenionym PDI ma bardziej otwartą konformację niż w stanie zredukowanym, ułatwiając dostęp do miejsca wiązania substratu (Ali Khan i Mutus, 2014). W wysokich stężeniach PDI aktywność foldazowa tego białka jest tak wydajna, że praktycznie wszystkie cząsteczki substratu występują we właściwej konformacji, w niskich stężeniach PDI zaś działanie tego białka jest odwrotne, gdyż wówczas PDI promuje tworzenie międzycząsteczkowych mostków dwusiarczkowych, prowadząc do tworzenia dużych amorficznych agregatów (Khan i wsp., 2016). PDI odgrywa istotną rolę w fizjologii, jak i w patofizjologii stanów chorobowych człowieka, dlatego jest to białko coraz częściej analizowane w celach diagnostycznych i terapeutycznych (Khan i wsp., 2016).

Izomerazy peptydylo-prolilowe cis-trans (rodzina PPI) odpowiedzialne są za katalizowanie izomeracji cis-trans wiązań peptydowych X-Pro (gdzie X jest dowolnym aminokwasem). Izomeryzacja cis-trans wiązania peptydowego X-Pro jest etapem ograniczającym szybkość fałdowania. Zadaniem białek PPI jest znaczne przyspieszenie tego etapu (około 300-krotnie), co obserwowane jest zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*. (Olejnik i Nuc, 2018). PPI dysponują aktywnością foldazy, która jest niezależna od aktywności izomerazy. Jedną z nich jest peryplazmatyczne białko SurA, które występuje u bakterii gram ujemnych takich jak *E. coli*. W strukturze pierwszorzędowej SurA wyróżnia się cztery domeny: domena N-końcowa, dwie domeny PPI (P1 i P2) oraz domena C-końcowa. Wariant pozbawiny domen PPI wykazuje aktywność opiekuńczą *in vitro*, co wskazuje, że za aktywność opiekuńczą odpowiedzialne są domeny N i C-końcowa. Białko SurA uczestniczy w fałdowaniu i oligomeryzacji białek błony zewnętrznej takich jak: LamB, OmpA, OmpC i OmpF, a mutanty insercyjne *surA* wykazywały obniżoną przeżywalność bakterii w fazie stacjonarnej. Dla białka SurA domeny PPI wydają się nie być niezbędne dla pełnienia przez to białko swoich funkcji *in vivo*, sugerując że SurA funkcjonuje raczej jako foldaza aniżeli białko PPI (Bitto i McKay, 2002).

Innym dobrze poznanym białkiem należącym do rodziny PPI posiadającym aktywność foldazy (i holdazy) jest prokariotyczny czynnik inicjujący (TF), jedno z najobficiej reprezentowanych białek bakteryjnych. TF może występować w formie

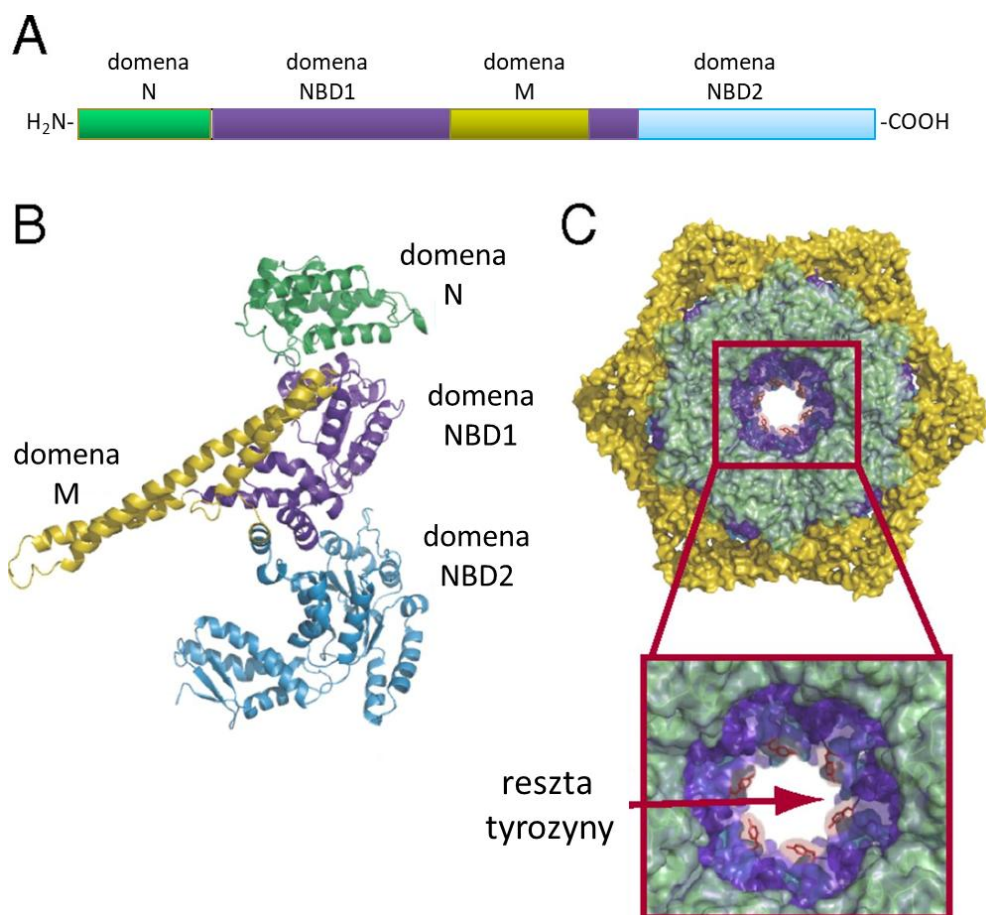
monomerycznej i dimerycznej, a związanie substratu zwykle prowadzi do monomeryzacji. TF jest zlokalizowany w pobliżu tzw. tunelu wyjściowego rybosomu (w obrębie większej podjednostki), co daje mu możliwość oddziaływania z nowo powstającymi łańcuchami polipeptydowymi i zapobiegania w ten sposób ich agregacji z już gotowymi innymi białkami (aktywność holdazowa TF). Ponadto aktywnie uczestniczy w fałdowaniu nowo powstających białek (aktywność foldazowa TF) (Halдар i wsp., 2017).

3.2.3 DEZAGREGAZY

Agregaty białkowe, które są efektem nefizjologicznych oddziaływań pomiędzy niewłaściwie sfałdowanymi białkami poprzez wyeksponowane hydrofobowe odcinki łańcucha polipeptydowego, mogą występować zarówno w stanie rozpuszczalnym, jak i nierozpuszczalnym, a także zarówno w zorganizowanej (np. amyloidy), jak i w niezorganizowanej (amorficznej) formie (Mokry i wsp., 2015). Holdazy i foldazy nie potrafią tak wiązać zdenaturowanych białek wewnątrz agregatów białkowych, aby oddzielić je od pozostałych składników agregatu, dlatego muszą polegać na białkach o aktywności dezagregazy, które mają zdolność do dezagregacji, czyli uwalniania z agregatów białkowych pojedynczych polipeptydów (Díaz-Villanueva i wsp., 2015; Mokry i wsp., 2015; Suss i Reichmann, 2015). Klasycznym przykładem białek o takiej aktywności są bakteryjne ClpB oraz drożdżowe Hsp104 z rodziny Hsp100. Homologami tych białek są Hsp101 (ClpB1) występujące w cytozolu roślin oraz Hsp78 występujące w mitochondriach drożdży. Niemniej jednak najlepiej zbadane są jak dotąd ClpB u bakterii oraz Hsp104 u drożdży (Doyle, 2013).

Jak już wspomniano białka z rodziny Hsp100 należą do nadrodziny AAA+, której cechą charakterystyczną jest obecność domeny AAA+ (NBD) (Johnston i wsp., 2018, Doyle i wsp., 2013). W przypadku bakteryjnego ClpB domeny NBD1 i NBD2 zawierają motywy Walker A i Walker B odpowiedzialne za wiązanie i hydrolizę ATP. W strukturze pierwszorzędowej ClpB i Hsp104 obecna jest również domena N, która odpowiada za wiązanie i destabilizację agregatów białkowych, co stanowi etap poprzedzający rozfałdowanie zagregowanych białek i właściwą dezagregację (Rosenzweig i wsp., 2015), a pomiędzy domenami NBD1 i NBD2 znajduje się domena M, która jest

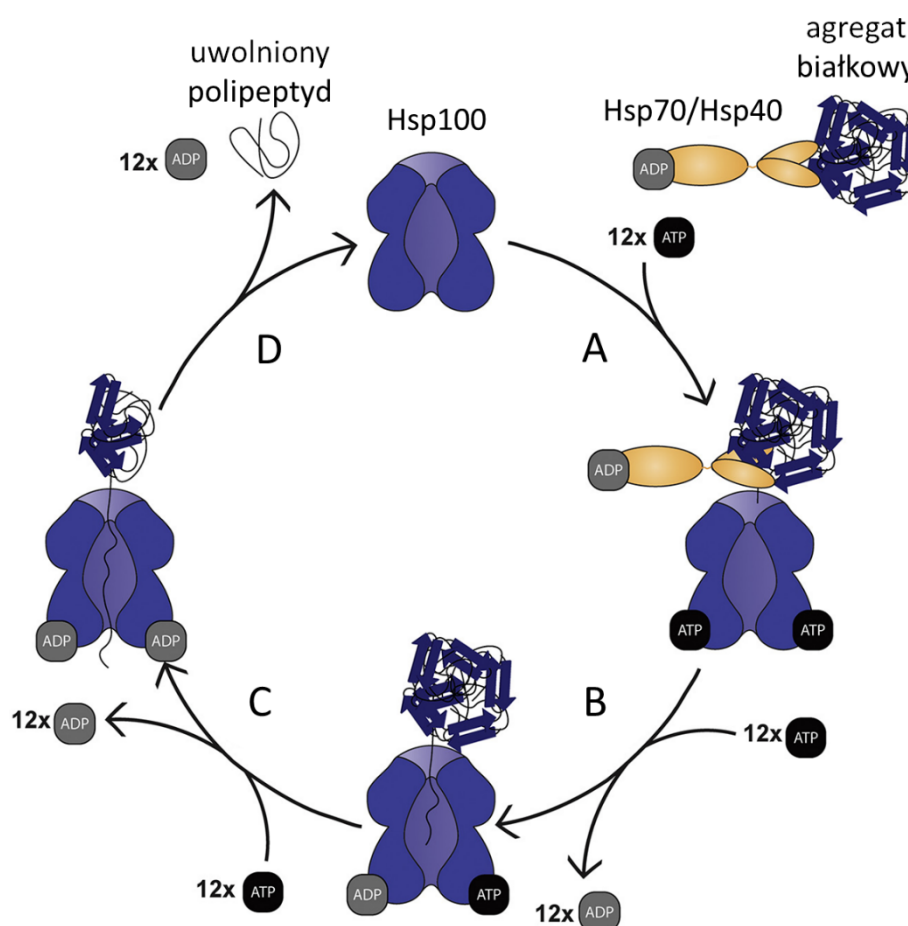
zbudowana z czterech α -helis uczestniczących w oddziaływaniu z substratem (Rysunek 14A i B). Kluczową rolę w samym procesie dezagregacji odgrywa reszta tyrozyny w domenie NBD1 (Rysunek 14C).



Rysunek 14. Struktura białka ClpB należącego do rodziny Hsp100. Rozkład domen w strukturze pierwszorzędowej ClpB (A), struktura trzeciorzędowa monomeru ClpB (B) oraz struktura krystaliczna heksameru ClpB (PDB ID: 1QVR) (C). Strukturę trzeciorzędową przedstawiono jako model wstęgowy. W panelach A, B i C obowiązuje ujednolicona kolorystyka domen struktury pierwszorzędowej ClpB. Na podstawie Rosenzweig i wsp., 2015.

Proces uwalniania pojedynczych polipeptydów z agregatów białkowych zachodzi kilkuetapowo. W pierwszej kolejności agregaty białkowe są wiązane i dostarczane do Hsp100 za pośrednictwem systemu Hsp70/Hsp40 (Rysunek 15A). W obecności ATP Hsp100 tworzą heksameryczne struktury pierścieniowe otaczające centralny kanał, wewnątrz którego znajdują się pętle zawierające hydrofobowe i aromatyczne reszty aminokwasowe odpowiedzialne za oddziaływanie z substratem. Związanie i hydroliza

ATP powoduje konformacyjne zmiany, które prowadzą do przeciągania związanych substratów przez centralny kanał heksameru, uwalniając stopniowo pojedyncze polipeptydy z agregatu białkowego (Rysunek 15B-D). Uwolnione polipeptydy mogą być następnie renaturowane spontanicznie bądź z udziałem innych białek opiekuńczych (Saibil, 2013; Mokry i wsp., 2015; Johnston i wsp., 2018).



Rysunek 15. Mechanizm działania białka należącego do rodziny Hsp100. W pierwszej kolejności następuje związanie ATP oraz agregatu białkowego z Hsp100 dostarczonego za pośrednictwem systemu Hsp70/Hsp40 (**A**). Kolejne cykle hydrolizy ATP prowadzą do przeciągania związanego substratu przez centralny kanał Hsp100 (**B** i **C**), czego efektem jest uwolnienie indywidualnych białek z agregatu (**D**). Na podstawie Johnston i wsp., 2018.

Główną funkcją Hsp104 jest dezagregacja agregatów powstałych na skutek denaturacji termicznej białek. Białko to zostało zidentyfikowane ponad 20 lat temu jako białko opiekuńcze odpowiedzialne za tolerancję na wysoką temperaturę, traktowanie etanolem oraz niektórymi metalami ciężkimi (Glover i Lindquist, 1998)

Drożdżowe mutanty insercyjne *hsp104* mają 10-1000-krotnie wyższą śmiertelność w temperaturze 50°C niż szczepy dzikie. Zdolność do dezagregacji białek Hsp104 wydaje się być niezbędna dla komórek nie tylko w warunkach niekorzystnych, ale także w całym okresie życia komórki. Zmniejszona aktywność białek Hsp104 prowadzi bowiem do przyspieszonego starzenia się komórek drożdży (Erjavec i wsp. 2007; Mokry i wsp., 2015).

3.3 CHLOROPLASTOWE BIAŁKA OPIEKUŃCZE *A. THALIANA*

Chloroplastowe białka opiekuńcze obejmują wszystkie rodziny białek Hsp tj. sHsp, Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90 i Hsp100, a także białka z rodzin FtsH, Lon i grupy Deg. W porównaniu z bakteryjnymi i eukariotycznymi białkami opiekuńczymi obecnymi w cytozolu i w ER funkcje chloroplastowych białek opiekuńczych są bardzo słabo poznane (Trösch i wsp., 2015).

3.3.1 sHSP

Rośliny dysponują wieloma białkami sHsp, ale w przypadku *A. thaliana* tylko jedno z nich, Hsp21, zlokalizowane jest w chloroplastach (Waters, 2013). W strukturze pierwszorzędowej można wyróżnić unikatowy region od strony N-końca z kilkoma zakonserwowanymi resztami metioniny odpowiedzialnymi prawdopodobnie za rozpoznawanie hydrofobowych odcinków częściowo niesfałdowanych białek. W warunkach stresu oksydacyjnego reszty metioniny ulegają utlenieniu. Proces ten jest odwracalny dzięki zlokalizowanej w chloroplastach reduktazie sulfotlenku metioniny, która przywraca w ten sposób aktywność opiekuńczą Hsp21 (Gustavsson i wsp., 2002). Do zwiększonej ekspresji białka Hsp21 w większości organów roślinnych dochodzi w warunkach stresu wysokiej temperatury, natomiast w warunkach optymalnych ekspresja Hsp21 ogranicza się do ziarnen pyłku (Chen i wsp., 1990; Zhong i wsp., 2013). Hsp21 jest niezbędny do prawidłowego rozwoju chloroplastów oraz wczesnych etapów kiełkowania w warunkach ekspozycji na wysoką temperaturę (Zhong i wsp., 2013). Nadekspresja Hsp21 prowadzi do zwiększonej tolerancji na wysoką temperaturę, ale tylko w warunkach ekspozycji na światło o wysokim natężeniu (Härndahl i wsp., 1999).

3.3.2 HSP40

Conajmniej 19 białek chloroplastowych zawiera w swojej strukturze charakterystyczną dla rodziny Hsp40 domenę DnaJ. Żadne z tych białek nie ma w swojej strukturze peptydu eksportowego charakterystycznego dla białek światła tylakoidu, co wskazuje na lokalizację stromową tych białek (Chiu i wsp. 2013). Chloroplastowe białka Hsp40 (DnaJ) uczestniczą samodzielnie bądź we współpracy z Hsp70 w takich procesach, jak rozwój chloroplastów (Vitha i wsp., 2003; Liu i wsp., 2005, 2007; Albrecht i wsp., 2008), ruchy chloroplastów wywoływane światłem (Suetsugu i wsp., 2005), translokacja białek przez błony chloroplastowe czy utrzymywanie homeostazy białek chloroplastowych (Chiu i wsp., 2010). Dla białek AtJ8, AtJ11 i AtJ20 u *Arabidopsis* wykazano, że są zaangażowane w optymalizacji reakcji fotosyntetycznych i stabilizacji kompleksów PSII w warunkach ekspozycji na światło o wysokim natężeniu (Chen i wsp., 2010), a BSD2 uczestniczy w montażu karboksylazy/oksygenazy rybulozo-1,5-bisfosforanu (ang. *ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase*, Rubisco) poprzez stabilizację stanów pośrednich w fałdowaniu dużej podjednostki Rubisco (Vitlin Gruber i Feiz, 2018).

3.3.3 HSP60

Zlokalizowane w stromie chloroplastowej białka Hsp60 są powszechnie znane pod nazwą chaperonin (Cpn60). W odróżnieniu od bakteryjnych i mitochondrialnych Hsp60 funkcjonujących w formie homooligomerów Cpn60 są bardziej złożone i występują w formie skomplikowanych heterooligomerów zbudowanych z dwóch typów podjednostek: Cpn60 α i Cpn60 β , które w swojej sekwencji aminokwasowej wykazują między sobą tylko 50% podobieństwa. W genomie *Arabidopsis* zidentyfikowano dwa geny kodujące Cpn60 α (*Cpn60 α 1-2*) oraz cztery kodujące Cpn60 β (*Cpn60 β 1-4*). Najwcześniej poznaną funkcją Cpn60 jest udział w fałdowaniu Rubisco (poprzez zapobieganie agregacji podjednostki α bezpośrednio po zakończeniu translokacji – Barraclough i Ellis, 1980); dziś wiemy, że Cpn60 ma więcej funkcji do spełnienia, w tym udział w podziałach chloroplastów (Suzuki i wsp., 2009) oraz udział w przebiegu embriogenezy (Ke i wsp., 2017).

W przeciwieństwie do bakteryjnych i mitochondrialnych Hsp60 współpracujących z jednym typem współdziałającego białka opiekuńczego (GroES w bakteriach, Hsp10 w mitochondriach) Cpn60 współpracuje z dwoma typami współdziałającego białka opiekuńczego: Cpn10 i Cpn20 (pierwszy zbudowany z jednej, a drugi z dwóch domen typu GroES) (Zhao i Liu, 2018).

3.3.4 HSP70

Chloroplastowe Hsp70 zostały zidentyfikowane zarówno w stromie, jak i w zewnętrznej błonie chloroplastowej. Stromowe Hsp70 (cpHsc70) są bardziej zbliżone do ich odpowiedników bakteryjnych i mitochondrialnych, natomiast Hsp70 związane z zewnętrzną błoną chloroplastową wykazują wyższe podobieństwo do Hsp70 występujących w cytozolu eukariontów (Schroda i wsp., 1999). W genomie *Arabidopsis* zidentyfikowano dwa geny kodujące stromowe Hsp70 (*cpHsc70-1* i *cpHsc70-2*). Mutanty insercyjne genu *cpHsc70-1* w warunkach optymalnych charakteryzowały się pstrolistnością liścieni (obecność na blaszce liściowej zielonych i biało-żółtych sektorów), nieregularnymi brzegami liści, opóźnionym wzrostem całej rośliny oraz zaburzonym wzrostem korzenia. W warunkach ekspozycji kiełkujących nasion na wysoką temperaturę wzrost korzeni *cpHsc70-1* był dodatkowo zaburzony. Mutant ten w warunkach stresowych charakteryzuje się także nietypowymi działkami kielicha i zdeformowanymi kwiatami. Wszystko to oznacza, że stromowe Hsp70 są zatem niezbędne dla prawidłowego rozwoju roślin oraz pełnią istotną rolę w tolerancji na wysoką temperaturę (Su i Li, 2008).

3.3.5 HSP90

Hsp90.5 *A. thaliana* (Hsp90C) jest jedynym białkiem z rodziny Hsp90 obecnym w chloroplastach, gdzie pełni swoje funkcje w stromie chloroplastowej. Hsp90.5 okazuje się być niezbędny dla funkcjonowania komórki, gdyż homozygotyczne mutanty insercyjne są letalne (Inoue i wsp., 2013). Hsp90.5 poprzez oddziaływanie z kompleksami translokonu wewnętrznej (TIC) i zewnętrznej błony chloroplastowej (TOC) uczestniczy w imporcie białek do chloroplastu (Inoue i wsp., 2013). Nadekspresja Hsp90.5 u *A. thaliana* obniża tolerancję rośliny na stres suszy, stres solny i oksydacyjny

(Song i wsp., 2009). Ostatnie badania pokazały, że Hsp90.5 oddziałuje z jednym ze składników PSII, PsbO1 oraz pełni rolę w jego transporcie do światła tylakoidu (Jiang i wsp., 2017).

3.3.6 HSP100

U *Arabidopsis* zidentyfikowano 10 białek opiekuńczych należących do rodziny Hsp100: cztery ClpB, dwa ClpC, jedno ClpD oraz trzy ClpX. W chloroplastach występują ClpB3, ClpC1, ClpC2 oraz ClpD (Sjögren i wsp., 2004). Wszystkie chloroplastowe Hsp100 należą do klasy I białek Hsp100 i zlokalizowane są w stromie, a ClpC oddziałują także z wewnętrzną błoną chloroplastową (Sjögren i wsp., 2004; Sjögren i wsp., 2014). Wszystkie chloroplastowe Hsp100 z wyjątkiem ClpB3 posiadają zakonserwowane motywy odpowiedzialne za tworzenie kompleksów z rdzeniem proteolitycznym ClpP. Białka te pełnią rolę foldaz (defoldaz), rozfałdowując substrat przeznaczony do hydrolizy w rdzeniu proteolitycznym (Trösch i wsp., 2015).

ClpB3 wyróżnia się wśród pozostałych chloroplastowych białek Hsp100 także dłuższą domeną M. Wysoki poziom homologii ClpB3 do drożdżowych Hsp104 może wskazywać na pełnienie podobnych funkcji, tj. funkcji dezagregazy. Wykazano, że ClpB3 odgrywa istotną rolę w kluczowych procesach związanych z rozwojem chloroplastów – prawdopodobnie uczestniczy w tworzeniu błon tylakoidowych oraz w translacji białek chloroplastowych podczas przekształcania się proplastydów w chloroplasty (Myouga i wsp., 2006). U *Arabidopsis* w warunkach wysokiej temperatury obserwuje się zwiększony poziom ekspresji chloroplastowego ClpB3, wskazując na jego udział w tolerancji na wysoką temperaturę (Trösch i wsp., 2015). Zaobserwowano także wzrost poziomu transkryptu ClpB3 w warunkach ekspozycji roślin na wysokie natężenie światła (Adamiec i wsp., 2011). Udział ClpB3 w tolerancji na wysoką temperaturę prawdopodobnie polega na dezagregacji przez ClpB3 agregatów powstałych w wyniku oddziaływania zdenaturowanych białek z białkami sHsp. Ten sam mechanizm działania ClpB3 może dotyczyć także białek zdenaturowanych w wyniku ekspozycji roślin na światło o wysokim natężeniu (Adamiec i wsp., 2011). Inne badania pokazały, że ClpB3 we współpracy z systemem Hsp70/Hsp40 uczestniczy w reaktywacji uszkodzonej syntazy 5-fosforanu

1-deoksyksylulozy (Llamas i wsp., 2017). Mutanty insercyjne chloroplastowego ClpB3 *A. thaliana* są letalne, co wskazuje na istotną rolę ClpB3 w rozwoju rośliny (Trösch i wsp., 2015).

ClpC są homologiczne do bakteryjnych ClpA. ClpC1 jest główną izoformą ClpC, która wykazuje wyższą ekspresję podczas całego rozwoju, a mutanty insercyjne *clpC1* są chlorotyczne, małe i mają zmniejszoną wydajność fotosyntetyczną. ClpC2 jest izoformą o znaczeniu drugorzędnym, a mutanty insercyjne *clpC2* wykazują fenotyp rośliny dzikiej (Sjögren i wsp., 2014; Trösch i wsp., 2015). ClpC często oczyszczają się wraz z białkami wewnętrznej błony otoczki chloroplastowej (np. Moore i Keegstra, 1993), co stanowi podstawę do sugestii, że białka te są składnikami kompleksu TIC i funkcjonują w jego ramach jako translokaza względnie jako element systemu kontroli jakości importowanych białek (Jarvis i López-Juez, 2013; Paila i wsp., 2014).

ClpD wykazuje wysoką homologię do ClpC, choć występuje tylko w stromie, dlatego jest mało prawdopodobne, by pełniło funkcje związane z błoną, jak ClpC. Obecność motywu w sekwencji ClpD odpowiedzialnego za oddziaływanie z proteazą ClpP może wskazywać na pełnienie funkcji proteolitycznych w stromie. Zaobserwowano wzrost ekspresji ClpD w warunkach dehydratacji (stąd pierwotnie ClpD określane było jako ERD1), a także w warunkach indukowanej ciemnością etiolacji oraz naturalnego starzenia. Ostatnio przypuszcza się, że ClpD może oddziaływać z ClpC, ponieważ poziom białka ClpD jest obniżony u mutantów *clpC1*. Jako że oba białka opiekuńcze różnią się sekwencją na N-końcu, mogą razem współdziałać z proteazą ClpP, ale działając na inne substraty (Trösch i wsp., 2015).

3.3.7 INNE

3.3.7.1 FtsH

W genomie *A. thaliana* znajduje się 12 genów kodujących defoldazy/proteazy FtsH. Produkty ośmiu genów *A. thaliana* kodujących izoformy defoldaz/proteaz FtsH kierowane są do chloroplastów (FtsH 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9 i 12), a FtsH11 zostało znalezione zarówno w chloroplastach, jak i mitochondriach (Sakamoto i wsp., 2003; Urantowka i wsp., 2005). Spośród chloroplastowych defoldaz/proteaz FtsH *A. thaliana* szczególnie wiele uwagi poświęcono FtsH1, 2, 5 i 8, które współtworzą heteroheksameryczny

kompleks (określany jako heterokompleks AtFtsH), w składzie którego prawdopodobnie przeważają kopie białek FtsH2 i FtsH5 (FtsH2 + FtsH5 / FtsH1 + FtsH8 = 2:1, Moldavski i wsp., 2012). Wyniki prac licznych zespołów badawczych pozwalają sądzić, że heterokompleks AtFtsH pełni bardzo różnorodne i ważne funkcje, wśród których należy wymienić regulację biogenezy błony tylakoidowej, biosyntezę PSI, udział w degradacji białka PsbA w ramach tzw. cyklu naprawczego PSII (za pośrednictwem szlakku retrogradowego zależnego od białka EX-1) (Kato i Sakomoto, 2018), a także stresozależnej degradacji białek Lhcb1-3 (Luciński i Jackowski, 2013).

3.3.7.2 LON

W genomie *A. thaliana* zidentyfikowano cztery geny kodujące defoldazy/proteazy Lon (Lon1-4), spośród których dwie charakteryzują się podwójną, chloroplastowo-mitochondrialną lokalizacją (Lon4 – Ostersetzer i wsp., 2007; Lon1 – Daras i wp., 2014). Funkcja tych białek pozostaje niewyjaśniona.

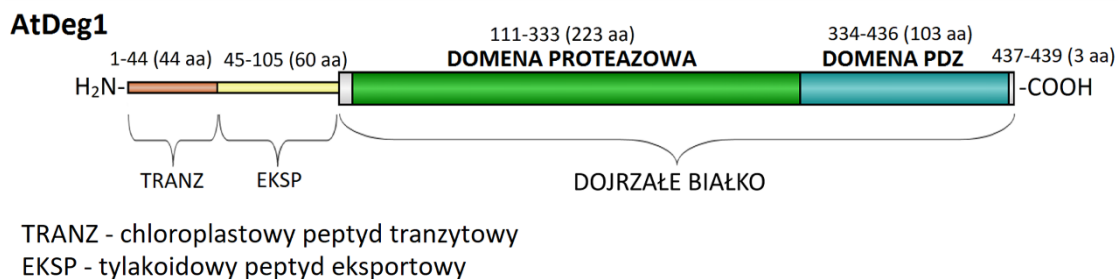
3.3.7.3 ATDEG1

W genomie *A. thaliana* zidentyfikowano 16 genów kodujących proteazy z grupy Deg (*AtDEG1-16*). Produkty siedmiu genów (*AtDEG1, 2, 3, 5, 8, 10 i 13*) kierowane są do chloroplastów (Schubert i wsp., 2002; Tanz i wsp., 2014). Najwcześniej zidentyfikowanym u *Arabidopsis* chloroplastowym homologiem proteazy DegP była proteaza AtDeg1 (stąd pierwotnie określana jako AtDegP1; At3g27925) (Adam i wsp., 2001), która okazała się być zarazem białkiem opiekuńczym o aktywności foldazy (Sun i wsp., 2010). Proteaza AtDeg1 według bazy danych NCBI w genomie *A. thaliana* kodowana jest przez jedną kopię genu *AtDEG1* zlokalizowaną na chromosomie 3 w pozycji pomiędzy 10365652 a 10369013 pz i „odczytywaną” w przeciwnym kierunku (10369013→10365652). Gen *AtDEG1* obejmuje 3362 pz, składa się z ośmiu egzonów i jest przepisywany na transkrypt (NM_113709.5) o długości 1779 pz. Występuje również wariant splicingowy (NM_001338921.1) o długości 1467 pz. Oba transkrypty kodują białka o identycznej sekwencji aminokwasowej (NP_189431.2 i NP_001325789.1) – wersję prekursorową AtDeg1 (pre-AtDeg1) składającą się z 439 aminokwasów. Pierwsze 44 aminokwasy stanowi chloroplastowy peptyd tranzytowy kierujący AtDeg1 do stromy chloroplastów. Kolejne 60 aminokwasów to peptyd

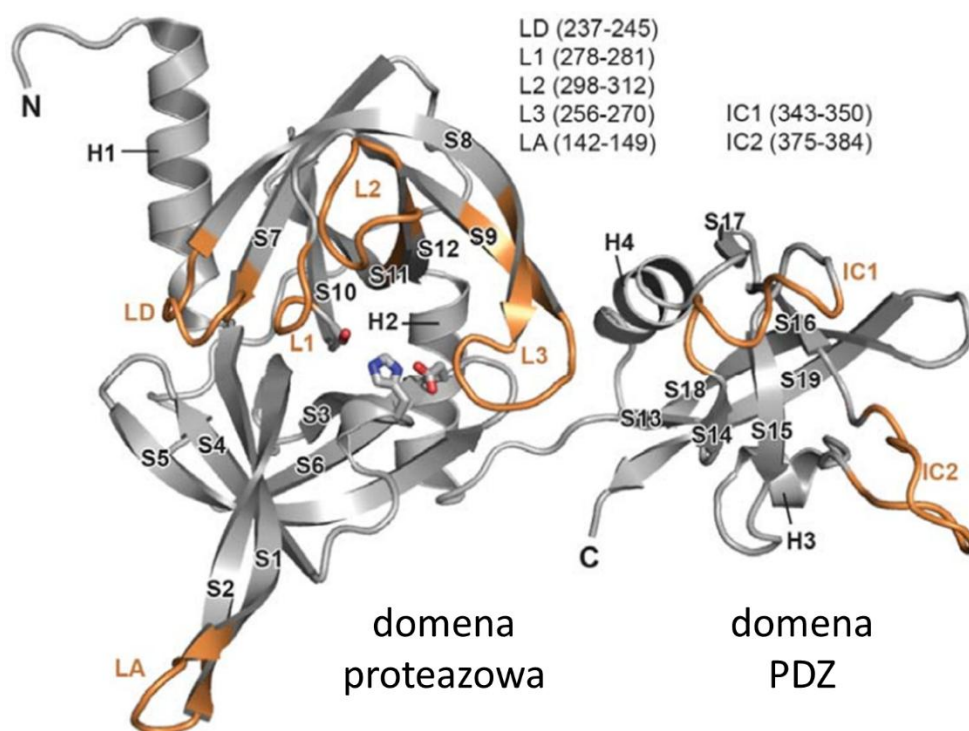
eksportowy kierujący AtDeg1 ze stromy do światła tylakoidu. Dojrzała forma AtDeg1 (po odcięciu peptydu tranzytowego i peptydu eksportowego) stanowi 335 aminokwasów, ma masę ok. 35 kDa i zlokalizowana jest na powierzchni błony tylakoidowej od strony światła tylakoidu (Chassin i wsp., 2002).

W strukturze pierwszorzędowej AtDeg1 w pozycji 111-333 jest zlokalizowana odpowiedzialna za hydrolizę substratu domena proteazowa wraz z trzema silnie zakonserwowanymi resztami aminokwasowymi stanowiącymi centrum katalityczne białka. Są to: reszta histydyny w pozycji 172 (H172), reszta asparaginy w pozycji 199 (D199) i reszta seryny w pozycji 282 (S282). AtDeg1 w przeciwieństwie do DegP i DegQ posiada tylko jedną domenę PDZ (pozycja 334-436) (Rysunek 16). Strukturę trzeciorzędową AtDeg1 poznano dzięki analizom rentgenostrukturalnym kryształów rekombinowanego białka (Kley i wsp., 2011). Ustalono, że domena proteazowa składa się z dwóch β -beczek z N- i C-terminalnymi α -helisami (określanymi jako H1 i H2). Indywidualne β -nici β -beczek są rozdzielone pętlami Ω , pięć spośród których (LD, L1, L2, L3, LA) odgrywa istotną rolę w nadawaniu białku aktywności proteolitycznej. Triada katalityczna HDS jest zlokalizowana w szczelinie pomiędzy β -beczkami. Z kolei na domenę PDZ składają się: β -kanapka obejmująca siedem β -nici oflankowanych przez α -helisy H3 i H4 oraz dwa motywy (IC1 i IC2) odgrywające istotną rolę w heksameryzacji monomerów AtDeg1 (Rysunek 17). Domena PDZ zawiera miejsce wiążące substrat. Struktura heksameryczna AtDeg1 jest aktywną proteolitycznie formą AtDeg1 i powstaje przez dimeryzację dwóch trimerów, które zamykają miejsca aktywne katalityczne wewnątrz struktury heksamerycznej „klatki”. Struktura ta jest stabilizowana przez liczne oddziaływania pomiędzy domenami proteazowymi (pętla LA) oraz domenami PDZ (motywy IC1 i IC2) pochodzące od każdego z trimerów i jest znacznie bardziej zwarta niż heksamer bakteryjnego DegP.

Do przejścia z nieaktywnej formy monomerycznej do trimerycznej, a następnie do aktywnej proteolitycznie formy heksamerycznej dochodzi *in vitro* w sytuacji, gdy pH środowiska osiąga wartość 6,0. Takie warunki mogą pojawiać się w ciągu dnia *in vivo*, gdy dochodzi do zakwaszenia światła tylakoidu i uszkodzenia białek fotosyntetycznych (Kley i wsp., 2011). Sugeruje się, że w warunkach ekspozycji roślin na światło o wysokim natężeniu heksamer AtDeg1 i heterokompleks FtsH wspólnie katalizują



Rysunek 16. Rozkład domen w strukturze pierwszorzędowej prekursora białka AtDeg1. Na podstawie Kley i wsp., 2011 oraz Grabsztunowicz i wsp. 2011.



Rysunek 17. Struktura monomeru białka AtDeg1. Strukturę trzeciorzędową AtDeg1 przedstawiono w formie modelu wstęgowego, a triadę katalityczną w formie modelu prętowego. Na podstawie Kley i wsp., 2011.

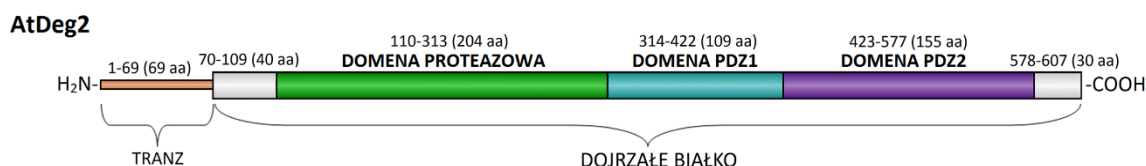
hydrolizę białka PsbA (D1), które uległo fotouszkodzeniu, a degradacja uszkodzonego PsbA stanowi element cyklu naprawczego PSII (Kato i Sakomoto, 2018; Knopf i Adam, 2018). AtDeg1 uczestniczy także w degradacji innych białek błony tylakoidowej uszkodzonych działaniem światła o wysokim natężeniu, a mianowicie PsbD (D2), PsbS, Lhcb4-6, Ptac16 i cytochrom b6 (Zienkiewicz i wsp., 2012). Rekombinowana wersja AtDeg1 posiada poza aktywnością proteolityczną także aktywność foldazy; sądzi się, że *in vitro* AtDeg1 uczestniczy poprzez swoją aktywność foldazy w biogenezie PSII (Sun i wsp., 2010). Proteaza/foldaza AtDeg1 odgrywa bardzo istotną rolę w życiu rośliny zarówno w warunkach komfortowych, jak i w warunkach ekspozycji roślin na światło o wysokim natężeniu (Kapri-Pardes i wsp., 2007; Butenko i wsp., 2018).

3.3.7.4 ATDEG2

Proteaza AtDeg2 w genomie *Arabidopsis* kodowana jest przez jedną kopię genu. Zgodnie z bazą danych NCBI gen *AtDEG2* zlokalizowany jest na końcu chromosomu 2 w pozycji pomiędzy 19617986 a 19622301 pz i tak jak w przypadku *AtDEG1* jego ekspresja zachodzi w przeciwnym kierunku (19622301→19617986). Gen *AtDEG2* obejmuje 4316 pz, składa się z 19 egzonów rozdzielonych 18 intronami i jest przepisywany na transkrypt (NM_130361.5) o długości 2347 pz, który koduje pre-AtDeg2 składający się z 607 aminokwasów (NP_566115.1). Występuje także wariant splicingowy mRNA (NM_001125072.1) genu *AtDEG2* o długości 2294 pz kodujący pre- AtDeg2 składający się z 606 aminokwasów. Wariant ten pozbawiony jest reszty lizyny w pozycji 62 w obrębie chloroplastowego peptydu tranzytowego (pozycje 1-69), który jest odcinany po wprowadzeniu pre-AtDeg2 do chloroplastu. Dojrzała forma proteazy AtDeg2 stanowi 538 aminokwasów (pozycje 70-607), ma masę 60 kDa i zlokalizowana jest od strony stromy na powierzchni niezespolonych obszarów błony tylakoidu tj. w 80-90% na powierzchni błony tylakoidów stromy i w 10-20% na błonach brzegowych i końcowych tylakoidów zespolonych w grana (Haussühl i wsp., 2001).

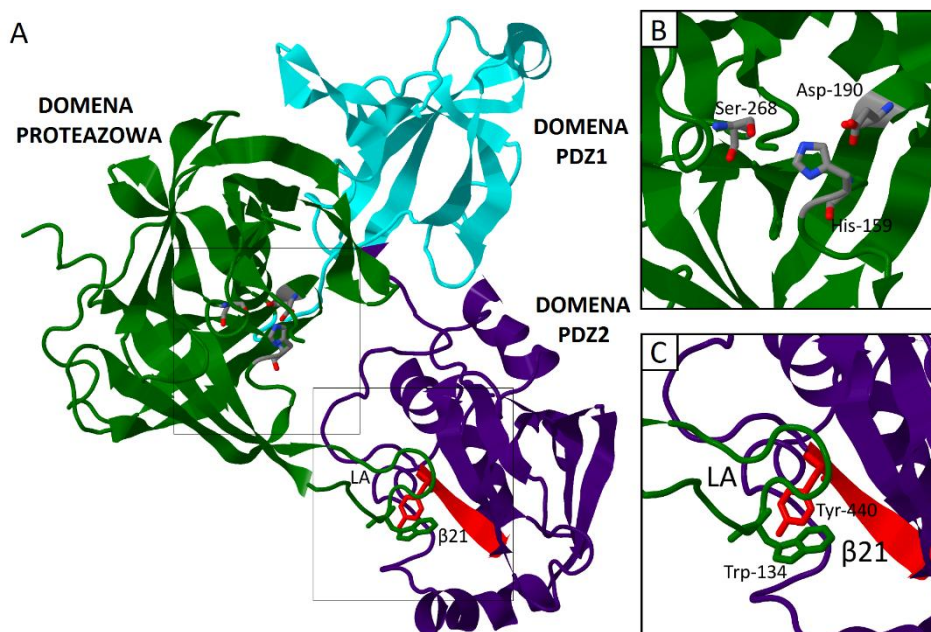
W strukturze pierwszorzędowej AtDeg2 w pozycji 110-313 jest zlokalizowana domena proteazowa wraz z triadą katalityczną HDS (H159, D190, S268) w pozycji 314-422 domena PDZ1, a w pozycji 423-577 domena PDZ2 (Rysunek 18). Strukturę trzeciorzędową AtDeg2 poznano dzięki analizom rentgenostrukturalnym kryształów rekombinowanego białka (Sun i wsp., 2012). Ustalono, że domena proteazowa,

podobnie jak w przypadku AtDeg1, składa się z dwóch β -beczek z N- i C-terminalnymi α -helisami αA i αD . Indywidualne β -nici β -beczek są rozdzielone pętlami Ω , pięć spośród których (LD, L1, L2, L3, LA) odgrywa istotną rolę w nadawaniu białku aktywności proteolitycznej. Triada katalityczna HDS jest zlokalizowana w szczelinie pomiędzy dwoma β -beczkami (Rysunek 19A i B). Domena PDZ1 jest zbudowana



TRANZ - chloroplastowy peptyd tranzytowy

Rysunek 18. Rozkład domen w strukturze pierwszorzędowej prekursora białka AtDeg2. Na podstawie Sun i wsp., 2012 oraz Grabsztunowicz i wsp. 2011.

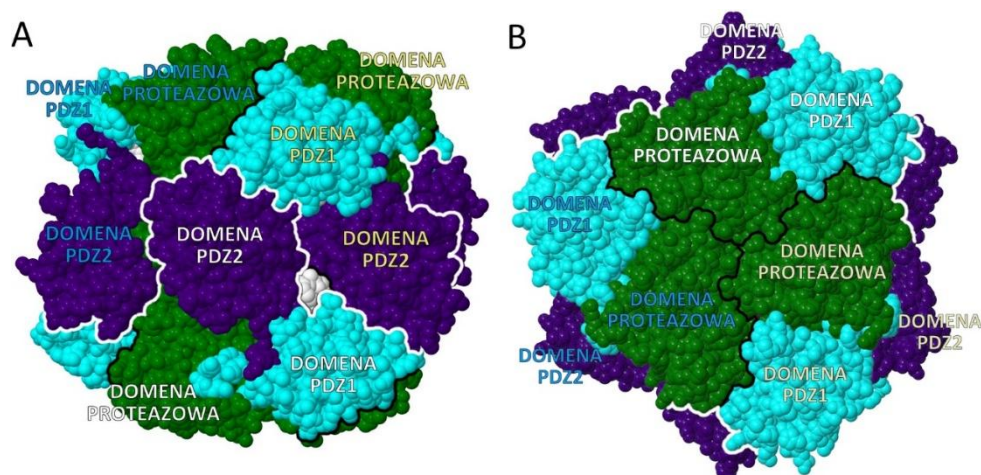


Rysunek 19. Struktura monomeru białka AtDeg2 (PDB ID: 4FLN). Struktura trzeciorzędowa AtDeg2 (**A**), jego triady katalitycznej (**B**) oraz wewnętrznego ligandu domeny PDZ2 – β -nici β 21 (**C**). Strukturę trzeciorzędową AtDeg2 przedstawiono w formie modelu wstęgowego, a triadę katalityczną i reszty aminokwasowe uczestniczące w wiązaniu β 21 w formie modelu prętowego. Domenę proteazową, PDZ1 i PDZ2 zaznaczono, odpowiednio, kolorem zielonym, niebieskim i fioletowym. Na podstawie Jagodzick i wsp., 2014.

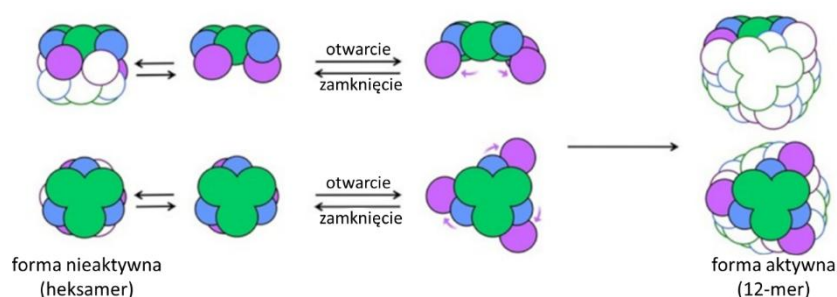
podobnie jak domena PDZ AtDeg1 i zawiera miejsce wiązania substratu. Domena PDZ2 u AtDeg2 ma dość nietypową strukturę trzeciorzędową w porównaniu z domenami PDZ występującymi u innych proteaz Deg. Najbardziej interesującą spośród trzech nietypowych cech domeny PDZ2 jest obecność β -nici β 21 (w pozycji 441-443) funkcjonującej jako wewnętrzny ligand okupujący drugie (pierwsze jest zlokalizowane w obrębie domeny PDZ1) miejsce wiązania substratu (β -nić β 22). Domena PDZ2 jest połączona z domeną proteazową poprzez pętlę LA tego samego monomeru (Rysunek 19C), czyniąc w ten sposób monomer sztywnym modulem. β -nić β 21 PDZ2 odpowiedzialna jest za oddziaływanie z pętlą LA domeny proteazowej. W procesie heksameryzacji pojedynczy monomer łączy się z dwoma innymi poprzez oddziaływanie pomiędzy domenami proteazowymi, tworząc trimer, który przez dimeryzację z drugim trimerem tworzy zwartą strukturę heksamerycznej „klatki”, w której dostęp do miejsca katalitycznego umożliwia sześć niewielkich otworów zlokalizowanych pomiędzy domenami PDZ. Dimeryzacja pomiędzy trimerami zachodzi poprzez dwa interfejsy oddziaływań formowanych przez każdy monomer. Interfejs I tworzy domena proteazowa wraz z domeną PDZ2, natomiast interfejs II jest tworzony przez domenę PDZ1 i PDZ2. Poprzez interfejs I monomer oddziałuje z sąsiednim monomerem drugiego trimera, a poprzez interfejs II oddziałuje z kolejnym monomerem drugiego trimera. Interakcje w interfejsie I występują tylko pomiędzy domenami proteazową a PDZ2* (gwiazdka wskazuje na udział domeny z sąsiedniego monomeru), natomiast w interfejsie II źródła oddziaływań są pomiędzy domenami PDZ2-PDZ1* i PDZ2-PDZ2* (Rysunek 20) (Sun i wsp., 2012).

W trakcie inkubacji AtDeg2 z β -kazeiną *in vitro* obserwowano stopniowy wzrost poziomu wyższych niż heksamer form oligomerycznych AtDeg2 (12-mer?, 24-mer?) skorelowany z pojawianiem się produktów degradacji β -kazeiny, co może sugerować, że heksamer jest formą nieaktywną proteolitycznie, aktywne zaś są wyższego rzędu oligomery AtDeg2. Przypuszcza się, że β -nić β 21 może pełnić kluczową rolę w przejściu z nieaktywnej formy heksamerycznej do aktywnej wyższej formy oligomerycznej AtDeg2. Obecność substratu, który będzie konkurować z β -nicią β 21 o miejsce wiązania substratu, może prowadzić do oddysocjowania wewnętrznego ligandu domeny PDZ2 z miejsca wiązania substratu, a więc też do zerwania wiązania pomiędzy pętlą LA domeny proteazowej a nicią β 21 domeny PDZ2. Efektem jest rozluźnienie struktury

monomerycznej, odsunięcie się domen PDZ2 od domen proteazowych w obrębie trimeru, zwiększenie powierzchni interfejsów oddziaływania pomiędzy trimerami oraz przekonstruowanie się heksameru w oligomer wyższego rzędu obejmujący cztery, osiem bądź jeszcze większą liczbę trimerów (Rysunek 21) (Sun i wsp., 2012).



Rysunek 20. Model czasowy struktury krystalicznej formy heksamerycznej AtDeg2 (PDB ID: 4FLN). Widok z boku (A) oraz widok z góry (B). Domena proteazowa, PDZ1 i PDZ2 oraz związany peptyd zostały wyróżnione kolorem, odpowiednio, zielonym, niebieskim, fioletowym i białym. Trimery rozdzielone są białą linią, a monomery trimerów czarną linią. Na podstawie Jagodzick i wsp., 2014.



Rysunek 21. Schemat konwersji formy heksamerycznej AtDeg2 w formę dodekameryczną. Widok z boku i z góry form oligomerycznych AtDeg2 z wyróżnionymi domenami jednego z trimerów (domena proteazowa – kolor zielony, domena PDZ1 – kolor niebieski, domena PDZ2 – kolor fioletowy). W procesie otwierania struktury trimeru oddziaływanie pomiędzy pętlą LA domen proteazowych a wewnętrznym ligandem domen PDZ2 zostaje zerwane, czego efektem jest odsunięcie się domen PDZ2 od domen proteazowych. „Otwarte” trimery oddziałują ze sobą, tworząc oligomer wyższego rzędu np. przedstawiony na schemacie 12-mer. Na podstawie Sun i wsp., 2012.

Aktywność proteolityczna AtDeg2 *in vitro* badana wobec sztucznych substratów jest zależna zarówno od pH, jak i od warunków oksydacyjnych. Warunki oksydacyjne sprzyjają aktywności proteolitycznej AtDeg2 wobec fluorescencyjnie znakowanej kazeiny zwiększając ją do poziomu 126% wartości kontrolnej, co może być związane z obecnością aż 11 reszt cysteinowych w strukturze AtDeg2, podczas gdy wrażliwy na warunki oksydacyjne AtDeg1 posiada tylko jedną (Ströher i Dietz, 2008). Późniejsze badania pokazały, że optymalnym poziomem pH roztworu dla aktywności proteolitycznej AtDeg2 wobec β -kazeiny *in vitro* jest pH 7,5 (Sun i wsp., 2012). Wcześniej, badania aktywności proteolitycznej AtDeg2 z użyciem żelatyny wskazywały jednak na pH alkaliczne jako optymalne dla tej aktywności AtDeg2, co bardziej koreluje z poziomem pH panującym w stromie chloroplastu, które jest słabo alkaliczne (Haussühl i wsp., 2001).

Wiedza na temat natywnych substratów aktywności proteolitycznej AtDeg2 jest bardzo skromna. Wykazano, że AtDeg2 degraduje *in vitro* białko PsbA uszkodzone światłem o wysokim natężeniu, czemu towarzyszy produkcja N-końcowego fragmentu o masie 23 kDa (Haussühl i wsp., 2001). Jednak rola AtDeg2 w degradacji PsbA *in vivo* pozostaje dyskusyjna, ponieważ późniejsze badania pokazały, że degradacja PsbA uszkodzonego światłem o wysokim natężeniu zachodzi również w mutantach insercyjnych *deg2-1* (insercja T-DNA w 5 egzonie *AtDEG2*) i *deg2-2* (insercja tandemowego powtórzenia T-DNA w 19 egzonie *AtDEG2*), czyli roślin *A. thaliana* całkowicie pozbawionych AtDeg2 (Huesgen i wsp., 2006). Na korzyść tezy o udziale AtDeg2 w degradacji PsbA *in vivo* działają wyniki późniejszych badań, w których wykazano udział AtDeg2 w ochronie rośliny przed fotoinhibicją (Luciński i wsp., 2011). Innym substratem AtDeg2 jest apobiałko Lhcb6, którego degradację obserwowano w liściach eksponowanych przez krótki okres czasu na światło o wysokim natężeniu, wysoką temperaturę, wysokie stężenie soli oraz poddawanych zranieniu (Luciński i wsp., 2011).

Bardzo mało wiadomo na temat udziału AtDeg2 w ontogenezie rośliny w warunkach bezstresowych. Ustalono jedynie, że AtDeg2 zaangażowany jest w regulację cyklu życiowego chloroplastów oraz morfologii liści młodocianych (Luciński i wsp., 2011). W promotorze genu *AtDEG2* wykryto obecność zakonserwowanych sekwencji regulatorowych rozpoznawanych przez czynniki transkrypcyjne ARR1 i ARR2

(z rodziny ARR-B), GATA-1 i ZML2 (z rodziny GATA), CAMTA3 (z rodziny CAMTA), LFY, NAP (z rodziny NAC) i RAP2.2 (z rodziny AP2/EREBP). Czynniki transkrypcyjne ARR1 i ARR2 aktywują ścieżki sygnalizacji związane z cytokininami. GATA-1 jest zaangażowany w regulowaną światłem ekspresję genów jądrowych, a ZML2 w odpowiedź na wysokie natężenie światła. CAMTA3 uczestniczy w odpowiedzi na stresy biotycznie, w tolerancji na niską temperaturę i zamrażanie, jak również w regulację starzenia indukowanego etylenem. LFY pełni istotną rolę w ścieżkach regulacji ekspresji genów związanych z fotoperiodem. NAP pełni kluczową rolę w starzeniu liści przez udział w ścieżkach regulacji, które kontrolują ruchy szparkowe i utratę wody podczas starzenia liści. RAP2.2 zaangażowany jest zaś w karotenogenezę (Jagodzicki i wsp., 2014).

Analizy *in vitro* wykazały, że aktywności proteolitycznej AtDeg2 towarzyszy aktywność opiekuńcza, podobnie jak w przypadku DegP, DegQ i AtDeg1. Doświadczenie z użyciem lizozymu zdenaturowanego obecnością DTT pokazało, że AtDeg2 dysponuje aktywnością typu holdazy. Aktywność ta okazała się być na tyle silna, że w obecności rekombinowanego AtDeg2 agregacja zdenaturowanego lizozymu była całkowicie zahamowana już od samego początku trwania inkubacji (Sun i wsp., 2012). Na temat aktywności opiekuńczej AtDeg2 wiadomo jeszcze mniej niż w przypadku AtDeg1, gdyż brak informacji, która domena w strukturze AtDeg2 odpowiedzialna jest za wykształcenie się tej aktywności, ani czy aktywności holdazy towarzyszy aktywność foldazy i/lub dezagregazy. Nie wykazano także dotąd, czy, a jeśli tak to, w jaki sposób aktywność holdazowa AtDeg2 ujawnia się *in vivo* w komfortowych i stresowych warunkach środowiskowych oraz jakie mogą być substraty dla tego typu aktywności AtDeg2.

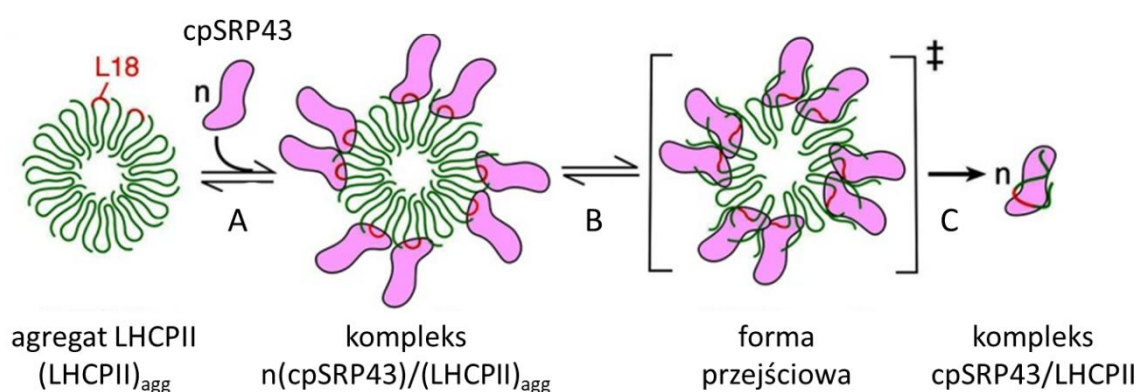
3.3.7.5 CHLOROPLASTOWE BIAŁKA POMOCNICE

Chloroplastowym białkom opiekuńczym oprócz współdziałających białek opiekuńczych (np. GroES) towarzyszą często także tzw. białka pomocnicze (określane również jako dodatkowe czynniki pomocnicze). W grupie białek pomocniczych znajduje się ogromna populacja białek chloroplastowych, które uczestniczą w rozmaity sposób w kształtowaniu struktury czwartorzędowej białek, montażu wieloskładnikowych kompleksów oraz w sortowaniu białek wewnątrz chloroplastu. Białka te, mimo że biorą

udział w wyżej wymienionych procesach, nie należą do żadnej z rodzin Hsp, dlatego nie są traktowane jako typowe białka opiekuńcze (ani jako współdziałające białka opiekuńcze). W kształtowaniu struktury czwartorzędowej Rubisco białkom Cpn60/Cpn20 oraz BSD2 (Hsp40) towarzyszą takie białka pomocnicze jak: Raf1 i Raf2. Z kolei w montażu PSII u *A. thaliana* uczestniczy aż 28 białek – należą do nich: Alb3, AtPDI6, CTPA, CYP38/TLP40, FKBP20-2, HCF136/YCF48, HCF243, HHL1, LPA1/REP27, LPA2, LPA3, LQY1, LTO1, MET1, PAM68/SII0933, Pitt, PPL1, PratA, PsbN, Psb27/LPA19, Psb28, Psb29/Thf1, Psb33, ROC4/CYP20-3, SCPs/LHC-like, Slr1768, TERC, TLP18.3/Psb32 (Rühle i Leister, 2016). W montażu PSI *A. thaliana* uczestniczą zaś takie białka pomocnicze jak: Alb3, VIPP1, Ycf3, Ycf4, Ycf37/Pyg7, Y3IP1, PPD1, Psb2, Hcf101 oraz CnfU (Yang i wsp., 2015). W sortowaniu białek wewnątrz chloroplastu uczestniczy zaś heterodimer cpSRP będący kompleksem białek cpSRP43 i cpSRP54. Kompleks cpSRP43/cpSRP54 uczestniczy w biogenezie głównego kompleksu zbierającego energię świetlną (LHCII) w taki sposób, że w charakterze holdazy wiąże w stromie niesfałdowane białka Lhcb1, Lhcb2 i Lhcb3 (kolektywnie nazywane LHCP II) i w sposób GTP-zależny przeprowadza je do błony tylakoidowej, gdzie w obecności białek Alb3 i Alb4 dochodzi do połączenia Lhcb1-3 z barwnikami fotosyntetycznymi i lipidami i ostatecznego przyjęcia przez Lhcb1-3 struktury trzeciorzędowej (Dall'Osto i wsp., 2015).

Jeden z komponentów kompleksu cpSRP, cpSRP43 jest szczególnie ciekawym białkiem pomocniczym, gdyż jest pierwszym chloroplastowym białkiem niezależnym od ATP, dla którego udowodniono obecność aktywności dezagregazy. Wykazano bowiem, że cpSRP43 posiada zdolność do aktywnego rozbijania agregatów białek LHCP II *in vitro* – na indywidualne cząsteczki i przekształcania ich w rozpuszczalne kompleksy cpSRP43/LHCP II niezależnie od ATP oraz bez udziału innych białek (Jaru-Ampornpan i wsp., 2010). Zakłada się, że energia potrzebna do rozbicia agregatów białkowych pochodzi z energii wiązania cpSRP43 z LHCP II, które jest na tyle wysoce specyficzne i rozległe, że prowadzi do konformacyjnych zmian w strukturze agregatu LHCP II, przez co kolejna cząsteczka cpSRP43 wiąże się jeszcze silniej. Ostatecznie dochodzi do zaburzenia oddziaływania pomiędzy składnikami agregatu i uwolnienia pojedynczych polipeptydów w formie rozpuszczalnych kompleksów (Rysunek 22) (Jaru-Ampornpan i wsp., 2010). W ten sposób w przeciwieństwie do zależnej od ATP dezagregazy

Hsp100, która działa lokalnie, uwalniając pojedyncze białka bez większego zakłócania struktury agregatu białkowego, cpSRP43 działa bardziej globalnie na agregat białkowy. Czynnikiem ograniczającym szybkość działania cpSRP43 wymagającym współpracy wielu cząsteczek cpSRP43 jest tworzenie późnego produktu przejściowego, w którym zaburzenia oddziaływania pomiędzy składnikami agregatu są na tyle rozległe, że prowadzą do destabilizacji całego agregatu. cpSRP43 stanowi kolejny przykład nowej klasy białek – niezależnych od ATP białek o aktywności dezagregazy (zidentyfikowanych również u nicieni i ssaków – Jaru-Ampornpan i wsp., 2013).



Rysunek 22. Schemat reakcji dezagregacji agregatu LHCP II przez cpSRP43. W pierwszym etapie (A) cząsteczki cpSRP43 (wyróżnione kolorem różowym) wiążą się do agregatu LHCP II (wyróżnionego kolorem zielonym) poprzez motyw L18 (kolor czerwony), przez co w drugim etapie (B) dochodzi do zaburzenia oddziaływania pomiędzy składnikami agregatu, a to prowadzi ostatecznie do uwolnienia pojedynczych polipeptydów LHCP II w formie rozpuszczalnych kompleksów cpSRP43/LHCP II (C). Na podstawie Jaru-Ampornpan i wsp., 2013.

3.4 PRZEBIEG ONTOGENEZY *A. THALIANA*

Ontogenezę roślin nasiennych tradycyjnie dzieli się na kiełkowanie nasion, embriogenezę, rozwój wegetatywny, rozwój generatywny i starzenie. Przebieg ontogenezy od dawna szczegółowo monitorowano u roślin uprawnych w celach komercyjnych, a dokonywano tego na poziomie całej rośliny za pomocą wizualnie rozpoznawalnych konkretnych cech morfologicznych stanowiących punkty

orientacyjne w ontogenezie. W efekcie istnieje wiele danych literaturowych szczegółowo opisujących fazy ontogenezy dla poszczególnych gatunków roślin bądź grup gatunków blisko spokrewnionych. Przykładem jest skala opracowana przez Zadoksa i wsp. (1974), która została sporządzona dla roślin zbożowych z myślą o wykorzystaniu jej głównie przez agronomów, hodowców roślin i fitopatologów. Elastyczność tej skali pozwoliła na rozszerzenie jej na inne rośliny uprawne i na jej podstawie został opracowany ujednolicony kod zwany skalą BBCH (Lancashire i wsp., 1991). Skala BBCH stosuje system kodu dziesiętnego, który wyróżnia zasadnicze i drugorzędne fazy ontogenezy. Kod dziesiętny wyrażony jest dwoma cyframi rozdzielonymi kropką. Cyfra przed kropką stanowi numer fazy ontogenezy, a cyfra po kropce numer podfazy osiągniętej przez roślinę (np. zapis 3.5 oznacza podfazę 3.5 fazy 3). Skala BBCH jest dość ogólna i sprawdza się w odniesieniu do wielu gatunków roślin uprawnych (Pujar i wsp., 2006). *A. thaliana* nie został uwzględniony w skali BBCH, ale z czasem na jej podstawie opisano fazy i podfazy ontogenezy także dla tego gatunku (Boyes i wsp., 2001).

Zgodnie ze skalą BBCH dostosowaną do *A. thaliana* ontogenezę tego gatunku dzieli się na następujące fazy: kiełkowanie nasion (faza 0), pojawianie się liści (faza 1), wzrost rozetki liściowej (faza 3), pojawienie się kwiatostanu (faza 5), kwitnienie (faza 6), dojrzewanie owoców (faza 8) i starzenie (faza 9). Faza 0 ontogenezy *A. thaliana* obejmuje podfazy 0.1 (pęcznienie nasion), 0.5 (pojawienie się korzenia zarodkowego) i 0.7 (pojawienie się hipokotyli i liścieni). Faza 1 ontogenezy *A. thaliana* obejmuje podfazy 1.0 (rozprostowanie się liścieni), 1.2 (jednoczesne pojawienie się liści 1 i 2) i 1.3-1.9 (pojawienie się liści 3-9). Faza 3 ontogenezy *A. thaliana* obejmuje podfazy 3.2, 3.5, 3.7 i 3.9 (uzyskanie przez rozetkę odpowiednio 20%, 50%, 70% i 100% swojej końcowej wielkości). Faza 5 ontogenezy *A. thaliana* jest reprezentowana przez podfazę 5.1 (pojawienie się pierwszego pąka kwiatowego). Faza 6 ontogenezy *A. thaliana* (kwitnienie) obejmuje podfazy 6.0 (otwarcie pierwszego kwiatu), 6.1, 6.5 i 6.9 (otwarcie się odpowiednio 10%, 50% i 100% kwiatów). Faza 8 ontogenezy *A. thaliana* (kwitnienie) obejmuje podfazy 8.0 (otwarcie pierwszej łuszczyнки), 8.1, 8.5 i 8.9 (otwarcie się odpowiednio 10%, 50% i 100% łuszczynek). Faza 9 ontogenezy *A. thaliana* (starzenie) obejmuje tylko podfazę 9.7 (zakończenie procesów starzeniowych). Porównawcze analizy fenotypowe uwzględniające przebieg wyżej wymienionych faz

i podfaz ontogenezy *A. thaliana* stanowią skuteczny sposób na zidentyfikowanie różnic fenotypowych wynikających ze zmienności genetycznej i/lub stresu środowiskowego analizowanych roślin (Boyes i wsp., 2001).

Morfologia i końcowy rozmiar liścia *A. thaliana* zależy od szybkości i czasu trwania proliferacji komórek, a także stopnia zachodzącego potem wzrostu wydłużeniowego komórek, który zaczyna się od wierzchołka liścia. Proliferacja i wzrost wydłużeniowy komórek liścia jest kontrolowany przez szereg czynników transkrypcyjnych takich jak: NGA, SPT, GRF oraz GIF. W procesach tych zaangażowane są też takie białka jak: ROT4, SWP, ARL, cytochrom CYP78A7, kinaza białkowa TOR oraz białko adaptorowe RAPTOR (Czesnik i Lenhard, 2015). Powszechnie uważa się, że głównymi czynnikami kontrolującymi – w toku ontogenezy *A. thaliana* – przejście od rozwoju wegetatywnego do generatywnego są miR156 i miR172 (Shrestha i wsp., 2014). miR156 opóźnia indukcję rozwoju generatywnego, ograniczając akumulację czynnika transkrypcyjnego SPL, który promuje zakwitanie (Wu i Poethig, 2006), podczas gdy miR172 przyspiesza indukcję rozwoju generatywnego między innymi przez obniżanie poziomu mRNA kodującego represory kwitnienia, wśród nich czynniki transkrypcyjne z grupy AP2 (Aukerman i Sakai, 2003). Dojrzewanie owoców (= pęknięcie łuszczynek) *A. thaliana* pozostaje pod kontrolą genów kodujących czynniki transkrypcyjne SHP1/2, IND oraz ALC (Liljegen i wsp., 2000; Rajani i Sundaresan, 2001; Liljegen i wsp., 2004). Funkcję SHP1/2 reguluje z kolei czynnik transkrypcyjny FUL (Ferrándiz i wsp., 2000).

W rozdziale 3.3 podano liczne przykłady potwierdzające istotną rolę chloroplastowych białek opiekuńczych w regulacji ontogenezy *A. thaliana* zarówno na poziomie komórkowym, jak i w skali całego organizmu roślinnego. Jednak wiedza ta jest bardzo skromna w odniesieniu do proteazy/holozymu AtDeg2, która stanowi przedmiot szczególnego zainteresowania naszego zespołu badawczego. Jak wspomniano, jedyne dane są rezultatem badań naszego zespołu, odnoszą się jednak wyłącznie do aktywności proteolitycznej AtDeg2, nie dysponujemy natomiast żadną wiedzą o tym, w regulacji jakich procesów związanych z przebiegiem ontogenezy *A. thaliana* może być zaangażowane białko AtDeg2 poprzez swoją aktywność opiekuńczą.

4 CEL PRACY

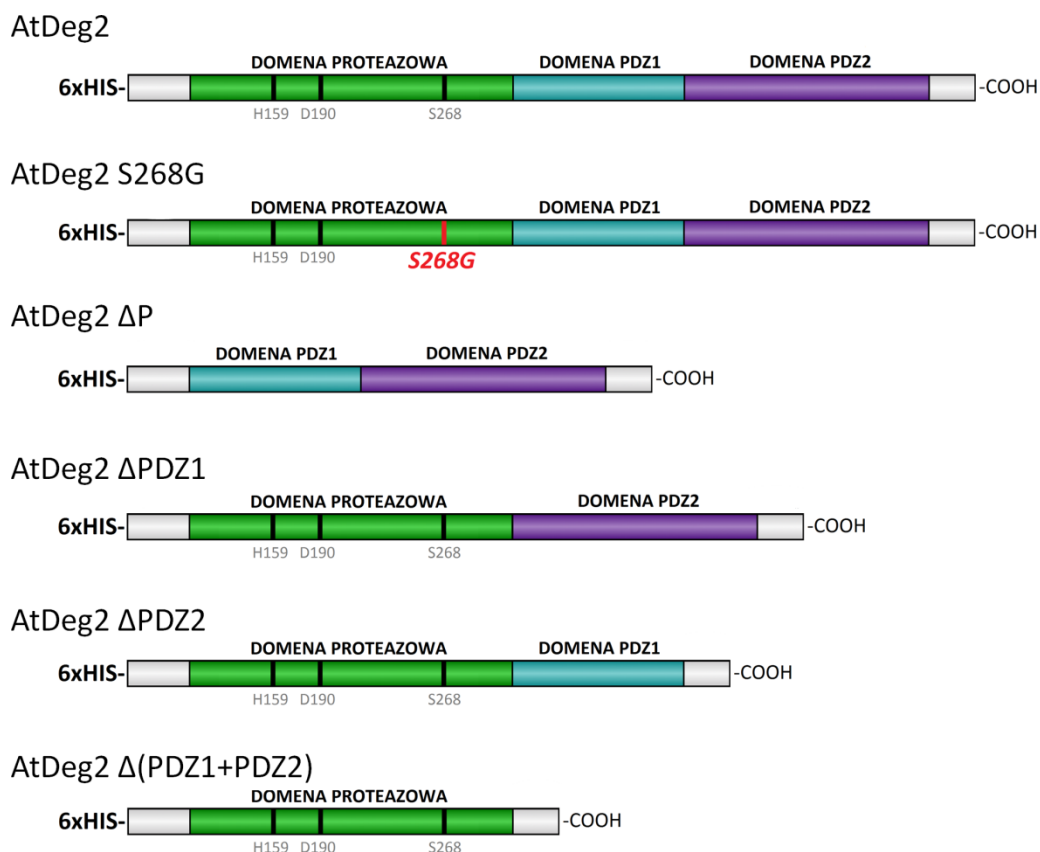
4.1 CEL STRATEGICZNY

Zważywszy na bardzo ograniczony stan wiedzy w zakresie funkcji fizjologicznych chloroplastowego białka AtDeg2, zwłaszcza zaś w zakresie funkcji, jakie pełni to białko poprzez swoją aktywność opiekuńczą, celem strategicznym mojej pracy doktorskiej stało się **znaczne rozszerzenie wiedzy na temat aktywności opiekuńczej AtDeg2**.

4.2 ZADANIA BADAWCZE

Zadania badawcze, jakie postanowiłem zrealizować w ramach badań, których wyniki mają się złożyć na moją rozprawę doktorską zostały sformułowane następująco:

1. Ustalenie, która domena w strukturze pierwszorzędowej AtDeg2 jest odpowiedzialna za aktywność opiekuńczą tego białka *in vitro*. Wykonanie tego zadania pozwoliło na uzyskanie informacji, w jaki sposób struktura pierwszorzędowa AtDeg2 determinuje podwójną, opiekuńczo-proteolityczną aktywność tego białka. Zadanie to zostało wykonane przez porównanie aktywności opiekuńczej *in vitro* sześciu wersji rekombinowanych białka AtDeg2 (Rysunek 23), a mianowicie:
 - AtDeg2 – wersja dzika AtDeg2,
 - AtDeg2 S268G – AtDeg2 z mutacją punktową prowadzącą do zamiany reszty seryny na resztę glicyny w miejscu katalitycznym białka,
 - AtDeg2 ΔP – AtDeg2 z delecją domeny proteazowej,
 - AtDeg2 $\Delta PDZ1$ – AtDeg2 z delecją domeny PDZ1,
 - AtDeg2 $\Delta PDZ2$ – AtDeg2 z delecją domeny PDZ2,
 - AtDeg2 $\Delta(PDZ1+PDZ2)$ – AtDeg2 z delecją obu domen PDZ.



Rysunek 23. Rozkład domen w strukturze pierwszorzędowej wersji rekombinowanych AtDeg2 pozyskanych i używanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej

2. Identyfikacja fizjologicznych substratów dla aktywności opiekuńczej AtDeg2 *in vivo* u roślin hodowanych w warunkach ekspozycji na światło o wysokim natężeniu. Zadanie to zostało wykonane przez analizę porównawczą rozdzielów elektroforetycznych uzyskanych drogą elektroforezy diagonalnej białek chloroplastowych wyizolowanych z liści roślin *A. thaliana* hodowanych w warunkach ekspozycji na światło o wysokim natężeniu i reprezentujących następujące genotypy:

- rośliny WT,
- transformanty posiadające białko AtDeg2 dysponujące samą tylko aktywnością opiekuńczą.

Poszukiwano substratów holdazowej aktywności opiekuńczej AtDeg2 wyrażającej się niedopuszczaniem do powstawania agregatów międzybiałkowych utrzymywanych wiązaniami dwusiarczkowymi.

3. Utworzenie katalogu cech fenotypowych *A. thaliana*, w których regulacji kształtowania się uczestniczy AtDeg2 *in vivo* poprzez swoją aktywność opiekuńczą lub opiekuńczą i proteolityczną jednocześnie. Zadanie to zostało zrealizowane przez wykonanie porównawczej analizy fenotypowej roślin reprezentujących cztery genotypy (Rysunek 24), a mianowicie:

- 1) rośliny WT (obecne obie aktywności AtDeg2),
- 2) mutanty *deg2-3* (brak obu aktywności AtDeg2),
- 3) transformanty posiadające białko AtDeg2 dysponujące samą tylko aktywnością opiekuńczą,
- 4) transformanty posiadające białko AtDeg2 dysponujące samą tylko aktywnością proteolityczną,

W pierwszej kolejności wykonano wstępną analizę fenotypową obejmującą rośliny WT i mutanty *deg2-3*, której celem było stworzenie

- katalogu cech fenotypowych, w których regulacji kształtowania się uczestniczy AtDeg2 poprzez swoją **aktywność opiekuńczą, proteolityczną lub obie aktywności jednocześnie** – są to cechy, którymi różni się w sposób istotny statystycznie rośliny WT i mutanty *deg2-3*.

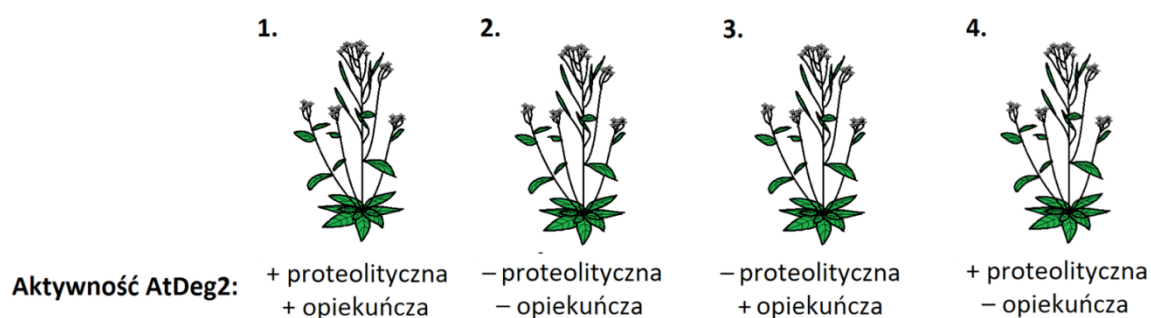
Następnie, uwzględniając tylko cechy zidentyfikowane podczas wstępnej analizy fenotypowej, wykonano obejmującą wszystkie cztery genotypy analizę fenotypową, której celem było stworzenie:

- podkatalogu cech fenotypowych, w których regulacji kształtowania się uczestniczy AtDeg2 poprzez swoją **aktywność opiekuńczą** – są to cechy, których wartość różni się w sposób istotny statystycznie w obrębie pary 1/4 oraz pary 3/4, ale nie w obrębie pary 1/3 (patrz Rysunek 24),
- podkatalogu cech fenotypowych, w których regulacji kształtowania się uczestniczy AtDeg2 poprzez swoją **aktywność proteolityczną i opiekuńczą** jednocześnie – są to cechy, których wartość różni się w sposób istotny statystycznie w obrębie pary 1/3 oraz pary 1/4, ale nie w obrębie pary 3/4.

Katalog badanych cech obejmował:

- chronologię przebiegu faz i podfaz ontogenezy *A. thaliana*, a mianowicie:

- fazy 1 (pojawianie się liści) i jej podfaz,
- fazy 3 (wzrost rozetki liściowej) i jej podfaz,
- fazy 5 (pojawianie się kwiatostanu),
- fazy 6 (kwitnienie) i jej podfaz,
- fazy 8 (dojrzewanie owoców) i jej podfaz,
- morfologię ósmego liścia w momencie, w którym osiągnął on swoją końcową wielkość,
- aktywność fotosyntetyczną ósmego liścia w momencie, w którym osiągnął on swoją końcową wielkość,
- morfologię organów generatywnych roślin, które osiągnęły podfazę 8.9 oraz morfologię dojrzałych nasion.



Rysunek 24. Rośliny wykorzystane do analizy fenotypowej w ramach realizacji trzeciego zadania badawczego

5 MATERIAŁY I METODY

5.1 MATERIAŁ ROŚLINNY I WARUNKI HODOWLI ROŚLIN

5.1.1 MATERIAŁ ROŚLINNY

Doświadczenia wykonywano z wykorzystaniem roślin rzodkiewnika pospolitego *Arabidopsis thaliana* (L.) linii Columbia (Col-0) reprezentowanych przez następujące genotypy:

- WT (ang. *wild type*) – rośliny dzikie.
- *deg2-3* (SALK_118424) – mutanty *A. thaliana* uzyskane na drodze mutagenazy insercyjnej roślin WT przez wprowadzenie transformującego DNA (T-DNA) do 19-stego egzonu genu *AtDEG2* (AT2G47940), czego efektem jest całkowity brak białka AtDeg2 w proteomie chloroplastowym (Luciński i wsp., 2011). Nasiona otrzymano z NASC (N^ottingham A^orabidopsis S^ock C^ontre, Wielka Brytania).
- *35S:AtDEG2^{S268G}-GFP*, linia 3.313 – transformanty *A. thaliana* uzyskane na drodze transformacji mutantu *deg2-3* z użyciem klonu ekspresyjnego (patrz podrozdział 5.7.5), w obrębie którego znajdował się odpowiednio zmodyfikowany region kodujący (ang. *coding DNA sequence*, CDS) genu *AtDEG2* określony jako *AtDEG2^{S268G}*. Modyfikacja polegała na wprowadzeniu mutacji w sekwencji nukleotydowej w kodonie AGT przez substytucję adeniny (A) na guaninę (G), prowadząc do zamiany seryny (S) na glicynę (G) w miejscu 268 białka AtDeg2. *AtDEG2^{S268G}* ulega ekspresji w fuzji ze znacznikiem histydynowym i fluorescencyjnym na C-końcu – pod kontrolą promotora wirusa mozaiki kalafiora (ang. *cauliflower mosaic virus*, CaMV) 35S. Rośliny uzyskano w trakcie realizacji niniejszej pracy doktorskiej.
- *35S:AtDEG2^{ΔPDZ1}-GFP*, linie 4.23 oraz 4.31 – transformanty *A. thaliana* uzyskane na drodze transformacji mutantu *deg2-3* z użyciem klonu ekspresyjnego, w obrębie którego znajdował się odpowiednio zmieniony region CDS genu *AtDEG2*, a mianowicie *AtDEG2^{ΔPDZ1}*. Zmiana polegała na delecji fragmentu DNA kodującego domenę PDZ1 białka AtDeg2. *AtDEG2^{ΔPDZ1}* ulega ekspresji w fuzji ze znacznikiem histydynowym i fluorescencyjnym na C-końcu – pod kontrolą

promotora CaMV 35S. Rośliny uzyskano w trakcie realizacji niniejszej pracy doktorskiej.

5.1.2 HODOWLA ROŚLIN W ZIEMI

Nasiona *A. thaliana* wysiewano do doniczek torfowych typu Jiffy o średnicy 42 mm, pH 6,0 (AgroWit, Polska) i poddawano 3-dniowej stratyfikacji w ciemności w temperaturze 4°C. Hodowlę roślin prowadzono w pokoju hodowlanym (NEMA, Niemcy) w warunkach ekspozycji na światło o umiarkowanym bądź wysokim natężeniu (Tabela 2).

Tabela 2. Warunki hodowli roślin *A. thaliana*

Parametry	Światło o umiarkowanym natężeniu	Światło o wysokim natężeniu
Natężenie światła	110 $\mu\text{moli kwantów światła m}^{-2} \text{s}^{-1}$	400 $\mu\text{moli kwantów światła m}^{-2} \text{s}^{-1}$
Fotoperiod	16 h światła i 8 h ciemności	
Temperatura	21°C	
Wilgotność powietrza	70%	

5.1.3 HODOWLA ROŚLIN NA PODŁOŻU MS

Nasiona roślin *A. thaliana* przeznaczonych do hodowli *in vitro* poddawano sterylizacji powierzchniowej w oparach 3% (v/v) HCl i 5,2% (v/v) wybielacza ACE przez 4,5 h.

Hodowlę *in vitro* prowadzono na pożywce stałej MS (Murashige i Skoog, 1962) o składzie: 4,4 g/L gotowej pożywki MS z witaminami (Sigma-Aldrich, USA), 8 g/L agaru do roślin (BIOCORP, Polska). W celu wyselekcjonowania transformantów roślinnych do pożywki MS dodawano również herbicyd glufosynat amonu (Sigma-Aldrich, USA) o stężeniu 10 mg/L.

W celu wyselekcjonowania transformantów roślinnych nasiona wysiewano na szalki z pożywką MS z dodatkiem herbicydu, po czym prowadzono 3-dniową stratyfikację w ciemności w 4°C. Następnie szalki wstawiano do pokoju hodowlanego

(NEMA, Niemcy) i hodowano w warunkach ekspozycji na światło o umiarkowanym natężeniu (Tabela 2).

5.2 IZOLACJA PROTOPLASTÓW ORAZ IZOLACJA, LIZA I FRAKCJONOWANIE CHLOROPLASTÓW

5.2.1 IZOLACJA PROTOPLASTÓW Z KOMÓREK MIĘKISZOWYCH LIŚCIA *A. THALIANA*

Izolację protoplastów z komórek miękiszowych liścia *A. thaliana* wykonano w oparciu o protokół opisany przez Wu i wsp., (2009). Do indywidualnych izolacji wykorzystywano po 4-6 liści rozetkowych 3-4 tygodniowych mutantów *deg2-3*, z których zdjęto epidermę za pomocą biurowej bezbarwnej taśmy samoprzylepnej przez utworzenie „kanapki” taśma-liść-taśma i oderwaniu taśmy od spodniej strony liścia wraz z przyklejoną do niej epidermą. Następnie liście umieszczono na powierzchni buforu enzymatycznego zawierającego 1,2% (w/v) celulazę 'Onozuka' R10 (Serva, Niemcy), 0,4% (w/v) macerozym 'Onozuka' R10 (Serva, Niemcy), 0,4 M mannitol, 10 mM CaCl₂, 20 mM KCl oraz 20 mM MES pH 5,7 na szalkach Petriego w taki sposób, aby tkanka miękiszowa zanurzona była w roztworze i wytrząsano (55 rpm, 1 h, 30°C). Po inkubacji uwolnione do buforu protoplasty wirowano (150 x g, 3 min, 4°C, wirówka Sorvall ST16R, Thermo Scientific™, USA), trzykrotnie przepłukano buforem W5 (154 mM NaCl, 125 mM CaCl₂, 5 mM KCl i 2 mM MES pH 5,7) i zawieszono w buforze MMg (0,4 M mannitol, 15 mM MgCl₂, 4 mM MES pH 5,7) w takiej objętości, aby docelowe stężenie protoplastów wynosiło ok. 2×10^4 komórek na 100 µl roztworu. Protoplasty zliczano z użyciem komory Bürkera i mikroskopu świetlnego. Następnie protoplasty poddawano procedurze transfekcji (patrz podrozdział 5.8.4).

5.2.2 IZOLACJA, LIZA I FRAKCJONOWANIE CHLOROPLASTÓW Z LIŚCI *A. THALIANA*

Do izolacji chloroplastów wykorzystywano liście rozetkowe roślin *A. thaliana*, które osiągnęły podfazę 6.0 ontogenezy (otwarcie się pierwszego kwiatu, patrz podrozdział 5.16.1) rosnących w warunkach ekspozycji na światło o umiarkowanym bądź wysokim natężeniu (Tabela 2). Izolację chloroplastów przeprowadzono z wykorzystaniem elementów zestawu Chloroplast Isolation Kit (Sigma-Aldrich, USA).

Ok. 10 g liści zanurzono w 25 ml buforu do izolacji chloroplastów o składzie: 50 mM trycyna-NaOH pH 7,8, 400 mM sacharoza, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM NaCl, 0,2% (w/v) BSA, 10mM jodoacetamid i przeprowadzono homogenizację za pomocą homogenizatora ostrzowego MPW 302 (Mechanika Precyzyjna, Polska) w dwóch cyklach po 5 s. Homogenat przefiltrowano przez filtr Mesh 100 z zestawu Chloroplast Isolation Kit i wirowano (1000 x g, 7 min, 4°C, wirówka 3K30, Sigma-Aldrich, Niemcy). Supernatant odrzucono, a osad zawieszono w 25 ml buforu do izolacji chloroplastów i ponownie zwirowano jw.

Lizę osmotyczną chloroplastów wykonano przez zawieszenie osadu chloroplastów w buforze lizującym (50 mM HEPES-KOH pH 7,8, 10mM $MgCl_2$, 10 mM jodoacetamid) i kilkuminutową inkubację w lodzie. Uzyskany lizat chloroplastowy wykorzystywano do frakcjonowania lub mrożono i przechowywano w -20°C po uprzednim dodaniu glicerolu do stężenia końcowego 10% (v/v).

Frakcjonowanie chloroplastów wykonano przez wirowanie lizatu chloroplastowego (12 250 x g, 10 min, 4°C, wirówka 3K30, Sigma-Aldrich, Niemcy), zebranie supernatantu do świeżej probówki i kolejne wirowanie (60 000 x g, 20 min, 4°C). Nowy supernatant (stroma + otoczki chloroplastowe) przeniesiono do świeżej probówki, a osady (tylakoidy) pochodzące z obydwu wirowań połączono, zawieszono w buforze lizującym z 10% (v/v) glicerolem, mrożono i przechowywano w -20°C. Nowy supernatant ultrawirowano (300 000 x g, 2 min, 4°C, ultrawirówka L7-55, Beckman Coulter, USA). Supernatant po ultrawirowaniu (stroma chloroplastowa) przeniesiono do świeżej probówki, dodano glicerolu do końcowego stężenia 10% (v/v), mrożono i przechowywano w -20°C.

5.3 MATERIAŁ BAKTERYJNY I WARUNKI HODOWLI BAKTERII

5.3.1 SZCZEPY *E. COLI*

W celu uzyskania klonów wejściowych i ekspresyjnych (patrz podrozdział 5.7.4 i 5.7.5), zastosowano szczep bakteryjny One Shot® OmniMAX™ 2 T1R *E. coli* (Invitrogen™, USA). Szczep charakteryzuje się opornością na infekcję fagiem T1 i T5 (*tonA*).

Do nadekspresji białek rekombinowanych z uzyskanych klonów ekspresyjnych wykorzystano szczep bakteryjny BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, który posiada dodatkowe rzadkie u *E. coli* kopie genów tRNA takie jak: *argU* (AGA, AGG), *ileY* (AUA) i *leuW* (CUA), dzięki czemu ekspresja białek niebakteryjnych jest zdecydowanie bardziej wydajna. Szczep posiada gen oporności na chloramfenikol i tetracyklinę.

5.3.2 SZCZEP *A. TUMEFACIENS*

Do uzyskania roślin transgenicznych wykorzystano szczep bakteryjny *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 zawierający plazmid indukujący guza (ang. *tumor inducing*, Ti) pAL4404 oraz chromosom TiAch5 z genem oporności na antybiotyk rifampicynę.

5.3.3 POŻYWKA LB DO HODOWLI BAKTERII

Hodowlę bakteryjną prowadzono w:

- pożywce płynnej LB (ang. *lysogeny broth*) o składzie: 0,5% (w/v) ekstrakt (lizat) z drożdży (BIOCORP, Polska) 1% (w/v) trypton (BIOCORP, Polska) i 1% (w/v) NaCl (Avantor Performance Materials Poland S.A., Polska) z dodatkiem antybiotyku o odpowiednim stężeniu;
- pożywce stałej LB o składzie: 0,5% (w/v) ekstrakt z drożdży, 1% (w/v) trypton, 1% (w/v) NaCl, 1,5% (w/v) agar bakteriologiczny (BIOCORP, Polska) z dodatkiem antybiotyku o odpowiednim stężeniu.

5.3.4 ANTYBIOTYKI

Do hodowli *E. coli* szczepu BL21-CodonPlus(DE3)-RIL stosowano antybiotyk chloramfenikol (ROTH Industries GmbH i Co, Niemcy) o stężeniu 36 mg/L oraz antybiotyk tetracyklinę (ROTH Industries GmbH i Co, Niemcy) o stężeniu 12,5 mg/L.

Do hodowli *A. tumefaciens* stosowano antybiotyk rifampicynę (ROTH Industries GmbH i Co, Niemcy) o stężeniu 30 mg/L.

Dodatkowo jako czynniki selekcyjne transformantów bakteryjnych stosowano następujące antybiotyki:

- karbenicyna (ROTH Industries GmbH i Co, Niemcy) o stężeniu 50 mg/L,
- kanamycyna (ROTH Industries GmbH i Co, Niemcy) o stężeniu 50 mg/L.

5.3.5 HODOWLA *E. COLI*

Hodowlę *E. coli* prowadzono na pożywce stałej lub płynnej LB zawierającej odpowiedni antybiotyk w temperaturze 37°C. Bakterie na pożywce stałej hodowano przez ok. 16 h. Hodowlę płynną prowadzono z wytrząsaniem (180 rpm), monitorując gęstość optyczną hodowli – której miarą jest poziom absorpcji światła przy długości fali 600 nm tzw. OD₆₀₀ (ang. *optical density*) – aż do osiągnięcia wczesnej fazy logarytmicznego wzrostu (OD₆₀₀ = 0,4-0,5) lub fazy stacjonarnej (OD₆₀₀ = 2,0-2,5).

5.3.6 HODOWLA *A. TUMEFACIENS*

Hodowlę *A. tumefaciens* prowadzono na pożywce stałej lub płynnej LB zawierającej rifampicynę i odpowiedni antybiotyk selekcyjny w temperaturze 28°C. Bakterie na pożywce stałej hodowano przez dwa dni, a hodowlę płynną prowadzono z wytrząsaniem (180 rpm), monitorując gęstość optyczną hodowli aż do osiągnięcia późnej fazy logarytmicznego wzrostu (OD₆₀₀ = 0,5-1,0) lub wczesnej fazy stacjonarnej (OD₆₀₀ = 1,0-2,0).

5.4 IZOLACJA RNA I DNA

5.4.1 IZOLACJA RNA CAŁKOWITEGO Z ROŚLIN

Izolację RNA całkowitego z roślin WT *A. thaliana* wykonano z użyciem TRI Reagent® (Sigma-Aldrich, USA) zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta. Do indywidualnych izolacji używano 100 mg liści 3-4 tygodniowych roślin *A. thaliana*.

5.4.2 IZOLACJA DNA GENOMOWEGO Z ROŚLIN

DNA genomowe izolowano z ok. 40 mg liści 3-4 tygodniowych roślin *A. thaliana*, które najpierw rozdrobniono końcówką do mikropipety w probówce typu Eppendorf i zawieszono w 0,5 ml buforu do izolacji DNA o składzie: 250 mM NaCl, 25mM EDTA

i 1% (w/v) SDS i 200 mM Tris-HCl pH 7,5. Preparat inkubowano 30 min w temperaturze 32°C z wytrząsaniem (300 rpm), po czym dodano 200 µl fenolu (Sigma-Aldrich, USA) i wymieszano. Następnie dodano 200 µl chloroformu (Avantor Performance Materials Poland S.A., Polska) zmieszanego z alkoholem izoamylowym (Avantor Performance Materials Poland S.A., Polska) w stosunku 2:1 i energicznie wstrząsnęto. Próbkę wirowano (10 000 x g, 12 min, temperatura pokojowa, wirówka Minispin, Eppendorf, Niemcy) i ostrożnie zebrano górną warstwę do świeżej probówki. Do próby dodano 400 µl chloroformu zmieszanego z alkoholem izoamylowym w stosunku 2:1 i energicznie wstrząsnęto. Próbkę wirowano (10 000 x g, 12 min, temperatura pokojowa) i ponownie zebrano górną warstwę do świeżej probówki. Z tak przygotowanego preparatu wytrącono DNA genomowe przez zmieszanie z izopropanolem (objętością odpowiadającą 0,6 objętości próby) i inkubację 10 min w temperaturze pokojowej. Próbkę następnie zwirowano (10 000 x g, 12 min, temperatura pokojowa), usunięto supernatant, a osad suszono przez pozostawienie otwartej probówki do czasu całkowitego odparowania resztek izopropanolu. Wysuszony osad DNA genomowego rozpuszczono w 100 µl sterylnej wody.

5.4.3 IZOLACJA DNA WEKTORÓW

5.4.3.1 IZOLACJA DNA WEKTORÓW PRZEZ ZAGOTOWANIE

Pojedynczą kolonię bakteryjną zawieszano w 50 µl H₂O i inkubowano 10 min w temperaturze 95°C, po czym schłodzono w lodzie i wirowano (12 000 x g, 15 s, temperatura pokojowa, wirówka Minispin, Eppendorf, Niemcy). Supernatant zawierający DNA określonego wektora wykorzystywano jako matrycę do reakcji PCR (patrz podrozdział 5.6.2) w celu identyfikacji kolonii bakteryjnych, które pomyślnie przeszły procedurę transformacji.

5.4.3.2 IZOLACJA DNA WEKTORÓW Z UŻYCIEM ZESTAWU DO IZOLACJI

Izolację DNA wektorów wykonano z użyciem zestawu odczynników GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific™, USA) zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta. Do indywidualnych izolacji wykorzystywano 9 ml całonocnej hodowli bakteryjnej (w fazie stacjonarnej).

5.4.4 IZOLACJA FRAGMENTÓW DNA Z ŻELU AGAROWEGO

Izolację fragmentów DNA z żelu agarowego przeprowadzono z użyciem zestawu odczynników QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Niemcy) zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta.

5.5 ELEKTROFOREZA RNA I DNA

Preparaty kwasów nukleinowych mieszano z sześciokrotnie stężonym buforem obciążającym DNA Gel Loading Dye (Thermo Scientific™, USA) zawierającym błękit bromofenolowy (BBF), umieszczano w kieszonkach uformowanych w żelu agarowym o grubości 6 mm o stężeniu 1,2% (w/v) z dodatkiem barwnika DNA Midori Green DNA Stain (Nippon Genetic, Niemcy) w stężeniu 5 µl/100 ml roztworu agarozy i rozdzielano elektroforetycznie względem markerów długości DNA w zakresie od 250 do 10 000 pz (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific™, USA) lub w zakresie od 100 do 3 000 pz (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific™, USA). Elektroforezę prowadzono w buforze do elektroforezy TAE (ang. *Tris-acetate-EDTA*) o składzie: 40 mM Tris, 20 mM kwas octowy i 1 mM EDTA pH 8,0 przy stałym napięciu 100 V aż do momentu osiągnięcia przez BBF granicy żelu. Żel agarowy otrzymywano przez rozpuszczenie agarozy w buforze TAE.

5.6 SYNTEZA I MODYFIKACJA DNA

5.6.1 STARTERY

Startery wykorzystywane do syntezy i modyfikacji DNA zaprojektowano w oparciu o sekwencję nukleotydową mRNA AtDeg2 (NM_130361, Rysunek 25), a ich jakość oceniono za pomocą programu OligoAnalyzer 1.0.2.

Startery stosowane do amplifikacji regionu CDS genu *AtDEG2* przeznaczonego do ekspresji AtDeg2 ze znacznikiem histydynowym i fluorescencyjnym na C-końcu białka w komórkach roślinnych zostały zaprojektowane w taki sposób, aby amplifikowany fragment DNA zawierał sekwencję kodującą peptyd tranzytowy AtDeg2 oraz kodon

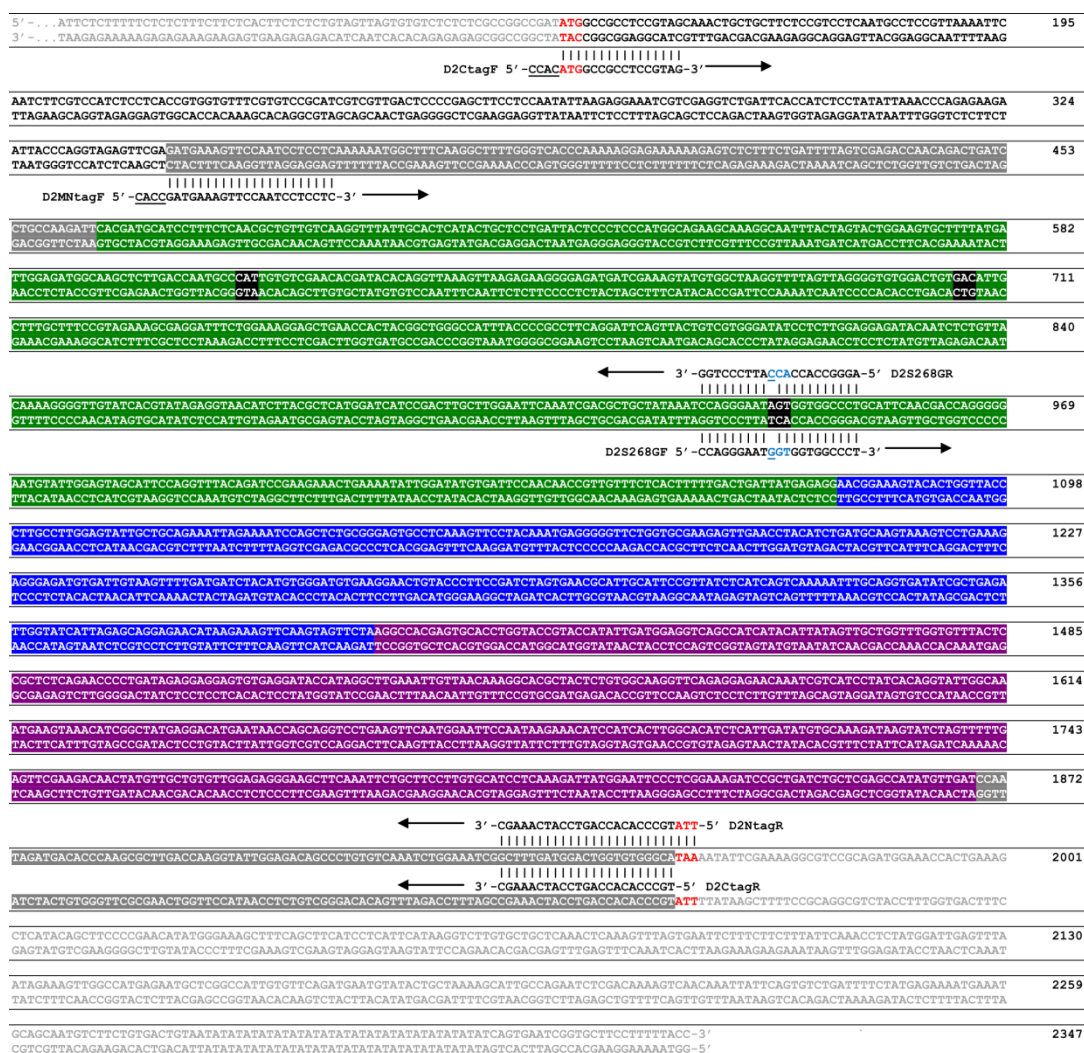
START (ATG), a był pozbawiony kodonu STOP (TAA). Dodatkowo starter przedni (ang. *forward*) wprowadzał do amplifikowanego DNA motyw CACC rozpoznawany przez topoizomerazę I związaną z wektorem wejściowym (patrz podrozdział 5.7.1). Sekwencje startera przedniego i wstecznego (ang. *reverse*) zostały przedstawione w Tabeli 3 pod nazwami: odpowiednio D2CtagF (ang. *Deg2 C-tag forward*) i D2CtagR (ang. *Deg2 C-tag reverse*).

Startery stosowane do amplifikacji regionu CDS DNA kodującego AtDeg2 wykorzystanego dalej do nadekspresji rekombinowanych wersji AtDeg2 ze znacznikiem histydynowym na N-końcu białka w komórkach bakteryjnych były zaprojektowane w taki sposób, aby amplifikowany fragment DNA zawierał kodon STOP (TAA), a był pozbawiony kodonu START (ATG) oraz sekwencji kodującej peptyd tranzytowy. Dodatkowo starter przedni wprowadzał do amplifikowanego DNA motyw CACC rozpoznawany przez topoizomerazę I związaną z wektorem wejściowym. Sekwencje startera przedniego i wstecznego zostały przedstawione w Tabeli 3 pod nazwami Deg2MntagF (ang. *Deg2 mature N-tag forward*) i D2NtagR (ang. *Deg2 N-tag reverse*).

Startery stosowane do mutagenazy ukierunkowanej regionu CDS kodującego AtDeg2, którego ekspresja miała prowadzić do powstania białka AtDeg2 z mutacją punktową S268G, zostały zaprojektowane w taki sposób, aby wprowadzały do amplifikowanego DNA kodon GGT kodujący nieaktywną katalitycznie resztę glicyny w miejsce kodonu AGT kodującego katalitycznie aktywną resztę seryny w miejscu 268 przez zamianę A na G. Sekwencje startera przedniego i wstecznego zostały przedstawione w Tabeli 3 pod nazwami Deg2S268GF (ang. *Deg2 S268G forward*) i D2S268GR (ang. *Deg2 S268G reverse*).

Startery stosowane do identyfikacji roślin zawierających transgen zostały zaprojektowane w taki sposób, aby amplifikowały fragment DNA kodujący białko GFP stanowiące znacznik fluorescencyjny wprowadzonego transgeny. Sekwencje startera przedniego i wstecznego zostały przedstawione w Tabeli 3 pod nazwami GFPF (ang. *green fluorescent protein forward*) i GFPR (ang. *green fluorescent protein reverse*).

Syntezę starterów zlecono Pracowni Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie.



Rysunek 25. Komplementarność sekwencji starterów do sekwencji nukleotydowej AtDeg2 (NM_130361). Sekwencje nukleotydowe AtDeg2 zostały zaprezentowane w postaci dwóch komplementarnych nici ograniczonych krawędzią górną i dolną. Sekwencje nukleotydowe AtDeg2 wykraczające poza otwartą ramkę odczytu (ang. *open reading frame*, ORF) wyróżniono szarym kolorem czcionki. Sekwencja ORF AtDeg2 została przedstawiona za pomocą czarnego (kodująca chloroplastowy peptyd tranzytowy) i białego koloru czcionki. Kodony START i STOP zarówno sekwencji AtDeg2, jak i sekwencji starterów wyróżnione zostały czerwonym kolorem czcionki. Sekwencje nukleotydowe AtDeg2 kodujące domeny: proteazową, PDZ1 i PDZ2 zostały umieszczone w blokach w kolorze odpowiednio zielonym, niebieskim i fioletowym. Sekwencje umieszczone w blokach szarych stanowią sekwencje kodujące N- i C-końcowe fragmenty białka niestanowiące żadnej z domen. Trójki nukleotydowe umieszczone w blokach czarnych stanowią sekwencje kodujące reszty aminokwasowe aktywne katalitycznie. Obok nazw starterów zostały umieszczone sekwencje starterów, których komplementarność do sekwencji AtDeg2 została oznaczona kreską pionową „|”. Za pomocą podkreślenia wyróżniono motyw rozpoznawany przez topoisomerazę I. Niebieskim kolorem czcionki wyróżniono kodon kodujący glicynę, w którego obrębie podkreśleniem wyróżniono miejsce wprowadzanej mutacji punktowej.

Tabela 3. Sekwencje starterów stosowanych w reakcjach PCR. T_h – temperatura hybrydyzacji stosowana w reakcji PCR dla danej pary starterów. Kodony START i STOP zostały wyróżnione czerwonym kolorem. Niebieskim kolorem wyróżniono kodon kodujący glicynę, w którego obrębie podkreśleniem wyróżniono miejsce wprowadzanej mutacji punktowej.

Nazwa	Sekwencja	T_h
D2CtagF	5'- <u>CACC</u> ATGCGCCTCCGTAG	60°C
D2CtagR	5'-TGCCCACACCAGTCCATCAAAGC	
D2MNtagF	5'- <u>CACCG</u> ATGAAAGTTCCAATCCTCCTC	60°C
D2NtagR	5'- <u>TTA</u> TGCCCACACCAGTCCATCAAAGC	
D2S268GF	5'-CCAGGGAAT <u>GGT</u> GGTGGCCCT	57°C
D2S268GR	5'-AGGGCCACC <u>ACC</u> ATTCCCTGG	
GFPF	5'- CGACGGGAAC TACAAGACAC	55°C
GFPR	5'- GCTGTTACAAACTCAAGAAGG	

5.6.2 AMPLIFIKACJA FRAGMENTÓW DNA METODĄ PCR

Reakcję łańcuchową polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*, PCR) wykonywano z wykorzystaniem termocyklera T100™ (Bio-Rad, USA) do celów oceny jakościowej transformantów za pomocą polimerazy DreamTaq Hot Start z użyciem zestawu odczynników DreamTaq Green DNA Polymerase (Thermo Scientific™, USA) lub do syntezy fragmentów DNA przeznaczonych do klonowania za pomocą polimerazy o wysokiej wierności Phusion® High-Fidelity (HF) z użyciem zestawu odczynników Phusion® HF DNA Polymerase (Thermo Scientific™, USA). Do reakcji PCR wykorzystywano również mieszaninę nukleotydów 10mM dNTP Mix firmy Thermo Scientific™ (USA).

Reakcję amplifikacji z użyciem polimerazy DreamTaq prowadzono w objętości 10 μ l, a reakcję amplifikacji z użyciem polimerazy Phusion® HF w objętości 50 μ l. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz warunki reakcji zostały przedstawione odpowiednio w Tabeli 4 i Tabeli 5.

Tabela 4. Skład mieszanin reakcyjnych stosowanych w reakcjach PCR

Składniki reakcji	Reakcja PCR z polimerazą DreamTaq Hot Start	Reakcja PCR z polimerazą Phusion® HF
Bufor	bufor barwiony DreamTaq zawierający 2mM MgCl ₂	bufor Phusion® HF zawierający 1,5mM MgCl ₂
dNTP	0,2 mM	0,2 mM
Starter przedni	0,25 µM	0,25 µM
Starter wsteczny	0,25 µM	0,25 µM
Polimeraza DNA	0,25 u polimerazy DNA DreamTaq Hot Start	0,5 u polimerazy DNA Phusion® HF
Matryca DNA	0,2 pg – 0,2 ng DNA wektora, 20 pg – 0,2 µg genomowego DNA (gDNA)	1 pg – 10 ng DNA wektora, 1 pg – 10 ng produktu syntezy chemicznej DNA, 5 µl produktu reakcji RT-PCR (cDNA)

Tabela 5. Warunki temperaturowo-czasowe stosowane w reakcjach PCR

Etap		Reakcja PCR z polimerazą DreamTaq Hot Start		Reakcja PCR z polimerazą Phusion® HF		Liczba cykli
		Temp.	Czas	Temp.	Czas	
1) Denaturacja wstępna		95°C	5 min	95°C	5 min	1
Synteza DNA	2) Denaturacja	95°C	30 s	95°C	30 s	30
	3) Hybrydyzacja starterów	55-60°C	30 s	60°C	30 s	
	4) Polimeryzacja	72°C	1 min	72°C	5 min	
5) Polimeryzacja końcowa		72°C	5 min	72°C	10 min	1

5.6.3 REAKCJA ODWROTNEJ TRANSKRYPCJI (RT-PCR)

W celu uzyskania komplementarnego DNA (ang. *complementary DNA*, cDNA) wymaganego do syntezy fragmentów DNA do klonowania wykonano reakcję PCR z odwrotną transkryptazą (ang. *reverse transcriptase PCR*, RT-PCR) za pomocą zestawu odczynników RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific™, USA) zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta i z zastosowaniem dołączonych

do zestawu starterów Oligo(dT)₁₈. Do reakcji jako matrycy użyto 3 µg RNA całkowitego wyizolowanego z roślin WT *A. thaliana*.

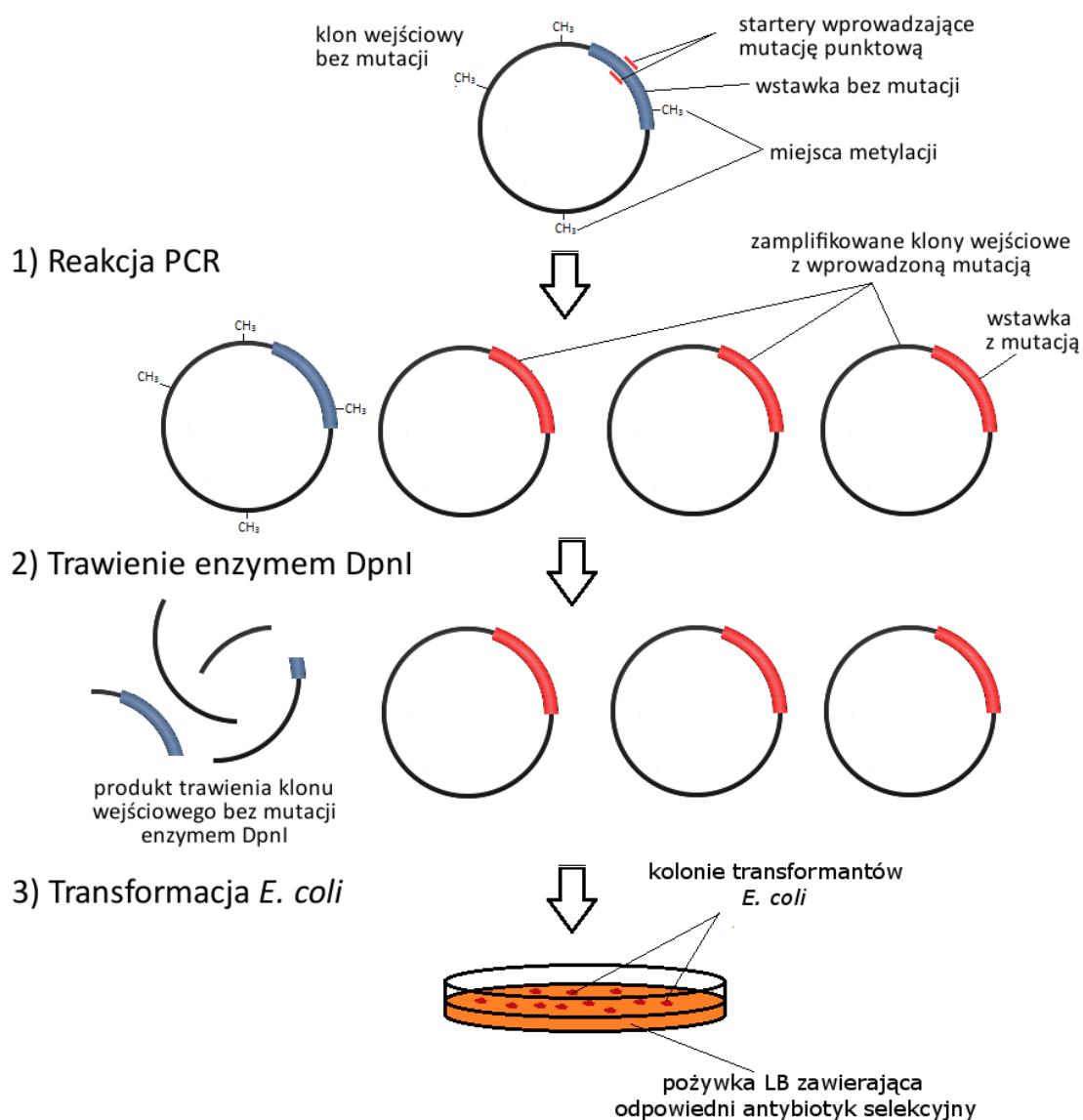
5.6.4 SYNTEZA CHEMICZNA FRAGMENTÓW DNA

Syntezę chemiczną fragmentów DNA kodujących warianty delecyjne AtDeg2 zlecono firmie Thermo Scientific™ (USA).

5.6.5 MUTAGENEZA UKIERUNKOWANA

Mutagenezę ukierunkowaną przeprowadzono za pomocą zestawu odczynników QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, USA) zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta.

Mutagenezę ukierunkowaną przeprowadzano w trzech etapach (Rysunek 26). W pierwszej kolejności wykonano reakcję PCR w objętości 25 µl, w której jako matrycy użyto wyizolowany z bakterii klon wejściowy kodujący wersję dziką AtDeg2 (*AtDEG2* pENTR™/SD/D-TOPO). Mutację punktową wprowadzano poprzez użycie specyficznych starterów tj. D2S268GF i D2S268GR (Tabela 3, s. 68), a reakcję prowadzono z użyciem polimerazy o bardzo wysokiej wiarygodności replikacji *PfuUltra* HF. Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w Tabeli 6, podczas gdy warunki temperaturowo-czasowe zaprezentowano w Tabeli 7. Po zakończonej reakcji PCR mieszaninę reakcyjną poddano trawieniu restrykcyjnemu przez 1,5 h w temperaturze 37°C poprzez dodanie do mieszaniny 10 u enzymu restrykcyjnego DpnI, który rozpoznaje i tnie miejsca metylacji. Jako że w mieszaninie reakcyjnej tylko klony wejściowe z wprowadzoną mutacją powielone były na skutek reakcji PCR (a więc nie były poddane procesowi metylacji) efektem trawienia było pofragmentowanie tylko niezmutowanych cząsteczek klonu wejściowego izolowanych z bakterii, a więc poddanych poreplikacyjnemu procesowi metylacji. Ostatnim etapem mutagenezy ukierunkowanej było wykonanie transformacji bakterii *E. coli* szczepu One Shot® OmniMAX™ 2 T1R z użyciem 1 µl otrzymanej mieszaniny reakcyjnej. Uzyskany produkt mutagenezy wyizolowano z bakterii i sprawdzono poprzez analizę wyniku sekwencjonowania DNA.



Rysunek 26. Etapy mutagenazy ukierunkowanej

Tabela 6. Skład mieszaniny reakcyjnej wykorzystywanej w reakcji PCR podczas wykonywania mutagenazy ukierunkowanej

Składniki reakcji	Reakcja PCR z polimerazą <i>PfuUltra</i> HF
Bufor	bufor <i>PfuUltra</i> HF zawierający 2mM MgCl ₂
dNTP	0,2 mM
Starter przedni	0,25 µM
Starter wsteczny	0,25 µM
Polimeraza DNA	2,5 u polimerazy DNA <i>PfuUltra</i> HF
Matryca DNA	10 ng DNA wektora (<i>AtDEG2</i> pENTR™/SD/D-TOPO)

Tabela 7. Warunki temperaturowo-czasowe stosowane w reakcji PCR podczas wykonywania mutagenazy ukierunkowanej

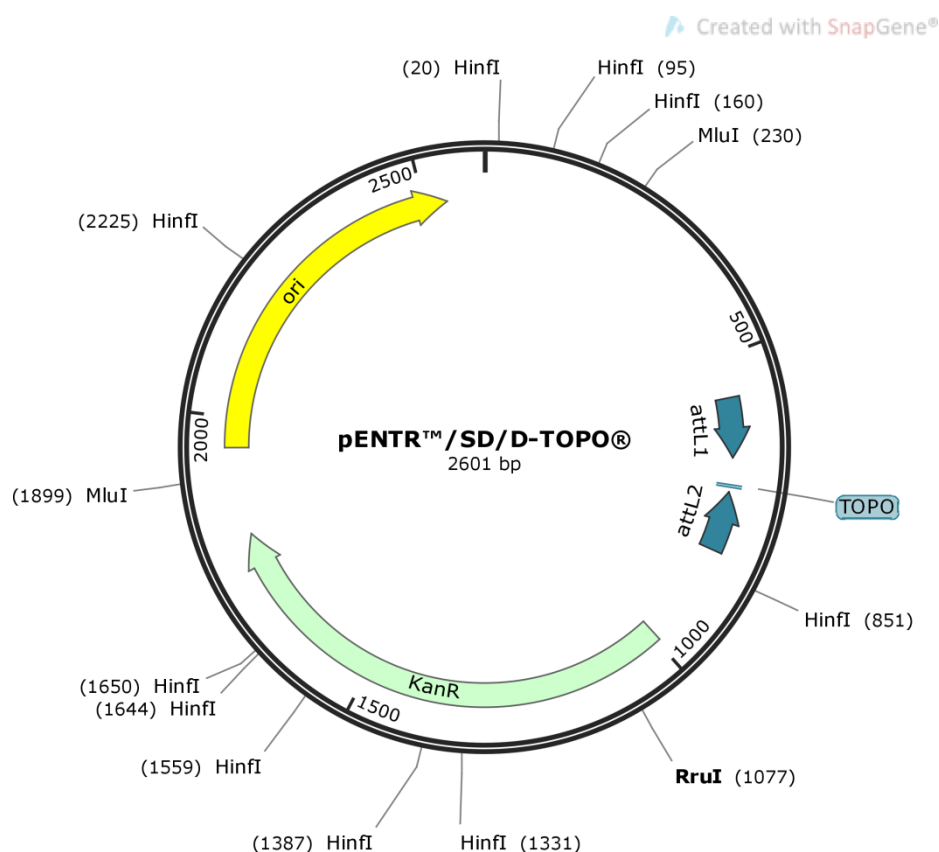
Etap		Reakcja PCR z polimerazą <i>PfuUltra HF</i>		Liczba cykli
		Temp.	Czas	
1) Denaturacja wstępna		95°C	2 min	1
Synteza DNA	2) Denaturacja	95°C	30 s	30
	3) Hybrydyzacja starterów	57°C	1 min	
	4) Polimeryzacja	68°C	5 min	
5) Polimeryzacja końcowa		68°C	5 min	1

5.7 KLONOWANIE DNA

W procesie klonowania (uzyskiwania klonów wejściowych i ekspresyjnych) zastosowano wektory wykorzystujące technologię Gateway® takie jak: pENTR™/SD/D-TOPO™, Champion™ pET300/NT-DEST oraz pEarleyGate103.

5.7.1 WEKTOR pENTR™/SD/D-TOPO™

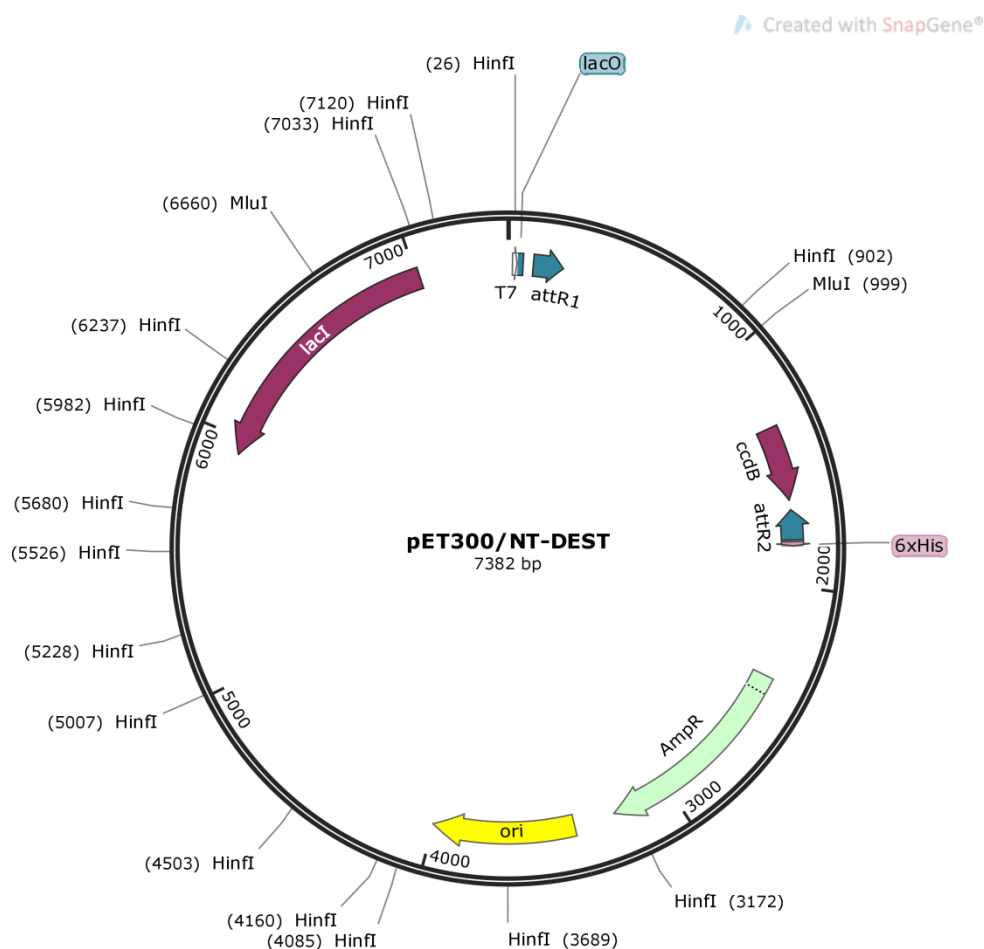
Jako wektor wejściowy do systemu klonowania Gateway® zastosowano wektor pENTR™/SD/D-TOPO™, który dzięki związanej z wektorem topoizomerasie I z wirusa *Vaccinia* pozwala na bezpośrednią ligację z produktami reakcji PCR. Wektor posiada miejsca rekombinacji *attL1* i *attL2* rozpoznawane przez klonazę LR (patrz podrozdział 5.7.5), umożliwiając przeniesienie klonowanego fragmentu DNA do wektorów docelowych systemu Gateway® (Rysunek 27).



Rysunek 27. Wektor pENTR™/SD/D-TOPO™. *attL1*, *attL2* – miejsca rekombinacji; KanR – gen oporności na kanamycynę; *ori* – miejsce inicjacji replikacji; HinfI, RruI, MluI – miejsca restrykcyjne dla enzymów HinfI, RruI, MluI. Rysunek wykonano z wykorzystaniem programu SnapGene®.

5.7.2 WEKTOR CHAMPION™ PET300/NT-DEST

Wektor Champion™ pET300/NT-DEST to wektor docelowy systemu klonowania Gateway®, jaki wykorzystano do indukowanej za pomocą izopropylotiogalaktozydu (IPTG) nadekspresji białek rekombinowanych w komórkach prokariotycznych pod kontrolą silnego promotora polimerazy RNA bakteriofaga T7 (Rysunek 28). Podczas nadekspresji do białka dołączany jest znacznik histydynowy (sześć reszt histydynowych) umożliwiający oczyszczanie białka za pomocą złoża niklowego.

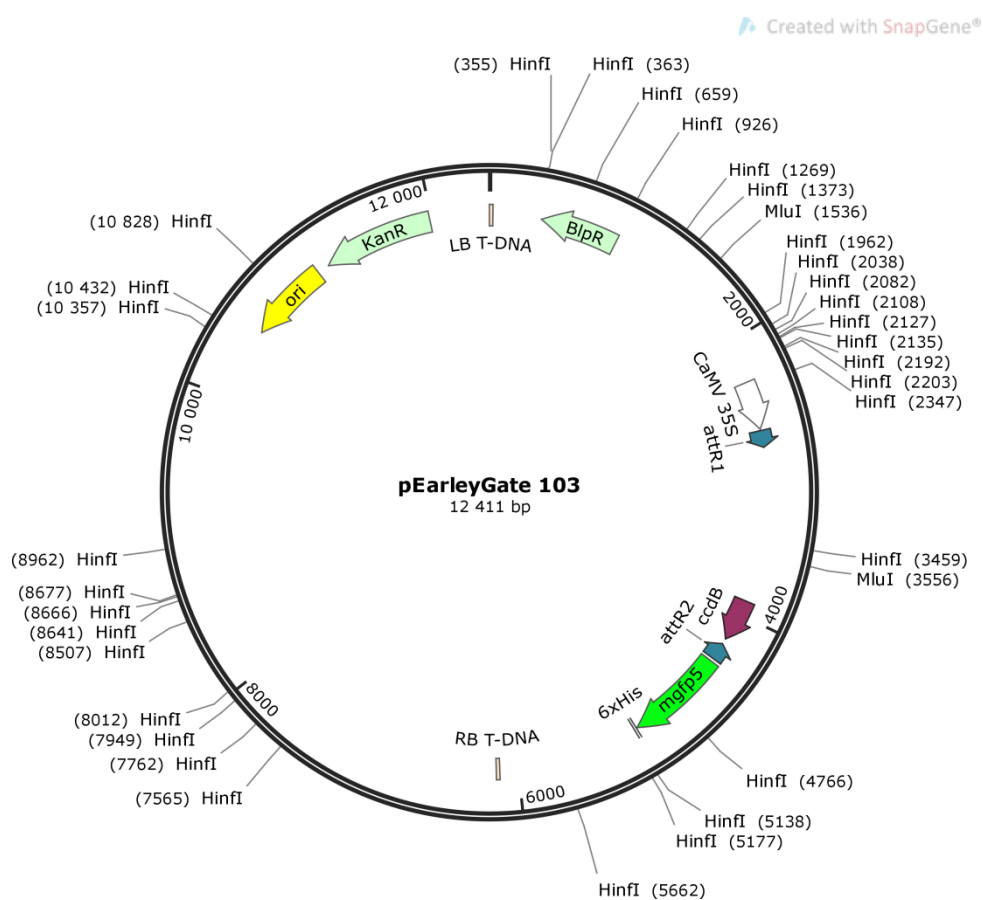


Rysunek 28. Wektor Champion™ pET300/NT-DEST. T7 – promotor polimerazy RNA bakteriofaga T7; *lacO* – operator laktozowy; *attR1*, *attR2* – miejsca rekombinacji; *ccdB* – gen kodujący toksynę bakteryjną (usuwany z wektora podczas reakcji rekombinacji), która hamuje aktywność gyrazy (enzymu naprawczego DNA), uniemożliwiając wzrost bakterii zawierających „pusty” wektor (bez wstawki), czyli taki, który nie przeszedł pomyślnie reakcji rekombinacji; 6xHis – sekwencja kodująca znacznik histydynowy; AmpR – gen oporności na ampicylinę i karbenicylinę; *ori* – miejsce inicjacji replikacji; *lacI* – gen kodujący represor laktozowy; Hinfi, MluI – miejsca restrykcyjne dla enzymów Hinfi, MluI. Rysunek wykonano z wykorzystaniem programu SnapGene®.

5.7.3 WEKTOR pEARLEYGATE 103

Do uzyskania stabilnych roślin transgeniczných wykorzystano binarny wektor docelowy pEarleyGate103 (pEG103) kompatybilny z systemem Gateway®, który można powielać zarówno w komórkach *E. coli*, jak i *A. tumefaciens* (tzw. wektor wahadłowy). T-DNA ulegający integracji z genomem rośliny stanowi fragment wektora pomiędzy sekwencjami powtórzonymi RB T-DNA (ang. *right border T-DNA*) i LB T-DNA (ang. *left border T-DNA*) i zawiera miejsca rekombinacji *attR1* i *attR2* umożliwiające

wprowadzenie klonowanego fragmentu DNA za pomocą klonazy LR (Rysunek 29). Ekspresja białka zachodzi w fuzji ze znacznikiem fluorescencyjnym mGFP5 [wariant białka zielonej fluorescencji (ang. *green fluorescent protein*, GFP) z *Aequorea victoria* o zwiększonej stabilności w komórkach roślinnych] i histydynowym pod kontrolą silnego promotora CaMV 35S. Gen oporności na kanamycynę pozwala na selekcję transformantów *A. thumefaciens*, podczas gdy gen oporności na herbicyd glufosynat amonu umożliwia selekcję transformantów *A. thaliana*.



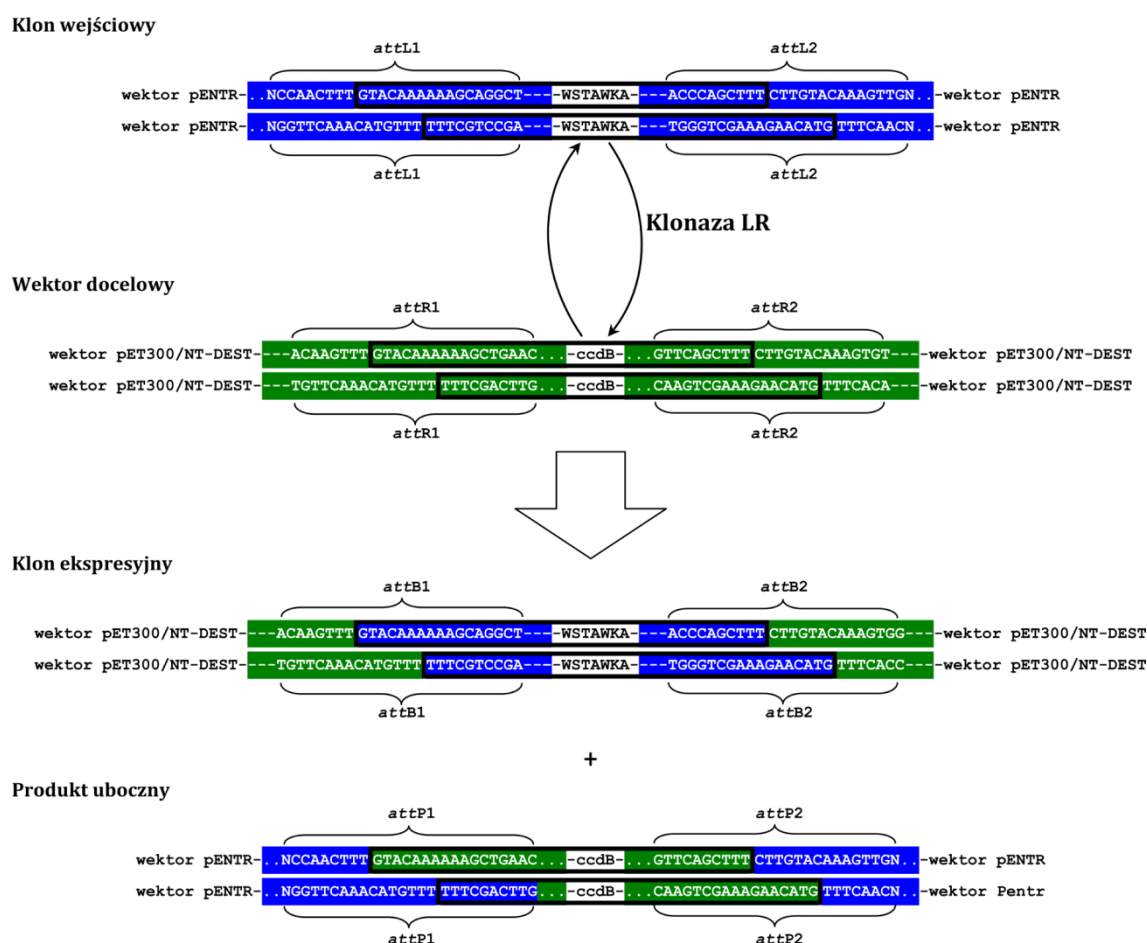
Rysunek 29. Wektor pEarleyGate103. CaMV 35S – promotor 35S RNA z wirusa mozaiki kalafiora; *attR1*, *attR2* – miejsca rekombinacji; *ccdB* – gen kodujący toksynę bakteryjną (usuwany z wektora podczas reakcji rekombinacji), która hamuje aktywność gyrazy (enzymu naprawczego DNA), uniemożliwiając wzrost bakterii zawierających „pusty” wektor (bez wstawki), czyli taki, który nie przeszedł pomyślnie reakcji rekombinacji; *mgfp5* – gen kodujący znacznik fluorescencyjny mGFP5; 6xHis – sekwencja kodująca znacznik histydynowy; RB T-DNA, LB T-DNA – odpowiednio prawa i lewa granica T-DNA; *ori* – miejsce inicjacji replikacji; KanR – gen oporności na kanamycynę; BIpR – gen oporności na glufosynat amonu; HinfI, MluI – miejsca restrykcyjne dla enzymów HinfI, MluI. Rysunek wykonano z wykorzystaniem programu SnapGene®.

5.7.4 KLONOWANIE DO WEKTORA WEJŚCIOWEGO

Zsyntezowane metodą PCR (z użyciem polimerazy Phusion® HF, patrz podrozdział 5.6.2) fragmenty DNA kodujące odpowiednie wersje AtDeg2 stanowiące wstawkę rozdzielono elektroforetycznie, wyizolowano z żelu i wprowadzono do wektora wejściowego pENTR™/SD/D-TOPO z użyciem zestawu odczynników do klonowania pENTR™/SD/D-TOPO™ Cloning Kit, with One Shot™ TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen™, USA). Reakcję klonowania wykonano przez inkubację 100-150 ng DNA wstawki z 3-5 ng DNA wektora pENTR™/SD/D-TOPO w roztworze 200 mM NaCl i 10mM MgCl₂ przez noc w temperaturze pokojowej. Produkt reakcji klonowania tzw. klon wejściowy wprowadzono do komórek bakteryjnych *E. coli* szczepu One Shot® OmniMAX™ 2 T1R drogą transformacji. Następnie przeprowadzono selekcję transformantów bakteryjnych przez hodowlę na pożywce stałej LB z kanamycyną. Namnożony w komórkach bakteryjnych klon wejściowy wyizolowano z bakterii i sprawdzono przez analizę rozdziału elektroforetycznego produktu trawienia restrykcyjnego uzyskanego klonu wejściowego enzymem MluI oraz poprzez analizę wyniku sekwencjonowania DNA.

5.7.5 KLONOWANIE DO WEKTORA DOCELOWEGO

Klonowanie do wektora docelowego wykonano z użyciem zestawu odczynników Gateway® LR Clonase® II Enzyme mix (Thermo Scientific™, USA), w którego skład wchodzi mieszanina enzymatyczna zawierająca integrację (Int) i rekombinację Xis bakteriofaga lambda oraz czynnik integracyjny gospodarza (ang. *integration host factor*, IHF) *E. coli*. Powyższa mieszanina jest określana mianem klonazy LR, ponieważ katalizuje rekombinację między miejscami rekombinacji attL klonu wejściowego, czyli wektora zawierającego wstawkę a miejscami rekombinacji attR „pustego” wektora docelowego, prowadząc do przeniesienia wstawki z klonu wejściowego do wektora docelowego w miejsce genu *ccdB*, czego efektem jest utworzenie tzw. klonu ekspresyjnego oraz zamiana sekwencji attR i attL na attB i attP (Rysunek 30). Do wektora pET300/NT-DEST wprowadzano wstawki z klonów wejściowych kodujące wersje AtDeg2 przeznaczone do nadekspresji w komórkach bakteryjnych



Rysunek 30. Reakcja rekombinacji z użyciem mieszaniny enzymatycznej określonej jako klonaza LR na przykładzie wektorów pENTR™/SD/D-TOPO i pET300/NT-DEST. Fragment DNA ulegający reakcji rekombinacji został wyróżniony przez umieszczenie go wewnątrz ramki. Sekwencje pochodzące od miejsc attR zostały umieszczone w blokach w kolorze zielonym natomiast sekwencje pochodzące od miejsc attL zostały umieszczone w blokach w kolorze niebieskim.

z użyciem zestawu do klonowania DNA Champion™ pET300/NT-DEST and pET301/CT-DEST Gateway® Vector Kit (Invitrogen™, USA). Reakcję rekombinacji wykonano przez inkubację przez noc w temperaturze pokojowej 8 µl mieszaniny reakcyjnej o następującym składzie:

- 100-150 ng DNA klonu wejściowego,
- 15 ng DNA wektora pET300/NT-DEST,
- bufor TE pH 8,0 (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA).

Następnie do mieszaniny reakcyjnej wprowadzono 0,5 µl proteiny K i inkubowano 5 min w 37°C. Po inkubacji mieszaninę reakcyjną wprowadzono do komórek bakteryjnych *E. coli* szczepu One Shot® OmniMAX™, które następnie hodowano na pożywce stałej LB z karbenicyną. Klon ekspresyjny wyizolowano z bakterii i sprawdzono przez analizę rozdziału elektroforetycznego produktu trawienia restrykcyjnego uzyskanego klonu ekspresyjnego enzymem HinfI oraz poprzez analizę wyniku sekwencjonowania DNA. Sprawdzony klon ekspresyjny wprowadzono do komórek *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL i przeprowadzono nadekspresję odpowiedniego białka rekombinowanego.

Wstawki z klonów wejściowych kodujące wersje AtDeg2 przeznaczone do ekspresji w komórkach roślinnych wprowadzano do wektora pEarleyGate103. Jako że klon wejściowy i wektor pEarleyGate103 zawierają gen oporności na ten sam antybiotyk, co utrudnia przeprowadzenie prawidłowej selekcji transformantów, przed przystąpieniem do reakcji rekombinacji pozbawiono klon wejściowy miejsca inicjacji replikacji (ang. *origin*, ori) oraz genu oporności na kanamycynę. W tym celu wykonano trawienie restrykcyjne klonu wejściowego enzymami MluI i RruI (Rysunek 27), a następnie rozdział elektroforetyczny produktu trawienia. Fragment DNA o właściwej wielkości izolowano z żelu i tak przygotowany preparat przeznaczono do klonowania. Reakcję rekombinacji wykonano przez inkubację przez noc w temperaturze pokojowej 8 µl mieszaniny reakcyjnej o następującym składzie:

- 100-150 ng DNA klonu wejściowego (wektora ze wstawką) pozbawionego miejsca ori i genu oporności na kanamycynę,
- 15 ng DNA wektora pEarleyGate103,
- bufor TE pH 8,0.

Następnie do mieszaniny reakcyjnej wprowadzono 0,5 µl proteiny K i inkubowano 5 min w 37°C. Po inkubacji mieszaninę reakcyjną wprowadzono do komórek bakteryjnych *E. coli* szczepu One Shot® OmniMAX™, które następnie hodowano na pożywce stałej LB z kanamycyną, a uzyskany klon ekspresyjny wyizolowano z bakterii. Jego prawidłowość sprawdzono przez trawienie enzymem HinfI i analizę rozdziału elektroforetycznego produktów trawienia oraz poprzez analizę wyniku sekwencjonowania DNA. Sprawdzony klon ekspresyjny wprowadzono do komórek *A. tumefaciens*, które przeznaczono dalej do transformacji *A. thaliana*.

5.7.6 TRAWIENIE RESTRYKCYJNE

Trawienie restrykcyjne wykonano z użyciem enzymów FastDigest MluI, FastDigest RruI oraz FastDigest HinfI firmy Thermo Scientific (USA) zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta. Reakcję trawienia prowadzono w objętości 20 µl przez inkubację 500 ng DNA określonego wektora (bądź klonu wejściowego/ekspresyjnego) w obecności 1µl odpowiedniego enzymu restrykcyjnego (lub enzymów restrykcyjnych) w buforze FastDigest przez 1 h w temperaturze 37°C.

5.7.7 SEKWENCJONOWANIE DNA

Wykonanie sekwencjonowania DNA uzyskanych klonów wejściowych i ekspresyjnych zlecono Pracowni Technik Molekularnych Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Analizę wyników wykonano z użyciem programu SnapGene® oraz narzędzia bioinformatycznego BLAST.

5.8 TRANSFORMACJA I TRANSFEKCJA MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO

5.8.1 TRANSFORMACJA *E. COLI*

Komórki chemikompentne *E. coli*, tzn. zdolne do transformacji chemicznej (wiązania i pobierania obcego DNA bezpośrednio z roztworu) przygotowano z użyciem CaCl₂ zgodnie z protokołem opisanym przez Seidman i wsp. (2001).

Zawiesinę komórek chemikompetentnych *E. coli* w objętości 100 µl rozmrożono w lodzie i dodano do niej 10 ng DNA wektora bądź ok. 5 µl produktu reakcji klonowania, wymieszano i inkubowano w lodzie przez 1 h. Następnie przeprowadzono szok cieplny przez umieszczenie zawiesiny bakteryjnej na 1 min w 42°C i przeniesienie ponownie do lodu. Aby zwiększyć wydajność transformacji bakterie hodowano z wytrząsaniem (200 rpm, 1 h, 37°C) w 1 ml pożywki płynnej LB. Bakterie zwirowano (12 000 x g, 15 s, temperatura pokojowa, wirówka Minispin, Eppendorf, Niemcy), zawieszono w ok. 50 µl pożywki LB i wysiano na szalki Petriego z pożywką stałą LB zawierającą odpowiednie antybiotyki (w tym odpowiedni antybiotyk selekcyjny) i hodowano przez noc w 37°C. Otrzymane kolonie przesiano pojedynczo na pola

o wielkości ok. 1 cm² na pożywce stałej LB z odpowiednimi antybiotykami i hodowano przez noc w 37°C. Obecność wprowadzonego wektora w poszczególnych koloniach bakteryjnych sprawdzano metodą PCR.

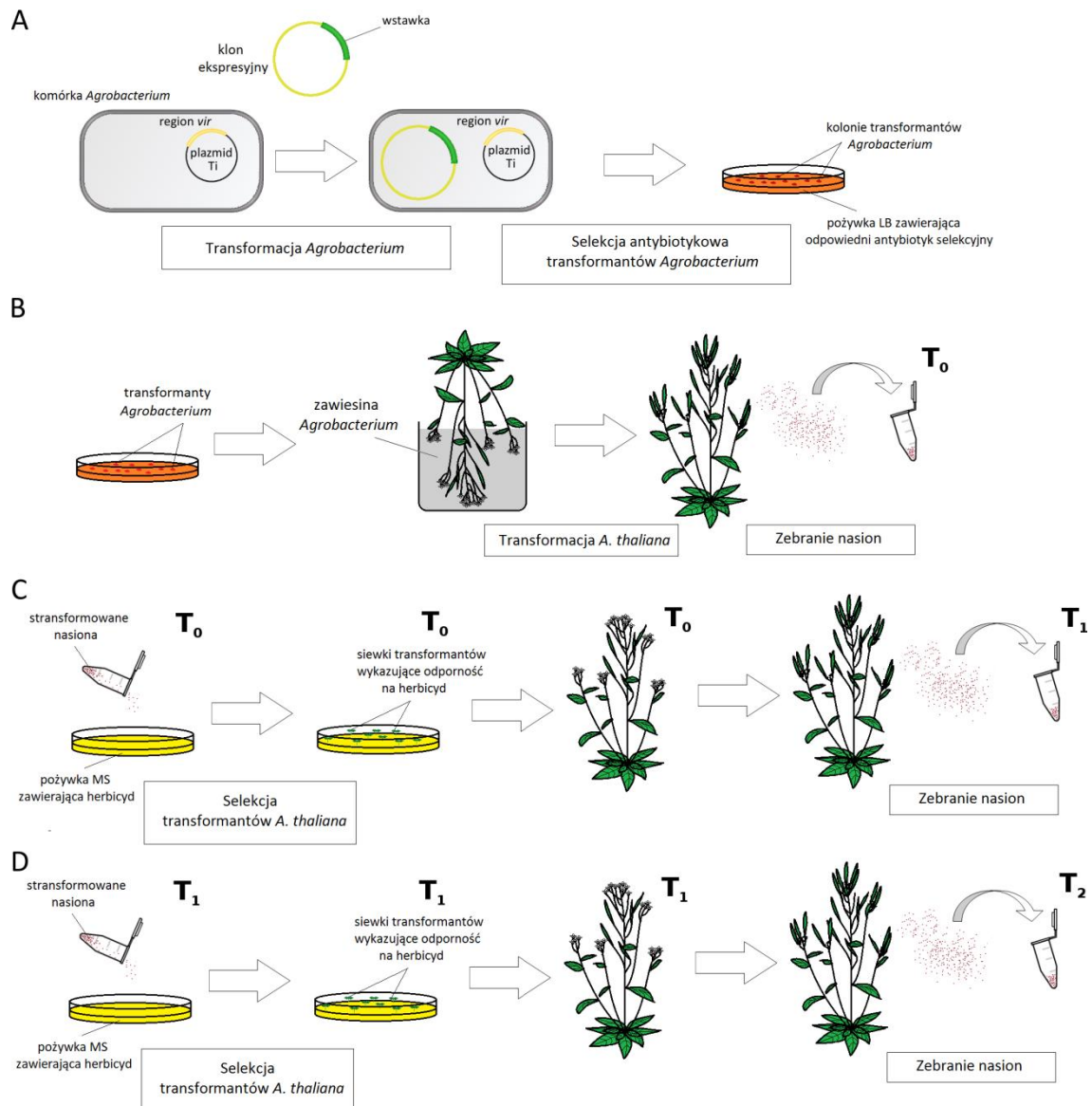
5.8.2 TRANSFORMACJA *A. TUMEFACIENS*

Bakterie *A. tumefaciens* hodowano w pożywce płynnej LB z rifampicyną w 27°C z wytrząsaniem (180 rpm) aż do osiągnięcia fazy logarytmicznego wzrostu (patrz podrozdział 5.3.6). Hodowlę schłodzono i wirowano (3 000 rpm, 6 min, 4°C, wirówka 3K30, Sigma-Aldrich, Niemcy), a otrzymany osad bakteryjny zawieszono w 0,25 ml 20 mM CaCl₂. Uzyskane komórki chemikompetentne *A. tumefaciens* wykorzystano w procedurze transformacji.

W celu wykonania transformacji do 100 µl zawiesiny komórek chemikompetentnych *A. tumefaciens* dodano 50 ng DNA klonu ekspresyjnego, wymieszano i zamrożono w ciekłym azocie. Następnie zamrożoną zawiesinę bakteryjną umieszczono w 37°C na 5 min, dodano 1 ml pożywki płynnej LB i hodowano z wytrząsaniem w 27°C przez 3,5 h. Bakterie zwirowano (12 000 x g, 15 s, temperatura pokojowa, wirówka Minispin, Eppendorf, Niemcy), zawieszono w ok. 50 µl pożywki LB i wysiano na szalki Petriego z pożywką stałą LB zawierającą rifampicynę i odpowiedni antybiotyk selekcyjny i hodowano przez dwa dni w 27°C. Otrzymane kolonie przesiano pojedynczo na pola o wielkości ok. 1 cm² na pożywce stałej LB z rifampicyną i odpowiednim antybiotykiem selekcyjnym i hodowano przez dwa dni w 27°C. Obecność wprowadzanego klonu ekspresyjnego w poszczególnych koloniach bakteryjnych sprawdzano metodą PCR.

5.8.3 TRANSFORMACJA *A. THALIANA* PRZEZ AGROINFILTRACJĘ

Transformację *A. thaliana* przez agroinfiltrację wykonano zgodnie z protokołem opisanym przez Clough i Bent (1998). Do transformacji wykorzystano 4-5 tygodniowe mutanty *deg2-3 A. thaliana*, u których przed przystąpieniem do agroinfiltracji usunięto otwarte kwiaty. Do agroinfiltracji wykorzystano bakterie *A. tumefaciens* transformowane wcześniej odpowiednim klonem ekspresyjnym (Rysunek 31A).



Rysunek 31. Etapy uzyskania roślin transgenicznych metodą agroinfiltracji

Bakterie hodowano w pożywce płynnej LB z rifampicyną i odpowiednim antybiotykiem selekcyjnym w 27°C aż do osiągnięcia późnej fazy logarytmicznego wzrostu lub wczesnej fazy stacjonarnej (patrz podrozdział 5.3.6). Bakterie zwirowano (10 000 rpm, 20 min, 4°C, wirówka 3K30, Sigma-Aldrich, Niemcy), zawieszono w roztworze 5% (w/v) sacharozy, ponownie zwirowano jak wyżej i zawieszono do stężenia $OD_{550} = 0,8$ w roztworze infiltracyjnym składającym się z 5% (w/v) sacharozy i 0,03% (v/v) Sliwet Gold (Arysta LifeScience Polska) – detergentu ułatwiającego wniknięcie T-DNA *Agrobacterium* do komórek roślinnych. W uzyskanej zawieszynie bakteryjnej zanurzano w pozycji leżącej i dodatkowo nakrapiano roztworem infiltracyjnym widoczne pąki

kwiatowe, po czym szczelnie zamknięto folią w celu zapewnienia warunków wysokiej wilgotności i pozostawiono w ciemności do następnego dnia. Po inkubacji w ciemności rośliny umieszczano w osłonkach foliowych typu Arasystem, w celu uniknięcia przekrzyżowań i hodowano w warunkach umiarkowanego natężenia światła (Tabela 2, s. 59) w pokoju hodowlanym aż do momentu uzyskania dojrzałych nasion (Rysunek 31B). Selekcję transformantów roślinnych prowadzono na szalkach Petriego z pożywką stałą MS z dodatkiem herbicydu przez ok. 2 tygodnie w pokoju hodowlanym w warunkach umiarkowanego natężenia światła, po czym siewki przenoszono na doniczki torfowe, umieszczano w osłonkach foliowych i hodowano aż do momentu uzyskania dojrzałych nasion (Rysunek 31C). Całą procedurę selekcji powtórzono w celu uzyskania linii homozygotycznych roślin transgeniczných (Rysunek 31D).

5.8.4 TRANSFEKCJA PROTOPLASTÓW KOMÓREK MIĘKISZOWYCH LIŚCIA

A. THALIANA

Transfekcję protoplastów komórek miękiszowych liścia *A. thaliana* wykonano w oparciu o protokół opisany przez Wu i wsp. (2009). Około 2×10^4 protoplastów zawieszonych w 100 μ l roztworu MMg (patrz podrozdział 5.2.1) ostrożnie wymieszano z 5 μ g klonu ekspresyjnego, po czym dodano 110 μ l 40% (v/v) glikolu polietylenowego (PEG), wymieszano i inkubowano 15 min w temperaturze pokojowej. Po inkubacji protoplasty zwirowano (300 x g, 3 min, temperatura pokojowa, wirówka Minispin, Eppendorf, Niemcy) zawieszono w 300 μ l roztworu W1 o składzie: 0,5 M mannitol, 20 mM KCl, 4 mM MES pH 5,7 i inkubowano w ciemności od 16 do 24 h. Efektywność transfekcji oceniano za pomocą mikroskopii konfokalnej dzięki zastosowaniu znacznika fluorescencyjnego ulegającego ekspresji w fuzji z odpowiednią wersją AtDeg2.

5.9 IZOLACJA I OCZYSZCZANIE BIAŁEK REKOMBINOWANYCH

5.9.1 NADEKSPRESJA BIAŁEK REKOMBINOWANYCH W KOMÓRKACH *E. COLI*

Nadekspresję białek rekombinowanych prowadzono z użyciem szczepu bakteryjnego *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL. W pierwszej kolejności komórki *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL transformowano klonem ekspresyjnym z wstawką kodującą

odpowiedni wariant AtDeg2 i hodowano na szalkach Petriego ze stałą pożywką LB z chloramfenikolem, tetracykliną i antybiotykiem selekcyjnym – karbenicyną. Obecność odpowiednich klonów ekspresyjnych w otrzymanych koloniach bakteryjnych sprawdzano metodą PCR. Kolonię, która pozytywnie przeszła procedurę transformacji zaszczepiano do pożywki płynnej LB z chloramfenikolem, tetracykliną i karbenicyną i hodowano przez noc w 37°C z wytrząsaniem (180 rpm). Bakterie z całonocnej hodowli zaszczepiono do świeżej i zawierającej wyżej wymienione antybiotyki pożywki płynnej LB w stosunku 1:100 (1 ml hodowli na 100 ml pożywki) i hodowano w 37°C z wytrząsaniem (180 rpm). Hodowlę prowadzono do uzyskania wczesnej fazy logarytmicznego wzrostu (patrz podrozdział 5.3.5), po czym indukowano nadekspresję przez dodanie IPTG (ROTH Industries GmbH i Co, Niemcy) do stężenia końcowego 1 mM i kontynuowano hodowlę w tych samych warunkach przez kolejne 3 h. Następnie bakterie zwirowano (10 000 rpm, 20 min, 4°C, wirówka 3K30, Sigma-Aldrich, Niemcy), zamrożono i przechowywano w -20°C lub od razu wykorzystano do lizy i izolacji białek rekombinowanych.

5.9.2 DEZINTEGRACJA KOMÓREK BAKTERYJNYCH *E. COLI*

Osad bakteryjny uzyskany z hodowli o objętości 100 ml, w której indukowano nadekspresję odpowiedniego białka rekombinowanego zawieszono w 30 ml buforu denaturującego pH 8,0 o składzie: 8 M mocznik, 100 mM fosforan sodu, 10 mM Tris-HCl pH 8,0 i wykonano wstępną lizę bakteryjną przez trzykrotne zamrażanie i rozmrażanie zawiesiny bakteryjnej. Właściwą dezintegrację komórek bakteryjnych wykonano z użyciem ultradźwięków za pomocą sonikatora Virtsonic 60 firmy VirTis (USA). W tym celu próbę poddano trzem cyklom sonikacji po 60 s z przerwą 90 s, po czym wirowano (10 000 rpm, 20 min, 4°C, wirówka 3K30, Sigma-Aldrich, Niemcy), a supernatant przeniesiono do świeżej probówki. Uzyskany lizat bakteryjny wykorzystano dalej do oczyszczania białek rekombinowanych z użyciem złoża niklowego.

5.9.3 OCZYSZCZANIE BIAŁEK REKOMBINOWANYCH Z UŻYCIEM ZŁOŻA NIKLOWEGO

Lizat bakteryjny zawierający odpowiednie białko rekombinowane dodano w stosunku 5:1 do przepłukanego buforem denaturującym pH 8,0 złoża niklowego cOmplete™ His-Tag Purification Resin (Roche Holding AG, Szwajcaria) i inkubowano przez 30 min z niewielkim wytrząsaniem w temperaturze pokojowej. Złoże ze związanym białkiem rekombinowanym następnie dwukrotnie przepłukano buforem denaturującym pH 8,0 (objętością trzykrotnie większą niż objętość użytego złoża), dwukrotnie buforem denaturującym pH 6,3 (objętością trzykrotnie większą niż objętość użytego złoża) o składzie: 8 M mocznik, 100 mM fosforan sodu, 10 mM Tris-HCl pH 6,3 oraz 10 mM imidazolem w buforze denaturującym pH 6,3. Elucję białka rekombinowanego ze złoża wykonywano za pomocą 100 mM imidazolu w buforze denaturującym pH 6,3. Eluat zamrożono i przechowywano w -80°C.

5.9.4 IZOLACJA BIAŁEK REKOMBINOWANYCH Z ŻELU POLIAKRYLAMIDOWEGO

5.9.4.1 ELEKTROFOREZA PREPARATYWNA

Eluaty białek rekombinowanych z pominięciem etapu termicznej denaturacji rozdzielono za pomocą SDS-PAGE (patrz podrozdział 5.10.1) w obecności barwnych markerów masy cząsteczkowej w zakresie od 10 do 170 kDa (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific™, USA) w żelu poliakrylamidowym o grubości 1,5 mm. Żel następnie barwiono przejściowo z użyciem KCl (patrz podrozdział 5.10.3.4) i wycięto wąski pasek żelu zawierający prążek na odpowiedniej wysokości reprezentujący określone białko rekombinowane. Wycięty pasek żelu odbarwiono i rozdrobniono przeciskając przez strzykawkę z igłą o średnicy 0,7 mm.

5.9.4.2 ELEKTROELUCJA Z ŻELU POLIAKRYLAMIDOWEGO

Rozdrobniony pasek żelu zawierający odpowiedni wariant białka rekombinowanego nakładano na spiek w aparacie do elektroelucji (Model 422 Electro-Eluter, Bio-Rad, USA) i prowadzono elektroelucję w zmodyfikowanym buforze do elektroforezy Leammli (1970) o składzie: 0,025 M Tris, 0,192 M glicyna, 0,05% (w/v) SDS przy stałym natężeniu 10mA/spiek przez 4 h w temperaturze 4°C. Elektroeluat

zbierano zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta, zamrożono i przechowywano w -20°C lub od razu wykorzystano do wymiany buforu przez ultrafiltrację.

5.9.4.3 ULTRAFILTRACJA

Elektroeluaty białek rekombinowanych (ok. 4 ml) zagęszczono metodą ultrafiltracji za pomocą kolumnienek Amicon® Ultra o objętości 0,5 ml (Amicon® Ultra-0.5 3K device, Merck, Niemcy) do objętości ok. 50 μl zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta. Następnie usuwano czynnik denaturujący (SDS) z jednoczesną zmianą buforu na bufor natywny o składzie: 50mM Tris-HCl pH 7,6, 20 mM NaH_2PO_4 za pomocą koncentratorów Amicon® Ultra o objętości 15ml (Amicon® Ultra-15 10K device, Merck, Niemcy). W tym celu wykonano 4 cykle rozcieńczania preparatu świeżym buforem natywnym do objętości 15 ml i ok. 30-krotnego zatężania. Próby dodatkowo zatężono za pomocą kolumnienek Amicon® Ultra (Amicon® Ultra-0.5 3K device, Merck, Niemcy) do objętości ok. 50 μl , rozporcjowano, zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C . Stężenie białka w próbkach określono poprzez rozdział elektroforetyczny SDS-PAGE, wizualizację białek metodą Blue Silver i ilościową analizę densytometryczną białek w żelach poliakrylamidowych w oparciu o krzywą wzorcową wykonaną dla znanych stężeń albuminy surowicy wołowej (ang. *bovine serum albumin*, BSA).

5.10 ELEKTROFOREZA BIAŁEK

5.10.1 JEDNOKIERUNKOWA ELEKTROFOREZA BIAŁEK W WARUNKACH DENATURUJĄCYCH (SDS-PAGE)

Elektroforezę białek w żelu poliakrylamidowym w obecności dodecylosiarczanu sodu (ang. *sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) prowadzono z wykorzystaniem systemu Mini-PROTEAN® (Bio-Rad, USA). Standardowo preparaty białkowe mieszano z czterokrotnie stężonym buforem próbkowym Laemmli (1970) o składzie: 250 mM Tris-HCl pH 6,8, 6% (w/v) SDS, 40% (w/v) sacharoza, 0,04% (w/v) BBF oraz 20% (v/v) β -merkaptioetanol o właściwościach redukujących i denaturowano termicznie w 95°C przez 3 min. Następnie próby schłodzono w lodzie, zwirowano (14 500 rpm, 15 s, temperatura pokojowa, wirówka Minispin, Eppendorf,

Niemcy) i nakładano na kieszonki uformowane w 10% lub 12% żelu poliakrylamidowym o grubości 1 mm składającym się z żelu zagęszczającego o składzie:

- 5% (w/v) akrylamid,
- 0,01% (w/v) bisakrylamid,
- 0,125 M Tris-HCl pH 6,8,
- 0,1% (w/v) SDS,
- 0,04% (w/v) nadsiarczan amonu,
- i 0,1% (v/v) TEMED (N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina),

w którym podczas elektroforezy próby ulegają zagęszczeniu oraz z żelu rozdzielającego o składzie:

- 10-12% (w/v) akrylamid,
- 0,04% (w/v) bisakrylamid,
- 0,375 M Tris-HCl pH 8,8,
- 0,1% (w/v) SDS,
- 0,02% (w/v) nadsiarczan amonu,
- oraz 0,08% (v/v) TEMED.

Rozdział elektroforetyczny prowadzono w buforze do elektroforezy Leammli o składzie: 0,5 M Tris-HCl pH 8,5, 0,192 M glicyna i 0,1% (w/v) SDS przy stałym natężeniu 25 mA/żel aż do momentu osiągnięcia przez BBF dolnej granicy żelu. Standardowo rozdział preparatów białkowych prowadzono względem niewybarwionych markerów masy cząsteczkowej w zakresie od 10 do 200 kDa (PageRuler Unstained Protein Ladder, Thermo Scientific™, USA).

5.10.2 DWUKIERUNKOWA DIAGONALNA ELEKTROFOREZA BIAŁEK (D2D SDS-PAGE)

Dwukierunkową diagonalną elektroforezę SDS-PAGE (ang. *diagonal 2-dimensional SDS-PAGE*, D2D SDS-PAGE) wykonano z wykorzystaniem systemu Mini-PROTEAN® (Bio-Rad, USA). Rozdział w pierwszym kierunku prowadzono w warunkach nieredukujących przez zmieszanie próby białkowej z buforem próbkowym Leammli pozbawionym czynnika redukującego (β -merkaptetoetanolu), denaturację termiczną w 95°C przez 3 min, schłodzenie w lodzie i elektroforezę w 12% żelu

poliakrylamidowym o grubości 1 mm w buforze do elektroforezy Leammli przy stałym natężeniu 25 mA/żel aż do momentu osiągnięcia przez BBF dolnej granicy żelu. Następnie ścieżkę żelu z rozdzieloną elektroforetycznie próbą białkową wycinano i inkubowano w buforze redukującym o składzie: 0,375 M Tris-HCl pH 8,8, 6 M mocznik, 2% (w/v) SDS, 20% (v/v) glicerol, 2% (v/v) β -merkaptoetanol przez 20 min w temperaturze pokojowej. Po przeprowadzonej redukcji wyciętą ścieżkę żelu przepłukano buforem o składzie: 0,375 M Tris-HCl pH 8,8, 6 M mocznik, 2% (w/v) SDS, 20% (v/v) glicerol i utrwalono przez inkubację w tym samym buforze z dodatkiem 2,5% (w/v) IAA, który alkiluje grupy sulfhydrylowe reszt cysteinowych, uniemożliwiając ich reoksydację w trakcie elektroforezy SDS-PAGE w drugim kierunku. Rozdział elektroforetyczny w drugim kierunku wykonano przez umieszczenie ścieżki żelu na górnej krawędzi 12% żelu poliakrylamidowego o grubości 1,5 mm, zatopienie jej w żelu agarozowym o stężeniu 0,5% (w/v) z dodatkiem 0,02% (w/v) BBF i elektroforezę w buforze do elektroforezy Leammli przy stałym natężeniu 25 mA/żel aż do momentu osiągnięcia przez BBF dolnej granicy żelu. Równolegle rozdzielano mieszaninę niewybarwionych markerów masy cząsteczkowej w zakresie od 10 do 200 kDa (PageRuler Unstained Protein Ladder, Thermo Scientific™, USA). Wizualizację białek wykonano metodą Blue Silver i przeprowadzono porównawczą analizę densytometryczną (patrz podrozdział 5.10.5).

5.10.3 TECHNIKI WIZUALIZACJI BIAŁEK W ŻELACH POLIAKRYLAMIDOWYCH

5.10.3.1 BARWIENIE BŁĘKITEM BRYLANTOWYM COOMASSIE (CBB R-250)

Po zakończonej elektroforezie żel poliakrylamidowy umieszczano w roztworze zawierającym 10% (v/v) kwas octowy, 25% (v/v) metanol i 0,25% (w/v) błękit brylantowy Coomassie R-250 (ang. *Coomassie Brilliant Blue R-250*, CBB R-250) (Serva, Niemcy) i inkubowano z wytrząsaniem (30 rpm) przez noc. Następnie żel odbarwiono przez inkubację w roztworze odbarwiającym o składzie: 10% (v/v) kwas octowy i 40% (v/v) metanol przez 2 h.

5.10.3.2 BARWIENIE Z UŻYCIEM ROZTWORU KOLOIDALNEGO CBB G-250 – BLUE SILVER

Barwienie metodą Blue Silver o czułości porównywalnej do konwencjonalnej metody barwienia srebrem (wizualizacja nawet 1 ng białka w żelu) wykonano w oparciu o protokół opisany przez Candiano i wsp. (2004), który jest zmodyfikowaną wersją procedury barwienia z użyciem roztworu koloidalnego CBB G-250 opisanej przez Neuhoff i wsp. (1988). W tym celu po zakończonej elektroforezie żel poliakrylamidowy umieszczano w roztworze zawierającym 10% (v/v) kwas fosforowy, 10% (w/v) siarczan amonu, 20% (v/v) metanol i 0,12% (w/v) CBB G-250 (Serva, Niemcy) i inkubowano z wytrząsaniem (30 rpm) przez noc. Następnie żel odbarwiono przez inkubację w H₂O.

5.10.3.3 BARWIENIE SREBREM

Barwienie srebrem wykonano zgodnie z procedurą opisaną przez Ansorge (1985).

5.10.3.4 PRZEJŚCIOWE BARWIENIE Z UŻYCIEM KCl

Po zakończonej elektroforezie preparatywnej żel poliakrylamidowy umieszczano w roztworze 1 M KCl i inkubowano aż do pojawienia się prążków reprezentujących rozdzielone elektroforetycznie białka (30-90 s). Wycięty wąski pasek żelu zawierający prążek na odpowiedniej wysokości reprezentujący określone białko rekombinowane odbarwiono przez inkubację w 10% (v/v) kwasie octowym przez 30 min.

5.10.4 ANALIZA ŻELI PO SDS-PAGE WYBARWIONYCH CBB R-250

Żele po SDS-PAGE wybarwione CBB R-250 analizowano densytometrycznie z wykorzystaniem systemu do obrazowania żeli ChemiDoc MP (Bio-Rad, USA) oraz oprogramowania Gelix One (Biostep, Niemcy).

5.10.5 ANALIZA ŻELI PO D2D SDS-PAGE WYBARWIONYCH METODĄ BLUE SILVER

Żele po D2D SDS-PAGE wybarwione metodą Blue Silver analizowano densytometrycznie z wykorzystaniem systemu do obrazowania żeli ChemiDoc MP (Bio-Rad, USA) oraz oprogramowania PDQuest 2-D (Bio-Rad, USA).

5.11 TECHNIKA IMMUNOBLOT

5.11.1 EKTROTRANSFER BIAŁEK NA BŁONĘ PVDF

Białka rozdzielone za pomocą SDS-PAGE w obecności barwnych markerów masy cząsteczkowej w zakresie od 10 do 170 kDa (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific™, USA) przeniesiono z żelu poliakrylamidowego na błonę PVDF firmy Roche Holding AG (Szwajcaria) za pomocą elektrotransferu mokrego. W tym celu błonę PVDF poddano aktywacji przez inkubację w metanolu przez 30 s, płukano w H₂O przez 60 s i umieszczono na minimum 5 min w buforze transferowym o składzie: 25 mM Tris-HCl pH 8,3, 192 mM glicyna, 0,1% (w/v) SDS, 20% (v/v) metanol. Następnie składano „kanapkę” z namoczonych w buforze transferowym elementów w następującej kolejności: gąbka, bibuła chromatograficzna Whatman, żel poliakrylamidowy, błona PVDF, bibuła chromatograficzna Whatman, gąbka. Elektrotransfer prowadzono w buforze transferowym w aparacie Trans-Blot® Plus Cell (Bio-Rad, USA) przy stałym napięciu 30V przez 16 h w 4°C.

5.11.2 IMMUNODETEKCJA BIAŁEK

Błonę PVDF, na powierzchnię której przeniesiono białka z żelu poliakrylamidowego, przepłukano buforem TBST o składzie: 20 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20 i blokowano w buforze TBST zawierającym 3% (w/v) BSA przez 1 h. Następnie błonę PVDF przepłukano dwukrotnie buforem TBST i inkubowano przez 1,5 h z odpowiednim przeciwciałem pierwszorzędowym zawieszonym w buforze TBST zawierającym 1% (w/v) BSA. Po związaniu przeciwciał pierwszorzędowych błonę PVDF przepłukano czterokrotnie buforem TBST, inkubowano przez 1 h z odpowiednim przeciwciałem drugorzędowym sprzężonym z peroksydazą chrzanową (ang. *horseradish peroxidase*, HRP) zawieszonym w buforze TBST z 1% (w/v) BSA i przepłukano dwukrotnie buforem TBST. Białka znakowane przeciwciałami pierwszo- i drugorzędowymi wizualizowano przez inkubację przez 5 min błony PVDF z substratem HRP (Lumi-Light Western Blotting Substrate, Roche Holding AG, Szwajcaria), który po utlenieniu przez peroksydazę sprzężoną z przeciwciałem drugorzędowym wykazuje zdolność do chemiluminescencji. Detekcję sygnału

chemiluminescencji wykonywano za pomocą kliszy RTG, którą umieszczono wraz z błoną PVDF w kasie do klisz RTG z ekranem wzmacniającym i prowadzono ekspozycję w różnych okresach czasowych, po czym kliszę RTG wywoływano za pomocą automatycznej wywoływarki do klisz OptimaX (Protec Processor Technology, Niemcy).

5.11.3 PRZECIWCIAŁA

Do doświadczeń immunoblot wykorzystano następujące, przeciwciała:

- I-rzędowe:
 - anty-Deg2 (GenScript, USA) – poliklonalne przeciwciało królicze skierowane przeciw syntetycznemu peptydowi o sekwencji aminokwasowej TQALDQGIGDSPVS, który odpowiada sekwencji pre-AtDeg2 obejmującej reszty 582–595 (Rysunek 32); stosowane w rozcieńczeniu 1 : 1000;
 - anty-Deg2 (Agrisera, Szwecja) – poliklonalne przeciwciało królicze skierowane przeciw syntetycznemu peptydowi o sekwencji aminokwasowej RDESSNPPQKMAFKA, który odpowiada sekwencji pre-AtDeg2 obejmującej reszty 69-83 (Rysunek 32); stosowane w rozcieńczeniu 1 : 1000;
 - anty-His₆ (GE Healthcare Life Sciences, Wielka Brytania) – monoklonalne przeciwciało mysie skierowane przeciwko sześciu resztom histydynowym (HHHHHH); stosowane w rozcieńczeniu 1 : 2500;
 - anty-GFP (Agrisera, Szwecja) – poliklonalne przeciwciało królicze skierowane przeciwko białku GFP z *Aequorea victoria*; stosowane do detekcji białek ze znacznikiem GFP w rozcieńczeniu 1 : 2500;
- II-rzędowe:
 - kozie przeciwciało poliklonalne skoniugowane z HRP skierowane przeciwko I-rzędowym przeciwciałom króliczym (Agrisera, Szwecja); stosowane w rozcieńczeniu 1 : 10 000;

- o kozie przeciwciało poliklonalne skoniugowane z HRP skierowane przeciwko I-rzędowym przeciwciałom mysim (Agrisera, Szwecja); stosowane w rozcieńczeniu 1 : 10 000.

1 maasvanccfsvlnasvkiqsssisppwcfvsassltprassnikrkssrsdpspilnp
 Anty-Deg2 (Agrisera)
 61 eknyppgrvr dessnppqkmafkafgspkkekessl sdfsrdqqtdpakihdasflnavvk
 121 vycthtapdyslpwqkqrqftstgsafmigdgklltnahcvehdtqvkvkrrgddrkyva
 181 kvlvrgvdc diallsvsedfwkgaep lrlghlprlqdsvtvvgyp lggdtisv tkgvvs
 241 rievtsyahgssdl lgiqidaainpgnsggpafndqgecigvafqvyrseetenigyvip
 301 ttvvshfltdyer ngkytgypclgvllqklenpalreclkvptnegvlvrrveptsdask
 361 vlkegdvivsfd dlhv gcegtvpfrsseriesafrylisqkfagdiaeigiiragehkkvqv
 421 vlrprvhlvpyhidggqpsyiivaglvftplseplieeecedtiglkl ltkarysvarfr
 481 geqivilsqv lanevnigyedmn nqqv lkfngipirnihhlahlidmckdkylvfefedn
 Anty-Deg2 (GeneScript)
 541 yvavlereasnsaslcilkdygipsersadllepyvdpiddt qaldqgigdspvs nleig
 601 fdglvwa

Rysunek 32: Sekwencja aminokwasowa pre-AtDeg2 (NP_566115) z wyróżnionymi sekwencjami rozpoznawanymi przez przeciwciało Anty-Deg2 (Agrisera) i Anty-Deg2 (GeneScript). Sekwencja aminokwasowa AtDeg2 została przedstawiona za pomocą czarnego (peptyd tranzytowy) i białego koloru czcionki. Sekwencje aminokwasowe AtDeg2 stanowiące domeny: proteazową, PDZ1 i PDZ2 zostały umieszczone w blokach w kolorze odpowiednio zielonym, niebieskim i fioletowym. Sekwencje umieszczone w blokach szarych stanowią sekwencje kodujące N- i C-końcowe fragmenty białka niestanowiące żadnej z domen. Reszty aminokwasowe umieszczone w blokach czarnych stanowią reszty aktywne katalitycznie.

5.11.4 ANALIZA BŁON PVDF PO ZASTOSOWANIU TECHNIKI IMMUNOBLLOT

Błony PVDF po zastosowaniu techniki immunoblot analizowano densytometrycznie z wykorzystaniem systemu ChemiDoc MP (Bio-Rad, USA) oraz oprogramowania Gelix One (Biostep, Niemcy).

5.12 OZNACZANIE ILOŚCIOWE RNA, DNA I BIAŁEK

5.12.1 ILOŚCIOWE OZNACZANIE STĘŻENIA RNA I DNA METODĄ SPEKTROFOTOMETRYCZNĄ

Stężenie kwasów nukleinowych metodą spektrofotometryczną oznaczano za pomocą urządzenia Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, USA) przez pomiar absorpcji światła o długościach fali 230 nm, 260 nm i 280 nm.

5.12.2 ILOŚCIOWE OZNACZANIE STĘŻENIA BIAŁKA METODĄ BRADFORD

Stężenie białka metodą Bradford oznaczano za pomocą odczynnika Bradford Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent (Bio-Rad, USA) zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta. W kuwecie spektrofotometrycznej zmieszano 20 µl preparatu białkowego z 1 ml odczynnika Bradford, odczekano 5 min i zmierzono absorpcję przy długości fali 595 nm za pomocą spektrofotometru Ultraspec 4000 (Pharmacia Biotech, Szwecja). Stężenie próby oszacowano w oparciu o krzywą wzorcową wykonaną dla znanych stężeń BSA.

5.13 OZNACZANIE AKTYWNOŚCI OPIEKUŃCZEJ BIAŁEK REKOMBINOWANYCH

Aktywność opiekuńcza białek rekombinowanych polegająca na powstrzymywaniu powstawania agregatów (aktywność holdazowa) lub upłynnianiu już powstałych agregatów (aktywność dezagregazy) była analizowana *in vitro* z użyciem lizozymu ulegającego agregacji w obecności ditiotreitolu (DTT), a poziom powstających agregatów mierzony był przez absorpcję przy długości 360 nm z użyciem spektrofotometru Synergy H1 (BioTek Instruments, Inc., USA).

Analizę aktywności holdazowej wykonano prowadząc inkubację w 28°C przez 220 min mieszaniny reakcyjnej o objętości 200 µl zawierającej: 40 µg lizozymu, 0, 3 lub 6 µg BSA lub odpowiedniej wersji białka AtDeg2 w buforze reakcyjnym zawierającym 50 mM buforowaną fosforanem sól fizjologiczną (ang. *phosphate buffered saline*, PBS), 3 mM NaH₂PO₄, 7,5 mM Tris-HCl pH 7,6 i 20 mM DTT.

Analizę aktywności dezagregazy analizowano, prowadząc inkubację mieszaniny reakcyjnej zawierającej 40 µg lizozymu w buforze reakcyjnym o takim samym składzie w 28°C przez 220 min, czyli do momentu, w którym poziom agregatów lizozymu osiągał stan wysycenia, po czym dodawano 0, 3 lub 6 µg BSA lub odpowiedniej wersji białka AtDeg2 i prowadzono inkubację przez kolejne 220 min.

5.14 OZNACZANIE AKTYWNOŚCI PROTEOLITYCZNEJ BIAŁEK REKOMBINOWANYCH

Analizę aktywności proteolitycznej białek rekombinowanych wykonano z użyciem β-kazeiny jako substratu. W tym celu zmieszano ze sobą 0,5 µg BSA lub odpowiedniej wersji AtDeg2 z 1 µg β-kazeiny i inkubowano w buforze reakcyjnym zawierającym 20 mM NaH₂PO₄ i 50 mM Tris-HCl pH 7,6 w temperaturze 37°C. Aby ocenić czy doszło do degradacji β-kazeiny mieszaninę reakcyjną po czasie inkubacji 0, 6 i 12 h rozdzielono za pomocą SDS-PAGE, a żele wybarwiono metodą srebrową.

5.15 OZNACZANIE AKTYWNOŚCI REDUKTAZY DWUSIARCZKOWEJ Z UŻYCIEM INSULINY

Aktywność reduktazy dwusiarczkowej analizowano jako stymulację agregacji łańcuchów B insuliny zgodnie z procedurą opisaną przez Holmgrena (1979). Do agregacji łańcuchów B dochodzi w wyniku stymulowanej przez DTT redukcji mostków dwusiarczkowych łączących łańcuchy A i B insuliny. Analizę aktywności reduktazy dwusiarczkowej w preparatach stromy chloroplastów roślin *A. thaliana* wykonano przez zmieszanie 5 µg białek stromy i 0,13 mM insuliny wołowej (Sigma-Aldrich, USA) i inkubację w 100 mM roztworu buforowego fosforanu sodu (ang. *sodium phosphate buffer*) pH 7,0 w obecności 1mM DTT przez 30 min, w temperaturze 30°C. Poziom

powstających agregatów monitorowano, mierząc absorpcję próbek przy długości 650 nm za pomocą spektrofotometru Ultraspec 4000 (Pharmacia Biotech, Szwecja).

5.16 ANALIZY FENOTYPOWE

5.16.1 ANALIZA CHRONOLOGII PRZEBIEGU FAZ I PODFAZ ONTOGENEZY *A. thaliana*

Analizę chronologii przebiegu faz i podfaz ontogenezy roślin wykonano w oparciu o skalę BBCH (niem. *Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und Chemische Industrie*) – wykorzystywaną do identyfikacji fitofenologicznych faz roślin uprawnych – dostosowaną do roślin *A. thaliana* przez Boyes i wsp. (2001). Moment osiągnięcia poszczególnych faz i podfaz ontogenezy *A. thaliana* określano w liczbie dni, traktując dzień wstawienia hodowli do pokoju hodowlanego jako dzień pierwszy. Analizowano fazy: pojawiania się liści, wzrostu rozetki liściowej, pojawienia się pierwszego pąka kwiatowego, przebiegu kwitnienia i dojrzewania owoców.

Chronologię przebiegu fazy pojawiania się liści (faza 1 ontogenezy *A. thaliana*) i jej podfaz (1.0 i 1.2-1.9 – stanowiących czas wymagany do rozprostowania się liścieni i pojawiania się kolejnych liści) analizowano przez obserwację siewek i roślin dwa razy dziennie.

Chronologię przebiegu fazy 3 ontogenezy *A. thaliana* (wzrostu rozetki liściowej) i jej podfaz (3.2, 3.5, 3.7 i 3.9 – stanowiących czas wymagany do osiągnięcia przez rozetkę liściową 20%, 50%, 70% i 100% swojego końcowego rozmiaru) analizowano przez fotografowanie roślin dwa razy dziennie i analizę zdjęć z użyciem programu ImageJ.

Chronologię przebiegu fazy pojawiania się kwiatostanu (faza 5 ontogenezy *A. thaliana*) i jej podfazy 5.0, która stanowi czas wymagany do pojawienia się pierwszego pąka kwiatowego analizowano przez obserwację roślin dwa razy dziennie.

Chronologię fazy kwitnienia (faza 6 ontogenezy *A. thaliana*) i jej podfaz 6.0, 6.1, 6.5 i 6.9, które stanowią czas wymagany do otwarcia się pierwszego kwiatu oraz 10%, 50% i 100% kwiatów, analizowano przez obserwację roślin dwa razy dziennie.

Chronologię przebiegu fazy dojrzewania owoców (faza 8 ontogenezy *A. thaliana*) i jej podfaz (8.1, 8.5 i 8.9 – stanowiących czas wymagany do pęknięcia pierwszej

łuszczynki oraz 10%, 50% i 100% łuszczynek) analizowano przez obserwację roślin dwa razy dziennie.

5.16.2 ANALIZY MORFOLOGICZNE LIŚCI

Analizę morfologiczną liści wykonano z wykorzystaniem ósmego liścia roślin *A. thaliana* w dniu, w którym liść ten osiągnął swoją końcową długość.

Analizę morfologiczną liści wykonano za pomocą skanera Epson Perfection Photoscanner V700 (Epson, Indonesia) oraz programu WinFOLIA 2012a (Regent Instruments Inc., Kanada) uwzględniając takie parametry blaszki liściowej, jak długość, szerokość, pole powierzchni oraz obwód. Ponadto określono współczynnik kształtu blaszki liściowej za pomocą wzoru opisanego przez Kincaid i Schneider (1983).

5.16.3 ANALIZY MORFOLOGICZNE ORGANÓW GENERATYWNYCH

Analizę morfologiczną organów generatywnych wykonano z wykorzystaniem roślin *A. thaliana*, które osiągnęły podfazę 8.9. Podczas analizy uwzględniono takie parametry, jak liczba węzłów na pędzie kwiatostanowym i jego rozgałęzieniach, wysokość rośliny oraz liczba nasion przypadających na roślinę (= liczba łuszczynek x liczba nasion na łuszczynkę). Ponadto za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) określono długość i szerokość nasion.

5.16.4 ANALIZY WYMIANY GAZOWEJ

Pomiary wymiany gazowej przeprowadzono z użyciem urządzenia Li-6400XT (Li-Cor Inc., USA) wyposażonego w komorę o powierzchni 6 cm^2 i w źródło światła czerwonego i niebieskiego typu LED. Pojedynczy liść (liść ósmy w momencie osiągnięcia swojej końcowej długości) umieszczono w komorze urządzenia Li-6400XT, którą dodatkowo uszczelniono przy pomocy taśmy. Po aklimatyzacji liścia w komorze, zależność intensywności fotosyntezy od natężenia światła była określana poprzez ekspozycję na światło o zmieniającym się natężeniu, w następującej kolejności: 1200, 1000, 800, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 75, 50, 25 i $0 \text{ } \mu\text{mol kwantów światła m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, utrzymując jednocześnie w komorze stałe stężenie CO_2 na poziomie

400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$. Następnie przywrócono natężenie światła do poziomu 1200 $\mu\text{mol kwantów światła m}^{-2} \text{s}^{-1}$ i gdy intensywność fotosyntezy wyrażona poziomem asymilacji CO_2 (ang. *assimilation*, A) wróciła do stanu początkowego, wyznaczono krzywą zależności intensywności fotosyntezy od stężenia CO_2 wewnątrz liścia (ang. *CO_2 internal leaf concentration*, C_i) czyli krzywą A/C_i poprzez wykonanie pomiarów wymiany gazowej liścia eksponowanego na zmieniające się stężenie CO_2 w komorze, w następującej kolejności: 400, 300, 200, 150, 100, 75, 50, ponownie 400 i dalej 500, 600, 750, 1000, 1400, 1800 $\mu\text{mol mol}^{-1}$.

Powierzchnię liścia określano za pomocą skanera Epson Perfection Photoscanner V700 (Epson, Indonezja) oraz programu WinFOLIA 2012a (Regent Instruments Inc., Kanada). Wartości A oraz C_i zostały wyliczone automatycznie za pomocą wbudowanego programu urządzenia Li-6400XT.

Za pomocą programu SigmaPlot11 (Systat Software, USA) dopasowywano nieprostokątną funkcję hiperboliczną opisującą krzywą świetlną fotosyntezy (Lobo i wsp., 2013) do wyznaczonych eksperymentalnie wartości A jako funkcji natężenia światła i estymowano następujące parametry krzywej świetlnej: maksymalna intensywność fotosyntezy (A_{max}), intensywność oddychania ciemnościowego (R_d), wypukłość krzywej świetlnej (Θ) i kwantowa wydajność fotosyntetycznego wiązania CO_2 (Φ). Następnie za pomocą programu SigmaPlot11 dopasowywano model dwufazowy opisujący krzywą A/C_i (Farquhar i wsp., 1980) do wyznaczonych eksperymentalnie wartości A jako funkcji C_i , przyjmując, że wartości A uzyskane dla C_i poniżej 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ określają intensywność fotosyntezy ograniczoną ilością, aktywnością bądź kinetyką Rubisco, natomiast wartości uzyskane dla C_i przekraczających poziom 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ określają intensywność fotosyntezy ograniczoną tempem transportu elektronów wykorzystywanego do regeneracji rybulozo-1,5-bisfosforanu (ang. *ribulose-1,5-bisphosphate*, RuBP). Użyto parametrów kinetycznych Rubisco według Long i Bernacchi (2003) i estymowano następujące parametry krzywej A/C_i : maksymalna intensywność karboksylacji RuBP limitowana przez właściwości Rubisco ($V_{c, \text{max}}$) oraz maksymalna szybkość transportu elektronów wykorzystywana do regeneracji RuBP (J_{max}). $V_{c, \text{max}}$ i J_{max} normalizowano do temperatury 25°C, wykorzystując arkusz kalkulacyjny opracowany przez Sharkeya (2016).

5.17 TECHNIKI MIKROSKOPOWE

5.17.1 SKANINGOWA MIKROSKOPIA ELEKTRONOWA (SEM)

Analizę długości i szerokości nasion *A. thaliana* przeprowadzono za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) zgodnie z procedurą opisaną przez Western i wsp. (2000). Nasiona oglądano przy 40-krotnym powiększeniu z użyciem mikroskopu EVO 40 (Carl Zeiss, Niemcy).

5.17.2 MIKROSKOPIA KONFOKALNA

Mikroskopię konfokalną wykorzystywano do obserwacji protoplastów poddanych procedurze transfekcji. Obserwację wykonywano za pomocą mikroskopu konfokalnego Eclipse Ti (Nikon, Japonia) z obiektywem Plan Apo VC 20x/0.75 DIC N2. Sygnał znacznika fluorescencyjnego GFP uzyskano dla długości fali wzbudzenia/emisji – 470/510 nm, natomiast sygnał autofluorescencji chloroplastów otrzymano dla długości fali wzbudzenia/emisji – 561/700 nm.

5.18 ANALIZY STATYSTYCZNE

Wyniki testów aktywności holdazowej, dezagregacyjnej i reduktazy dwusiarczkowej *in vitro* były porównywane pomiędzy mieszaninami reakcyjnymi za pomocą testu t-Studenta na poziomie $p < 0,01$ z użyciem programu Origin 2018. Przed wykonaniem testu t-Studenta, normalność rozkładu analizowanych danych oceniono przy pomocy testu W (Shapiro-Wilka), natomiast jednorodność wariancji przy pomocy testu F (Fishera).

Istotność statystyczną analizowanych różnic fenotypowych pomiędzy genotypami wykonano za pomocą testu t-Studenta na poziomie $p < 0,05$ z użyciem programu Origin 2018. Przed wykonaniem testu t-Studenta, normalność rozkładu analizowanych danych oceniono przy pomocy testu W (Shapiro-Wilka), natomiast jednorodność wariancji przy pomocy testu F (Fishera).

Wyniki uzyskane podczas analizy krzywej świetlnej oraz krzywej A/C_i („dwutlenkowej”) były porównywane pomiędzy genotypami za pomocą testu

t-Studenta dla nierównych wariancji z użyciem pakietu JMP 8.0.2 (SAS Institute Inc., USA).

5.19 ODCZYNNIKI

5.19.1 ENZYMY I ZESTAWY ODCZYNNIKÓW DO REAKCJI ENZYMATYCZNYCH

5.19.1.1 ENZYMY RESTRYKCYJNE

Do przygotowania klonów wejściowych i ekspresyjnych podczas klonowania zastosowano następujące enzymy restrykcyjne:

- FastDigest RruI (Thermo Scientific™, USA) rozpoznający sekwencję TCG[^]CGA (gdzie [^] oznacza miejsce hydrolizy przez enzym wiązań fosfodiesterowych między nukleotydami),
- FastDigest MluI (Thermo Scientific™, USA) rozpoznający sekwencję A[^]CGCGT,
- FastDigest HinfI (Thermo Scientific™, USA) rozpoznający sekwencję G[^]ANTC (gdzie N oznacza dowolny nukleotyd).

5.19.1.2 ENZYMY I ZESTAWY ODCZYNNIKÓW DO SYNTEZY I MODYFIKACJI DNA

- RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific™, USA),
- DreamTaq Green DNA Polymerase (Thermo Scientific™, USA),
- Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific™, USA),
- QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, USA),
- 10mM dNTP Mix (Thermo Scientific™, USA).

5.19.1.3 POZOSTAŁE ENZYMY

- Celulaza 'Onozuka' R10 (Serva, Niemcy),
- Macerozym 'Onozuka' R10 (Serva, Niemcy).

5.19.2 ZESTAWY ODCZYNNIKÓW DO IZOLACJI I OCZYSZCZANIA RNA LUB DNA ORAZ ZESTAWY DO KLONOWANIA

- TRI Reagent® (Sigma-Aldrich, USA),
- QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Niemcy),
- GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific™, USA),
- Gateway® LR Clonase® II Enzyme mix (Thermo Scientific™, USA),
- pENTR™/SD/D-TOPO™ Cloning Kit, with One Shot™ TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen™, USA),
- Champion™ pET300/NT-DEST and pET301/CT-DEST Gateway® Vector Kit (Invitrogen™, USA).

5.19.3 POZOSTAŁE ODCZYNNIKI I ZESTAWY

- IPTG (ROTH Industries GmbH i Co, Niemcy),
- cComplete™ His-Tag Purification Resin (Roche Holding AG, Szwajcaria),
- Chloroplast Isolation Kit (Sigma-Aldrich, USA),
- Midori Green DNA Stain (Nippon Genetic, Niemcy),
- GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific™, USA),
- GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific™, USA),
- PageRuler Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific™, USA),
- PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific™, USA),
- Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva, Niemcy),
- Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva, Niemcy),
- Lumi-Light Western Blotting Substrate (Roche Holding AG, Szwajcaria),
- Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent (Bio-Rad, USA).

6 WYNIKI

6.1 USTALENIE, KTÓRA DOMENA W STRUKTURZE PIERWSZORZĘDOWEJ ATDEG2 JEST ODPOWIEDZIALNA ZA AKTYWNOŚĆ OPIEKUŃCZĄ TEGO BIAŁKA

6.1.1 UZYSKANIE RÓŻNYCH WERSJI REKOMBINOWANYCH ATDEG2

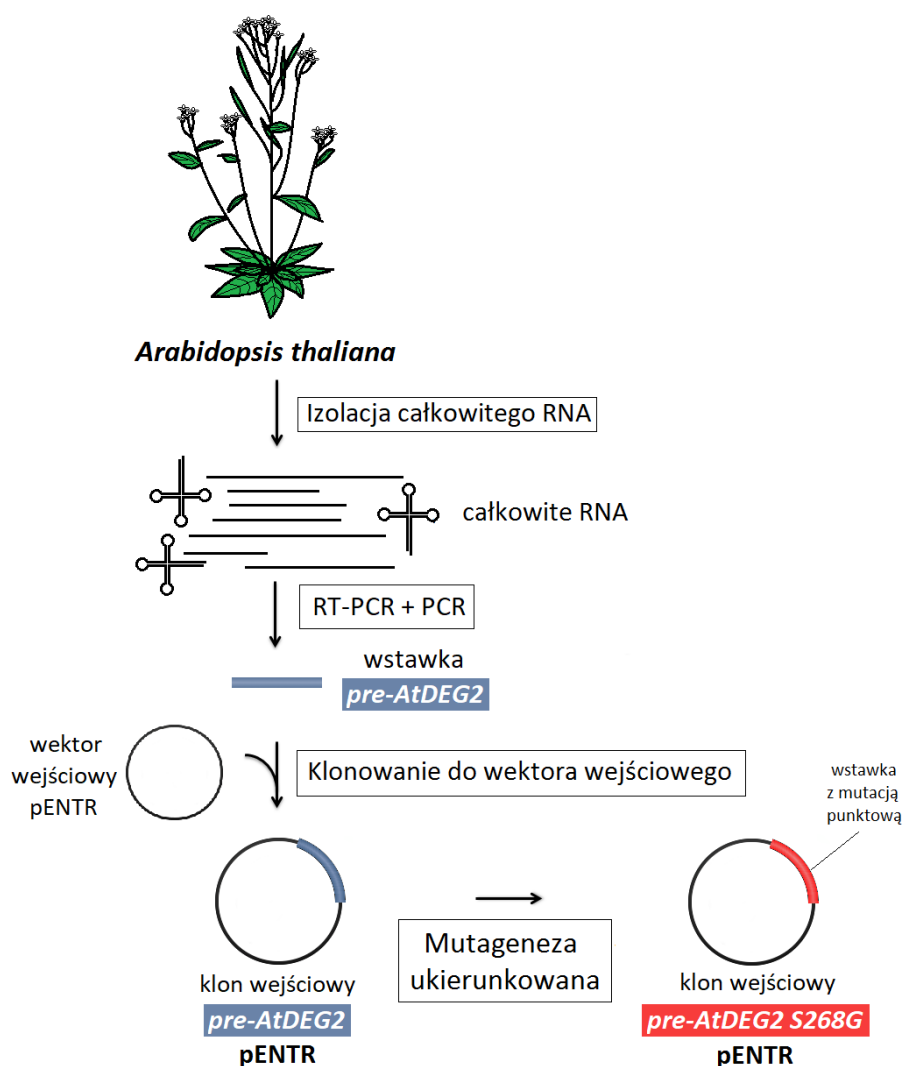
W celu ustalenia, która domena w strukturze pierwszorzędowej AtDeg2 jest odpowiedzialna za aktywność opiekuńczą (holdazową) tego białka, w pierwszej kolejności uzyskano sześć wersji rekombinowanego białka AtDeg2, tj. wersję dziką, wersję z mutacją punktową w miejscu katalitycznym białka i cztery wersje delecyjne, czyli pozbawione co najmniej jednej domeny białkowej (Rysunek 23, s. 55). Oto lista uzyskanych wersji rekombinowanego AtDeg2:

- 1) AtDeg2 – wersja dzika AtDeg2,
- 2) AtDeg2 S268G – AtDeg2 z mutacją punktową prowadzącą do zamiany reszty seryny na resztę glicyny w miejscu katalitycznym białka,
- 3) AtDeg2 ΔP – AtDeg2 z delecją domeny proteazowej,
- 4) AtDeg2 $\Delta PDZ1$ – AtDeg2 z delecją domeny PDZ1,
- 5) AtDeg2 $\Delta PDZ2$ – AtDeg2 z delecją domeny PDZ2,
- 6) AtDeg2 $\Delta(PDZ1+PDZ2)$ – AtDeg2 z delecją obu domen PDZ.

Ponadto, każda z wersji zawierała na N-końcu znacznik His₆ (sześć reszt histydynowych), który był niezbędny w procesie oczyszczania białek rekombinowanych. Białka rekombinowane otrzymano w trzech etapach: klonowanie, nadekspresja i oczyszczanie.

Klonowanie DNA to metoda stosowana w biologii molekularnej, za pomocą której odpowiedni fragment DNA (wstawka) jest przenoszony do organizmu biorcy w celu jego powielenia (sklonowania). Zastosowana w niniejszej pracy technologia Gateway® (patrz podrozdział 5.7, s. 72) obejmuje trzy główne etapy:

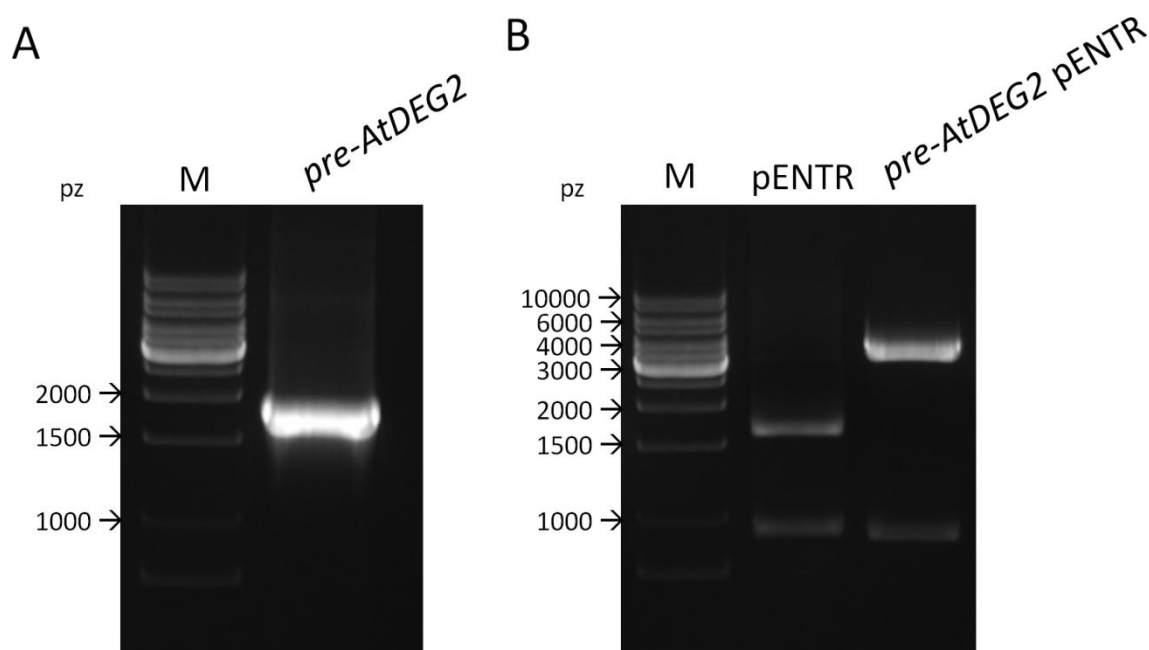
- 1) uzyskanie wstawki i klonu wejściowego,
- 2) uzyskanie klonu ekspresyjnego,
- 3) wprowadzenie klonu ekspresyjnego do organizmu biorcy.



Rysunek 33. Schemat postępowania prowadzącego do uzyskania klonów wejściowych kodujących pre-AtDeg2 oraz pre-AtDeg2 S268G

6.1.1.1 UZYSKANIE KLONÓW WEJŚCIOWYCH *pre-AtDEG2* pENTR ORAZ *pre-AtDEG2 S268G* pENTR

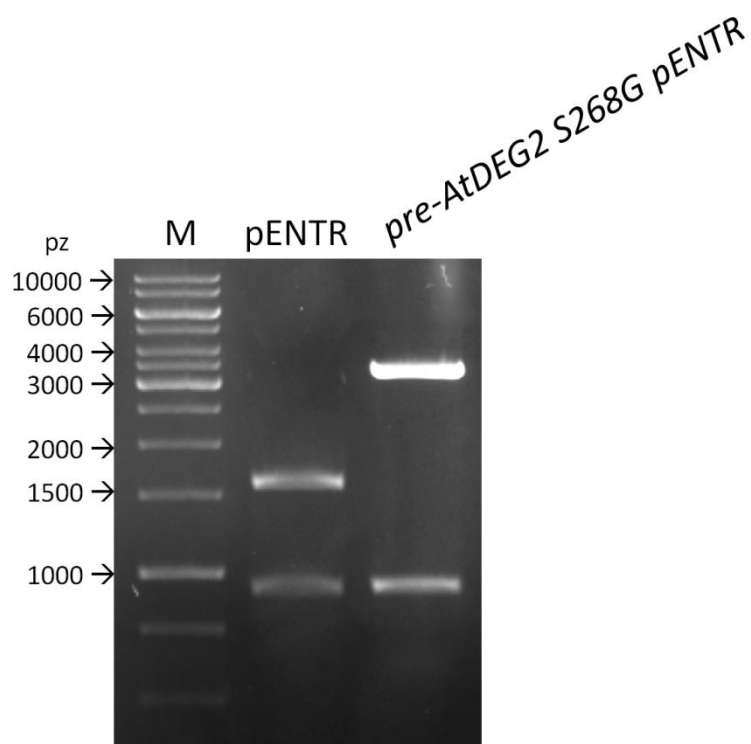
Uzyskanie klonów wejściowych kodujących pre-AtDeg2 oraz pre-AtDeg2 S268G rozpoczęto od skonstruowania wstawki kodującej pre-AtDeg2 (Rysunek 33). W tym celu z liści 4-tygodniowych roślin WT *A. thaliana* hodowanych w warunkach kontaktu ze światłem o umiarkowanym natężeniu (Tabela 2, s. 59) izolowano RNA, które wykorzystano jako matrycę w reakcji RT-PCR z użyciem zestawu starterów Oligo(dT)₁₈. Otrzymane cDNA posłużyło do uzyskania wstawki *pre-AtDEG2* poprzez reakcję PCR z użyciem starterów D2CtagF i D2CtagR (Rysunek 25, s. 67 i Tabela 3, s. 68). Otrzymany produkt PCR w przybliżeniu odpowiadał oczekiwanej wielkości 1824 pz (Rysunek 34A).



Rysunek 34. Analiza elektroforetyczna wstawki *pre-AtDEG2* (A) oraz produktów trawienia enzymem restrykcyjnym MluI wektora wejściowego pENTR oraz klonu wejściowego *pre-AtDEG2* pENTR (B). M – markery masy cząsteczkowej; pz – pary zasad.

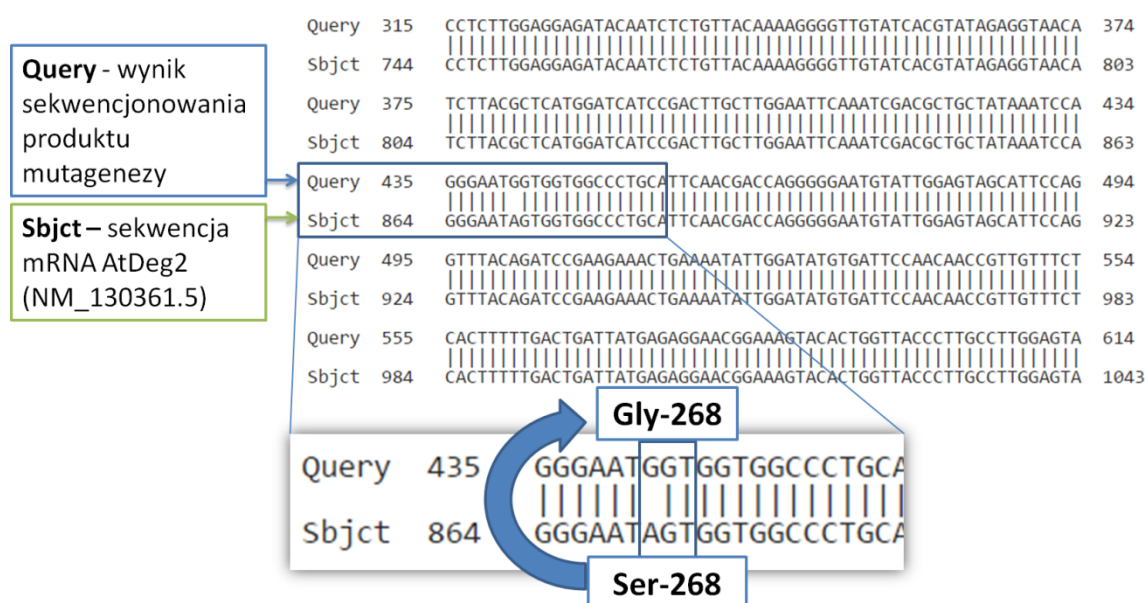
Produkt PCR wyizolowano z żelu i wprowadzono do wektora wejściowego pENTR (Rysunek 27, s. 73). Uzyskanie klonu wejściowego potwierdzono poprzez trawienie enzymem restrykcyjnym MluI i elektroforetyczny rozdział produktu trawienia (Rysunek 34B). Jako produkt trawienia klonu wejściowego *pre-AtDEG2* pENTR otrzymano dwa fragmenty o wielkościach w przybliżeniu odpowiadającym wielkościom oczekiwanym, tj. 3493 pz i 932 pz. Oba te fragmenty składają się na klon wejściowy o wielkości 4425 pz. Jako kontrolę negatywną wykorzystano produkt trawienia enzymem MluI wektora wejściowego pENTR (pozbawionego wstawki), który stanowią fragmenty o wielkości 1669 pz i 932 pz (= 2601 pz). Prawidłowość uzyskania klonu wejściowego dodatkowo potwierdzono poprzez sekwencjonowanie.

W celu skonstruowania klonu wejściowego *pre-AtDEG2* S268G pENTR zaprojektowano specyficzne startery wprowadzające mutację punktową w centrum katalitycznym proteazy: D2S268GF i D2S268GR (Rysunek 25, s. 67 i Tabela 3, s. 68). Zaprojektowane startery wykorzystano w mutagenizie ukierunkowanej (Rysunek 26, s. 71) uzyskanego wcześniej klonu wejściowego *pre-AtDEG2* pENTR,



Rysunek 35. Analiza elektroforetyczna produktów trawienia enzymem restrykcyjnym MluI wektora wejściowego pENTR oraz klonu wejściowego *pre-AtDEG2 S268G* pENTR uzyskanego za pomocą ukierunkowanej mutagenazy. M – markery masy cząsteczkowej; pz – pary zasad.

a produkt mutagenazy poddano trawieniu enzymem restrykcyjnym MluI i rozdzielono elektroforetycznie (Rysunek 35). Jako produkt trawienia klonu wejściowego *pre-AtDEG2 S268G* pENTR otrzymano dwa fragmenty o wielkościach w przybliżeniu odpowiadającym wielkościom oczekiwany, tj. 3493 pz i 932 pz. Oba te fragmenty składają się na klon wejściowy o wielkości 4425 pz. Jako kontrolę negatywną wykorzystano produkt trawienia enzymem MluI wektora wejściowego pENTR, który stanowią fragmenty o wielkości 1669 pz i 932 pz (= 2601 pz). W celu potwierdzenia obecności mutacji punktowej w sekwencji uzyskanego klonu wejściowego *pre-AtDEG2 S268G* pENTR produkt mutagenazy poddano sekwencjonowaniu. Porównanie wyniku sekwencjonowania z sekwencją nukleotydową AtDeg2 potwierdziło obecność substytucji jednego nukleotydu prowadzącej do zamiany seryny na glicynę w miejscu 268 sekwencji aminokwasowej AtDeg2 (Rysunek 36).

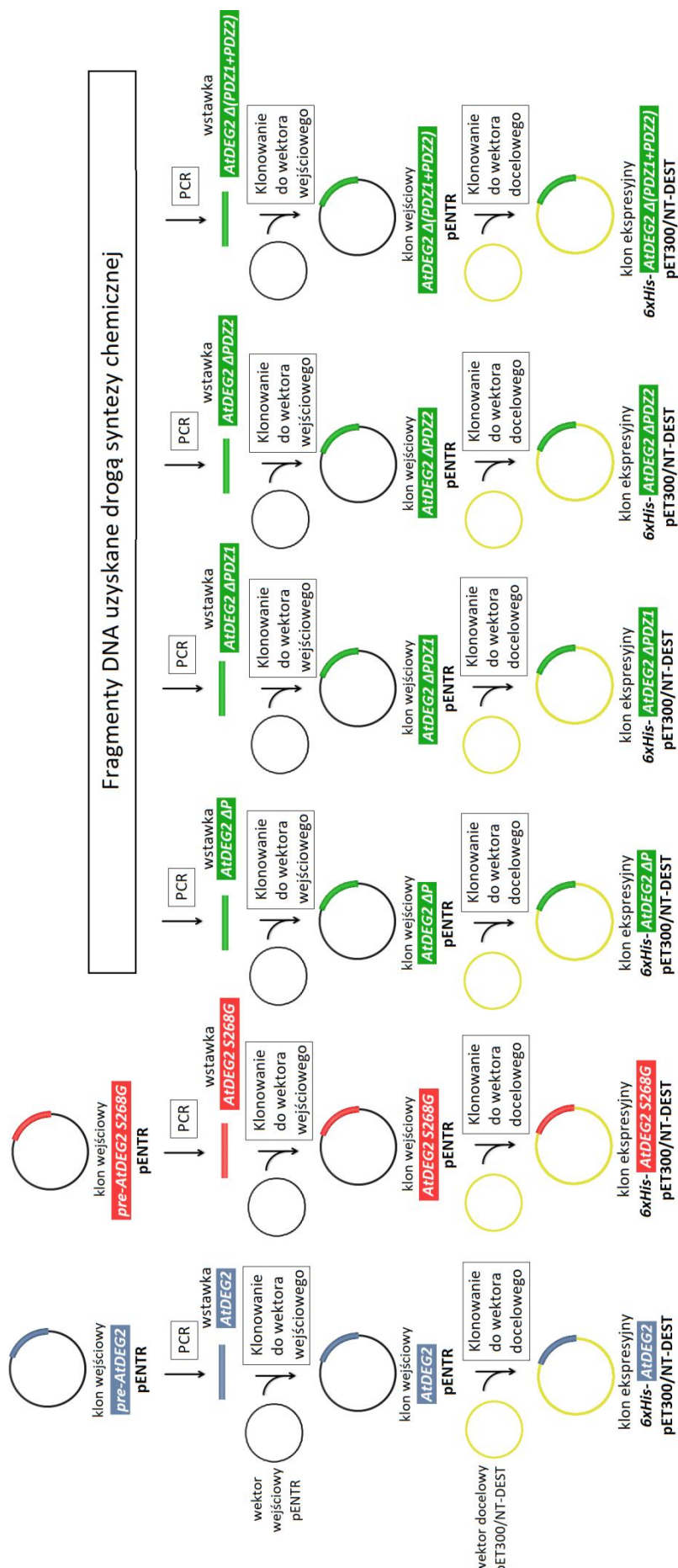


Rysunek 36. Potwierdzenie prawidłowości sekwencji klonu wejściowego *pre-AtDEG2 S268G* pENTR uzyskanego za pomocą ukierunkowanej mutagenazy. Na rysunku zaprezentowano odpowiedni fragment wyniku porównania sekwencji produktu mutagenazy – *pre-AtDEG2 S268G* pENTR z sekwencją nukleotydową mRNA AtDeg2 pozyskaną z bazy danych NCBI. Porównanie sekwencji wykonano za pomocą narzędzia bioinformatycznego BLAST.

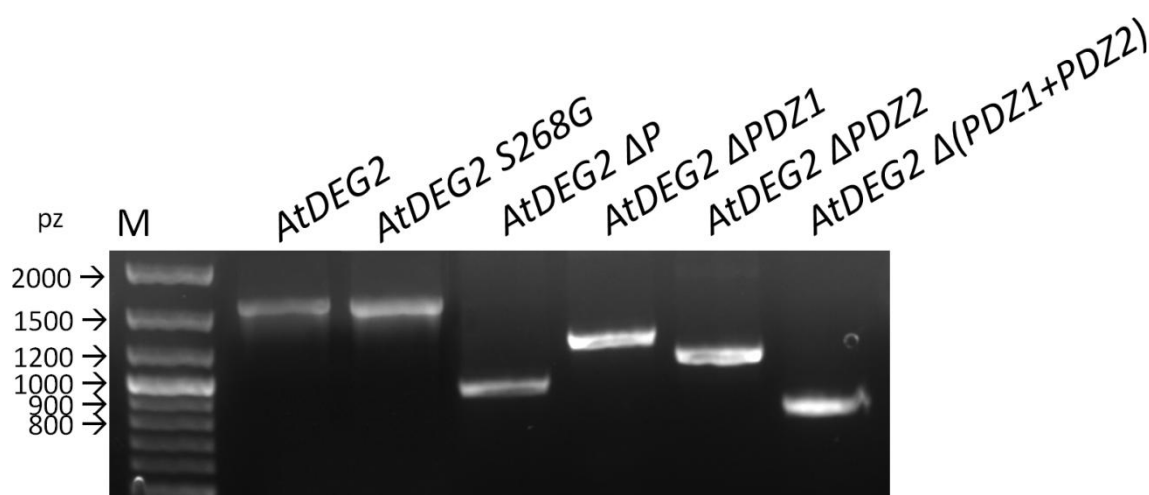
6.1.1.2 UZYSKANIE KLONÓW EKSPRESYJNYCH KODUJĄCYCH AtDEG2, AtDEG2 S268G, AtDEG2 ΔP, AtDEG2 ΔPDZ1, AtDEG2 ΔPDZ2 i AtDEG2 Δ(PDZ1+PDZ2)

Wstawki kodujące dojrzałe wersje białka AtDeg2 i AtDeg2 S268G uzyskano za pomocą starterów D2MntagF i D2ntagR (Rysunek 25, s. 67 i Tabela 3, s. 68), stosując jako matrycę uzyskane wcześniej klonów wejściowe: odpowiednio *pre-AtDEG2* pENTR i *pre-AtDEG2 S268G* pENTR (Rysunek 37). W ten sposób otrzymano produkty o wielkości w przybliżeniu odpowiadające oczekiwanej wielkości 1617 pz, co potwierdzono przez rozdział elektroforetyczny (Rysunek 38).

Wstawki kodujące wersje delecyjne AtDeg2 również uzyskano za pomocą starterów D2MntagF i D2ntagR, ale tym razem jako matrycę zastosowano fragmenty DNA odpowiednio zaprojektowane i uzyskane drogą syntezy chemicznej (Rysunek 37). Otrzymane produkty PCR w przybliżeniu odpowiadały oczekiwanej wielkości 1005 pz dla *AtDEG2* ΔP, 1290 pz dla *AtDEG2* ΔPDZ1, 1152 pz dla *AtDEG2* ΔPDZ2 oraz 825 pz dla *AtDEG2* Δ(PDZ1+PDZ2) (Rysunek 38).



Rysunek 37. Schemat postępowania prowadzącego do uzyskania klonów ekspresyjnych kodujących poszczególne wersje rekombinowane *AtDeg2*: *AtDeg2*, *AtDeg2* ΔP, *AtDeg2* ΔPDZ1, *AtDeg2* ΔPDZ2 i *AtDeg2* Δ(PDZ1+PDZ2)

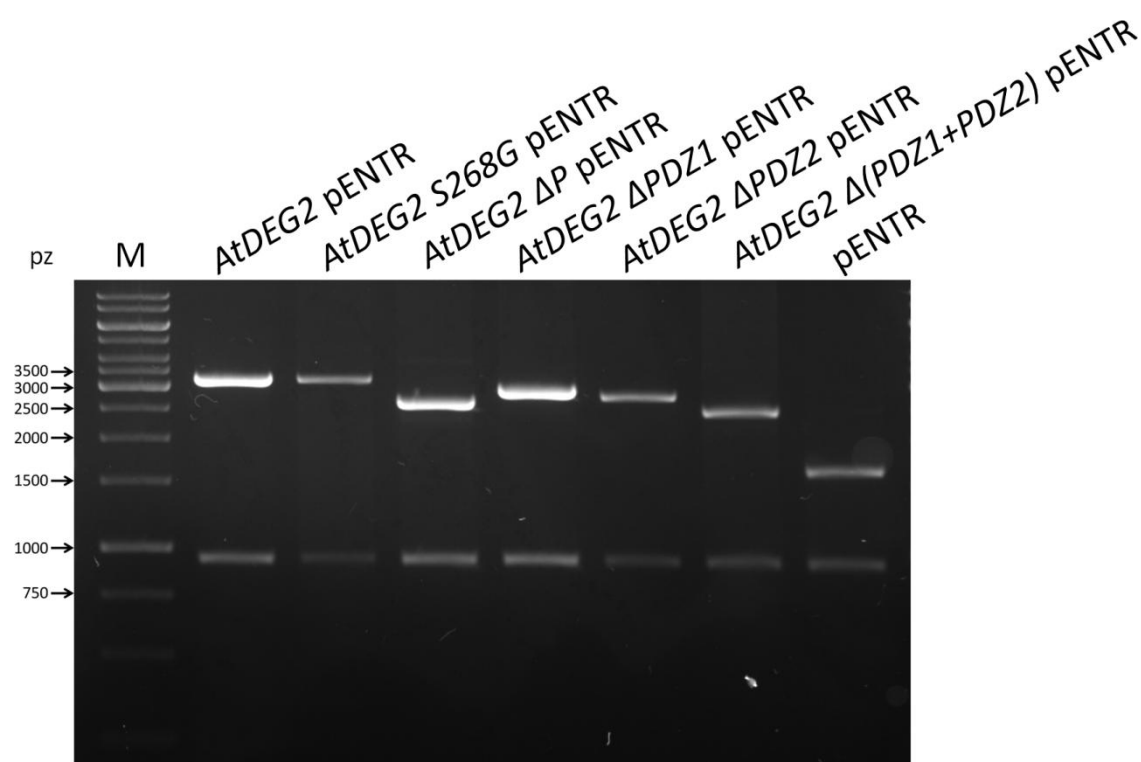


Rysunek 38. Analiza elektroforetyczna wstawek kodujących poszczególne wersje rekombinowane AtDeg2: AtDeg2, AtDeg2 S268G, AtDeg2 Δ P, AtDeg2 Δ PDZ1, AtDeg2 Δ PDZ2 i AtDeg2 Δ (PDZ1+PDZ2). M – markery masy cząsteczkowej; pz – pary zasad.

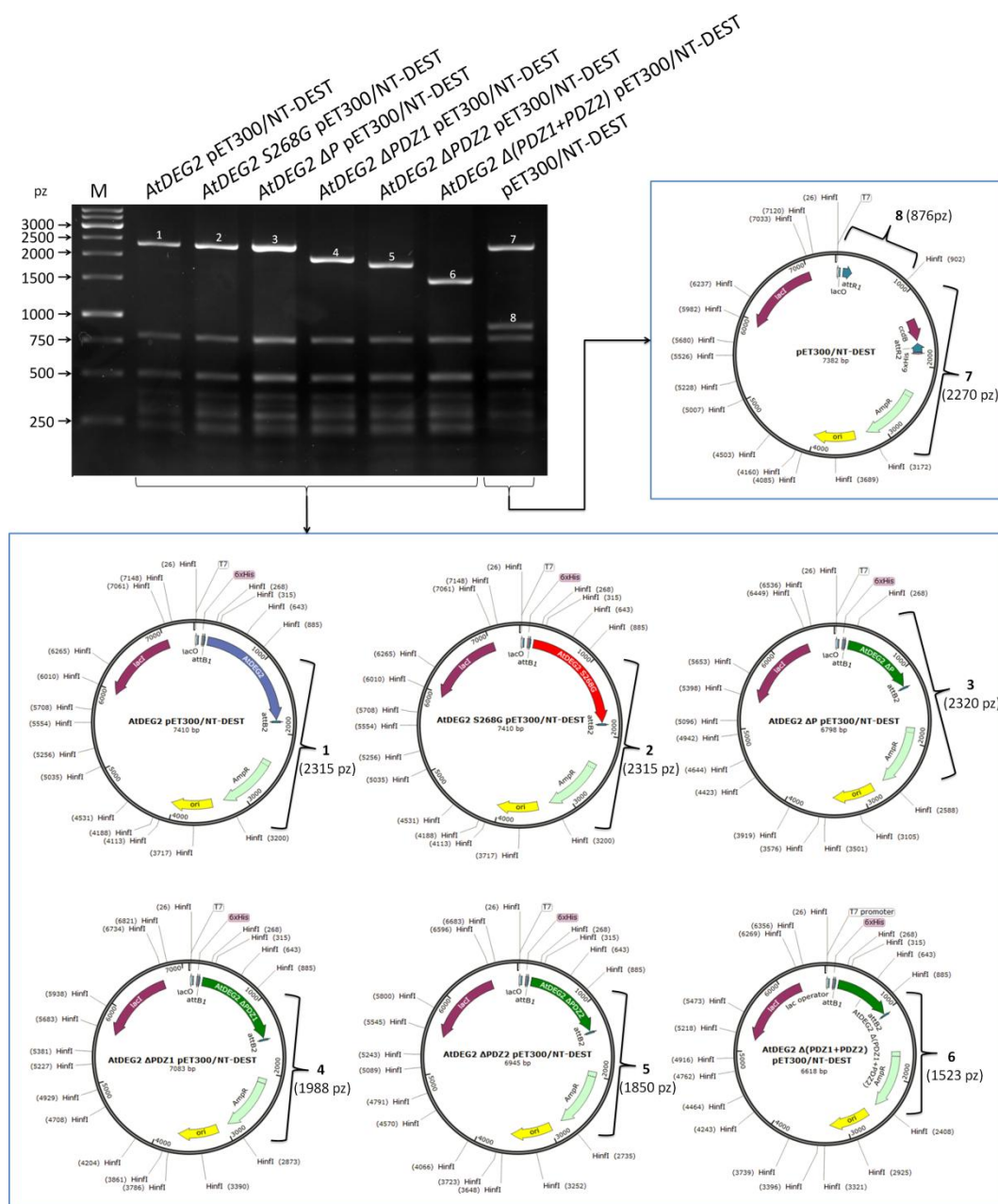
Kolejnym etapem było uzyskanie klonów wejściowych z wykorzystaniem wszystkich sześciu wstawek, po czym obecność wstawki w klonie wejściowym potwierdzono poprzez przeprowadzenie reakcji trawienia enzymem MluI i rozdział elektroforetyczny produktów trawienia (Rysunek 39). Dla każdego z klonów wejściowych jako produkt trawienia otrzymano dwa fragmenty o wielkościach w przybliżeniu odpowiadającym oczekiwanym wielkościom, tj. 3286 pz i 932 pz dla *AtDEG2* pENTR i *AtDEG2 S268G* pENTR, 2674 pz i 932 pz dla *AtDEG2 Δ P* pENTR, 2959 pz i 932 pz dla *AtDEG2 Δ PDZ1* pENTR, 2821 pz i 932 pz dla *AtDEG2 Δ PDZ2* pENTR, 2494 pz i 932 pz dla *AtDEG2 Δ (PDZ1+PDZ2)* pENTR. Prawidłowość sekwencji uzyskanych klonów wejściowych dodatkowo potwierdzono poprzez sekwencjonowanie.

Klony ekspresyjne zostały uzyskane przez przeniesienie wstawek kodujących każdą z wersji rekombinowanych AtDeg2 z klonu wejściowego do wektora docelowego poprzez reakcję klonowania. Uzyskanie klonów ekspresyjnych zostało potwierdzone przez przeprowadzenie reakcji trawienia enzymem HinfI i rozdział elektroforetyczny produktów trawienia (Rysunek 40). „Pusty” wektor docelowy (taki, w którym wprowadzenie wstawki zakończyło się niepowodzeniem) od klonów ekspresyjnych (zawierających wstawkę) różni się miejscami cięcia rozpoznawanym przez enzym HinfI

pomiędzy miejscami rekombinacji *attR1* i *attR2* (Rysunek 28, s. 74), dając po reakcji trawienia tym enzymem dwa unikatowe fragmenty DNA o wielkości 2270 pz i 876 pz (wśród fragmentów o wielkości powyżej 500 pz), podczas gdy w przypadku klonów ekspresyjnych tylko jeden – obejmujący wstawkę (wśród fragmentów o wielkości powyżej 500 pz). Po reakcji klonowania fragment DNA zawierający takie miejsce cięcia jest zastępowany przez odpowiednią wstawkę zawierającą inaczej rozmieszczone miejsca cięcia rozpoznawane przez *Hin*I. To pozwala odróżnić wektory, w których doszło do wprowadzenia wstawki od tych, gdzie klonowanie zakończyło się niepowodzeniem. Jak w przypadku klonów wejściowych, także i w tym przypadku prawidłowość sekwencji uzyskanych klonów ekspresyjnych potwierdzono poprzez sekwencjonowanie. Potwierdzone klony ekspresyjne wprowadzono do bakterii *E. coli* BL21 CodonPlus w celu przeprowadzenia nadekspresji.



Rysunek 39. Analiza elektroforetyczna produktów trawienia enzymem restrykcyjnym *Mlu*I klonów wejściowych kodujących poszczególne wersje rekombinowane *AtDeg2*: *AtDeg2*, *AtDeg2* S268G, *AtDeg2* ΔP, *AtDeg2* ΔPDZ1, *AtDeg2* ΔPDZ2 i *AtDeg2* Δ(PDZ1+PDZ2) oraz wektora wejściowego pENTR. M – markery masy cząsteczkowej; pz – pary zasad.



Rysunek 40. Analiza elektroforetyczna produktów trawienia enzymem restrykcyjnym *HinfI* klonów ekspresyjnych kodujących poszczególne wersje rekombinowane *AtDeg2*: *AtDeg2*, *AtDeg2* S268G, *AtDeg2* Δ*P*, *AtDeg2* Δ*PDZ1*, *AtDeg2* Δ*PDZ2* i *AtDeg2* Δ(*PDZ1*+*PDZ2*) oraz wektora docelowego pET300/NT-DEST oraz prezentacja graficzna klonów ekspresyjnych kodujących powyższe wersje rekombinowane *AtDeg2* oraz wektora pET300/NT-DEST ze wskazanymi unikatowymi fragmentami DNA (oznaczone numerami 1-8) powstającymi w wyniku trawienia restrykcyjnego enzymem *HinfI*. M – markery masy cząsteczkowej; pz – pary zasad; T7 – promotor polimerazy RNA bakteriofaga T7; *lacO* – operator laktozowy; *attR1*, *attR2*, *attB1*, *attB2* – miejsca rekombinacji; *ccdB* – gen kodujący toksynę bakteryjną, która hamuje aktywność gyrazy; 6xHis – sekwencja kodująca znacznik histydynowy; *AmpR* – gen oporności na ampicylinę i karbenicylinę; *ori* – miejsce inicjacji replikacji; *lacI* – gen kodujący represor laktozowy; *HinfI* – miejsca restrykcyjne dla enzymu *HinfI*. Rysunki wykonano z wykorzystaniem programu SnapGene®.

6.1.1.3 NADEKSPRESJA I OCZYSZCZANIE WERSJI REKOMBINOWANYCH AtDeg2

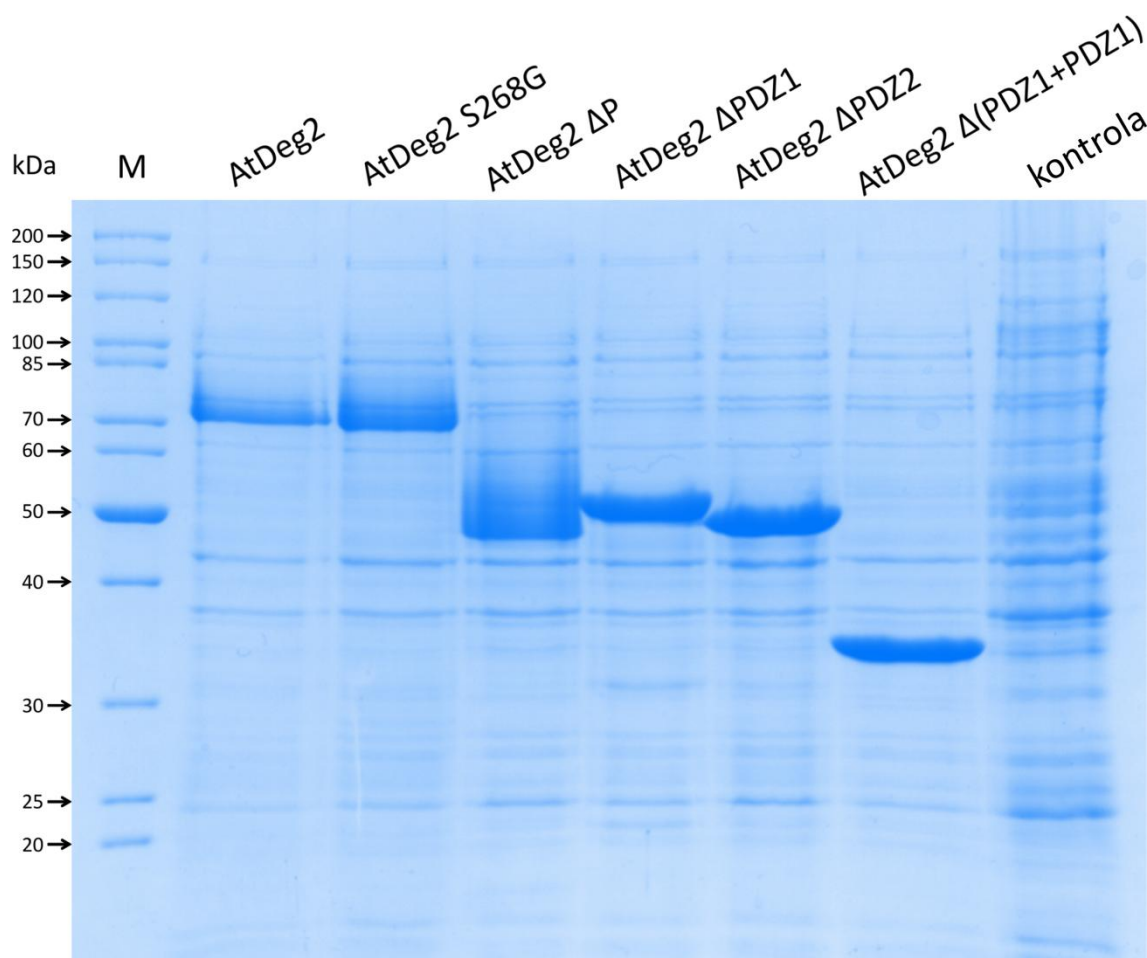
Nadekspresję poszczególnych wersji rekombinowanych AtDeg2 indukowano za pomocą IPTG (patrz podrozdział 5.9.1, s. 82). Po rozdziale elektroforetycznym lizatów z bakterii, w których indukowano nadekspresję – na żelu poliakrylamidowym poza prążkami odpowiadającymi białkom bakteryjnym wyraźnie widoczne były prążki o masie odpowiadającej w przybliżeniu masie poszczególnych wersji rekombinowanych AtDeg2 (Rysunek 41). Z wykorzystaniem narzędzia bioinformtycznego Compute pI/Mw (Gasteiger i wsp., 2003) wyliczono, że masa poszczególnych wersji rekombinowanych powinna wynosić:

- 62,9 kDa dla AtDeg2 (568 aa),
- 62,9 kDa dla AtDeg2 S268G (568 aa),
- 40,7 kDa dla Adeg AtDeg2 ΔP (364 aa),
- 50,9 kDa dla AtDeg2 ΔPDZ1 (459 aa),
- 45,3 kDa dla AtDeg2 ΔPDZ2 (413 aa),
- 33,4 kDa dla AtDeg2 Δ(PDZ1+PDZ2) (304 aa).

W wyniku analizy próbek lizatów bakteryjnych rozdzielonych za pomocą SDS-PAGE dla poszczególnych wersji rekombinowanych AtDeg2 ustalono następujące masy cząsteczkowe:

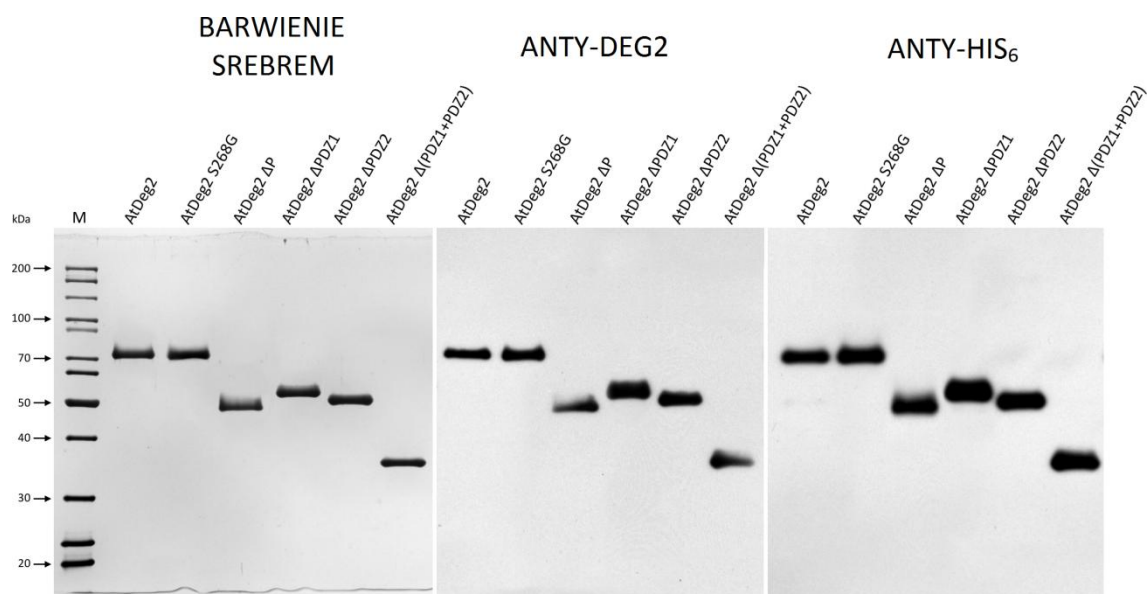
- 71,5 ±1,3 kDa dla AtDeg2,
- 70,5 ±2,0 kDa dla AtDeg2 S268G,
- 44,7 ±1,0 kDa dla Adeg AtDeg2 ΔP,
- 49,9 ±1,2 kDa dla AtDeg2 ΔPDZ1,
- 47,0 ±1,0 kDa dla AtDeg2 ΔPDZ2,
- 33,0 ±0,7 kDa dla AtDeg2 Δ(PDZ1+PDZ2).

Po dezintegracji komórek bakteryjnych wykonanej w warunkach denaturujących (patrz podrozdział 5.9.2, s. 83) wykonano oczyszczanie białek rekombinowanych, które obejmowało dwa główne etapy. Pierwszym etapem było wykonanie chromatografii powinowactwa z użyciem złoża niklowego, które wiąże białka rekombinowane poprzez znacznik His₆ (patrz podrozdział 5.9.3, s. 84). W efekcie otrzymano wstępnie



Rysunek 41. Analiza elektroforetyczna lizatów z bakterii nietransformowanych (kontrola) oraz bakterii, w których indukowano nadekspresję poszczególnych wersji rekombinowanych AtDeg2: AtDeg2, AtDeg2 S268G, AtDeg2 Δ P, AtDeg2 Δ PDZ1, AtDeg2 Δ PDZ2 i AtDeg2 Δ (PDZ1+PDZ2). Próbkę lizatów rozdzielono za pomocą SDS-PAGE i wybarwiono z użyciem CBB R-250. M – markery masy cząsteczkowej; kDa – kilodaltony.

oczyszczone preparaty białkowe. Drugim etapem było wykonanie elektroforezy preparatywnej i elektroelucji białka z wyciętego fragmentu żelu poliakrylamidowego, a uzyskane preparaty poddano procedurze wymiany buforu przez ultrafiltrację. Czystość uzyskanych preparatów białkowych została potwierdzona poprzez rozdział elektroforetyczny i barwienie srebrem, a za pomocą techniki immunoblot z wykorzystaniem przeciwciał anti-Deg2 i anti-His₆ potwierdzono tożsamość białek rekombinowanych (Rysunek 42).



Rysunek 42. Analiza czystości i identyfikacja poszczególnych wersji rekombinowanych AtDeg2: AtDeg2, AtDeg2 S268G, AtDeg2 ΔP, AtDeg2 ΔPDZ1, AtDeg2 ΔPDZ2 i AtDeg2 Δ(PDZ1 + PDZ2). Próbkę poszczególnych wersji AtDeg2 rozdzielano elektroforetycznie za pomocą SDS-PAGE, a następnie żele wybarwiano metodą srebrną lub białka znajdujące się w żelu przenoszono na błonę PVDF i identyfikowano za pomocą przeciwciał anti-Deg2 i anti-His₆. M – markery masy cząsteczkowej; kDa – kilodaltony.

6.1.2 ANALIZA AKTYWNOŚCI OPIEKUŃCZEJ WERSJI REKOMBINOWANYCH ATDEG2

6.1.2.1 TEST NA AKTYWNOŚĆ HOLDAZY

Holdazowa aktywność opiekuńcza AtDeg2 polegająca na hamowaniu powstawania agregatów była analizowana *in vitro* z użyciem lizozymu ulegającego denaturacji i agregacji w obecności DTT. Lizozym posiada w swojej strukturze wewnątrzcząsteczkowe mostki dwusiarczkowe, które utrzymują lizozym we właściwej konformacji, a obecność DTT sprawia, że mostki te ulegają redukcji, czego efektem jest denaturacja i następująca po niej agregacja zdenaturowanych cząsteczek lizozymu. Do pomiaru stopnia agregacji wykorzystano fakt, że pojawianie się agregatów białkowych objawia się zwiększaniem stopnia zmętnienia roztworu, którego poziom może być oznaczony przez pomiar absorpcji przechodzącej przez ten roztwór wiązki światła o długości 360 nm.

W badaniach wstępnych ustalono, że podczas inkubacji lizozymu w obecności DTT poziom agregatów osiąga stan wysycenia w 220 min doświadczenia. Możliwość

niespecyficznego hamowania agregacji lizozymu przez dowolne białko wykluczono poprzez inkubację zdenaturowanego lizozymu z BSA. W obecności BSA zaobserwowano nawet stymulację agregacji zdenaturowanego lizozymu (Rysunek 43A). Zgodnie z wynikami wcześniejszego doniesienia (Sun i wsp., 2012) wersja dzika AtDeg2 wykazywała aktywność opiekuńczą typu holdazy polegającą na istotnym statystycznie hamowaniu postawiania agregatów lizozymu od początku trwania doświadczenia. W obecności rekombinowanego AtDeg2 obserwowano 3,6-krotnie (dla dawki 3 μ g) i 9,9-krotnie (dla dawki 6 μ g) niższy poziom agregatów w stosunku do poziomu agregatów w stanie wysycenia (obserwowanego w próbie kontrolnej w 220 min doświadczenia). Wcześniej wykazano, że zamiana katalitycznie aktywnej reszty seryny na katalitycznie nieaktywną resztę glicyny (Zienkiewicz i wsp., 2012) bądź alaniny (Skórko-Glonek i wsp., 2007; Sun i wsp., 2010; Malet i wsp., 2012) prowadzi do pozbawienia proteaz z grupy Deg aktywności proteolitycznej. W związku z tym należało oczekiwać, że AtDeg2 S268G będzie nieaktywną proteolitycznie wersją AtDeg2 (to oczekiwanie zostało potwierdzone eksperymentalnie – patrz Rysunek 45, s. 118). Ustalono, że w obecności AtDeg2 S268G zahamowanie powstawania agregatów zdenaturowanego lizozymu było równie efektywne jak w przypadku AtDeg2 (Rysunek 43B), nie można zatem tłumaczyć tego zahamowania hydrolizą powstających agregatów katalizowaną przez AtDeg2/AtDeg2 S268G, lecz aktywnością holdazową tych wersji rekombinowanego AtDeg2. AtDeg2 Δ P hamował agregację istotnie statystycznie słabiej niż AtDeg2, ale dopiero delecja PDZ1, PDZ2 lub obu domen PDZ prowadziła do całkowitej utraty przez AtDeg2 holdazowej aktywności opiekuńczej (Rysunek 43B). Różnice w stopniu rozproszenia światła pomiędzy zastosowanymi dawkami każdej z wersji rekombinowanych AtDeg2 nie są istotne statystycznie.

6.1.2.2 TEST NA AKTYWNOŚĆ DEZAGREGAZY

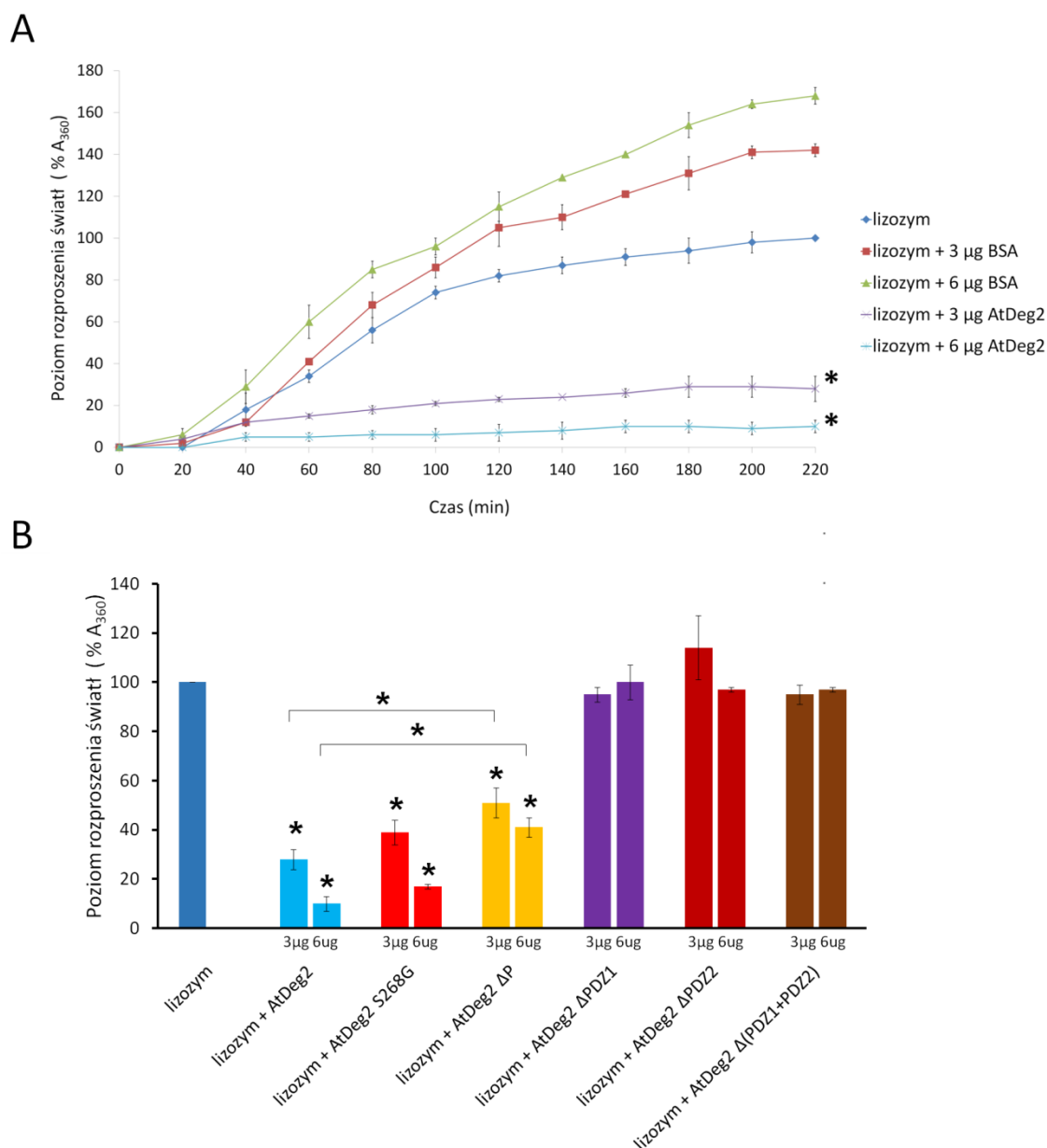
W celu zbadania, czy AtDeg2 wykazuje aktywność dezagregazy, wykorzystano typ doświadczenia opisany w sekcji 6.1.2.1 z tą różnicą, że rekombinowane wersje AtDeg2 wprowadzano do mieszaniny reakcyjnej zawierającej już zagregowany lizozym. W ten sposób właściwe doświadczenie obejmujące wszystkie składniki reakcji, tj. zdenaturowany przez DTT i zagregowany lizozym oraz odpowiednie wersje rekombinowane AtDeg2 lub BSA rozpoczynało się w momencie, w którym poziom

agregatów lizozymu osiągał stan wysycenia (220 min), a który dla analizy aktywności dezagregazy oznaczono jako czas 0 min. Inkubację agregatów lizozymu z białkami rekombinowanymi lub z BSA prowadzono przez kolejne 220 min. Poziom A_{360} zidentyfikowany w poszczególnych mieszaninach reakcyjnych w czasie 0 min oznaczono jako 100% poziomu rozproszenia światła. Możliwość niespecyficznego dezagregacji agregatów lizozymu przez dowolne białko wykluczono poprzez inkubację zagregowanego lizozymu z BSA. W tym przypadku również zaobserwowano stymulację agregacji, która dochodziła do poziomu 130-150% wartości początkowej, podczas gdy poziom agregatów w próbie kontrolnej (zawierającej sam lizozym) utrzymywał się w na poziomie ok. 100%.

W ciągu 220 min inkubacji zagregowanego lizozymu z AtDeg2 poziom rozproszenia światła obniżał się do 58% (3 μ g AtDeg2) i 46% (6 μ g AtDeg2) wartości początkowej (Rysunek 44A). W 220 min inkubacji zagregowanego lizozymu z AtDeg2 S268G zaobserwowano podobne obniżenie wartości A_{360} . W obecności AtDeg2 Δ P wydajność dezagregacji zdenaturowanego lizozymu była istotnie statystycznie niższa od wydajności dezagregacji obserwowanej w obecności AtDeg2, ale dopiero delecja PDZ1, PDZ2 lub obu domen PDZ prowadziła do całkowitej utraty dezagregazowej aktywności opiekuńczej AtDeg2 (Rysunek 44B). Różnice w stopniu rozproszenia światła pomiędzy zastosowanymi dawkami każdej z wersji rekombinowanych AtDeg2 nie są istotne statystycznie.

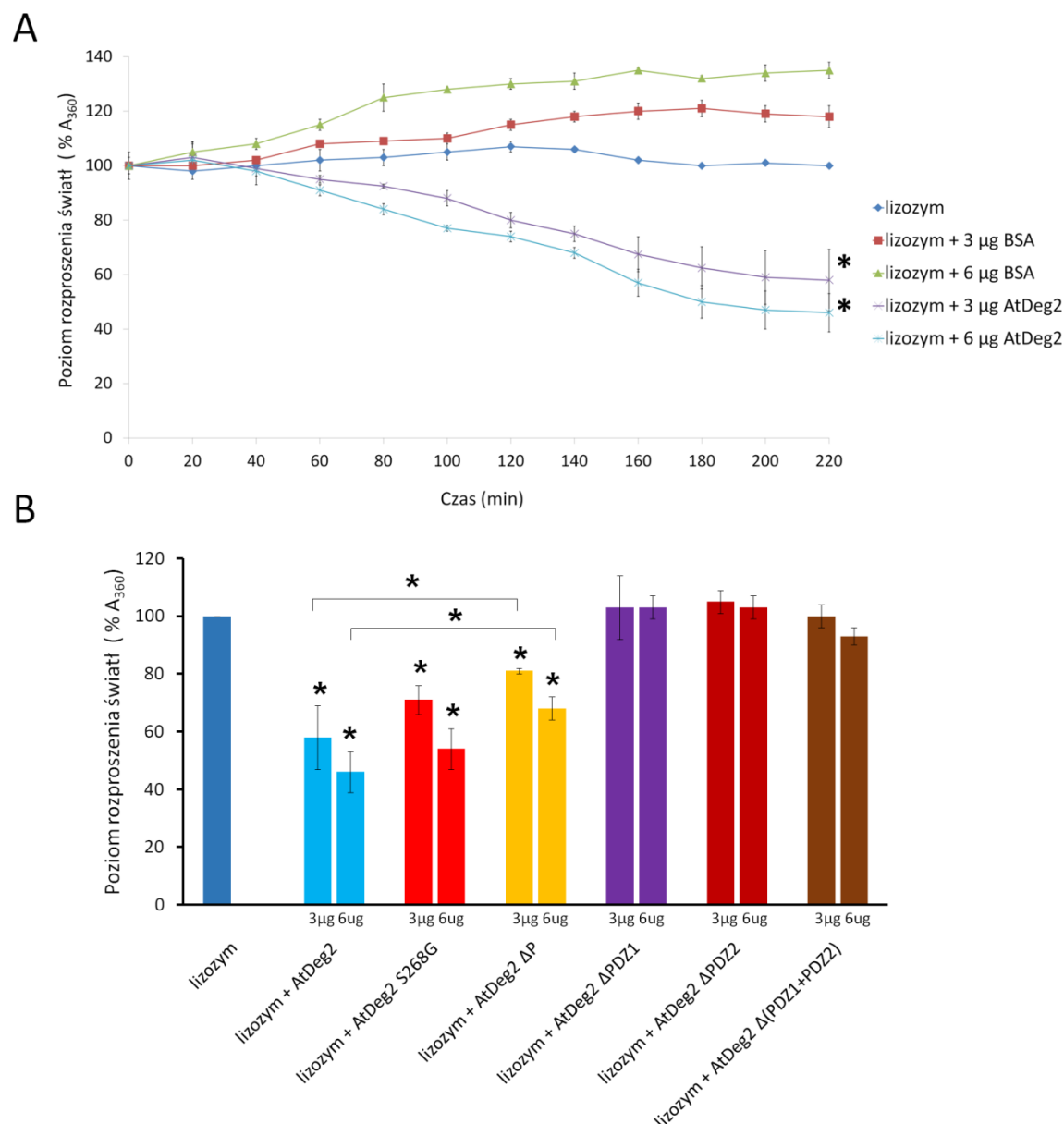
A zatem wyniki opisane powyżej wskazują, że:

- AtDeg2 dysponuje (co najmniej) dwoma typami aktywności opiekuńczej: holdazy (co stanowi potwierdzenie wyników pojedynczego doniesienia Sun i wsp., 2012) i dezagregazy (wykrytej po raz pierwszy);
- reszta seryny w miejscu katalitycznym AtDeg2 nie jest istotna ani dla aktywności holdazowej, ani dla aktywności dezagregacyjnej AtDeg2;
- pewną rolę w kształtowaniu się obu typów aktywności opiekuńczej AtDeg2 odgrywa domena proteazowa;
- obie domeny PDZ są niezbędne zarówno dla aktywności holdazowej, jak i aktywności dezagregazowej AtDeg2 (Tabela 8).



Rysunek 43. Udział poszczególnych domen AtDeg2 w hamowaniu powstawania agregatów lizozymu zdenaturowanego przez DTT. Kinetyka agregacji (0-220 min) 40 μ g lizozymu zdenaturowanego przez DTT monitorowana w obecności 0, 3 lub 6 μ g BSA lub AtDeg2 (**A**) oraz agregacja 40 μ g lizozymu zdenaturowanego przez DTT zarejestrowana w 220 min inkubacji w obecności 0, 3 lub 6 μ g AtDeg2, AtDeg2 S268G, AtDeg2 Δ P, AtDeg2 Δ PDZ1, AtDeg2 Δ PDZ2 lub AtDeg2 Δ (PDZ1+PDZ2) (**B**). Agregację rejestrowano w formie zmian absorpcji światła o długości 360 nm (A_{360}) spowodowanej rozpraszaniem światła przez agregaty białkowe powstające w mieszaninie inkubacyjnej. Poziom A_{360} zidentyfikowany w mieszaninie zawierającej sam lizozym w momencie wysycenia ustalono jako 100% poziomu rozproszenia światła. Przedstawione wartości stanowią średnią spośród minimum trzech wykonanych doświadczeń dla każdej z wersji rekombinowanych AtDeg2. Gwiazdki oznaczają, że poziom agregatów obserwowany w mieszaninie zawierającej określoną wersję rekombinowanego AtDeg2 różni się w sposób istotny statystycznie od poziomu agregatów obserwowanego w mieszaninie zawierającej sam lizozym ($p < 0,01$).

Gwiazdki umieszczone nad kłami oznaczają, że poziom agregatów różni się w sposób istotny statystycznie w mieszaninach zawierających objęte kłami wersje rekombinowanego AtDeg2 ($p < 0,01$).



Rysunek 44. Udział poszczególnych domen AtDeg2 w dezagregacji agregatów lizozymu zdenaturowanego przez DTT. Kinetyka dezagregacji (0-220 min) agregatów 40 μ g lizozymu zdenaturowanego przez DTT badana w obecności 0, 3 lub 6 μ g BSA lub AtDeg2 (**A**) oraz dezagregacja agregatów 40 μ g lizozymu zdenaturowanego przez DTT zarejestrowana w 220 min inkubacji w obecności 0, 3 lub 6 μ g AtDeg2, AtDeg2 S268G, AtDeg2 Δ P, AtDeg2 Δ PDZ1, AtDeg2 Δ PDZ2 lub AtDeg2 Δ (PDZ1+PDZ2) (**B**). Dezagregację rejestrowano w formie zmian absorpcji światła o długości 360 nm (A_{360}) spowodowanej rozpraszaniem światła przez agregaty białkowe obecne w mieszaninie inkubacyjnej. Poziom A_{360} zidentyfikowany w poszczególnych mieszaninach reakcyjnych w czasie 0 min ustalono jako 100% poziomu rozproszenia światła.

Przedstawione wartości stanowią średnią spośród minimum trzech wykonanych doświadczeń dla każdej z wersji rekombinowanych AtDeg2. Gwiazdki oznaczają, że poziom agregatów obserwowany w mieszaninie zawierającej określoną wersję rekombinowanego AtDeg2 różni się w sposób istotny statystycznie od poziomu agregatów obserwowanego w mieszaninie zawierającej sam lizozym ($p < 0,01$). Gwiazdki umieszczone nad klamrami oznaczają, że poziom agregatów różni się w sposób istotny statystycznie w mieszaninach zawierających objęte klamrami wersje rekombinowanego AtDeg2 ($p < 0,01$).

Tabela 8. Aktywność holdazy i dezagregazy *in vitro* poszczególnych wersji rekombinowanych AtDeg2: AtDeg2, AtDeg2 S268G, AtDeg2 ΔP, AtDeg2 ΔPDZ1, AtDeg2 ΔPDZ2 i AtDeg2 Δ(PDZ1+PDZ2). „++” – aktywność nie różni się w sposób istotny statystycznie od aktywności wersji dzikiej AtDeg2; „+” aktywność różni się w sposób istotny statystycznie od aktywności wersji dzikiej AtDeg2 (jest niższa); „–” – brak aktywności.

WERSJA REKOMBINOWANEGO ATDEG2	AKTYWNOŚĆ HOLDAZY	AKTYWNOŚĆ DEZAGREGAZY
AtDeg2 	++	++
AtDeg2 S268G 	++	++
AtDeg2 ΔP 	+	+
AtDeg2 ΔPDZ1 	–	–
AtDeg2 ΔPDZ2 	–	–
AtDeg2 Δ(PDZ1+PDZ2) 	–	–

6.2 POSZUKIWANIE FIZJOLOGICZNYCH SUBSTRATÓW DLA HOLDAZOWEJ AKTYWNOŚCI OPIEKUŃCZEJ ATDEG2

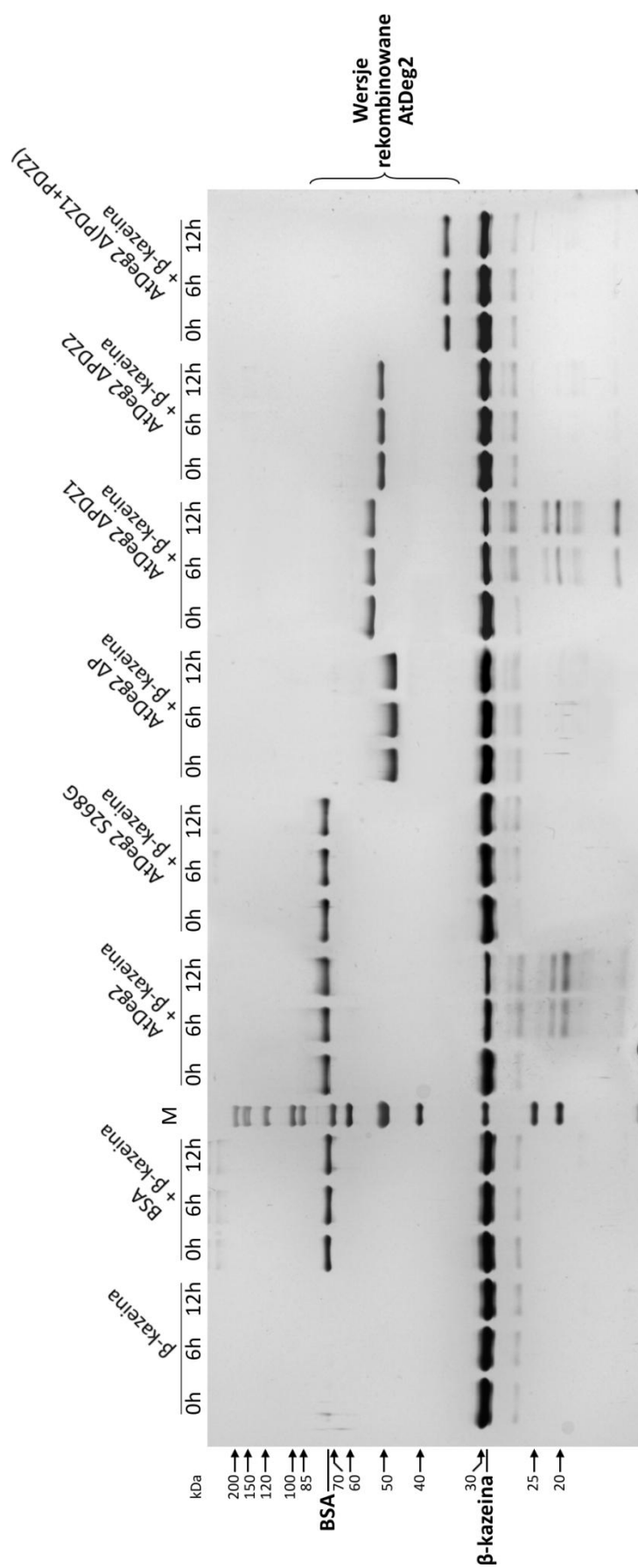
Drugie zadanie badawcze polegało na identyfikacji fizjologicznych substratów dla aktywności holdazowej AtDeg2 u roślin hodowanych w warunkach ekspozycji na światło o wysokim natężeniu. Do realizacji tego zadania badawczego wymagane było dysponowanie dwoma genotypami roślin *A. thaliana*:

- roślinami WT,
- transformantami posiadającymi białko AtDeg2 pozbawione aktywności holdazowej, z nienaruszoną aktywnością proteolityczną.

Do uzyskania transformantów zawierających białko AtDeg2 dysponujące samą tylko aktywnością proteolityczną wymagane było odnalezienie mutacji w strukturze pierwszorzędowej AtDeg2, która pozbawi AtDeg2 jego aktywności opiekuńczej z jednoczesnym zachowaniem jego aktywności proteolitycznej. Mutacje prowadzące do pozbawienia AtDeg2 jego aktywności opiekuńczej zostały zidentyfikowane poprzez porównawczą analizę aktywności opiekuńczej różnych wersji rekombinowanych AtDeg2 wykonaną w ramach realizacji pierwszego zadania badawczego (patrz Tabela 8). W związku z tym te same wersje rekombinowane AtDeg2 przeanalizowano także pod względem aktywności proteolitycznej.

6.2.1 ANALIZA AKTYWNOŚCI PROTEOLITYCZNEJ WERSJI REKOMBINOWANYCH ATDEG2

Analizę aktywności proteolitycznej indywidualnych wersji rekombinowanych AtDeg2 wykonano z użyciem β -kazeiny jako modelowego substratu. W badaniach wstępnych udowodniono, że β -kazeina nie ulega autohydrolizie w czasie inkubacji *in vitro* oraz, że nie ulega niespecyficzej hydrolizie w obecności dowolnego białka (reprezentowanego przez BSA) (Rysunek 45). Większość β -kazeiny uległa hydrolizie w ciągu 12 h inkubacji w obecności dzikiej wersji AtDeg2 (od początku inkubacji obserwowano obecny w preparacie β -kazeiny produkt jej degradacji o masie cząsteczkowej 27 kDa, na który przypada ok. 4% masy β -kazeiny). Mutacja w miejscu

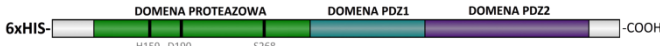
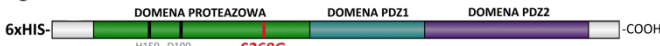


Rysunek 45. Udział poszczególnych domen w aktywności proteolitycznej AtDeg2. Aktywność proteolityczną analizowano przez inkubację przez 0, 6 i 12 h mieszanin zawierających 1 μ g samej β -kazeiny bądź 1 μ g β -kazeiny i 0,5 μ g każdej z wersji rekombinowanych AtDeg2 lub 0,5 μ g BSA. Mieszaniny inkubacyjne rozdzielano za pomocą SDS-PAGE, a żele wybarwiano za pomocą metody srebrowej. Rysunek przedstawia wyniki jednego typowego doświadczenia spośród minimum trzech wykonanych dla każdej z wersji rekombinowanych AtDeg2 oraz BSA. M – markery masy cząsteczkowej; kDa – kilodaltony.

katalitycznym (S268G) oraz delecja domeny proteazowej prowadziły do pozbawienia AtDeg2 aktywności proteolitycznej ujawniającej się niezdolnością do hydrolizy β -kazeiny. Na zdolność do hydrolizy β -kazeiny nie miała wpływu delecja domeny PDZ1 (AtDeg2 Δ PDZ1), natomiast wersje AtDeg2 Δ PDZ2 i AtDeg2 Δ (PDZ1+PDZ2) były pozbawione tej aktywności *in vitro* (Rysunek 45).

Zestawiając wyniki analizy aktywności proteolitycznej z wynikami uzyskanymi przez analizę aktywności holdazowej wersji rekombinowanych AtDeg2, stwierdzono, że poszukiwaną mutację pozbawiającą AtDeg2 jego aktywności holdazowej z jednoczesnym zachowaniem aktywności proteolitycznej stanowi delecja domeny PDZ1 (Tabela 9).

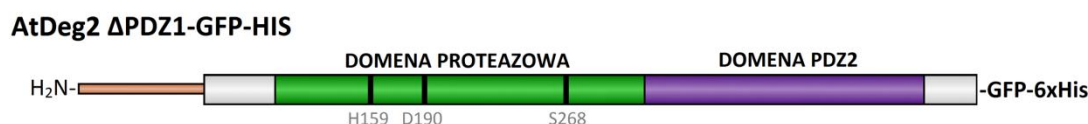
Tabela 9. Aktywność holdazy i aktywność proteolityczna *in vitro* poszczególnych wersji rekombinowanych AtDeg2: AtDeg2, AtDeg2 S268G, AtDeg2 Δ P, AtDeg2 Δ PDZ1, AtDeg2 Δ PDZ2 i AtDeg2 Δ (PDZ1+PDZ2). Poszukiwana wersja AtDeg2 pozbawiona aktywności holdazowej, z nienaruszoną aktywnością proteolityczną została wyróżniona kolorem zielonym. „++” – aktywność nie różni się w sposób istotny statystycznie od aktywności wersji dzikiej AtDeg2; „+” aktywność różni się w sposób istotny statystycznie od aktywności wersji dzikiej AtDeg2 (jest niższa); „–” – brak aktywności.

WERSJA REKOMBINOWANEGO ATDEG2	AKTYWNOŚĆ HOLDAZY	AKTYWNOŚĆ PROTEOLITYCZNA
AtDeg2 	++	++
AtDeg2 S268G 	++	–
AtDeg2 Δ P 	+	–
AtDeg2 Δ PDZ1 	–	++
AtDeg2 Δ PDZ2 	–	–
AtDeg2 Δ (PDZ1+PDZ2) 	–	–

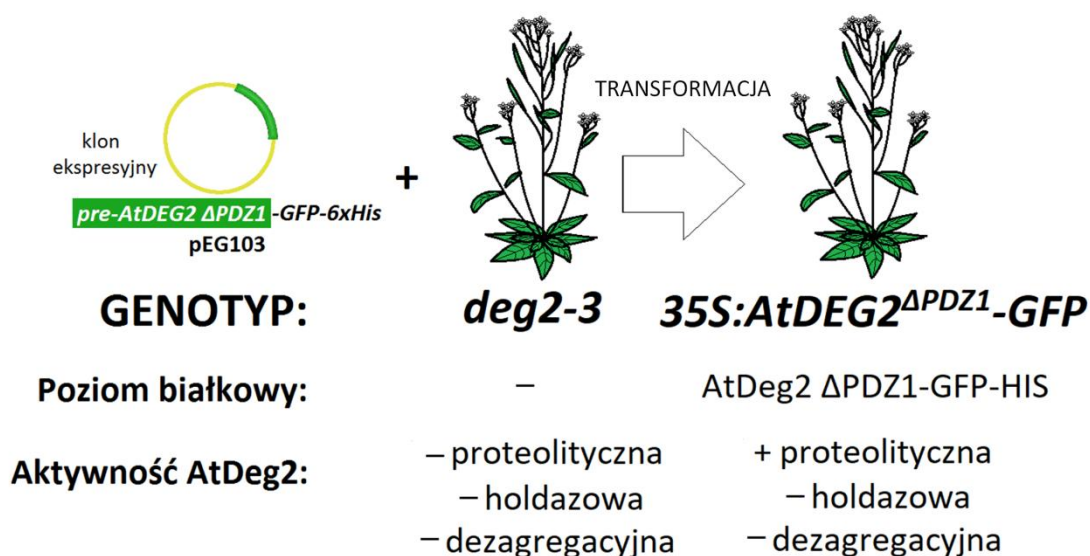
6.2.2 UZYSKANIE TRANSFORMANTÓW *35S:AtDEG2^{ΔPDZ1}-GFP*

W celu identyfikacji białek, które w warunkach ekspozycji roślin na światło o wysokim natężeniu są substratami dla aktywności holdazowej AtDeg2 – polegającej na hamowaniu agregacji białek/substratów w efekcie powstawania międzycząsteczkowych wiązań dwusiarczkowych – skonstruowano transformanty ekspresjonujące (w tle genetycznym *deg2-3* tj. mutanta inercyjnego całkowicie pozbawionego AtDeg2) białko fuzyjne AtDeg2 Δ PDZ1-GFP po kontrolą promotora CaMV 35S (Rysunek 46).

A



B

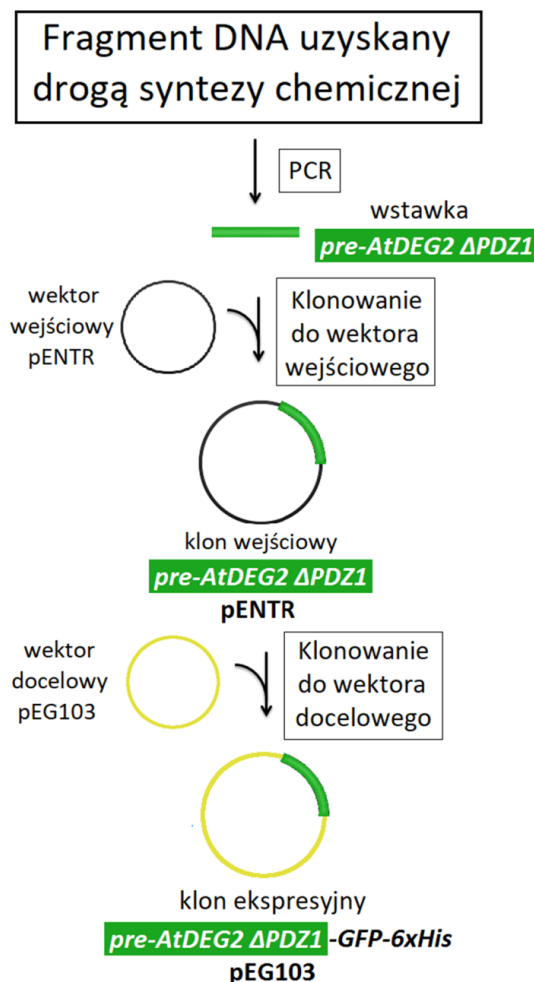


Rysunek 46. Rozkład domen w strukturze pierwszorzędowej pre-AtDeg2 Δ PDZ1-GFP (A) oraz schemat postępowania prowadzącego do uzyskania transformanta *35S:AtDEG2^{ΔPDZ1}-GFP* (B)

Pierwszym etapem uzyskania klonu ekspresyjnego kodującego *pre-AtDeg2 ΔPDZ1-GFP* było uzyskanie wstawki (Rysunek 47). Wstawkę otrzymano za pomocą starterów D2CtagF i D2CtagR (Rysunek 25, s. 67 i Tabela 3, s. 68) na matrycy stanowiącej odpowiednio zaprojektowany fragment DNA uzyskany drogą syntezy chemicznej. Otrzymany produkt PCR w przybliżeniu odpowiadał oczekiwanej wielkości 1496 pz (Rysunek 48A). Wstawkę następnie wprowadzono do wektora wejściowego, po czym obecność wstawki w klonie wejściowym potwierdzono poprzez przeprowadzenie reakcji trawienia enzymem MluI i rozdział elektroforetyczny produktów trawienia (Rysunek 48B). Prawidłowość sekwencji uzyskanego klonu wejściowego dodatkowo potwierdzono poprzez sekwencjonowanie. Wstawkę z klonu wejściowego wprowadzono następnie do wektora docelowego jakim był pEG103 (Rysunek 29, s. 75) w obrębie T-DNA ulegającego integracji z genomem rośliny. Uzyskanie klonu ekspresyjnego zostało potwierdzone przez przeprowadzenie reakcji trawienia enzymem HinfI i rozdział elektroforetyczny produktów trawienia (Rysunek 48C). Podobnie jak w przypadku wektora docelowego stosowanego do uzyskania wersji rekombinowanych *AtDeg2* „pusty” wektor docelowy pEG103 od klonu ekspresyjnego różni się miejscami cięcia rozpoznawanymi przez enzym HinfI pomiędzy miejscami rekombinacji (*attR1* i *attR2* lub *attB1* i *attB2*), dając po reakcji trawienia tym enzymem dwa unikatowe fragmenty DNA o wielkości 1112 pz i 1307 pz (wśród fragmentów DNA o wielkości powyżej 500 pz). Unikatowym fragmentem DNA po reakcji trawienia enzymem HinfI klonu ekspresyjnego *pre-AtDEG2 ΔPDZ1* pEG103 jest natomiast fragment o wielkości 1040 pz (wśród fragmentów DNA o wielkości powyżej 500 pz) (Rysunek 48C i D). To pozwala odróżnić wektory, w których doszło do wprowadzenia wstawki od tych, gdzie klonowanie zakończyło się niepowodzeniem. Jak w przypadku klonu wejściowego, także i w tym przypadku prawidłowość sekwencji potwierdzono poprzez sekwencjonowanie.

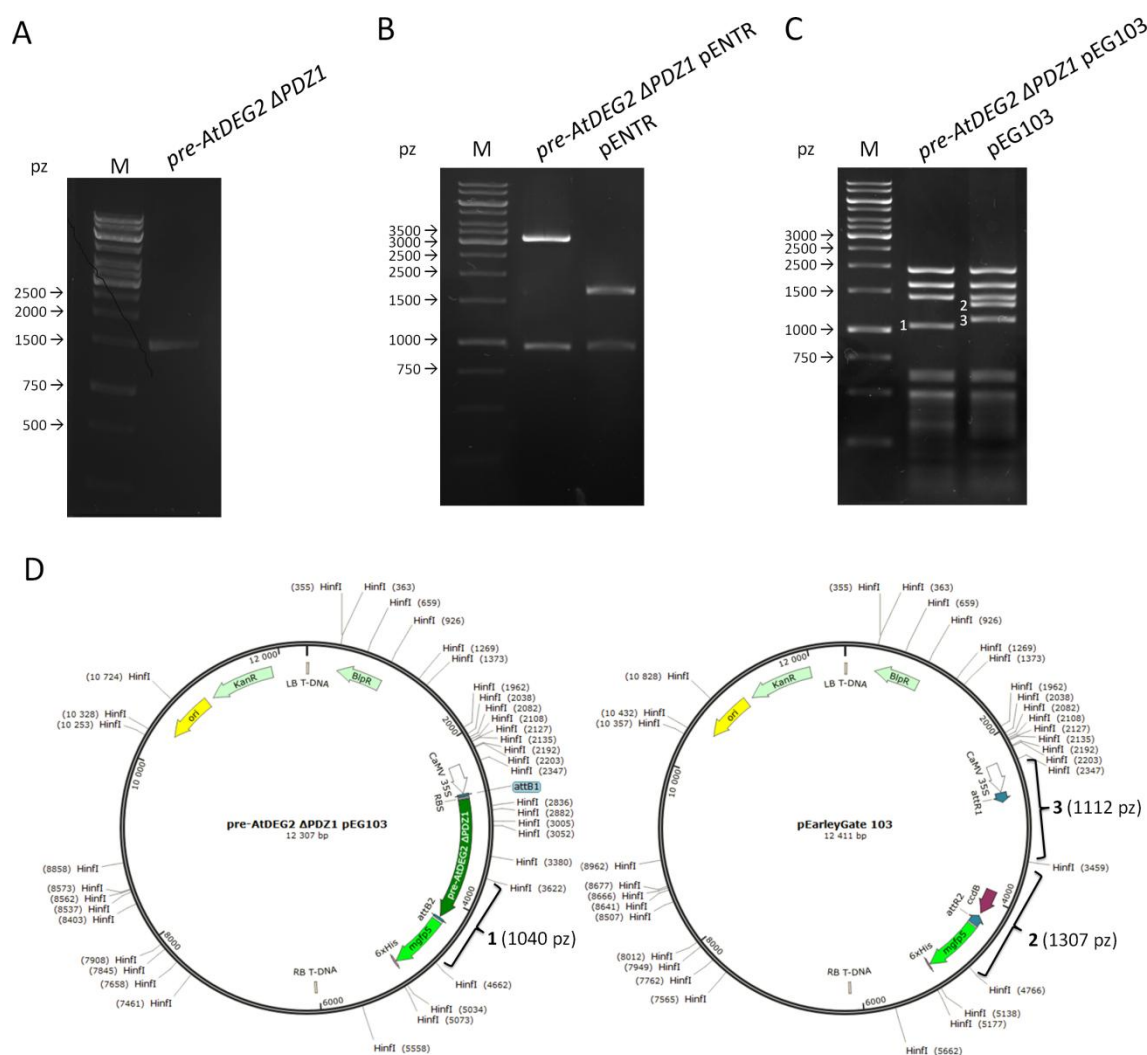
Przed transformacją roślin *A. thaliana* uzyskanym klonem ekspresyjnym sprawdzono, czy klon ten ulega ekspresji w komórkach roślinnych, a jego produkt jest kierowany do chloroplastów. W tym celu klon ekspresyjny *pre-AtDEG2 ΔPDZ1* pEG103 wprowadzono do protoplastów komórek mięsiszowych liści mutantów *deg2-3* drogą transfekcji, które następnie obserwowano pod mikroskopem konfokalnym. Na podstawie obrazów z mikroskopu konfokalnego (Rysunek 49) potwierdzono, że klon

ekspresyjny ulega ekspresji w protoplastach i że produkt ekspresji kierowany jest do chloroplastów, na co wskazuje obecność żółtych plamek będąca efektem nałożenia się zielonej fluorescencji GFP i czerwonej autofluorescencji chloroplastów (Rysunek 49D).

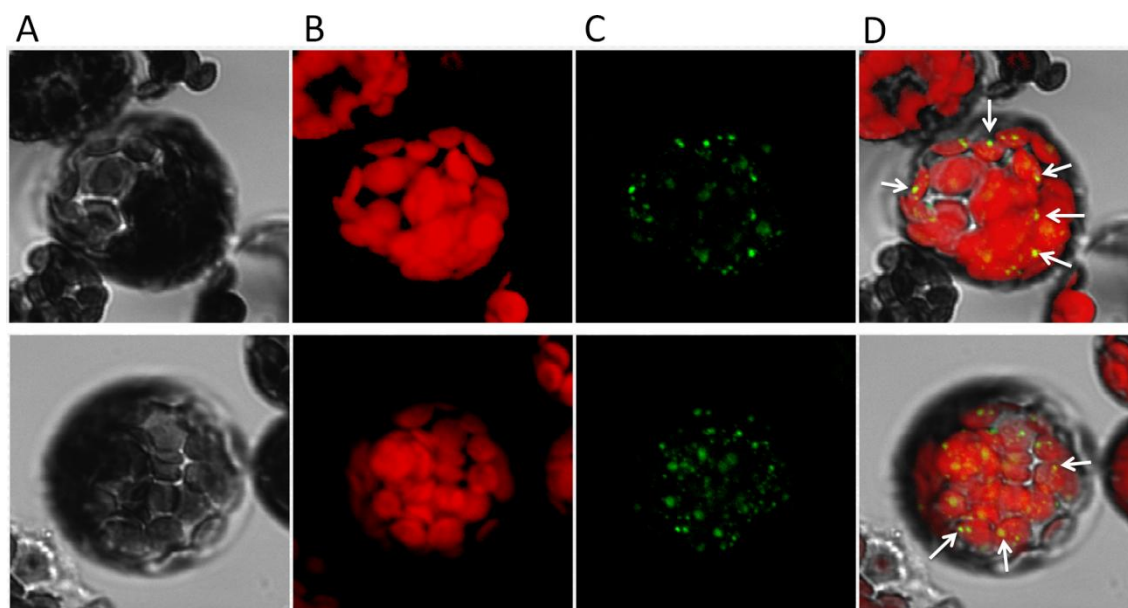


Rysunek 47. Schemat postępowania prowadzącego do uzyskania klonu ekspresyjnego kodującego *pre-AtDeg2 ΔPDZ1*-GFP

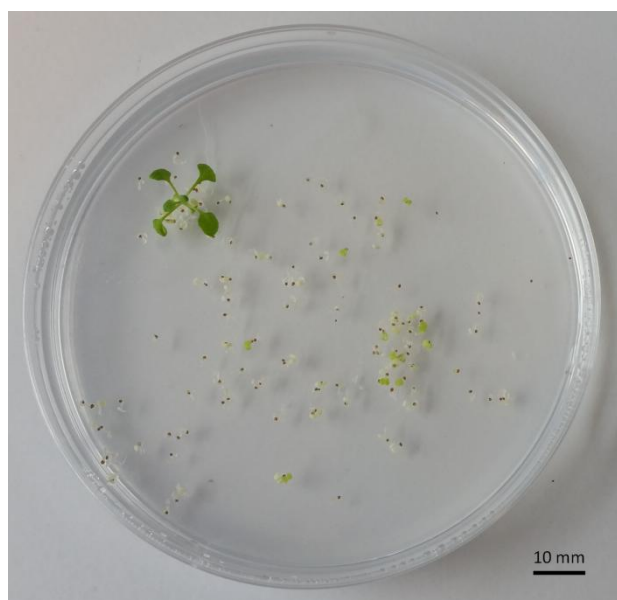
Klon ekspresyjny *pre-AtDEG2 ΔPDZ1* pEG103 wprowadzono do bakterii *Agrobacterium*, które następnie wykorzystano do transformacji mutantów *deg2-3* metodą agroinfiltracji (Rysunek 31, s. 81). Poprzez selekcję siewek transformantów z pokolenia T₀, a następnie T₁ na pożywce z herbicydem – na której utrzymywały się tylko te rośliny, w których nastąpiła integracja T-DNA (zawierającego wstawkę) klonu ekspresyjnego z genomem (Rysunek 50) – wyprowadzono linie homozygotyczne transformantów (pokolenie T₂).



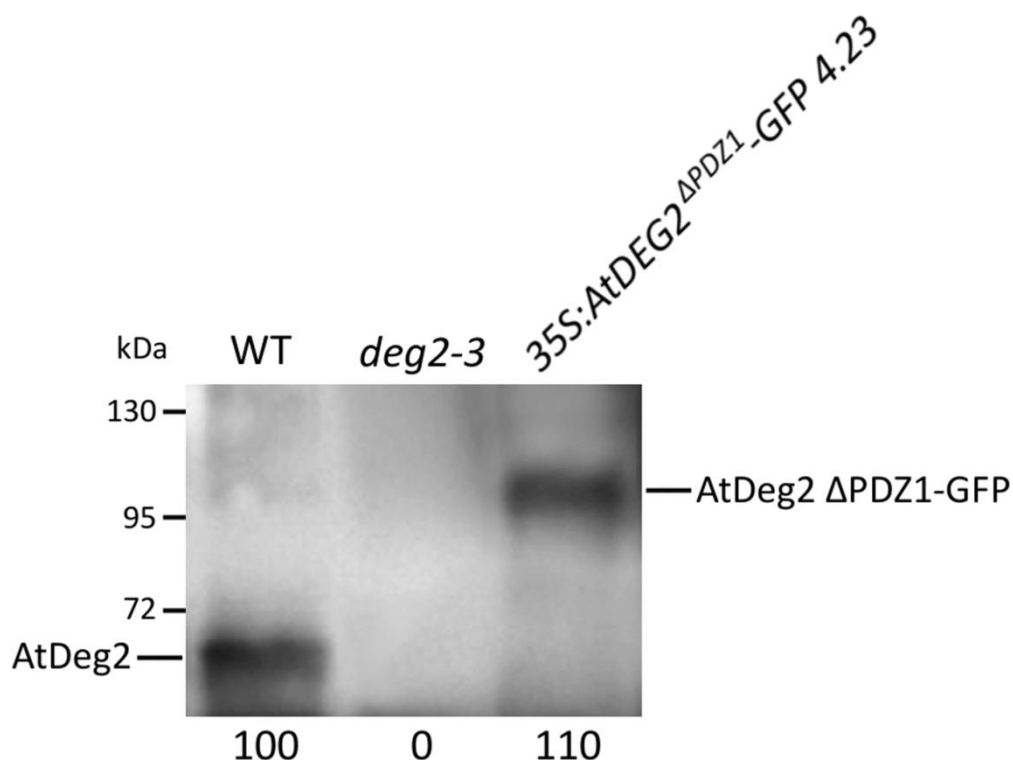
Rysunek 48. Analiza elektroforetyczna wstawki *pre-AtDEG2 ΔPDZ1* (A) produktów trawienia enzymem MluI klonu wejściowego *pre-AtDEG2 ΔPDZ1* pENTR i wektora pENTR (B), produktów trawienia enzymem HindIII klonu ekspresyjnego *pre-AtDEG2 ΔPDZ1* pEG103 i wektora pEG103 ze wskazanymi fragmentami DNA unikatowymi dla każdego konstruktu (oznaczone numerami 1-3) (C) oraz prezentacja graficzna klonu ekspresyjnego *pre-AtDEG2 ΔPDZ1* pEG103 oraz wektora pEG103 ze wskazanymi unikatowymi fragmentami DNA (oznaczone numerami 1-3) powstającymi w wyniku trawienia restrykcyjnego enzymem HindIII (D). M – markery masy cząsteczkowej; pz – pary zasad, CaMV 35S – promotor 35S RNA z wirusa mozaiki kalafiora; *attR1*, *attR2*, *attB1*, *attB2* – miejsca rekombinacji; *ccdB* – gen kodujący toksynę bakteryjną, która hamuje aktywność gyrazy; *mgfp5* – gen kodujący znacznik fluorescencyjny mGFP5; 6xHis – sekwencja kodująca znacznik histydynowy; RB T-DNA, LB T-DNA – odpowiednio prawa i lewa granica T-DNA; *ori* – miejsce inicjacji replikacji; KanR – gen oporności na kanamycynę; BIpR – gen oporności na glufosynat amonu; RBS – miejsce wiązania rybosomu; HindIII – miejsca restrykcyjne dla enzymu HindIII. Rysunki wykonano z wykorzystaniem programu SnapGene®.



Rysunek 49. Detekcja sygnału fluorescencji białka GFP w protoplastach komórek mięsistowych liścia *deg2-3 A. thaliana* transfekowanych klonem ekspresyjnym kodującym pre-AtDeg2 Δ PDZ1-GFP. Obrazy z mikroskopu świetlnego (A), autofluorescencji chlorofilu (B) i fluorescencji białka GFP (C) oraz efekt nałożenia na siebie obrazów mikroskopu świetlnego, autofluorescencji chlorofilu i fluorescencji białka GFP (D). Strzałkami wskazano plamki w kolorze żółtym, który jest efektem nałożenia się zielonej fluorescencji GFP i czerwonej autofluorescencji chlorofilu.



Rysunek 50. Siewka transformantów *35S:AtDEG2^{ΔPDZ1}-GFP* (z pokolenia T₀) utrzymująca się na pożywce z herbicydem. Rośliny nie będące transformantami zaprzestały wzrostu i utraciły swój intensywny zielony kolor.



Rysunek 51. Określenie poziomu białka AtDeg2 oraz AtDeg2 Δ PDZ1-GFP u roślin WT, mutantów *deg2-3* oraz u transformantów *35S:AtDEG2 Δ PDZ1-GFP 4.23*. Chloroplasty wyizolowane z liści roślin, które hodowano w warunkach ekspozycji na światło o wysokim natężeniu do momentu otwarcia się pierwszego kwiatu (podfaza 6.0), poddano lizie osmotycznej, a próbki lizatów rozdzielono za pomocą SDS-PAGE, przenoszono na błonę PVDF i wykonano immunodetekcję za pomocą techniki immunoblot z użyciem przeciwciał anty-Deg2. Ilość preparatów lizatów wprowadzonych do kieszonek normalizowano w oparciu o taką samą ilość białka. „Immunobloty” analizowano densytometrycznie, a intensywność indywidualnych sygnałów określono względem sygnału zidentyfikowanego dla lizatu chloroplastów roślin WT (100%). kDa – kilodaltony.

Uzyskane linie homozygotyczne transformantów *35S:AtDEG2 Δ PDZ1-GFP* hodowano w warunkach ekspozycji na światło o wysokim natężeniu do momentu otwarcia się pierwszego kwiatu (podfaza 6.0), z liści tych roślin izolowano chloroplasty, które następnie poddano lizie i analizie immunoblot z użyciem przeciwciała anty-Deg2. Wynikiem tej analizy był wybór linii 4.23 (spośród innych linii transformantów *35S:AtDEG2 Δ PDZ1-GFP*), u której poziom białka fuzyjnego był najbardziej zbliżony do ilości białka AtDeg2 u rośliny WT (Rysunek 51).

6.2.3 IDENTYFIKACJA FIZJOLOGICZNYCH SUBSTRATÓW DLA HOLDAZOWEJ AKTYWNOŚCI OPIEKUŃCZEJ AtDEG2

Poszukiwanie fizjologicznych substratów dla holdazowej aktywności opiekuńczej AtDeg2 wykonano za pomocą podejścia eksperymentalnego w oparciu o elektroforezę diagonalną, tj. rodzaj analizy dwukierunkowej użytecznej dla badania składu podjednostek wieloskładnikowych białek zawierających międzybiałkowe wiązania dwusiarczkowe. Białka, które są połączone międzycząsteczkowymi mostkami dwusiarczkowymi migrują w drugim kierunku poniżej przekątnej żelu. Zastosowanie elektroforezy diagonalnej w poszukiwaniu fizjologicznych substratów białkowych dla aktywności opiekuńczej AtDeg2 jest oparte na założeniu, że:

- AtDeg2 poprzez swoją aktywność holdazową może uczestniczyć – u roślin WT poddanych działaniu stresu wysokiego natężenia światła – w hamowaniu agregacji białko-białko poprzez mostki dwusiarczkowe (przykładem potwierdzającym, że białka chloroplastowe mogą ulegać w warunkach stresu agregacji poprzez mostki dwusiarczkowe jest homogagregacja LS Rubisco zachodząca u zielenic *Chlamydomonas* poddanych działaniu nadtlenu wodoru – Esquivel i wsp., 2006 – oraz u roślin *A. thaliana* poddanych działaniu stresu zmiany natężenia światła z umiarkowanego na niskie – Grabsztunowicz i wsp., 2015),
- AtDeg2 pozbawione aktywności holdazowej – w roślinach *35S:AtDEG2^{ΔPDZ1}-GFP 4.23* poddanych działaniu stresu wysokiego natężenia światła – może być całkowicie lub częściowo niezdolne do hamowania agregacji białko-białko poprzez mostki dwusiarczkowe.

Opierając się na powyższych założeniach, fizjologiczne substraty dla aktywności opiekuńczej identyfikowano jako białka wyizolowane z chloroplastów liści transformantów *35S:AtDEG2^{ΔPDZ1}-GFP 4.23* rosnących w warunkach ekspozycji na światło o wysokim natężeniu, które:

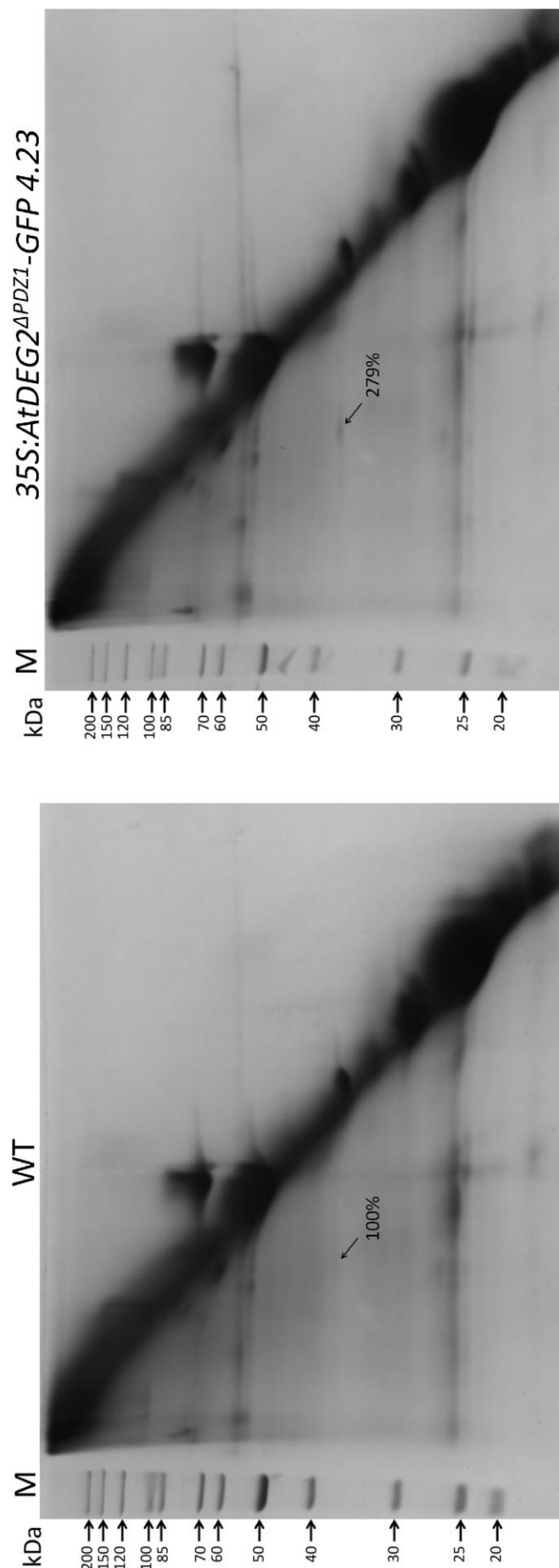
- migrują poniżej przekątnej żelu po elektroforezie diagonalnej białek wyizolowanych z chloroplastów liści transformantów *35S:AtDEG2^{ΔPDZ1}-GFP 4.23* rosnących w warunkach ekspozycji na światło o wysokim natężeniu,
- występują znacznie bardziej obficie niż w chloroplastach roślin WT.

Zgodnie z powyższym lizaty chloroplastów z liści roślin obu genotypów w podfazie 6.0 rozdzielono za pomocą elektroforezy diagonalnej i przez porównawczą analizę żeli wykryto białko reprezentowane przez plamkę, która:

- 1) znajdowała się poniżej przekątnej żelu i
- 2) była prawie trzykrotnie intensywniejsza na żelach z rozdzielonymi lizatami chloroplastowymi transformantów *35S:AtDEG2^{ΔPDZ1}-GFP 4.23* niż na żelach, w których rozdzielono lizaty z roślin WT (Rysunek 52).

Białko to zidentyfikowano za pomocą spektrometrii mas jako podjednostkę γ_1 kompleksu F_1 syntazy ATP (Tabela 10 i Rysunek 53A), która tak jak AtDeg2 znajduje się na powierzchni błony tylakoidowej od strony stromy, a w swojej strukturze posiada 3 reszty cysteinowe (Rysunek 53B), z których część mogła uczestniczyć w procesie tworzenia homoagregatów podjednostki γ_1 syntazy ATP.

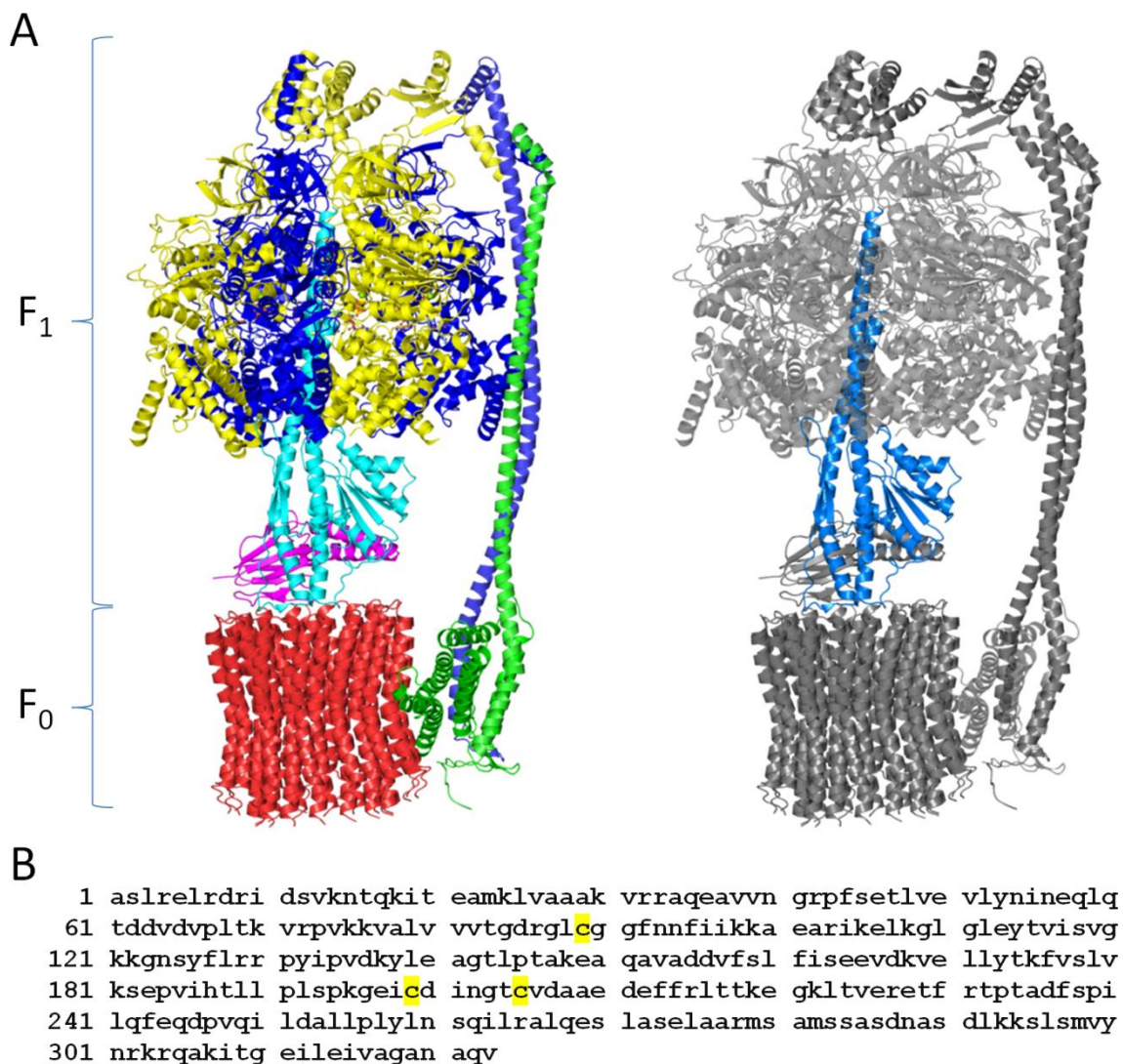
Uzyskany wynik wskazuje, że podjednostka γ_1 kompleksu F_1 syntazy ATP jest substratem aktywności holdazowej AtDeg2, tzn., że AtDeg2 może hamować agregację za pośrednictwem mostków dwusiarczkowych podjednostek γ_1 syntazy ATP, do jakiej może dochodzić w warunkach ekspozycji roślin na światło o wysokim natężeniu. Istnieje jednak alternatywna możliwość wytłumaczenia akumulacji w chloroplastach transformantów *35S:AtDEG2^{ΔPDZ1}-GFP 4.23* znacznych ilości podjednostki γ_1 syntazy ATP, większych niż w przypadku chloroplastów roślin WT, mianowicie niższa aktywność reduktazy dwusiarczkowej w chloroplastach transformantów. Do białek o aktywności reduktazy dwusiarczkowej należą tioredoksyny oraz glutaredoksyny, które poprzez tę aktywność działają antyoksydacyjnie, redukując drogą tzw. wymiany tiolowo-dwusiarczkowej mostki dwusiarczkowe powstające wewnątrz białek lub pomiędzy białkami chloroplastowymi w wyniku stresu oksydacyjnego (Rouhier, 2010). Niższa aktywność reduktazy dwusiarczkowej w chloroplastach transformantów prowadziłaby do mniej efektywnego – w porównaniu z roślinami WT – usuwania powstających agregatów podjednostki γ_1 syntazy ATP, co z kolei prowadziłoby do wyższego poziomu agregatów tego białka u transformantów (w porównaniu z roślinami WT).



Rysunek 52. Identyfikacja substratów dla holdazowej aktywności opiekuńczej AtDeg2. Chloroplasty (wyzolowane z liści roślin WT i transformantów 35S:AtDEG2 Δ PDZ1-GFP 4.23, które hodowano w warunkach ekspozycji na światło o wysokim natężeniu do momentu otwarcia się pierwszego kwiatu – podfaza 6.0) poddano lizie osmotycznej, a próbki lizatów rozdzielono za pomocą elektroforezy diagonalnej. Ilość preparatów lizatów normalizowano w oparciu o taką samą ilość białka. Żele wybarwiono za pomocą techniki Blue Silver i analizowano densytometrycznie. Strzałki wskazują lokalizację na żelach białka, którego sygnał dla lizatu chloroplastów roślin 35S:AtDEG2 Δ PDZ1-GFP 4.23 był istotnie intensywniejszy niż w przypadku lizatu chloroplastów roślin WT (100%). M – markery masy cząsteczkowej; kDa – kilodaltony.

Tabela 10. Wynik spektrometrii mas wykrytej plamki

Białko	Wartość score	Pokrycie sekwencji	Masa białka	Lokalizacja wewnątrzchloroplastowa
ATPC1 ATPaza, kompleks F ₁ , podjednostka γ_1	1660	41%	41kDa	Stroma



Rysunek 53. Struktura krystaliczna kompleksu F₀ i F₁ chloroplastowej syntazy ATP ze *Spinacia oleracea* (PDB ID: 6FKH) z wyróżnioną kolorem niebieskim podjednostką γ_1 (z prawej strony) (A) oraz sekwencja aminokwasowa podjednostki γ_1 (At4G04640, na podstawie Hisabori i wsp., 2013) chloroplastowej syntazy ATP *A. thaliana* z wyróżnionymi kolorem żółtym resztami cysteinowymi (B). Wizualizację struktury krystalicznej otrzymano z bazy danych PDB (http://www.ebi.ac.uk/pdbe/node/1).

Test na aktywność reduktazy dwusiarczkowej wykonano z wykorzystaniem insuliny, która w obecności DTT ulega spontanicznej agregacji. Wynika to z faktu, że łańcuchy A i B w strukturze insuliny połączone są mostkami dwusiarczkowymi, których redukcja prowadzi do denaturacji i agregacji wolnych łańcuchów B. Reakcja ta może być katalizowana przez białka o aktywności reduktazy dwusiarczkowej, prowadząc do zwiększenia stopnia agregacji insuliny. Poziom powstających agregatów może być oznaczony przez pomiar absorpcji światła o długości 650 nm spowodowanej rozproszeniem światła przez powstające w mieszaninie inkubacyjnej agregaty białkowe (Holmgren, 1979). W badaniach wstępnych wykazano, że do spontanicznej agregacji dochodzi po 25-30 minutach inkubacji insuliny w obecności DTT. Rozproszenie światła obserwowane w 30 minucie inkubacji uznano za 100%.

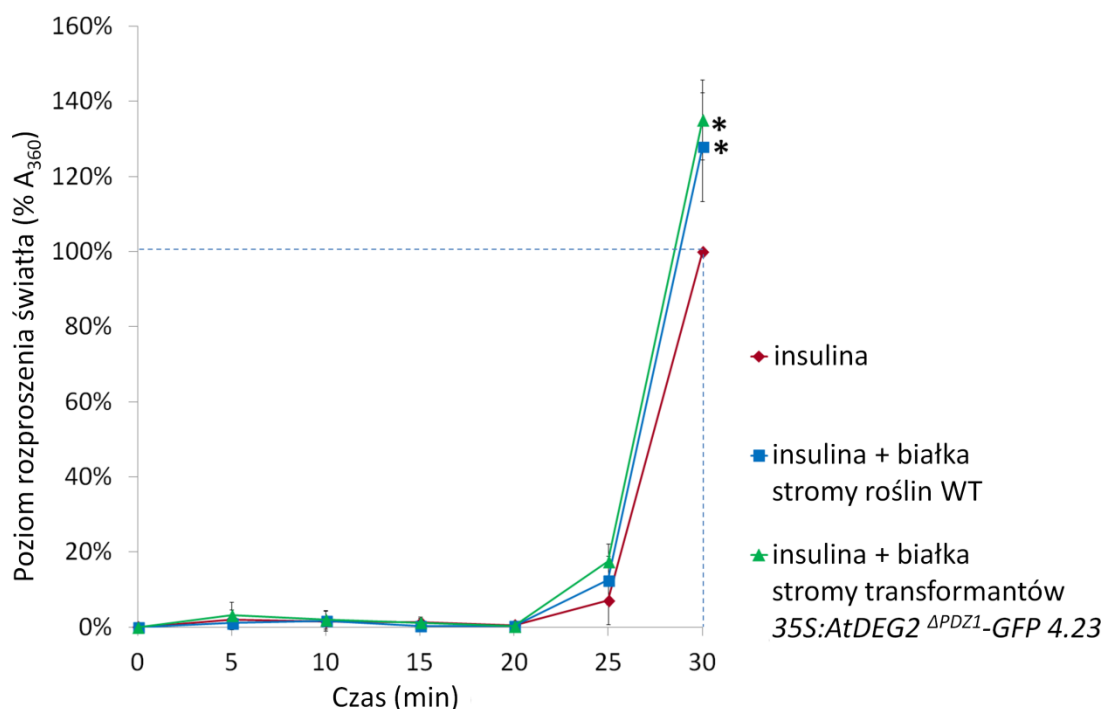
Do analizy aktywności reduktazy dwusiarczkowej wykorzystano stromę chloroplastową uzyskaną z liści roślin WT i transformantów *35S:AtDEG2^{ΔPDZ1}-GFP 4.23* (hodowanych w warunkach ekspozycji na światło o wysokim natężeniu w momencie otwarcia się pierwszego kwiatu), gdyż chloroplastowe białka o aktywności reduktazy dwusiarczkowej tj. tioredoksyny i glutaredoksyny są białkami zlokalizowanymi w stromie (Rouhier, 2010; Nikkanen i Rintamäki, 2014). Obecność białek o aktywności reduktazy dwusiarczkowej zgodnie z oczekiwaniem doprowadziła po 30 minutach do wzrostu rozproszenia światła przez mieszaninę inkubacyjną do poziomu wyższego niż obserwowany w obecności tylko insuliny i DTT. Poziom agregatów insuliny w mieszaninie zawierającej stromę roślin WT nie różnił się w sposób istotny statystycznie od poziomu agregatów w mieszaninie zawierającej stromę transformantów *35S:AtDEG2^{ΔPDZ1}-GFP 4.23*. Oznacza to, że zwiększony poziom homoagregatu podjednostek γ_1 syntazy ATP u transformantów *35S:AtDEG2^{ΔPDZ1}-GFP 4.23* nie jest efektem obniżonej aktywności reduktazy dwusiarczkowej.

A zatem wyniki opisane powyżej wskazują, że:

- wersja rekombinowana AtDeg2 Δ PDZ1 nie posiada aktywności holdazowej, ale jest aktywna proteolitycznie,
- w warunkach ekspozycji na światło o wysokim natężeniu w chloroplastach transformantów *35S:AtDEG2^{ΔPDZ1}-GFP 4.23*, zagregowane za pośrednictwem mostków dwusiarczkowych podjednostki γ_1 syntazy ATP

gromadzą się na trzykrotnie wyższym poziomie niż w chloroplastach roślin WT,

- efekt ten nie jest wynikiem niższej aktywności reduktazy dwusiarczkowej w chloroplastach transformantów *35S:AtDEG2^{ΔPDZ1}-GFP* 4.23, lecz najprawdopodobniej nieefektywnego hamowania powstawania agregatów wynikającego z posiadania AtDeg2 pozbawionego aktywności holdazy.



Rysunek 54. Aktywność reduktazy dwusiarczkowej w chloroplastach roślin WT oraz *35S:AtDEG2^{ΔPDZ1}-GFP* 4.23. Chloroplasty (wyzilnowowane z roślin WT i *35S:AtDEG2^{ΔPDZ1}-GFP* 4.23, które hodowano w warunkach ekspozycji na światło o wysokim natężeniu do momentu otwarcia się pierwszego kwiatu – podfaza 6.0) poddano lizie osmotycznej, a lizaty frakcjonowano. Aktywność reduktazy dwusiarczkowej analizowano, inkubując przez 0-30 min mieszaninę zawierającą insulinę wołową, DTT i stromę chloroplastową. Poziom powstających agregatów łańcuchów B insuliny rejestrowano, mierząc zmiany absorpcji światła mieszanin inkubacyjnych przy 650 nm, do jakich dochodzi na skutek rozproszenia światła przez powstające agregaty. Gwiazdki oznaczają istotność różnicy poziomu agregatów pomiędzy mieszaninami zawierającymi preparaty stromy, insuliny i DTT a mieszaniną zawierającą tylko insulinę i DTT ($p < 0,01$).

6.3 UTWORZENIE KATALOGU CECH FENOTYPOWYCH *A. THALIANA*, W KTÓRYCH REGULACJI KSZTAŁTOWANIA SIĘ UCZESTNICZY *AtDEG2 IN VIVO* POPRZECZ SWOJĄ AKTYWNOŚĆ OPIEKUŃCZĄ LUB OPIEKUŃCZĄ I PROTEOLITYCZNĄ JEDNOCZEŚNIE

W celu zbadania udziału aktywności opiekuńczej *AtDeg2* w kształtowaniu się cech fenotypowych roślin *A. thaliana* w warunkach bezstresowych wymagane było dysponowanie roślinami reprezentującymi cztery genotypy (patrz Rysunek 24, s. 57), które na podstawie wyników analizy aktywności opiekuńczej i proteolitycznej różnych wersji rekombinowanych *AtDeg2* (Tabela 9, s. 119) określono następująco:

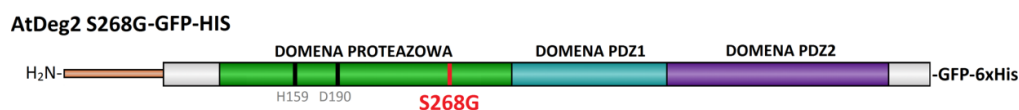
- 1) rośliny WT,
- 2) mutanty *deg2-3*,
- 3) *35S:AtDEG2^{S268G}-GFP* – transformanty posiadające białko *AtDeg2* S268G-GFP dysponujące samą tylko aktywnością opiekuńczą,
- 4) *35S:AtDEG2^{ΔPDZ1}-GFP* – transformanty posiadające białko *AtDeg2* ΔPDZ1-GFP dysponujące samą tylko aktywnością proteolityczną.

6.3.1 UZYSKANIE TRANSFORMANTÓW *35S:AtDEG2^{S268G}-GFP*

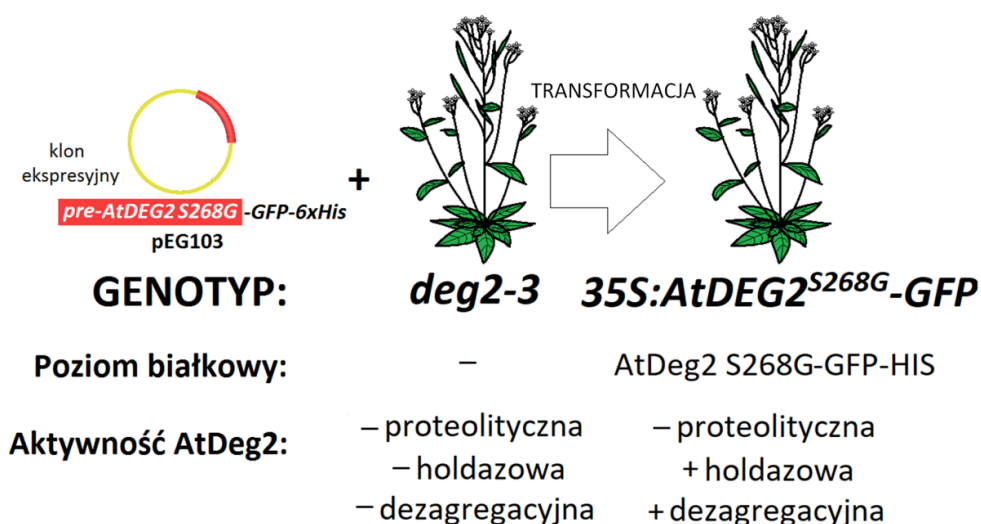
Transformanty *35S:AtDEG2^{S268G}-GFP* uzyskano przez wprowadzenie do mutantów *deg2-3* klonu ekspresyjnego, który pod kontrolą promotora CaMV 35S umożliwia ekspresję pre-*AtDeg2* S268G w fuzji ze znacznikiem histydynowym i fluorescencyjnym (Rysunek 55).

Do uzyskania klonu ekspresyjnego kodującego pre-*AtDeg2* S268G-GFP wykorzystano klon wejściowy *pre-AtDEG2* S268G pENTR uzyskany w ramach realizacji pierwszego zadania badawczego (Rysunek 33, s. 101). Wstawkę z klonu wejściowego wprowadzono do wektora docelowego jakim był pEG103 (Rysunek 29, s. 75) w obrębie T-DNA ulegającego integracji z genomem rośliny (Rysunek 56). Uzyskanie klonu ekspresyjnego zostało potwierdzone przez przeprowadzenie reakcji trawienia enzymem *HinfI* i rozdział elektroforetyczny produktów trawienia (Rysunek 57A). Jak już wspomniano, „pusty” wektor docelowy pEG103 od klonu ekspresyjnego różni się

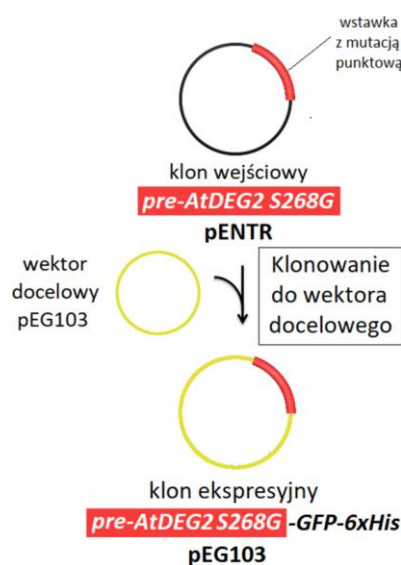
A



B

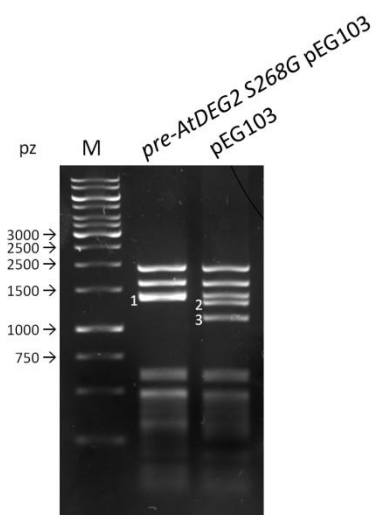


Rysunek 55. Rozkład domen w strukturze pierwszorzędowej pre-AtDeg2 S268G-GFP (A) oraz schemat postępowania prowadzącego do uzyskania transformanta *35S:AtDEG2^{S268G}-GFP* (B)

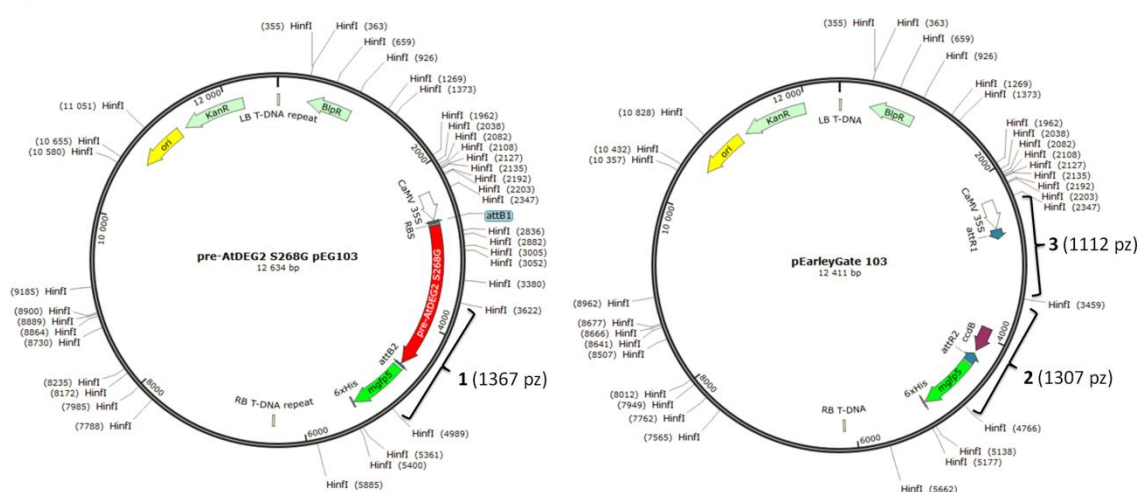


Rysunek 56. Schemat postępowania prowadzącego do uzyskania klonu ekspresyjnego kodującego pre-AtDeg2 S268G-GFP

A



B



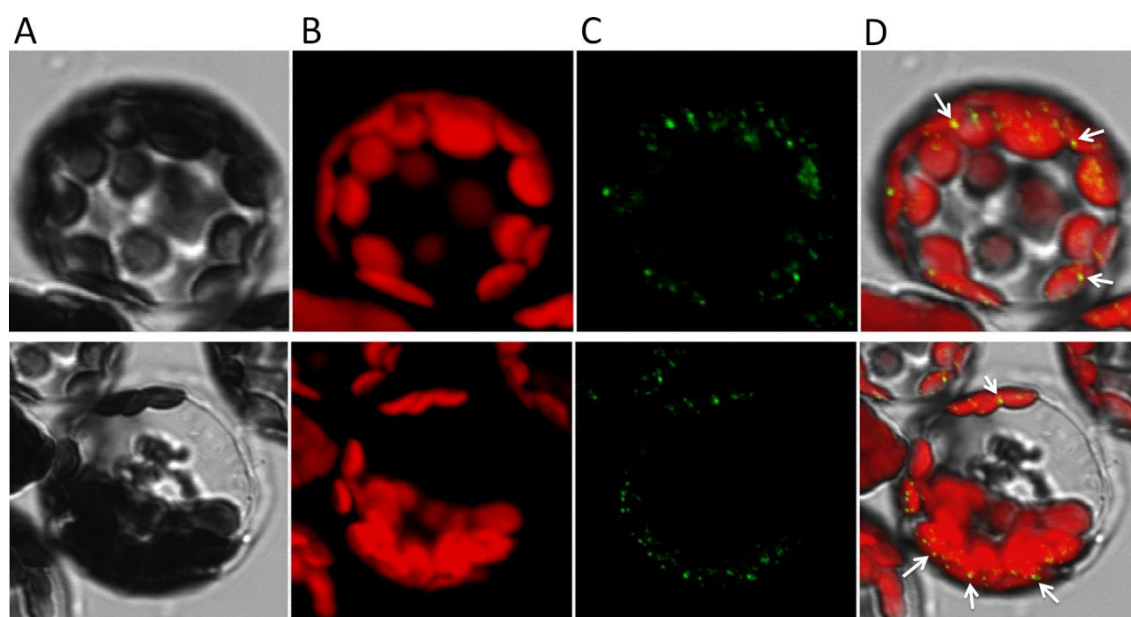
Rysunek 57. Analiza elektroforetyczna produktów trawienia enzymem *HinfI* klonu ekspresyjnego *pre-AtDEG2 S268G* pEG103 i wektora pEG103 ze wskazanymi fragmentami DNA unikatowymi dla każdego konstrukt (oznaczone numerami 1-3) (A) oraz prezentacja graficzna klonu ekspresyjnego *pre-AtDEG2 S268G* pEG103 oraz wektora pEG103 ze wskazanymi unikatowymi fragmentami DNA (oznaczone numerami 1-3) powstającymi w wyniku trawienia restrykcyjnego enzymem *HinfI* (B). M – markery masy cząsteczkowej; pz – pary zasad. CaMV 35S – promotor 35S RNA z wirusa mozaiki kalafiora; *attR1*, *attR2*, *attB1*, *attB2* – miejsca rekombinacji; *ccdB* – gen kodujący toksynę bakteryjną (usuwany z wektora podczas reakcji rekombinacji), która hamuje aktywność gyrazy (enzymu naprawczego DNA), uniemożliwiając wzrost bakterii zawierających „pusty” wektor (bez wstawki), czyli taki, który nie przeszedł pomyślnie reakcji rekombinacji; *mgfp5* – gen kodujący znacznik fluorescencyjny mGFP5; 6xHis – sekwencja kodująca znacznik histydynowy; RB T-DNA, LB T-DNA – odpowiednio prawa i lewa granica T-DNA; *ori* – miejsce inicjacji replikacji; KanR – gen oporności na kanamycynę; BpR – gen oporności na glufosynat amonu; RBS – miejsce wiązania rybosomu; *HinfI* – miejsca restrykcyjne dla enzymu *HinfI*. Rysunek wykonano z wykorzystaniem programu SnapGene®.

miejscami cięcia rozpoznawanymi przez enzym *HinfI* pomiędzy miejscami rekombinacji, dając po reakcji trawienia tym enzymem dwa unikatowe fragmenty DNA o wielkości 1112 pz i 1307 pz (wśród fragmentów DNA o wielkości powyżej 500 pz). Unikatowym fragmentem DNA po reakcji trawienia enzymem *HinfI* klonu ekspresyjnego *pre-AtDEG2 S268G* pEG103 jest fragment o wielkości 1367 pz (wśród fragmentów DNA o wielkości powyżej 500 pz) (Rysunek 57). Prawidłowość sekwencji klonu ekspresyjnego potwierdzono poprzez sekwencjonowanie.

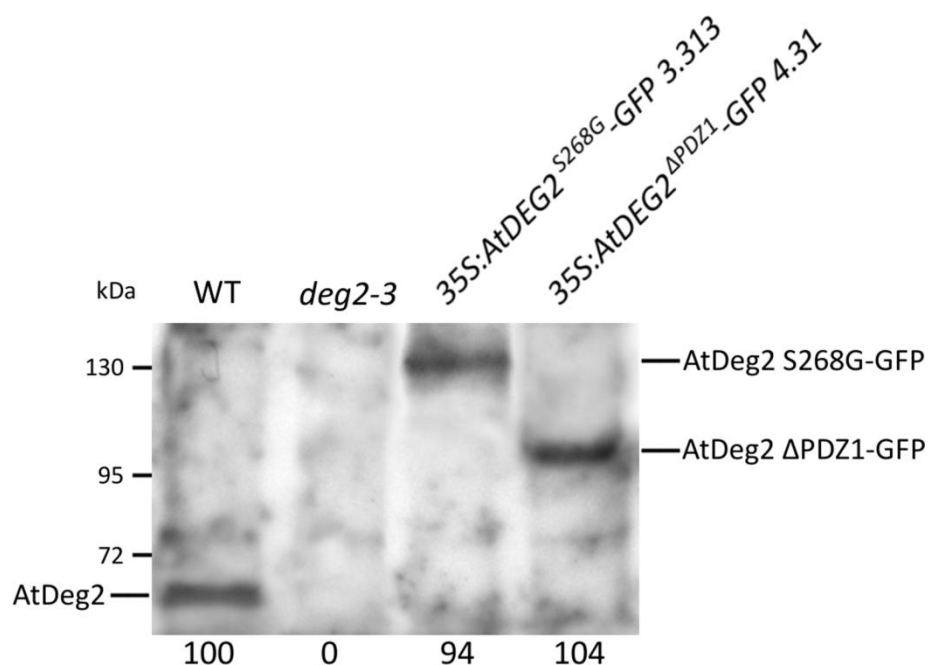
Przed transformacją roślin *A. thaliana* klonem ekspresyjnym *pre-AtDEG2 S268G* pEG103 sprawdzono, czy klon ten ulega ekspresji w komórkach roślinnych, a jego produkt jest kierowany do chloroplastów. W tym celu klon ekspresyjny wprowadzono do protoplastów komórek miękiszowych liści mutantów *deg2-3* drogą transfekcji, które następnie obserwowano pod mikroskopem konfokalnym. Na podstawie obrazów z mikroskopu konfokalnego (Rysunek 58) potwierdzono, że klon ekspresyjny ulega ekspresji w protoplastach i że produkt ekspresji kierowany jest do chloroplastów, na co wskazuje obecność żółtych plamek będąca efektem nałożenia się zielonej fluorescencji GFP i czerwonej autofluorescencji chloroplastów (Rysunek 58D).

Klon ekspresyjny *pre-AtDEG2 S268G* pEG103 wprowadzono do bakterii *Agrobacterium*, które następnie wykorzystano do transformacji mutantów *deg2-3* metodą agroinfiltracji (Rysunek 31, s. 81). Poprzez selekcje siewek transformantów z pokolenia T_0 , a następnie T_1 na pożywce z herbicydem wyprowadzono linie homozygotyczne transformantów (pokolenie T_2).

Uzyskane linie homozygotyczne transformantów *35S:AtDEG2^{S268G1}-GFP* oraz linie homozygotyczne transformantów *35S:AtDEG2^{APDZ1}-GFP* hodowano w warunkach ekspozycji na światło o umiarkowanym natężeniu (Tabela 2, s. 59) do momentu otwarcia się pierwszego kwiatu (podfaza 6.0), po czym izolowano chloroplasty, które następnie poddano lizie i analizie immunoblot z użyciem przeciwciała anty-Deg2. Wynikiem tej analizy był wybór linii *35S:AtDEG2^{S268G}-GFP* 3.313 i *35S:AtDEG2^{APDZ1}-GFP* 4.31, u których poziom białka fuzyjnego był najbardziej zbliżony do ilości białka AtDeg2 u rośliny WT (Rysunek 59).



Rysunek 58. Detekcja sygnału fluorescencji białka GFP w protoplastach mezofilu liścia *deg2-3 A. thaliana* transfekowanych klonem ekspresyjnym kodującym pre-AtDeg2 S268G-GFP. Obrazy z: mikroskopu świetlnego (A), autofluorescencji chloroplofilu (B) i fluorescencji białka GFP (C) oraz efekt nałożenia na siebie obrazów mikroskopu świetlnego, autofluorescencji chlorofilu i fluorescencji białka GFP (D). Strzałkami wskazano plamki w kolorze żółtym, który jest efektem nałożenia się zielonej fluorescencji GFP i czerwonej autofluorescencji chlorofilu.



Rysunek 59. Określenie poziomu białka AtDeg2, AtDeg2 S268G-GFP oraz AtDeg2 Δ PDZ1-GFP u roślin WT, mutantów *deg2-3* oraz u transformantów *35S:AtDEG2^{S268G}-GFP 3.313* i *35S:AtDEG2 Δ PDZ1-GFP 4.31*. Chloroplasty wyizolowane z liści roślin, które hodowano w warunkach ekspozycji na światło o umiarkowanym

natężeniu do momentu otwarcia się pierwszego kwiatu (podfaza 6.0), poddano lizie osmotycznej, a próbki lizatów rozdzielono za pomocą SDS-PAGE, przenoszono na błonę PVDF i wykonano immunodetekcję za pomocą techniki immunoblot z użyciem przeciwciał anti-Deg2. Ilość preparatów lizatów wprowadzonych do kieszonek normalizowano w oparciu o taką samą ilość białka. „Immunobloty” analizowano densytometrycznie, a intensywność indywidualnych sygnałów określono względem sygnału zidentyfikowanego dla lizatu chloroplastów roślin WT (100%). kDa – kilodaltony.

6.3.2 PORÓWNAWCZA ANALIZA FENOTYPOWA ROŚLIN *A. THALIANA*

W celu zbadania roli aktywności opiekuńczej AtDeg2 w regulacji przebiegu faz i podfaz ontogenezy oraz kształtowania się wybranych cech fenotypowych rośliny *A. thaliana* wszystkie cztery genotypy roślin hodowano w warunkach kontaktu ze światłem o umiarkowanym natężeniu (Tabela 2, s. 59) i poddano analizie fenotypowej. W pierwszym etapie wykonano analizę obejmującą rośliny WT i mutanty *deg2-3*, której celem było stworzenie katalogu cech fenotypowych, w regulacji kształtowania się których uczestniczy AtDeg2. W celu ustalenia indywidualnej roli aktywności opiekuńczej i proteolitycznej AtDeg2 w kształtowaniu się cech fenotypowych zidentyfikowanych w pierwszym etapie, do analiz fenotypowych włączono transformanty *35S:AtDEG2^{S268G}-GFP 3.313* i *35S:AtDEG2^{ΔPDZ1}-GFP 4.31* (drugi etap). W ten sposób w ramach katalogu cech fenotypowych regulowanych przez AtDeg2 wyróżniono:

- 1) cechy fenotypowe, w których regulacji kształtowania się uczestniczy AtDeg2 przez swoją aktywność opiekuńczą,
- 2) cechy fenotypowe, w których regulacji kształtowania się uczestniczy AtDeg2 przez swoją aktywność proteolityczną,
- 3) cechy fenotypowe, w których regulacji kształtowania się uczestniczy AtDeg2 przez swoją aktywność opiekuńczą i proteolityczną.

6.3.2.1 ANALIZA PORÓWNAWCZA CHRONOLOGII PRZEBIEGU FAZ I PODFAZ ONTOGENEZY *A. THALIANA*

Do określenia roli, jaką AtDeg2 odgrywa w regulacji przebiegu faz i podfaz ontogenezy, przeanalizowano chronologię przebiegu poszczególnych faz i podfaz

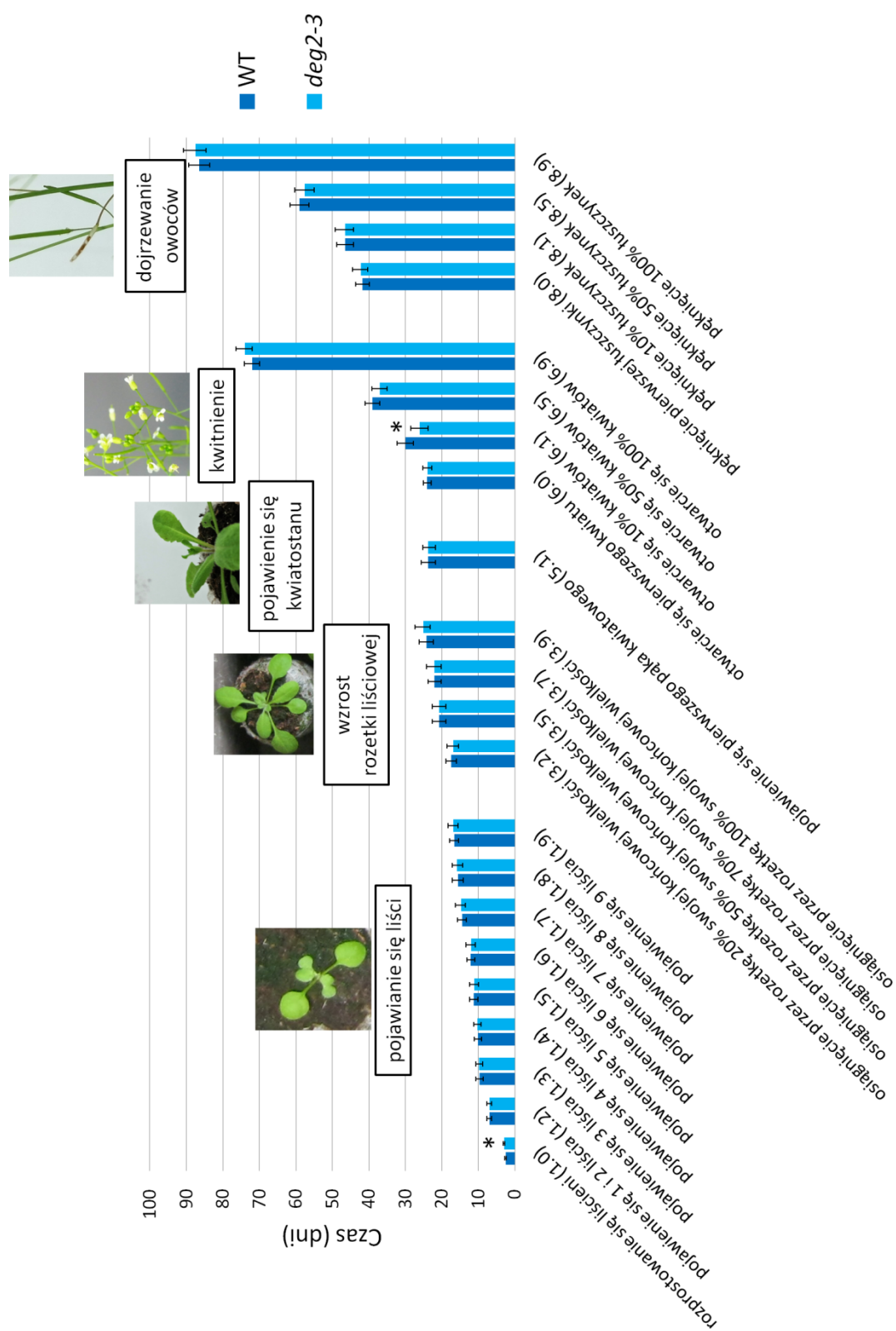
ontogenezy roślin WT i mutantów *deg2-3* od momentu rozprostowania się liścieni aż do otwarcia się wszystkich łuszczynek. Istotne statystycznie różnice zaobserwowano jedynie w odniesieniu do czasu niezbędnego do osiągnięcia podfazy 1.0 i 6.1, a mianowicie brak AtDeg2 powodował opóźnienie wejścia w podfazę 1.0 z 2,5 do 3 dni oraz przyspieszenie wejścia w podfazę 6.1 z 30 dni do 26 dni (Rysunek 60).

Analiza podfazy 1.0 z uwzględnieniem transformantów wykazała, że czas wymagany do rozprostowania się liścieni u obu transformantów był – podobnie jak u mutantów *deg2-3* – dłuższy w porównaniu z roślinami WT (Rysunek 61). Brak różnic istotnych statystycznie pomiędzy mutantami *deg2-3* i transformantami oraz pomiędzy transformantami dowodzi, że ani sama aktywność opiekuńcza (u *35S:AtDEG2^{S268G}-GFP 3.313*) ani sama aktywność proteolityczna AtDeg2 (u *35S:AtDEG2^{APDZ1}-GFP 4.31*) nie była wystarczająca do rozprostowania się liścieni w odpowiednim czasie, wskazując na udział obu aktywności AtDeg2 w regulacji kształtowania się tej cechy.

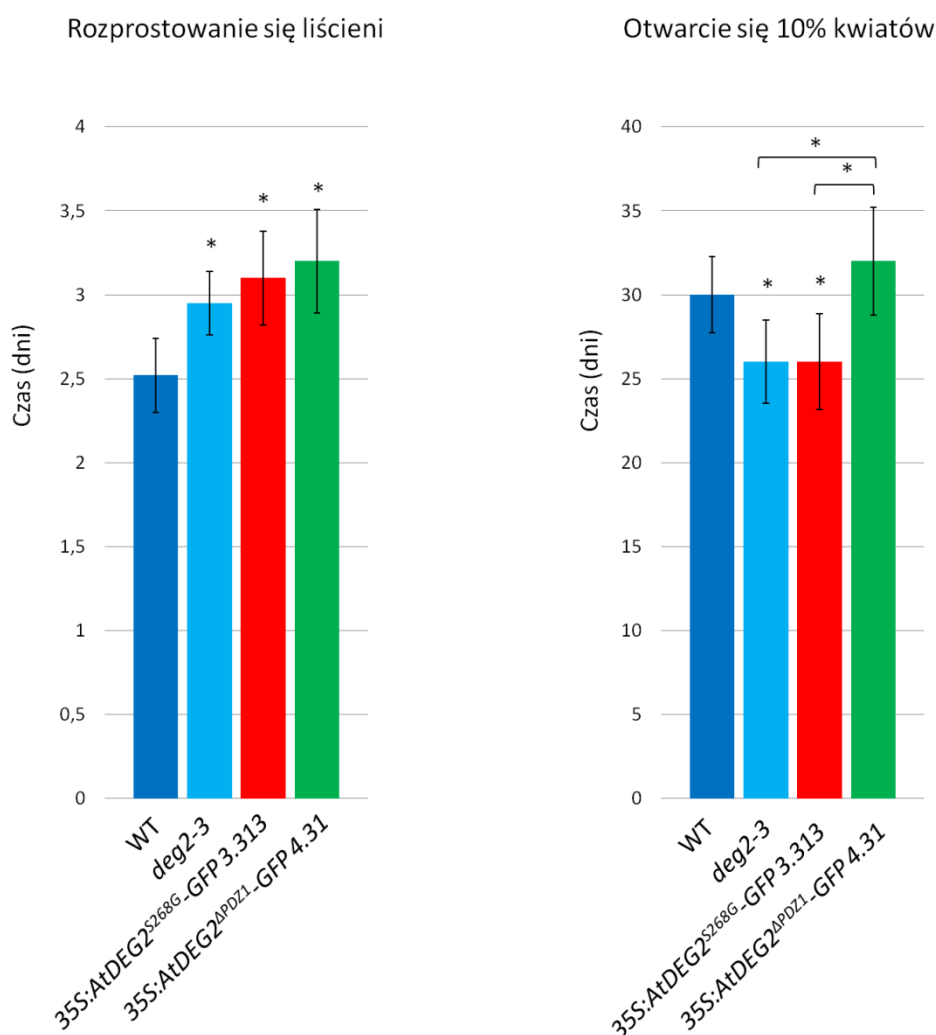
Transformanty *35S:AtDEG2^{S268G}-GFP 3.313* nie różniły się pod względem momentu osiągnięcia podfazy 6.1 od mutantów *deg2-3*, a transformaty *35S:AtDEG2^{APDZ1}-GFP 4.31* od roślin WT (Rysunek 61). Wyniki te wskazują, że sama aktywność proteolityczna AtDeg2 (obecna u transformantów *35S:AtDEG2^{APDZ1}-GFP 4.31*) jest wystarczająca do osiągnięcia przez roślinę podfazy 6.1 w odpowiednim czasie.

6.3.2.2 ANALIZA PORÓWNAWCZA CECH ORGANÓW GENERATYWNYCH ROŚLIN, KTÓRE ZAKOŃCZYŁY PODFAZĘ 8.9

Jako że AtDeg2 pełni – przynajmniej przejściowo – rolę w rozwoju generatywnym rośliny (podfaza 6.1), zbadano też, czy AtDeg2 jest zaangażowany w rozwój cech morfologicznych roślin, u których rozwój generatywny dobiegł końca (podfaza 8.9). Podczas analizy uwzględniono takie parametry jak wysokość rośliny, liczbę nasion przypadających na roślinę oraz liczbę węzłów na pędzie kwiatostanowym i jego rozgałęzieniach. Ponadto wykonano pomiary długości i szerokości wyprodukowanych nasion.



Rysunek 60. Analiza chronologii przebiegu faz 1, 3, 5, 6 i 8 (i ich podfaz) ontogenezy roślin WT i mutantów *deg2-3*. Wartości są średnimi $\pm$ SD uzyskanymi po przeanalizowaniu 40 roślin dla każdego genotypu, reprezentujących dwa doświadczenia biologiczne. Gwiazdki oznaczają istotność statystyczną różnic *deg2-3*/WT ($p < 0,05$).

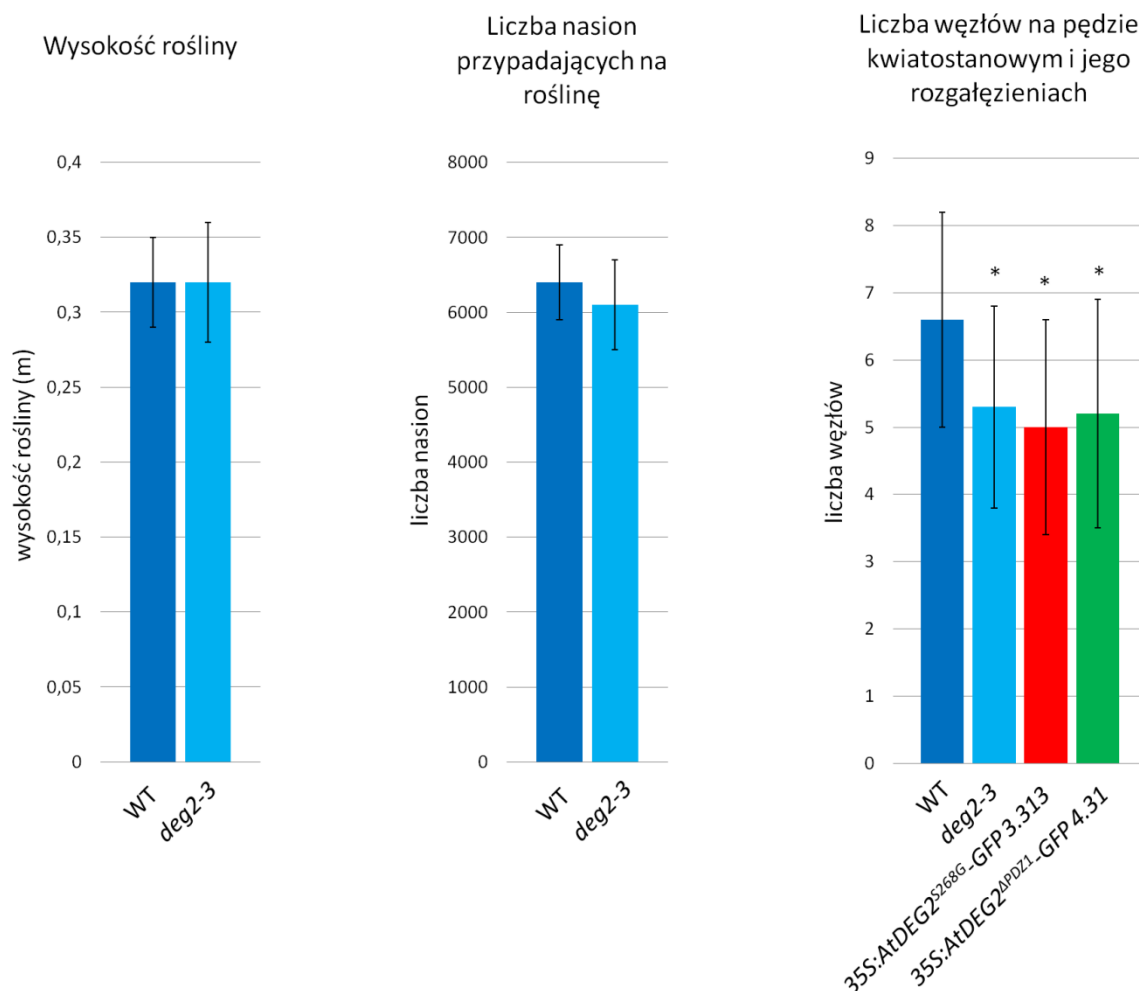


Rysunek 61. Analiza chronologii przebiegu podfazy 1.0 (rozprostowanie się liścieni) i podfazy 6.1 (otwarcie się 10% kwiatów) ontogenezy roślin WT i mutantów *deg2-3* oraz transformantów *35S:AtDEG2^{S268G}-GFP 3.313* i *35S:AtDEG2^{APDZ1}-GFP 4.31*. Wartości są średnimi $\pm$ SD uzyskanymi po przeanalizowaniu 40 roślin dla każdego genotypu, reprezentujących dwa doświadczenia biologiczne. Gwiazdki oznaczają istotność statystyczną różnic *deg2-3*/WT, *35S:AtDEG2^{S268G}-GFP 3.313* / WT oraz *35S:AtDEG2^{APDZ1}-GFP 4.31* / WT ($p < 0,05$). Klamry + gwiazdki oznaczają istotność statystyczną różnic *deg2-3* / *35S:AtDEG2^{APDZ1}-GFP 4.31* oraz *35S:AtDEG2^{S268G}-GFP 3.313* / *35S:AtDEG2^{APDZ1}-GFP 4.31* ($p < 0,05$).

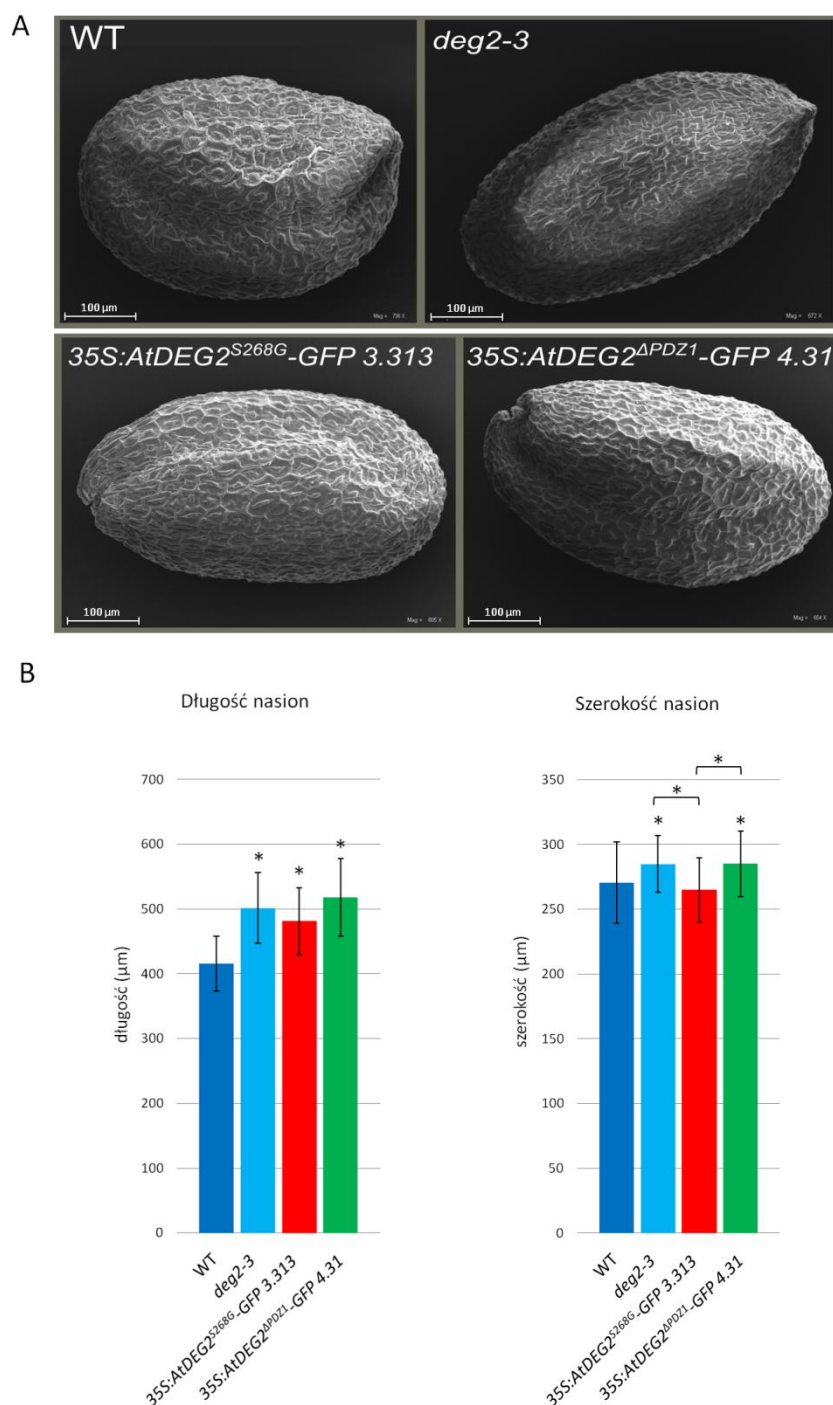
Wyniki tych analiz dowiodły, że AtDeg2 uczestniczy w regulacji rozgałęziania się pędu kwiatostanowego oraz długości i szerokości nasion, ponieważ brak białka AtDeg2 (mutanty *deg2-3*) prowadził do obniżenia liczby węzłów na pędzie kwiatostanowym i jego rozgałęzieniach z 6,5 do 5, a także do wyprodukowania większych nasion (tzn. szerszych i dłuższych) (Rysunek 62 i Rysunek 63). Obniżoną liczbę węzłów zaobserwowano także u obu transformantów, które pod tym względem nie różniły się od mutantów *deg2-3*. Oznacza to, że obie aktywności AtDeg2 są niezbędne do właściwego rozgałęziania się pędu kwiatostanowego. Brak różnic pomiędzy transformantami i mutantami *deg2-3* zaobserwowano również w odniesieniu do długości nasion, co wskazuje na udział obu aktywności AtDeg2 w uzyskaniu przez nasiona właściwej długości. Wyniki analizy szerokości nasion dowiodły natomiast, że sama aktywność opiekuńcza AtDeg2 u transformantów *35S:AtDEG2^{S268G}-GFP 3.313* jest wystarczająca do tego, aby nasiona uzyskały właściwą szerokość – czyli taką, jaką zaobserwowano u roślin WT.

6.3.2.3 ANALIZA PORÓWNAWCZA MORFOLOGII LIŚCI

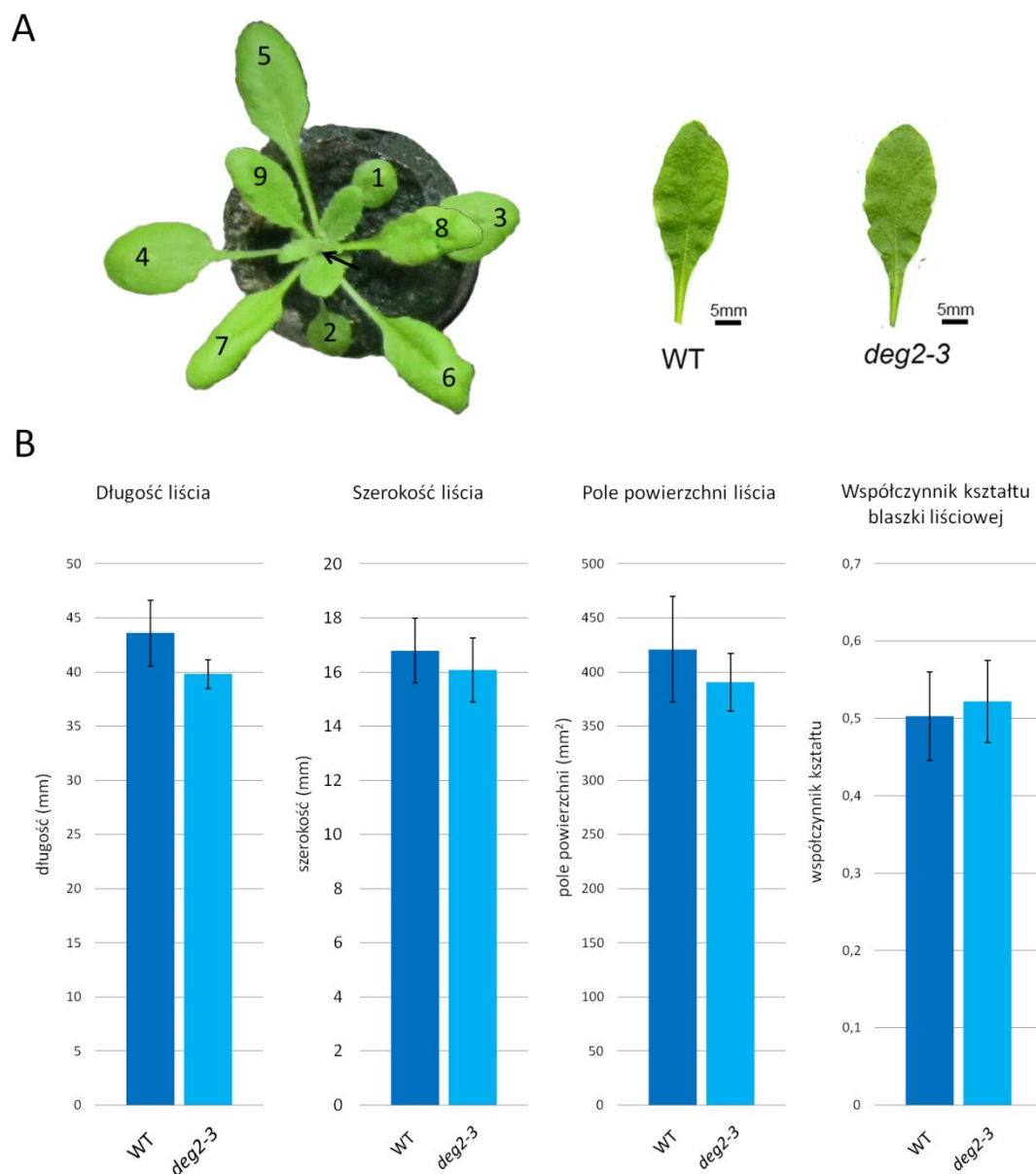
Wcześniejsze doniesienia wskazują, że AtDeg2 u 4-tygodniowych roślin uczestniczy w regulacji powierzchni rosnących liści młodocianych (liście 3 i 4), ale nie ma wpływu na powierzchnię rosnących liści dojrzałych (liście 7 i 8) (Luciński i wsp., 2011). Chcąc określić udział AtDeg2 w regulacji cech morfologicznych dojrzałych liści, w niniejszej pracy poddano analizie liść ósmy w momencie, w którym osiągnął on swoją końcową długość. Ustalono, że następuje to u roślin WT w 30 dniu, a u mutantów *deg2-3* w 29 dniu, a więc blisko momentu, w którym rośliny tych genotypów osiągają podfazę 6.1. Z kolei nie zidentyfikowano różnic istotnych statystycznie pomiędzy roślinami WT i mutantami *deg2-3* w odniesieniu do żadnego z badanych parametrów (Rysunek 64), co oznacza, że AtDeg2 nie jest zaangażowany w regulację cech morfologicznych dojrzałych liści w momencie osiągnięcia przez nie swoich końcowych rozmiarów.



Rysunek 62. Analiza cech organów generatywnych roślin, które osiągnęły podfazę 8.9. Analiza wysokości roślin oraz liczby nasion roślin WT i *deg2-3*, które osiągnęły podfazę 8.9 oraz liczby węzłów na pędzie kwiatostanowym i jego rozgałęzieniach u roślin WT, *deg2-3*, *35S:AtDEG2^{S268G}-GFP 3.313* i *35S:AtDEG2^{ΔPDZ1}-GFP 4.31*, które osiągnęły podfazę 8.9. Wartości są średnimi $\pm$ SD uzyskanymi po przeanalizowaniu 40 roślin dla każdego genotypu, reprezentujących dwa doświadczenia biologiczne. Gwiazdki oznaczają istotność statystyczną różnic *deg2-3*/WT, *35S:AtDEG2^{S268G}-GFP 3.313* / WT oraz *35S:AtDEG2^{ΔPDZ1}-GFP 4.31* / WT ($p < 0,05$).



Rysunek 63. Analiza budowy nasion roślin WT, *deg2-3*, *35S:AtDEG2^{S268G}-GFP 3.313* i *35S:AtDEG2^{APDZ1}-GFP 4.31* w momencie, w którym osiągnęły podfazę 8.9. Zdjęcia wykonano za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (**A**) i analizowano z użyciem programu do cyfrowej obróbki obrazów (**B**). Wartości są średnimi $\pm$ SD uzyskanymi po przeanalizowaniu 300 nasion roślin każdego genotypu, reprezentujących dwa doświadczenia biologiczne. Gwiazdki oznaczają istotność statystyczną różnic *deg2-3*/WT, *35S:AtDEG2^{S268G}-GFP 3.313* / WT oraz *35S:AtDEG2^{APDZ1}-GFP 4.31* / WT ($p < 0,05$). Klamry + gwiazdki oznaczają istotność statystyczną różnic *deg2-3* / *35S:AtDEG2^{S268G}-GFP 3.313* oraz *35S:AtDEG2^{S268G}-GFP 3.313* / *35S:AtDEG2^{APDZ1}-GFP 4.31* ($p < 0,05$).



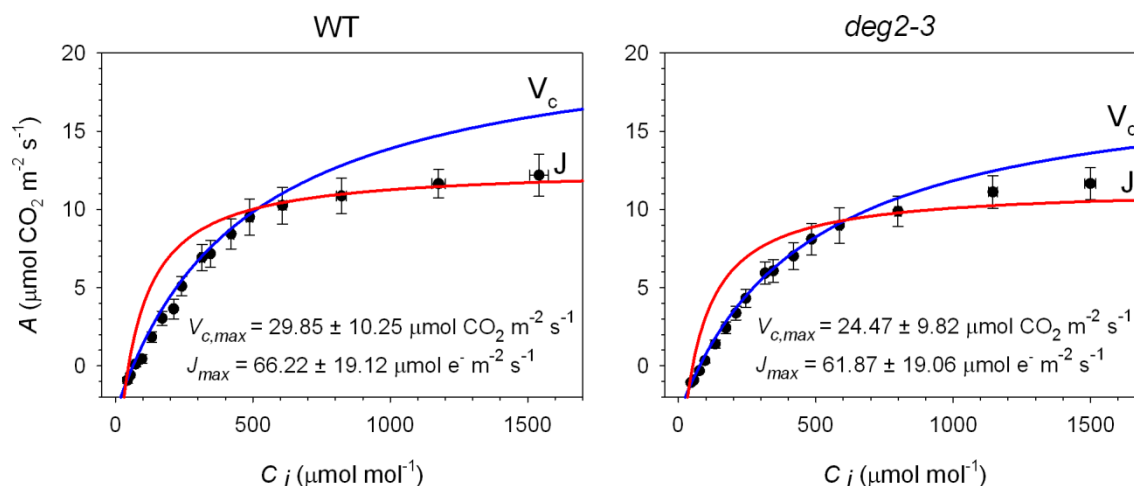
Rysunek 64. Analiza morfologii ósmego liścia roślin WT i mutantów *deg2-3* w momencie, w którym osiągnął on swoją końcową długość. Liście nr 8 odcinano, skanowano (**A**) i analizowano z użyciem programu do cyfrowej obróbki obrazów (**B**). Wartości są średnimi $\pm$ SD uzyskanymi po przeanalizowaniu 40 liści roślin każdego genotypu, reprezentujących dwa doświadczenia biologiczne ($p < 0,05$).

6.3.2.4 ANALIZA AKTYWNOŚCI FOTOSYNTETYCZNEJ LIŚCI

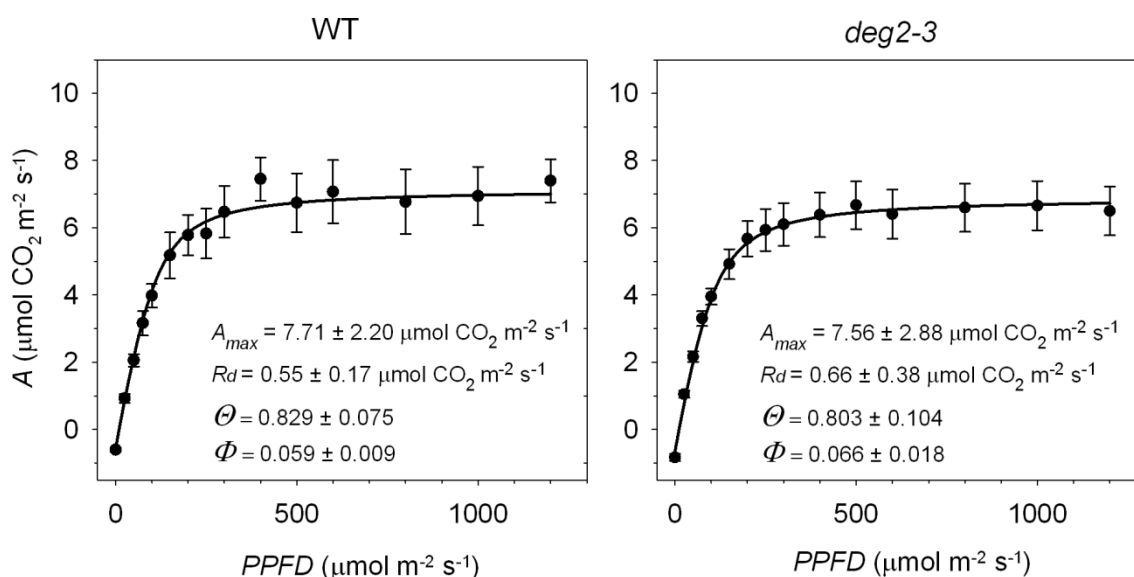
Niektóre dane literaturowe wskazują, że proteazy chloroplastowe, w tym te należące do grupy Deg, wpływają na wydajność aparatu fotosyntetycznego liścia (Sjögren i wsp., 2006, Luciński i wsp., 2011, Kim i wsp., 2013). Aby sprawdzić, jaką rolę odgrywa aktywność opiekuńcza AtDeg2 w aktywności fotosyntetycznej rośliny, sporządzono krzywe odpowiedzi A/C_i przy wysycającym natężeniu światła dla liścia ósmego w momencie, w którym osiągnął on swoją końcową długość. Analizy te pozwoliły oszacować maksymalne tempo karboksylacji limitowanej przez ilość, kinetykę i aktywność Rubisco ($V_{c,max}$) i maksymalne tempo karboksylacji limitowanej przez transport elektronów wykorzystywany do regeneracji RuBP (J_{max}). Nie zaobserwowano jednak istotnych różnic między liśćmi nr 8 roślin WT i *deg2-3* w wartościach $V_{c,max}$ ani J_{max} (Rysunek 65).

Sprawdzono także czy rośliny WT i *deg2-3* różnią się wartościami parametrów opisujących intensywność fotosyntezy, które oszacowano przez sporządzenie krzywych świetlnych dla liścia ósmego w momencie, w którym osiągnął on swoją końcową długość. Na podstawie danych pozyskanych z krzywej świetlnej obliczono wartości maksymalnej intensywności fotosyntezy (A_{max}), wypukłości krzywej świetlnej (Θ), kwantowej wydajności fotosyntetycznego wiązania CO_2 (Φ) oraz intensywności oddychania ciemnościowego (R_d), i nie zaobserwowano istotnych różnic między liśćmi nr 8 roślin WT i *deg2-3* (Rysunek 66).

A zatem wyniki opisane powyżej wskazują, że AtDeg2 przez aktywność opiekuńczą i proteolityczną jednocześnie uczestniczy w regulacji momentu rozprostowania się liścieni, liczby węzłów na pędzie kwiatostanowym i jego rozgałęzieniach oraz w regulacji długości nasion; przez swoją aktywność proteolityczną uczestniczy w regulacji momentu otwarcia się 10% kwiatów, a przez swoją aktywność opiekuńczą bierze udział w regulacji szerokości nasion (Tabela 11). Rośliny WT i *deg2-3* nie różnią się pod względem innych badanych cech, co wskazuje, że AtDeg2 nie uczestniczy ani w regulacji chronologii przebiegu większości faz (i ich podfaz) ontogenezy *A. thaliana*, ani w regulacji wielkości rośliny czy liczby nasion przypadających na roślinę, ani też w regulacji morfologii i aktywności fotosyntetycznej ósmego liścia w momencie osiągnięcia przez niego swoich końcowych rozmiarów.



Rysunek 65. Krzywe zależności intensywności fotosyntezy od stężenia CO_2 wewnątrz ósmego liścia roślin WT ($N = 6$) i *deg2-3* ($N = 12$) w momencie, gdy liść osiągnął swoją końcową długość. Punkty stanowią wartości średnie ($\pm SE$) i zostały wyznaczone eksperymentalnie, a krzywe są wynikiem dopasowania modelu dwufazowego opisującego krzywą A/C_i (Farquhar i wsp., 1980) do wyznaczonych eksperymentalnie wartości A jako funkcji C_i . Wartości A uzyskane dla $C_i < 400 \mu\text{mol mol}^{-1}$ określają intensywność fotosyntezy limitowaną właściwościami Rubisco (niebieska krzywa oznaczona jako „ V_c ”), natomiast wartości A uzyskane dla $C_i > 400 \mu\text{mol mol}^{-1}$ określają intensywność fotosyntezy ograniczoną szybkością regeneracji RuBP (czerwona krzywa oznaczona jako „ J ”). Estymowane parametry ($\pm SD$) krzywej A/C_i , tj. maksymalna intensywność karboksylacji RuBP limitowana przez właściwości Rubisco ($V_{c,\max}$) oraz maksymalna szybkość transportu elektronów wykorzystywana do regeneracji RuBP ($J_{\max}$) zostały przedstawione w odpowiednich panelach.



Rysunek 66. Krzywe zależności intensywności fotosyntezy (A) od natężenia światła ($PPFD$) ósmego liścia roślin WT ($N = 7$) i *deg2-3* ($N = 11$) w momencie, gdy liść osiągnął swoją końcową długość. Punkty stanowią wartości średnie ($\pm SE$) i zostały wyznaczone eksperymentalnie, a krzywe są wynikiem dopasowania nieprostokątnej

funkcji hiperbolicznej opisującej krzywą świetlną fotosyntezy (Lobo i wsp., 2013) do wyznaczonych eksperymentalnie wartości A jako funkcji natężenia światła. Estymowane parametry ($\pm SD$) krzywej świetlnej, tj. maksymalna intensywność fotosyntezy (A_{max}), intensywność oddychania ciemnościowego (R_d), wypukłość krzywej świetlnej (Θ) i kwantowa wydajność fotosyntetycznego wiązania CO_2 (Φ) zostały przedstawione w odpowiednich panelach.

Tabela 11. Cechy fenotypowe, w których regulacji kształtowania się uczestniczy AtDeg2 poprzez swoją aktywność opiekuńczą (holdazową i dezagregacyjną) lub proteolityczną.

CECHY FENOTYPOWE, W KTÓRYCH REGULACJI KSZTAŁTOWANIA SIĘ UCZESTNICZY AtDeg2	UDZIAŁ AKTYWNOŚCI OPIEKUŃCZEJ W REGULACJI KSZTAŁTOWANIA SIĘ CECHY	UDZIAŁ AKTYWNOŚCI PROTEOLITYCZNEJ W REGULACJI KSZTAŁTOWANIA SIĘ CECHY
Rozprostowanie się liścieni (podfaza 1.0)	+	+
Otwarcie się 10% kwiatów (podfaza 6.1)	–	+
Liczba węzłów na pędzie kwiatostanowym i jego rozgałęzieniach	+	+
Długość nasion	+	+
Szerokość nasion	+	–

7 DYSKUSJA

Celem strategicznym niniejszej rozprawy doktorskiej było znaczne rozszerzenie wiedzy na temat aktywności opiekuńczej chloroplastowej proteazy AtDeg2. Aby zrealizować ten cel w pierwszej kolejności analizowano, która domena w strukturze pierwszorzędowej AtDeg2 odpowiedzialna jest za wykształcenie się aktywności opiekuńczej (holdazowej) *in vitro*. Następnie poszukiwano substratów dla tej aktywności w warunkach ekspozycji na światło o wysokim natężeniu, a w ostatnim etapie prac badano udział AtDeg2 w regulacji kształtowania się cech fenotypowych *A. thaliana* poprzez aktywność opiekuńczą lub opiekuńczą i proteolityczną jednocześnie. Zatem wyniki uzyskane w ramach niniejszej pracy doktorskiej nie tylko rozszerzają wiedzę na temat proteazy AtDeg2 jako białka opiekuńczego *in vitro*, ale też po raz pierwszy dostarczają danych na temat udziału aktywności opiekuńczej AtDeg2 *in vivo*.

W pierwszej serii eksperymentów potwierdzono – zgodnie z wynikami zawartymi w publikacji Sun i wsp. (2012) – że rekombinowany AtDeg2 wykazuje aktywność holdazy ujawniającą się zdolnością do hamowania indukowanej przez DTT agregacji białek (lizozymu) *in vitro* (Rysunek 43, s. 114). Agregacja w obecności rekombinowanego AtDeg2 nie została całkowicie zahamowana, jak to obserwowano w przypadku poprzedniego doniesienia (Sun i wsp., 2012), lecz nieznacznie wzrastała w ciągu 220 min inkubacji do poziomu 10-28% wartości charakterystycznej dla inkubacji samego zdenaturowanego lizozymu. Możliwą przyczyną takiej sytuacji jest różnica między proporcjami AtDeg2:lizozym; w doświadczeniach Suna i wsp. (2012) ta proporcja wyniosła 1:1, podczas gdy w naszych doświadczeniach wynosiła 1:6,7 (w przypadku wyższej dawki AtDeg2) lub 1:13,3 (w przypadku niższej dawki AtDeg2). Określona wydajność nadekspresji i oczyszczania rekombinowanego AtDeg2 spowodowała, że nie używaliśmy w doświadczeniach nad jego aktywnością holdazową równie wysokich dawek jak te, które opisali Sun i wsp. (2012). Poza potwierdzeniem, że AtDeg2 jest *in vitro* holdazą, w niniejszej pracy po raz pierwszy pokazano, że AtDeg2 dysponuje także aktywnością opiekuńczą dezagregazy wyrażającą się zdolnością do dezagregacji *in vitro* agregatów zdenaturowanego lizozymu (Rysunek 44, s. 115). To odkrycie rzuca zupełnie nowe światło na funkcjonowanie AtDeg2, ponieważ jak dotąd

tylko dla jednego białka chloroplastowego działającego niezależnie od ATP, mianowicie białka pomocniczego cpSRP43, udowodniono, że dysponuje aktywnością dezagregazy *in vitro*. Białko pomocnicze cpSRP43 wiąże się do motywu L18 zdenaturowanych i zagregowanych cząsteczek LHCP II i niezależnie od ATP, oraz bez udziału innych białek (również bez udziału cpSRP54, z którym tworzy heterokompleks *in vivo*) wykazuje zdolność do dezagregacji zdenaturowanego LHCP II *in vitro* (Jaru-Ampornpan i wsp., 2010). Jak wykazano w niniejszej rozprawie doktorskiej, działająca niezależnie od ATP chloroplastowa proteaza AtDeg2 (również bez udziału innych białek) wykazuje taką samą zdolność, ale w stosunku do zagregowanego lizozymu. Wyniki doświadczeń Jaru-Ampornpan i wsp. (2010, 2013) sugerują, że cpSRP43 doprowadza do dezagregacji LHCP II według tzw. modelu aktywnego, tzn. że cpSRP43 aktywnie remodeluje agregaty LHCP II, uwalniając z nich indywidualne cząsteczki LHCP II i przekształcając je w rozpuszczalne kompleksy LHCP II/cpSRP43 (Rysunek 22, s. 51). Energia potrzebna do rozbicia agregatów LHCP II pochodzi z energii wiązania indywidualnych cząsteczek cpSRP43 z LHCP II, które jest na tyle specyficzne i rozległe, że prowadzi do zmian w strukturze agregatu LHCP II. Alternatywny model dezagregacji LHCP II z udziałem cpSRP43 (tzw. model pasywny) Jaru-Ampornpan i wsp. uważają za bardzo mało prawdopodobny. W myśl tego modelu pojedyncze cząsteczki LHCP II, które spontanicznie oddysocjowały od agregatu, mogą zostać związane przez cpSRP43 w formie rozpuszczalnych kompleksów, a to zapobiega ponownemu włączaniu się LHCP II do agregatów. Rozróżnienie między modelem aktywnym i pasywnym wymaga wykonania bardzo precyzyjnych analiz kinetyki procesu dezagregacji w obecności wielu dawek białka o aktywności dezagregazy i ustalenia, czy stała szybkości reakcji dezagregacji zależy od dawki białka dezagregującego czy nie (istnienie takiej zależności wspiera model aktywny - Jaru-Ampornpan i wsp., 2010). Ze względu na określony poziom wydajności nadekspresji i oczyszczania AtDeg2 nie wykonaliśmy takich doświadczeń, dlatego mechanizm dezagregującego działania AtDeg2 wobec zdenaturowanego lizozymu pozostaje niewyjaśniony. Wyniki moich badań z wykorzystaniem zmutowanych wersji rekombinowanego AtDeg2 pokazały, że reszta seryny w miejscu katalitycznym AtDeg2 (S268) nie jest istotna dla aktywności holdazowej AtDeg2 *in vitro* (Rysunek 44, s. 115). Podobny efekt zaobserwowano w odniesieniu do bakteryjnego DegP i DegQ (Skórko-Glonek i wsp., 2007; Bai i wsp.,

2011). Analiza wariantów delecyjnych rekombinowanego AtDeg2 wykazała z kolei, że domena proteazowa jako całość (z wyłączeniem S268) odgrywa pewną rolę w kształtowaniu aktywności holdazowej AtDeg2, natomiast każda z dwóch domen PDZ jest absolutnie niezbędna dla podtrzymania przez AtDeg2 aktywności holdazowej *in vitro*. Identyczne wyniki przyniosły analizy aktywności dezagregacyjnej *in vitro* zmutowanych wersji rekombinowanego AtDeg2. Wszystko to oznacza, że obie domeny PDZ i, w pewnym stopniu, domena proteazowa (z wyłączeniem S268 w miejscu katalitycznym) są wymagane, aby białko AtDeg2 dysponowało aktywnością opiekuńczą holdazy i dezagregazy. Literatura światowa nie zawiera żadnych danych odnoszących się do istotności domen PDZ dla aktywności holdazowej bakteryjnych białek Deg. Niezbędność obu domen PDZ dla obu typów aktywności opiekuńczej AtDeg2 *in vitro* oraz pewna rola domeny proteazowej może wynikać z faktu, że prawdopodobnie wszystkie te domeny uczestniczą w oddziaływaniach trimerów, które prowadzą do powstawania 12- i /lub 24-merów AtDeg2, co do których sądzi się, że są formą aktywną nie tylko proteolitycznie, ale także opiekuńczo (holdazowo – Sun i wsp., 2012). Reszty aminokwasowe zaangażowane w tworzenie tych oddziaływań mogą być tymi samymi, które są odpowiedzialne za heksameryzację AtDeg2, tj.: Q139 i K168 domeny proteazowej, E331, N332 i Q328 domeny PDZ1 oraz A492, Y561, E500, V542 i I497 domeny PDZ2 (Sun i wsp., 2012). S268 w miejscu katalitycznym białka nie uczestniczy w procesie heksameryzacji (Sun i wsp., 2012) i prawdopodobnie także w tworzeniu 12- czy 24-merów, dlatego jej substytucja na nieaktywną katalitycznie resztę G268 nie ma wpływu na żadną z dwóch aktywności opiekuńczych AtDeg2.

Kolejnym zadaniem badawczym, jaki postanowiono wykonać w ramach niniejszej pracy doktorskiej, była identyfikacja fizjologicznych substratów dla aktywności opiekuńczej AtDeg2. Zdecydowano, że poszukiwane będą białka chloroplastowe, wobec których AtDeg2 spełnia funkcję holdazową, tzn. po denaturacji tych białek (będącej konsekwencją działania na roślinę stresu abiotycznego) AtDeg2 chroni je przed spontaniczną agregacją, umożliwiając ponowne sfałdowanie z pomocą foldaz. Zdecydowana większość danych eksperymentalnych odnoszących się do aktywności białek opiekuńczych (w tym także białek roślinnych) pochodzi z doświadczeń wykonywanych *in vitro* z wykorzystaniem нефизjologicznych, modelowych substratów. I tak, dysponowanie aktywnością foldazową przypisuje się białkom, które w testach

in vitro przywracają zdenaturowanym białkom ich natywną strukturę trzeciorzędową oraz aktywność enzymatyczną (o ile zdenaturowanym białkiem jest enzym). W badaniach nad foldazami najczęściej wykorzystywanymi białkami modelowymi są: białko MaS zdenaturowane działaniem wysokich stężeń mocznika (np. Sun i wsp., 2010) oraz β -galaktozydaza zdenaturowana działaniem wysokich stężeń chlorowodoru guanidyny (Freeman i Morimoto, 1996). Z kolei dysponowanie aktywnością holdazową przypisuje się białkom, które w testach *in vitro* nie dopuszczają do agregacji zdenaturowanych białek modelowych, najczęściej zdenaturowanej termicznie dehydrogenazy jabłczanowej (np. Lee i wsp., 2009) lub lizozymu zdenaturowanego działaniem DTT (np. Sun i wsp., 2012). Aktywność dezagregazy oceniana jest natomiast na podstawie zdolności badanych białek do upłynniania agregatów utworzonych przez zdenaturowane białka modelowe, najczęściej lizozym (Skórko-Glonek i wsp., 2007) lub lucyferazę (Nillegoda i wsp., 2015). Wiedza na temat fizjologicznych, tzn. rzeczywistych substratów białek opiekuńczych jest raczej skromna (w przypadku białek roślinnych bardzo skromna), a jedną z przyczyn tego stanu rzeczy są trudności metodyczne (np. znaczny stopień skomplikowania stosowanych metod) towarzyszące identyfikacji białek-substratów. Jeden z przykładów prób identyfikacji fizjologicznych substratów ludzkich holdaz z rodziny sHSP znajdziemy w publikacji Mymrikova i wsp. (2017) – białka ochraniające przez sHSP przed agregacją w podwyższonych temperaturach znajdowano jako te (spośród białek lizatów komórek HeLa), które w warunkach szoku termicznego pozostawały rozpuszczalne w obecności indywidualnych sHSP, a ponadto wchodziły w interakcje z sHSP w testach immunoprecypitacyjnych i w warunkach doświadczeń typu *pull-down*. Co się tyczy chloroplastowych holdaz *A. thaliana* to w światowej literaturze znajdziemy bardzo mało przykładów prób identyfikacji fizjologicznych substratów dla tej grupy białek opiekuńczych, z wyjątkiem badań nad udziałem białek opiekuńczych w biogenezie Rubisco (Vitlin Gruber i Feiz, 2018), w zakresie których nasz zespół nie ma żadnego doświadczenia. Dlatego podjęliśmy decyzję, by do identyfikacji chloroplastowych białek *A. thaliana* będących substratami dla AtDeg2 jako holdazy wykorzystać elektroforezę diagonalną – podejście metodyczne wcześniej w badaniach holdaz nie stosowane, a z sukcesem wykorzystywane przez nasz zespół do innych celów badawczych (Grabsztunowicz i wsp., 2015).

Od dawna wiadomo, że ekspozycja roślin na różne stresy abiotyczne prowadzi do akumulacji reaktywnych form tlenu (np. chłód – Wise i Naylor, 1987a,b; wysokie natężenie światła – Asada 1999; zranienie – Orozco-Cardenas i Ryan, 1999; niskie natężenie światła – Grabsztunowicz i wsp., 2015), które z wysoką efektywnością indukują oksydacyjne modyfikacje reszt aminokwasowych, co może prowadzić do różnego typu uszkodzeń białek (Gill i Tuteja, 2010). Szczególnie podatne na modyfikacje oksydacyjne są reszty aminokwasów zawierających w swojej strukturze atom siarki, tzn. reszta cysteiny i metioniny; jedną z modyfikacji oksydacyjnych reszty cysteiny jest formowanie wewnątrz- lub międzybiałkowych mostków dwusiarczkowych (Davies 2005). Stresozależna agregacja białek chloroplastowych (LS Rubisco) poprzez mostki dwusiarczkowe została opisana w odniesieniu do komórek zielenic *Chlamydomonas* poddanych *in vivo* działaniu nadtlenu wodoru (Esquivel i wsp., 2006) oraz roślin *A. thaliana* eksponowanych na światło o niskim natężeniu (Grabsztunowicz i wsp., 2015). Przyjęliśmy założenie, że ekspozycja roślin *A. thaliana* na światło o wysokim natężeniu także może prowadzić do międzycząsteczkowej agregacji białek chloroplastowych poprzez mostki dwusiarczkowe, a AtDeg2, działając jako holdaza, może częściowo zapobiegać agregacji owych białek-substratów.

Dla identyfikacji białek-substratów niezbędne było dysponowanie (poza roślinami WT) transformantami ekspresjonującymi AtDeg2 pozbawione aktywności opiekuńczej, z nienaruszoną aktywnością proteolityczną. Testy *in vitro* dowiodły, że właściwościami takimi dysponuje AtDeg2 Δ PDZ1 (Rysunek 45, s. 118), zatem do identyfikacji białek-substratów dla aktywności holdazowej AtDeg2 użyto transformantów *35S:AtDEG2^{ΔPDZ1}-GFP* 4.23. Fakt, że delecja domeny PDZ1 nie ma wpływu na aktywność proteolityczną AtDeg2 – podczas gdy delecja PDZ2 lub obu domen PDZ powodowała całkowitą utratę tej aktywności – wydaje się dość zaskakujący w świetle wyników zawartych w pracy Sun i wsp. (2012). Według tych autorów obie domeny PDZ wydają się być zaangażowane w tworzenie interfejsów uczestniczących w formowaniu aktywnych proteolitycznie 12- i/lub 24-merów AtDeg2. Analiza struktury krystalicznej AtDeg2 (Sun i wsp., 2012) pozwala sądzić, że w tworzenie trimerów AtDeg2 są zaangażowane tylko domeny proteazowe poszczególnych monomerów, dlatego AtDeg2 Δ PDZ1 powinien mieć organizację trimeryczną, a mimo to może zachowywać aktywność proteolityczną, podobnie jak to ma miejsce w przypadku DegP Δ PDZ2

(Spiess i wsp., 1999; Jiang i wsp., 2008). Miejsce wiązania substratów w domenie PDZ2 AtDeg2 (wnęka między α -helisą αI a β -nicią $\beta 22$) może zatem być wystarczające do zachowania aktywności proteolitycznej tego białka. Miejsce wiązania substratu obecne w domenie PDZ1 (wnęka pomiędzy α -helisą αF a β -nicią $\beta 13$) może zaś nie być wystarczające do wiązania substratów, co tłumaczyłoby dlaczego AtDeg2 Δ PDZ2 oraz AtDeg2 Δ (PDZ1 + PDZ2) są trimerami nieaktywnymi proteolitycznie, podobnie jak w przypadku DegP Δ (PDZ1+PDZ2) i DegP Δ PDZ1 (Spiess i wsp., 1999).

Analiza porównawcza żeli po elektroforezie diagonalnej lizatów chloroplastowych uzyskanych z roślin WT i transformantów *35S:AtDEG2^{ΔPDZ1}-GFP* 4.23 hodowanych w warunkach ekspozycji na światło o wysokim natężeniu umożliwiła wykrycie pojedynczego białka reprezentowanego przez plamkę, która znajdowała się poniżej przekątnej żelu i była trzykrotnie intensywniejsza na żelach z rozdzielonymi białkami lizatu chloroplastowego transformantów niż na żelach z rozdzielonymi białkami lizatu chloroplastowego roślin WT (Rysunek 52, s. 128). Białko to spełniało zatem kryteria czyniące je potencjalnym substratem dla poszukiwanego typu aktywności holdazowej AtDeg2. Jednocześnie test na aktywność reduktazy dwusiarczkowej wykonany dla roślin WT i transformantów *35S:AtDEG2^{ΔPDZ1}-GFP* 4.23 pokazał, że preparaty stromy obu genotypów wykazywały podobną aktywność reduktazy dwusiarczkowej (Rysunek 54, s. 131). Oznacza to, że wykryte białko – podjednostka γ_1 kompleksu F_1 chloroplastowej syntazy ATP (Rysunek 53 i Tabela 10, s. 129) – nie jest substratem reduktazy dwusiarczkowej upłynniającej powstałe agregaty przez redukcję mostków dwusiarczkowych, lecz substratem dla aktywności holdazowej AtDeg2, niedopuszczającej do stresozależnej homoagregacji cząsteczek tego białka.

Chloroplastowa syntaza ATP (określana jako CF_0F_1) jest enzymem katalizującym syntezę ATP z ADP i Pi przez przekształcenie gradientu potencjału elektrochemicznego protonów i potencjału elektrycznego związanego z rozdziałem ładunku w energię wiązań chemicznych w cząsteczce ATP. Syntaza ATP jest jednym z enzymów chloroplastowych regulowanych przez światło – aktywowanym w świetle i dezaktywowanym w ciemności. Zanurzony w błonie tylakoidowej kompleks F_0 syntazy ATP jest odpowiedzialny za transport protonów przez błonę tylakoidową i zbudowany jest z trzech typów podjednostek w stosunku stechiometrycznym $a_1b_2c_{10-15}$ (jedna podjednostka a na dwie podjednostki b i 10-15 podjednostek c), natomiast

zlokalizowany w stromie kompleks F_1 stanowi część katalityczną i składa się z pięciu typów podjednostek w stosunku stechiometrycznym $\alpha_3\beta_3\gamma_1\delta_1\varepsilon_1$. Podjednostka γ wraz z podjednostką ε tworzy ramię centralne łączące rdzeń katalityczny $\alpha_3\beta_3$ z pierścieniem c_{10-15} . Przepływ protonów przez kanał protonowy znajdujący się pomiędzy pierścieniem c_{10-15} a podjednostką α wprawia w ruch zestaw podjednostek c . Ruch obrotowy pierścienia c_{10-15} jest przekazywany przez podjednostkę γ do wnętrza rdzenia katalitycznego $\alpha_3\beta_3$ unieruchomionego przez ramię zewnętrzne $b_2\delta_1$, dostarczając w ten sposób energii potrzebnej do syntezy ATP (Hisabori i wsp., 2013; Colina-Tenorio i wsp., 2018).

W genomie jądrowym *A. thaliana* zlokalizowane są dwa geny kodujące plastydową podjednostkę γ syntazy ATP: *atpC1* (At4G04640) i *atpC2* (At1G15700). Izoformy molekularne podjednostki γ kodowane przez te geny są określane, odpowiednio, jako γ_1 i γ_2 . Ekspresja genu *atpC2* ma miejsce głównie w plastydach komórek korzenia, w mniejszym stopniu w plastydach innych tkanek niefotosyntetycznych. Sądzi się, że γ_2 może wchodzić w skład pomp protonowych niezielonych plastydów. Z kolei podjednostka γ_1 wchodzi w skład chloroplastowej syntazy ATP (Kohzuma i wsp., 2012). W strukturze pierwszorzędowej podjednostki γ_1 syntazy ATP znaleziono trzy reszty cysteinowe (C89, C199 i C205), z których dwie (C199 i C205) pełnią istotną rolę w regulacji aktywności tego enzymu w odpowiedzi na zmiany stanu redoks. W przypadku utlenionej wersji podjednostki γ_1 (taka forma akumuluje się w ciemności i jest nieaktywna katalitycznie) reszty cysteiny tworzą mostek dwusiarczkowy. Mostek ten jest redukowany na świetle przez zredukowaną tioredoksynę f ; jej redukcja zaś jest konsekwencją fotosyntetycznego transportu elektronów. Światłozależna redukcja mostka dwusiarczkowego C199-C205 powoduje zmiany struktury trzeciorzędowej podjednostki γ_1 , co prowadzi do aktywacji chloroplastowej syntazy ATP. Wykazano także, że redukcja podjednostki γ_1 zwiększa stopień dysocjacji podjednostki ε , działającej hamująco na aktywność syntazy ATP (Hisabori i wsp., 2013). Rola AtDeg2 może polegać na zapobieganiu powstawania nienatywnych mostków dwusiarczkowych między cząsteczkami podjednostki γ_1 zarówno w dzień jak i w nocy. „Nocny scenariusz” polegałby na zapobieganiu powstawania nienatywnych mostków międzycząsteczkowych z udziałem C89, „dzienny” zaś na zapobieganiu powstawania nienatywnych mostków pomiędzy dowolnymi parami reszt C. Alternatywnie, AtDeg2

może zapobiegać oksydacyjnym modyfikacjom i homoagregacji podjednostek γ_1 na etapie ich fałdowania, zanim dojdzie do oddziaływania podjednostek γ_1 z heksamerem $\alpha_3\beta_3$ i zmontowania natywnego kompleksu F_1 (Rühle i Leister, 2015).

Nie można wykluczyć, iż AtDeg2 wykazuje aktywność holdazową w warunkach ekspozycji roślin na światło o wysokim natężeniu także wobec innych białek chloroplastowych, jednak musiałyby to być białka, które w wyniku modyfikacji oksydacyjnych (indukowanych stresem wysokiego natężenia światła) mogą agregować z wykorzystaniem oddziaływań innych niż wiązania dwusiarczkowe. Tak powstałych agregatów nie można wykryć za pomocą elektroforezy diagonalnej.

Jeszcze jednym zadaniem badawczym, jakie zamierzono wykonać w ramach niniejszej pracy doktorskiej, było rozpoznanie roli AtDeg2 jako białka opiekuńczego w kształtowaniu się wybranych cech fenotypowych roślin *A. thaliana*. Dla wykonania tego zadania niezbędne było dysponowanie (poza roślinami WT i mutantami *deg2-3*) dwoma typami transformantów, a mianowicie:

- 1) takimi, które ekspresjonują białko AtDeg2 dysponujące tylko aktywnością opiekuńczą; były nimi transformanty *35S:AtDEG2^{S268G}-GFP* (linia 3.313);
- 2) takimi, które ekspresjonują białko AtDeg2 dysponujące tylko aktywnością proteolityczną; były nimi transformanty *35S:AtDEG2^{APDZ1}-GFP* (linia 4.31).

Cechy fenotypowe roślin *A. thaliana*, w regulacji których uczestniczy AtDeg2 poprzez swoją aktywność opiekuńczą bądź opiekuńczą i proteolityczną jednocześnie, zidentyfikowano poprzez dwuetapową porównawczą analizę fenotypową obejmującą rośliny WT i mutanty *deg2-3* (pierwszy etap), a w przypadku wykrycia istotnych statystycznie różnic WT/*deg2-3* także transformanty *35S:AtDEG2^{S268G}-GFP* 3.313 i *35S:AtDEG2^{APDZ1}-GFP* 4.31. W pierwszej kolejności analizowano chronologię przebiegu wybranych faz ontogenezy roślin WT i *deg2-3* (1, 3, 5, 6 i 8) i ich podfaz. Wyniki uzyskane dla roślin WT w zdecydowanej większości przypadków pozostają w dobrej zgodności z danymi literaturowymi odnoszącymi się do roślin *A. thaliana* tego samego ekotypu (Columbia), hodowanych w bardzo podobnych warunkach oświetleniowych i temperaturowych (Boyes i wsp., 2001). Szczególnie znaczące podobieństwo pomiędzy naszymi wynikami i wynikami zawartymi w pracy Boyesa i wsp. (2001) odnotowaliśmy w odniesieniu do momentu osiągnięcia przez rośliny WT fazy 3 i jej podfaz oraz podfazy 5.1 (jedynej podfazy wyróżnianej w obrębie fazy 5) (Rysunek 60, s. 139). Nieco większe

rozbieżności zaobserwowano w odniesieniu do momentu osiągnięcia fazy 1 i jej podfaz oraz podfaz 6.0, 6.1 i 6.5 (Rysunek 60, s. 139), mimo to wyniki te są nadal bardzo podobne. Nasze wyniki różnią się natomiast znacząco od danych Boyesa i wsp. (2001) w odniesieniu do momentu osiągnięcia podfazy 6.9, która w naszych warunkach hodowlanych osiągana jest przez rośliny WT 25,6 dni później (Rysunek 60, s. 139), w zgodności z wynikami wcześniejszych analiz fenotypowych roślin WT wykonywanych w naszym zespole (Baranek i wsp., 2015). Wskazane wyżej różnice – między naszymi wynikami i wynikami opisanymi w pracy Boyesa i wsp. (2001) – odnoszące się do chronologii przebiegu niektórych faz ontogenezy wynikają najprawdopodobniej z drobnych różnic w warunkach hodowli, np. Boyes i wsp. hodowali rośliny w temperaturze zmiennej: 22⁰C (dzień) / 20⁰C (noc), podczas gdy rośliny opisane w niniejszej pracy były hodowane przy stałej temperaturze (21⁰C).

Wyniki analizy obejmującej cztery genotypy *A. thaliana* w odniesieniu do chronologii przebiegu faz i podfaz ontogenezy wskazują na udział obu aktywności AtDeg2 w regulacji czasu wymaganego do całkowitego rozprostowania się liścieni (Rysunek 61, s. 140). W indukowanym czerwonym świetle otwieraniu się liścieni uczestniczą kinazy białkowe aktywowane mitogenami (MAPKs, ang. *mitogen-activated protein kinases*), które poprzez kaskadę MAPKKK-MKK10-MPK6 doprowadzają do fosforylacji czynnika transkrypcyjnego PIF3, przyspieszając jego degradację. W ten sposób umożliwiają ekspresję genów hamowanych przez PIF3, promując otwieranie się liścieni (Xin i wsp., 2018). Jak wskazują wyniki uzyskane za pomocą narzędzia Arabidopsis eFP Browser 2.0 poziom ekspresji genu *AtDEG2* w całkowicie otwartych liścieniach jest dość wysoki (Winter i wsp., 2007). Nasze wyniki wskazują zatem na istnienie powiązania pomiędzy ścieżkami sygnalizacyjnymi włączonymi w otwieranie się liścieni i ścieżkami, w regulacji których uczestniczy AtDeg2 poprzez obie swoje aktywności: proteazy i białka opiekuńczego (Rysunek 61, s. 140).

Wyniki analizy morfologii organów generatywnych roślin WT, które osiągnęły podfazę 8.9, obejmujące wysokość rośliny, liczbę węzłów na pędzie kwiatostanowym i jego rozgałęzieniach (Rysunek 62, s. 142), długość i szerokość wyprodukowanych nasion oraz liczbę nasion przypadających na roślinę (Rysunek 63, s. 143) były również w zdecydowanej większości przypadków podobne do wyników uzyskanych przez Boyesa i wsp. (2001) (różnice na poziomie 9-22%). Jedynie w odniesieniu do liczby

nasion przypadających na roślinę (Rysunek 62, s. 142) różnica ta była poważniejsza, co także należy przypisać drobnym różnicom w warunkach hodowli roślin używanych w naszych doświadczeniach oraz w doświadczeniach Boyesa i wsp. (2001). Wyniki analizy obejmującej cztery genotypy *A. thaliana* w odniesieniu do morfologii organów generatywnych roślin, które osiągnęły podfazę 8.9 wskazują na udział obu aktywności AtDeg2 w regulacji właściwego rozgałęziania się pędu kwiatostanowego (Rysunek 62, s. 142) i osiągnięcia właściwej długości wyprodukowanych nasion (Rysunek 63, s. 143); udział samej aktywności opiekuńczej AtDeg2 zaobserwowano zaś w odniesieniu do regulacji szerokości wyprodukowanych nasion (Rysunek 63, s. 143).

Rozgałęzianie się pędu kwiatostanowego u *A. thaliana* jest regulowane przez cytokininy, czynniki transkrypcyjne AP1, LFY oraz czynniki transkrypcyjne z kasetą MADS (Liu i wsp., 2013; Han i wsp., 2014). W regulacji rozmiaru nasiona uczestniczą natomiast ścieżki sygnalizacyjne obejmujące udział genów *IKU1*, *IKU2*, *SHB1* i *MINI3*, jak również szlak ubikwityna-proteasom 26S, szlaki sygnalizacyjne przebiegające z udziałem białek G oraz ścieżki MAPK (Li i Li, 2016). Nasze wyniki sugerują istnienie powiązań pomiędzy ścieżkami sygnalizacyjnymi włączonymi w rozgałęzianie się pędu kwiatostanowego oraz kształtowanie się końcowej długości nasion ze ścieżkami, w regulacji których AtDeg2 uczestniczy jako proteaza i holdaza/dezagregaza (Rysunek 62, s. 142 i Rysunek 63, s. 143). Sugerujemy także istnienie powiązania pomiędzy ścieżkami regulowanymi przez AtDeg2 jako holdazę/dezagregazę i ścieżkami sygnalizacyjnymi uczestniczącymi w regulacji szerokości nasion (Rysunek 63, s. 143).

Nasze wyniki są zatem pierwszymi w historii badań nad AtDeg2 wskazującymi, że poprzez swoją aktywność holdazy/dezagregazy (w połączeniu z funkcją proteazową lub niezależnie od niej) białko to jest niezbędne dla prawidłowego przebiegu ontogenezy *A. thaliana* – zarówno rozwoju wegetatywnego jak i generatywnego (Tabela 11, s. 147). Liczba cech fenotypowych roślin *A. thaliana* regulowanych przez aktywność opiekuńczą AtDeg2 lub opiekuńczą i proteolityczną jednocześnie jest jednak niewielka, co znajduje potwierdzenie w obserwacji, że AtDeg2 nie ma wpływu na wartość przystosowawczą roślin rozumianą jako ich zdolność reprodukcyjna (Rysunek 62, s. 142). Można zatem sugerować, że AtDeg2 poprzez swoją aktywność opiekuńczą (a konkretnie holdazową) spełnia zadania głównie w warunkach stresowych, czego

przykładem jest zapobieganie homoagregacji podjednostek γ_1 chloroplastowej syntazy ATP w warunkach ekspozycji roślin na wysokie natężenie światła.

Wyniki analizy powierzchni ósmego liścia roślin WT w momencie osiągnięcia jego końcowej długości różniły się od wyników, jakie można znaleźć w literaturze światowej w odniesieniu do roślin ekotypu Columbia hodowanych w porównywalnych warunkach. Otóż liść ósmy roślin WT osiągał w naszych warunkach końcową powierzchnię równą 421 mm^2 (Rysunek 64, s. 144), podczas gdy w innych laboratoriach zarejestrowano ok. 250 mm^2 (Cookson i wsp., 2007) lub ok. 170 mm^2 (Massonnet i wsp., 2010). Różnice te wynikają najprawdopodobniej z niewielkich różnic w warunkach hodowli, np. Cookson i wsp. 2007 używali światła o natężeniu $134 \mu\text{moli kwantów m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, a wilgotność względna atmosfery w komorze fitotronowej wynosiła 81%, podczas gdy nasze parametry osiągały wartości $110 \mu\text{moli kwantów m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ i 70%, odpowiednio. Niezależnie od tego, wyniki badań Massonnet i wsp. (2010) wskazują na istnienie różnic międzylaboratoryjnych w zakresie cech fenotypowych roślin WT *A. thaliana*, nawet jeśli porównuje się rośliny hodowane w warunkach praktycznie identycznych.

Wyniki porównania WT/*deg2-3* wskazują na brak istotnych statystycznie różnic w odniesieniu do wszystkich badanych cech morfologii ósmego liścia, który zakończył wzrost. W pochodzącej z naszego zespołu pracy Lucińskiego i wsp. (2011) opisano wyniki wskazujące, że AtDeg2 uczestniczy w regulacji powierzchni rosnących liści młodocianych (liście 3 i 4) ale nie ma wpływu na powierzchnię rosnących liści dojrzałych (liście 7 i 8). Wyniki uzyskane w ramach niniejszej pracy pokazują zatem, że AtDeg2 ani przez swoją aktywność opiekuńczą, ani proteolityczną nie odgrywa żadnej roli w regulacji powierzchni liści dojrzałych, ani w okresie kiedy pozostają one w fazie wzrostu, ani po osiągnięciu końcowej długości. Ponadto, w związku z brakiem różnic w rozwoju liści (tj. chronologii pojawiania się kolejnych liści) pomiędzy roślinami WT i mutantami *deg2-3* (Rysunek 60, s. 139) można sądzić, że opisany w pracy Lucińskiego i wsp. (2011) udział AtDeg2 w regulacji powierzchni rosnących liści młodocianych (3 i 4) polega raczej na regulacji szybkości i czasu trwania proliferacji i następującego po niej wzrostu wydłużeniowego komórek liści młodocianych, a nie regulacji chronologii pojawiania się liści młodocianych.

Parametry oszacowane w oparciu o analizę krzywej A/C_i wyznaczonej dla ósmego liścia roślin WT w momencie, gdy osiąga końcową długość (Rysunek 65, s. 146), a mianowicie maksymalna intensywność karboksylacji RuBP limitowanej przez właściwości Rubisco ($V_{c,max} = 29,85 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) oraz maksymalna szybkość transportu elektronów wykorzystywana do regeneracji RuBP ($J_{max} = 66,22 \mu\text{mol e}^- \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) były niemal identyczne z danymi literaturowymi odnoszącymi się do siódmego liścia tego samego ekotypu roślin WT *A. thaliana* hodowanych w podobnych warunkach, tzn. z wartościami, odpowiednio, $30 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ oraz $64,5 \mu\text{mol e}^- \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Atkinson i wsp., 2016). Parametry oszacowane w oparciu o analizę krzywej świetlnej ósmego liścia roślin WT (Rysunek 66, s. 146) tj. maksymalna intensywność fotosyntezy ($A_{max} = 7,71 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), kwantowa wydajność fotosyntetycznego wiązania CO_2 ($\Phi = 0,059$), wypukłość krzywej świetlnej ($\Theta = 0,829$) oraz intensywność oddychania ciemnościowego ($R_d = 0,55 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), również były bardzo zbliżone do danych literaturowych, opisanych w pracy Retkute i wsp. (2015) (hodowla roślin w warunkach podobnych do tych jakie zastosowano w niniejszej pracy): $A_{max} = 8,3 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $\Theta = 0,96$, $\Phi = 0,055$ oraz $R_d = \text{ok. } 1,9 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Retkute i wsp., 2015). To porównanie należy jednak traktować z dużą ostrożnością, ponieważ Retkute i wsp. (2015) nie informują, który liść był poddany analizom fotosyntetycznym.

Wyniki porównania WT/*deg2-3* dowodzą braku istotnych statystycznie różnic w odniesieniu do wszystkich analizowanych parametrów aktywności fotosyntetycznej ósmego liścia w momencie osiągnięcia jego końcowej długości. Między wartościami maksymalnej intensywności fotosyntezy A_{max} a ilością Rubisco w liściu obserwuje się wysoką korelację (Hubbart i wsp., 2007). Można zatem sugerować, że brak różnic istotnych statystycznie pomiędzy wartościami A_{max} uzyskanymi dla roślin WT i *deg2-3* (Rysunek 66, s. 146) wskazuje na to, że AtDeg2 nie uczestniczy w regulacji ilości Rubisco. Wysokie podobieństwo wartości $V_{c,max}$ liści roślin WT i *deg2-3* dodatkowo wzmacnia powyższą tezę (Rysunek 65, s. 146).

Obserwowana w przypadku ósmego liścia roślin WT wartość kwantowej wydajności fotosyntetycznego wiązania CO_2 (Φ) wynosząca 0,059 (Rysunek 66, s. 146) jest znacznie niższa od teoretycznej wartości maksymalnej (0,125 - Singaas i wsp., 2001). Takiej wartości Φ nie obserwowano jednak nigdy, co tłumaczy się aktywnością

cyklu fotorespiracyjnego, cyklicznym transportem elektronów oraz (w specyficznych warunkach) fotoinhibicją. Wykonane przez Skillmana (2008) zestawienie 61 indywidualnych wyników analiz wykonanych na liściach roślin typu roślin C3 (do których należy *A. thaliana*) w komorze z atmosferycznym stężeniem O_2 dało 0,052 jako wartość średnią. Jest to przede wszystkim skutek znaczącej aktywności cyklu fotorespiracyjnego w komórkach badanych liści, gdyż wykonywanie pomiarów Φ w komorach z wysokim stężeniem CO_2 (obniżenie efektywności cyklu fotorespiracyjnego) pozwalało na uzyskiwanie wartości Φ równych 0,10-0,12, a więc dużo bardziej zbliżonych do teoretycznej wartości maksymalnej (Skillman, 2008). Brak różnic pomiędzy wartościami Φ liści roślin WT i *deg2-3* (Rysunek 66, s. 146) sugeruje, że cykl fotorespiracyjny zachodzi u roślin obydwu genotypów z taką samą intensywnością, a to oznacza, iż AtDeg2 ani poprzez aktywność opiekuńczą, ani proteazową nie reguluje intensywności tego cyklu.

Na wartość wypukłości krzywej świetlnej θ ma wpływ wiele czynników takich jak kompozycja aparatu fotosyntetycznego, grubość liścia, jego stan fizjologiczny i absorpcja światła przez cały liść (Ögren i Evans, 1993, Ögren, 1993) a także rozkład pionowy chlorofilu i liczba chloroplastów (Xiao i wsp., 2016). Na wartość θ ma też wpływ stężenie CO_2 w otaczającej atmosferze podczas wykonywania pomiarów (Akhkha i wsp., 2001). Brak różnic między wartościami θ liści roślin WT i *deg2-3* hodowanych w identycznych warunkach świetlnych wskazuje, że AtDeg2 nie ma wpływu na globalną charakterystykę aktywności fotosyntetycznej dojrzałych liści, reprezentowanych przez liść ósmy.

8 PODSUMOWANIE WYNIKÓW

- 1) AtDeg2 dysponuje aktywnością polegającą na hamowaniu powstawania agregatów zdenaturowanego lizozymu oraz upłynniania już istniejących agregatów zdenaturowanego lizozymu *in vitro*.
- 2) Usunięcie pojedynczej lub obydwu domen PDZ powoduje całkowitą niezdolność AtDeg2 do hamowania powstawania agregatów zdenaturowanego lizozymu oraz upłynniania już istniejących agregatów zdenaturowanego lizozymu *in vitro*. Usunięcie całej domeny proteazowej powoduje częściową utratę tych aktywności, ale zamiana katalitycznie aktywnej reszty seryny na nieaktywną katalitycznie resztę glicyny nie ma wpływu na te aktywności.
- 3) Usunięcie domeny PDZ1 nie prowadzi do uszkodzenia aktywności proteolitycznej AtDeg2 *in vitro*.
- 4) W warunkach ekspozycji na światło o wysokim natężeniu w chloroplastach linii 4.23 transformanta 35S:DEG2^{ΔPDZ1}-GFP, zagregowana podjednostka γ_1 syntazy ATP gromadzi się na 3-krotnie wyższym poziomie niż w chloroplastach roślin szczepu dzikiego.
- 5) Podczas hodowli w warunkach bezstresowych mutanty *deg2-3* i transformanty 35S:DEG2^{S268G}-GFP linii 3.313 oraz 35S:DEG2^{ΔPDZ1}-GFP linii 4.31 różnią się od roślin WT (ale nie między sobą) momentem osiągnięcia podfazy 1.0 (rozprostowanie się liścieni), liczbą węzłów na pędzie kwiatostanowym i jego rozgałęzieniach oraz długością nasion.
- 6) Podczas hodowli w warunkach bezstresowych mutanty *deg2-3* i transformanty DEG2^{ΔPDZ1}-GFP linii 4.31 różnią się od roślin WT i transformantów 35S:DEG2^{S268G}-GFP linii 3.313 szerokością nasion.

9 WNIOSKI

- 1) AtDeg2 dysponuje (co najmniej) dwoma typami aktywności opiekuńczej *in vitro*: holdazy oraz dezagregazy.
- 2) Za aktywność opiekuńczą AtDeg2 typu zarówno holdazy, jak i dezagregazy *in vitro* odpowiedzialne są obie domeny PDZ oraz w pewnym stopniu domena proteazowa, natomiast katalitycznie aktywna reszta seryny nie odgrywa istotnej roli w kształtowaniu się tych aktywności *in vitro*.
- 3) AtDeg2 dysponuje aktywnością opiekuńczą holdazy *in vivo* w warunkach ekspozycji roślin na światło o wysokim natężeniu, dla której substratem jest podjednostka γ_1 syntazy ATP. Aktywność ta wyraża się zahamowaniem agregacji zmienionych oksydacyjnie cząsteczek podjednostki γ_1 syntazy ATP poprzez niedopuszczanie do powstawania mostków dwusiarczkowych między tymi cząsteczkami.
- 4) Podczas hodowli w warunkach bezstresowych AtDeg2 przez swoją aktywność opiekuńczą bierze udział w regulacji szerokości nasion, a przez swoją aktywność opiekuńczą i proteolityczną jednocześnie uczestniczy w regulacji momentu rozprostowania się liścieni, liczby węzłów na pędzie kwiatostanowym i jego rozgałęzieniach oraz w regulacji długości nasion.

10 LITERATURA

Adam Z, Adamska I, Nakabayashi K, Ostersetzer O, Haussühl K, Manuell A, Zheng B, Vallon O, Rodermel SR, Shinozaki K, Clarke AK. Chloroplast and mitochondrial proteases in *Arabidopsis*. A proposed nomenclature. *Plant Physiol.* 2001; 125: 1912-8.

Adamiec M, Luciński R, Jackowski G. The irradiance dependent transcriptional regulation of *AtCLPB3* expression. *Plant Sci.* 2011; 181: 449-56.

Akhkha A, Reid I, Clarke DD, Dominy PJ. Photosynthetic light response curves determined with the leaf oxygen electrode: minimization of errors and significance of convexity term. *Planta* 2001; 214: 135-41.

Albrecht V, Ingenfeld A, Apel K. *SNOWY COTYLEDON 2* promotes chloroplast development and has a role in leaf variegation in both *Lotus japonicas* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 2008; 66: 599-608.

Alderson TR, Kim JH, Markley JL. Dynamical structures of Hsp70 and Hsp70-Hsp40 complexes. *Structure* 2016; 24: 1014-30.

Alexopoulos JA, Guarné A, Ortega J. ClpP: a structurally dynamic protease regulated by AAA+ proteins. *J. Struct. Biol.* 2012; 179: 202-10.

Ali Khan H, Mutus B. Protein disulfide isomerase a multifunctional protein with multiple physiological roles. *Front. Chem.* 2014; 2: 70.

Anfinsen CB. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 1973; 181: 223-30.

Anfinsen CB. The formation and stabilization of protein structure. *Biochem. J.* 1972; 128: 737-49.

Ansorge W. Fast and sensitive detection of protein and DNA bands by treatment with potassium permanganate. *J. Biochem. Biophys. Methods* 1985; 11: 13-20.

Asada K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1999; 50: 601-39.

Atkinson N, Feike D, Mackinder LC, Meyer MT, Griffiths H, Jonikas MC, Smith AM, McCormick AJ. Introducing an algal carbon-concentrating mechanism into higher plants: location and incorporation of key components. *Plant Biotechnol. J.* 2016; 14: 1302-15.

Aukerman MJ, Sakai H. Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its *APETALA2*-like target genes. *Plant Cell* 2003; 15: 2730-41.

Bai XC, Pan XJ, Wang XJ, Ye YY, Chang LF, Leng D, Lei J, Sui SF. Characterization of the structure and function of *Escherichia coli* DegQ as a representative of the DegQ-like proteases of bacterial HtrA family proteins. *Structure* 2011; 19: 1328-37.

Balchin D, Hayer-Hartl M, Hartl FU. *In vivo* aspects of protein folding and quality control. *Science* 2016; 353: aac4354.

Baldwin GS. Post-translational processing of gastrointestinal peptides. W: Johnson R (red.) *Physiology of the Gastrointestinal Tract* 2012; Academic Press, ISBN: 978-0-12-382096-9: 43-63.

Baranek M, Grabsztunowicz M, Sikora B, Jackowski G., Zależne od ATP proteazy chloroplastowe FtsH i Lon. *Postępy Biochem.* 2011; 57: 101-8.

Baranek M, Wyka TP, Jackowski G. Downregulation of chloroplast protease AtDeg5 leads to changes in chronological progression of ontogenetic stages, leaf morphology and chloroplast ultrastructure in *Arabidopsis*. *Acta Soc. Bot. Pol.* 2015: 84: 59-70.

Barraclough R, Ellis RJ. Protein synthesis in chloroplasts IX. Assembly of newly-synthesized large subunits into ribulose biphosphate carboxylase in isolated intact pea chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 1980; 608: 19-31.

Bitto E, McKay DB. Crystallographic structure of SurA, a molecular chaperone that facilitates folding of outer membrane porins. *Structure* 2002; 10: 1489-98.

Boyes DC, Zayed AM, Ascenzi R, McCaskill AJ, Hoffman NE, Davis KR, Görlach J. Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell* 2001; 13: 1499-510.

Butenko Y, Lin A, Naveh L, Kupervaser M, Levin Y, Reich Z, Adam Z. Differential roles of the thylakoid lumenal Deg protease homologs in chloroplast proteostasis. *Plant Physiol.* 2018; 178: 1065-80.

Cai H, Wang CC, Tsou CL. Chaperone-like activity of protein disulfide isomerase in the refolding of a protein with no disulfide bonds. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 24550-2.

Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti PG. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 2004; 25: 1327-33.

Caplan AJ. What is a co-chaperone? *Cell Stress Chaperones* 2003; 8: 105-7.

Chassin Y, Kapri-Pardes E, Sinvany G, Arad T, Adam Z. Expression and characterization of the thylakoid lumen protease DegP1 from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2002; 130: 857-64.

- Chen KM, Holmström M, Raksajit W, Suorsa M, Piippo M, Aro EM. Small chloroplast-targeted DnaJ proteins are involved in optimization of photosynthetic reactions in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol.* 2010; 10: 43.
- Chen Q, Lauzon LM, DeRocher AE, Vierling E. Accumulation, stability, and localization of a major chloroplast heat-shock protein. *J. Cell Biol.* 1990; 110: 1873-83.
- Chiu CC, Chen LJ, Li HM. Pea chloroplast DnaJ-J8 and Toc12 are encoded by the same gene and localized in the stroma. *Plant Physiol.* 2010; 154: 1172-82.
- Chiu CC, Chen LJ, Su PH, Li HM. Evolution of chloroplast J proteins. *PLoS One* 2013; 8: e70384.
- Clausen T, Southan C, Ehrmann M. The HtrA family of proteases: implications for protein composition and cell fate. *Mol. Cell* 2002; 10: 443-55.
- Cline K, Henry R. Import and routing of nucleus-encoded chloroplast proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1996; 12: 1-26.
- Clough SJ, Bent AF. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 1998; 16: 735-43.
- Colina-Tenorio L, Dautant A, Miranda-Astudillo H, Giraud MF, González-Halphen D. The peripheral stalk of rotary ATPases. *Front. Physiol.* 2018; 9: 1243.
- Cookson SJ, Chenu K, Granier C. Day length affects the dynamics of leaf expansion and cellular development in *Arabidopsis thaliana* partially through floral transition timing. *Ann. Bot.* 2007; 99: 703-11.
- Culp E, Wright GD. Bacterial proteases, untapped antimicrobial drug targets. *J. Antibiot. (Tokyo)* 2017; 70: 366-77.
- Czesnick H, Lenhard M. Size control in plants—lessons from leaves and flowers. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2015; 7: a019190.
- Czuryło EA. Zjawisko zwijania łańcucha polipeptydowego białek. *Postępy Biochem.* 2002; 48: 101-10.
- Dall'Osto L, Bressan M, Bassi R. Biogenesis of light harvesting proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 2015; 1847: 861-71.
- Daras G, Rigas S, Tsitsekian D, Zur H, Tuller T, Hatzopoulos P. Alternative transcription initiation and the AUG context configuration control dual-organellar targeting and functional competence of *Arabidopsis* Lon1 protease. *Mol. Plant* 2014; 7: 989-1005.
- Datta K, Rahalkar K, Dinesh DK. Heat shock proteins (Hsp): classifications and its involvement in health and disease. *J. Pharma Care Health Sys.* 2017; 4: 175.

Davies MJ. The oxidative environment and protein damage. *Biochim. Biophys. Acta* 2005; 1703: 93-109.

Díaz-Villanueva JF, Díaz-Molina R, García-González V. Protein folding and mechanisms of proteostasis. *Int. J. Mol. Sci.* 2015; 16: 17193-230.

Dill KA, Ozkan SB, Shell MS, Weikl TR. The protein folding problem. *Annu. Rev. Biophys.* 2008; 37: 289-316.

Donch J, Greenberg J. Genetic analysis of *lon* mutants of strain K-12 of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 1968; 103: 105-15.

Doyle SM, Genest O, Wickner S. Protein rescue from aggregates by powerful molecular chaperone machines. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2013; 14: 617-29.

Dziedzic-Letka A, Ożyhar A. Białka inherentnie nieuporządkowane. *Postępy Biochem.* 2012; 58: 100-9.

Ellis RJ. Molecular chaperones: the plant connection. *Science* 1990; 250: 954-9.

Erjavec N, Larsson L, Grantham J, Nyström T. Accelerated aging and failure to segregate damaged proteins in Sir2 mutants can be suppressed by overproducing the protein aggregation-remodeling factor Hsp104p. *Genes Dev.* 2007; 21: 2410-21.

Esquivel MG, Pinto TS, Marín-Navarro J, Moreno J. Substitution of tyrosine residues at the aromatic cluster around the β A- β B loop of rubisco small subunit affects the structural stability of the enzyme and the *in vivo* degradation under stress conditions. *Biochemistry* 2006; 45: 5745-53.

Farmer LM, Rinaldi MA, Young PG, Danan CH, Burkhardt SE, Bartel B. Disrupting autophagy restores peroxisome function to an *Arabidopsis lon2* mutant and reveals a role for the LON2 protease in peroxisomal matrix protein degradation. *Plant Cell* 2013; 25: 4085-100.

Farquhar GD, von Caemmerer S, Berry JA. A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species. *Planta* 1980; 149: 78-90.

Ferrándiz C, Gu Q, Martienssen R, Yanofsky MF. Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by *FRUITFULL*, *APETALA1* and *CAULIFLOWER*. *Development* 2000; 127: 725-34.

Finkelstein AV. 50+ years of protein folding. *Biochemistry (Mosc.)* 2018; 83: S3-S18.

Freeman BC, Morimoto RI. The human cytosolic molecular chaperones hsp90, hsp70 (hsc70) and hsp71 have distinct roles in recognition of a non-native protein and protein refolding. *EMBO J.* 1996; 15: 2969-79.

Garrido C, Paul C, Seigneuric R, Kampinga HH. The small heat shock proteins family: the long forgotten chaperones. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2012; 44: 1588-92.

Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31: 3784-8.

Gill SS, Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 2010; 48: 909-30.

Glover JR, Lindquist S. Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* 1998; 94: 73-82.

Goloubinoff P. Editorial: the HSP70 molecular chaperone machines. *Front. Mol. Biosci.* 2017; 4: 1.

Górka A, Bonarek P. Dwie twarze struktury przestrzennej białek – zastosowanie wiedzy o białkach samoistnie nieuporządkowanych w racjonalnym projektowaniu leków. *Studia i Materiały Informatyki Stosowanej* 2013; 5: 7-12.

Grabsztunowicz M, Górski Z, Luciński R, Jackowski G. A reversible decrease in ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase carboxylation activity caused by the aggregation of the enzyme's large subunit is triggered in response to the exposure of moderate irradiance-grown plants to low irradiance. *Physiol. Plant.* 2015; 154: 591-608.

Grabsztunowicz M, Luciński R, Baranek M, Sikora B, Jackowski G. Proteazy chloroplastowe Deg. *Postępy Biochem.* 2011; 57: 109-14.

Guenther I, Kędzierska-Mieszkowska S. System kontroli jakości białek w cytoplazmie - rola białek opiekuńczych. *Postępy Biochem.* 2011; 57: 275-82.

Gupta D, Tuteja N. Chaperones and foldases in endoplasmic reticulum stress signaling in plants. *Plant Signal. Behav.* 2011; 6: 232-6.

Gur E, Vishkautzan M, Sauer RT. Protein unfolding and degradation by the AAA+ Lon protease. *Protein Sci.* 2012; 21: 268-78.

Gustavsson N, Kokke BP, Härndahl U, Silow M, Bechtold U, Poghosyan Z, Murphy D, Boelens WC, Sundby C. A peptide methionine sulfoxide reductase highly expressed in photosynthetic tissue in *Arabidopsis thaliana* can protect the chaperone-like activity of a chloroplast-localized small heat shock protein. *Plant J.* 2002; 29: 545-53.

Guthrie B, Wickner W. Trigger factor depletion or overproduction causes defective cell division but does not block protein export. *J. Bacteriol.* 1990; 172: 5555-62.

Haldar S, Tapia-Rojas R, Eckels EC, Valle-Orero J, Fernandez JM. Trigger factor chaperone acts as a mechanical foldase. *Nat. Commun.* 2017; 8: 668.

Han Y, Yiang H, Jiao Y. Regulation of inflorescence architecture by cytokinins. *Front. Plant Sci.* 2014; 5: 669.

Härndahl U, Hall RB, Osteryoung KW, Vierling E, Bornman JF, Sundby C. The chloroplast small heat shock protein undergoes oxidation-dependent conformational changes and may protect plants from oxidative stress. *Cell Stress Chaperones* 1999; 4: 129-38.

Hartl FU, Hayer-Hartl M. Converging concepts of protein folding *in vitro* and *in vivo*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009; 16: 574-81.

Haussühl K, Andersson B, Adamska I. A chloroplast DegP2 protease performs the primary cleavage of the photodamaged D1 protein in plant photosystem II. *EMBO J.* 2001; 20: 713-22.

Hill JE, Hemmingsen SM. *Arabidopsis thaliana* type I and II chaperonins. *Cell Stress Chaperones.* 2001; 6: 190-200.

Hisabori T, Sunamura E, Kim Y, Konno H. The chloroplast ATP synthase features the characteristic redox regulation machinery. *Antioxid. Redox Signal.* 2013; 19: 1846-54.

Hoffmann A, Bukau B, Kramer G. Structure and function of the molecular chaperone Trigger Factor. *Biochim. Biophys. Acta* 2010; 1803: 650-61.

Holmgren A. Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide. *J. Biol. Chem.* 1979; 254: 9627-32.

Hubbart S, Peng S, Horton P, Chen Y, Murchie EH. Trends in leaf photosynthesis in historical rice varieties developed in the Philippines since 1966. *J. Exp. Bot.* 2007; 58: 3429-38.

Huesgen PF, Schuhmann H, Adamska I. Photodamaged D1 protein is degraded in *Arabidopsis* mutants lacking the Deg2 protease. *FEBS Lett.* 2006; 580: 6929-32.

Inoue H, Li M, Schnell DJ. An essential role for chloroplast heat shock protein 90 (Hsp90C) in protein import into chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2013; 110: 3173-8.

Iwanczyk J, Damjanovic D, Kooistra J, Leong V, Jomaa A, Ghirlando R, Ortega J. Role of the PDZ domains in *Escherichia coli* DegP protein. *J. Bacteriol.* 2007; 189: 3176-86.

Jagodzik P, Adamiec M, Jackowski G. AtDeg2 – a chloroplast protein with dual protease/chaperone activity. *Acta Soc. Bot. Pol.* 2014; 83: 169-74.

Jakob U, Buchner J. Assisting spontaneity: the role of Hsp90 and small Hsps as molecular chaperones. *Trends Biochem. Sci.* 1994; 19: 205-11.

Jaru-Ampornpan P, Liang FC, Nisthal A, Nguyen TX, Wang P, Shen K, Mayo SL, Shan SO. Mechanism of an ATP-independent protein disaggregase: II. distinct molecular interactions drive multiple steps during aggregate disassembly. *J. Biol. Chem.* 2013; 288: 13431-45.

Jaru-Ampornpan P, Shen K, Lam VQ, Ali M, Doniach S, Jia TZ, Shan SO. ATP-independent reversal of a membrane protein aggregate by a chloroplast SRP subunit. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2010; 17: 696-702.

Jarvis P, López-Juez E. Biogenesis and homeostasis of chloroplasts and other plastids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2013; 14: 787-802.

Jee H. Size dependent classification of heat shock proteins: a mini-review. *J. Exerc. Rehabil.* 2016; 12: 255-9.

Jeng W, Lee S, Sung N, Lee J, Tsai FT. Molecular chaperones: guardians of the proteome in normal and disease states. *F1000Res.* 2015; 4: 1448.

Jiang J, Zhang X, Chen Y, Wu Y, Zhou ZH, Chang Z, Sui SF. Activation of DegP chaperone-protease via formation of large cage-like oligomers upon binding to substrate proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008; 105: 11939-44.

Jiang T, Oh ES, Bonea D, Zhao R. HSP90C interacts with PsbO1 and facilitates its thylakoid distribution from chloroplast stroma in *Arabidopsis*. *PLoS One* 2017; 12: e0190168.

Johnston CL, Marzano NR, van Oijen AM, Ecroyd H. Using single-molecule approaches to understand the molecular mechanisms of heat-shock protein chaperone function. *J. Mol. Biol.* 2018; 430: 4525-46.

Kaiser CM, Liu K. Folding up and moving on-nascent protein folding on the ribosome. *J. Mol. Biol.* 2018; 430: 4580-91.

Kampinga HH, Craig EA. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2010; 11: 579-92.

Kapri-Pardes E, Naveh L, Adam Z. The thylakoid lumen protease Deg1 is involved in the repair of photosystem II from photoinhibition in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2007; 19: 1039-47.

Kato Y, Sakamoto W. FtsH protease in the thylakoid membrane: physiological functions and the regulation of protease activity. *Front. Plant Sci.* 2018; 9: 855.

Katsogiannou M, Andrieu C, Rocchi P. Heat shock protein 27 phosphorylation state is associated with cancer progression. *Front. Genet.* 2014; 5: 346.

Ke X, Zou W, Ren Y, Wang Z, Li J, Wu X, Zhao J. Functional divergence of chloroplast Cpn60 α subunits during *Arabidopsis* embryo development. *PLoS Genet.* 2017; 13: e1007036.

Khan RH, Siddiqui MK, Salahuddin P. Protein disulfide isomerase: structure, mechanism of oxidative protein folding and multiple functional roles. *J. Biochem. Mol. Biol. Res.* 2016; 2: 173-9.

Kim J, Olinares PD, Oh SH, Ghisaura S, Poliakov A, Ponnala L, van Wijk KJ. Modified Clp protease complex in the ClpP3 null mutant and consequences for chloroplast development and function in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2013; 162: 157-79.

Kim S, Grant RA, Sauer RT. Covalent linkage of distinct substrate degrons controls assembly and disassembly of DegP proteolytic cages. *Cell* 2011; 145: 67-78.

Kincaid DT, Schneider RB. Quantification of leaf shape with a microcomputer and Fourier transform. *Can. J. Bot.* 1983; 61: 2333-42

Kirstein J, Molière N, Dougan DA, Turgay K. Adapting the machine: adaptor proteins for Hsp100/Clp and AAA+ proteases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2009; 7: 589-99.

Kiyosue T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Characterization of cDNA for a dehydration-inducible gene that encodes a CLP A, B-like protein in *Arabidopsis thaliana* L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993; 196: 1214-20.

Kley J, Schmidt B, Boyanov B, Stolt-Bergner PC, Kirk R, Ehrmann M, Knopf RR, Naveh L, Adam Z, Clausen T. Structural adaptation of the plant protease Deg1 to repair photosystem II during light exposure. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2011; 18: 728-31.

Knopf RR, Adam Z. Lumenal exposed regions of the D1 protein of PSII are long enough to be degraded by the chloroplast Deg1 protease. *Sci. Rep.* 2018; 8: 5230.

Kohzuma K, Dal Bosco C, Kanazawa A, Dhingra A, Nitschke W, Meurer J, Kramer DM. Thioredoxin-insensitive plastid ATP synthase that performs moonlighting functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012; 109: 3293-8.

Kotak S, Larkindale J, Lee U, von Koskull-Döring P, Vierling E, Scharf KD. Complexity of the heat stress response in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2007; 10: 310-6.

Krishna P, Gloor G. The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Stress Chaperones* 2001; 6: 238-46.

Krojer T, Sawa J, Schäfer E, Saibil HR, Ehrmann M, Clausen T. Structural basis for the regulated protease and chaperone function of DegP. *Nature* 2008; 453: 885-90.

Kumar CM, Mande SC, Mahajan G. Multiple chaperonins in bacteria—novel functions and non-canonical behaviors. *Cell Stress Chaperones* 2015; 20: 555-74.

Lackie RE, Maciejewski A, Ostapchenko VG, Marques-Lopes J, Choy WY, Duennwald ML, Prado VF, Prado MAM. The Hsp70/Hsp90 chaperone machinery in neurodegenerative diseases. *Front. Neurosci.* 2017; 11: 254.

Lancashire PD, Bleiholder H, Van Den Boom T, Landgeluddeke P, Strauss R, Weber E, Witzemberger A. A uniform decimal code for growth stages of crops and weeds. *Ann. Appl. Biol.* 1991; 119: 561-601.

Laskey RA, Honda BM, Mills AD, Finch JT. Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature* 1978; 275: 416-20.

Lee JR, Lee SS, Jang HH, Lee YM, Park JH, Park SC, Moon JC, Park SK, Kim SY, Lee SY, Chae HB, Jung YJ, Kim WY, Shin MR, Cheong GW, Kim MG, Kang KR, Lee KO, Yun DJ, Lee SY. Heat-shock dependent oligomeric status alters the function of a plant-specific thioredoxin-like protein, AtTDX. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009; 106: 5978-83.

Lee U, Rioflorido I, Hong SW, Larkindale J, Waters ER, Vierling E. The *Arabidopsis* ClpB/Hsp100 family of proteins: chaperones for stress and chloroplast development. *Plant J.* 2007; 49: 115-27.

Leonhard K, Stiegler A, Neupert W, Langer T. Chaperone-like activity of the AAA domain of the yeast Yme1 AAA protease. *Nature* 1999; 398: 348-51.

Leopold PE, Montal M, Onuchic JN. Protein folding funnels: a kinetic approach to the sequence-structure relationship. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992; 89: 8721-5.

Li N, Li Y. Signaling pathways of seed size control in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2016; 33: 23-32.

Li T, Jiang HL, Tong YG, Lu JJ. Targeting the Hsp90-Cdc37-client protein interaction to disrupt Hsp90 chaperone machinery. *J. Hematol. Oncol.* 2018; 11: 59.

Liljegren SJ, Ditta GS, Eshed Y, Savidge B, Bowman JL, Yanofsky MF. *SHATTERPROOF* MADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis*. *Nature* 2000; 404: 766-70.

Liljegren SJ, Roeder AH, Kempin SA, Gremski K, Østergaard L, Guimil S, Reyes DK, Yanofsky MF. Control of fruit patterning in *Arabidopsis* by INDEHISCENT. *Cell* 2004; 116: 843-53.

- Lipińska B, Sharma S, Georgopoulos C. Sequence analysis and regulation of the *htrA* gene of *Escherichia coli*: a σ^{32} -independent mechanism of heat-inducible transcription. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16: 10053-67.
- Liu C, Teo ZW, Bi Y, Song S, Xi W, Yang X, Yin Z, Yu H. A conserved genetic pathway determines inflorescence architecture in *Arabidopsis* and rice. *Dev. Cell* 2013; 24: 612-22.
- Liu C, Willmund F, Golecki JR, Cacace S, Hess B, Markert C, Schroda M. The chloroplast HSP70B-CDJ2-CGE1 chaperones catalyse assembly and disassembly of VIPP1 oligomers in *Chlamydomonas*. *Plant J.* 2007; 50: 265-77.
- Liu C, Willmund F, Whitelegge JP, Hawat S, Knapp B, Lodha M, Schroda M. J-Domain protein CDJ2 and HSP70B are a plastidic chaperone pair that interacts with vesicle-inducing protein in plastids 1. *Mol. Biol. Cell* 2005; 16: 1165-77.
- Llamas E, Pulido P, Rodriguez-Concepcion M. Interference with plastome gene expression and Clp protease activity in *Arabidopsis* triggers a chloroplast unfolded protein response to restore protein homeostasis. *PLoS Genet.* 2017; 13: e1007022.
- Lobo F, de Barros MP, Dalmagro HJ, Dalmolin ÂC, Pereira WE, de Souza ÉC, Vourlitis GL, Rodríguez Ortiz CE. Fitting net photosynthetic light-response curves with Microsoft Excel — a critical look at the models. *Photosynthetica* 2013; 51: 445-56.
- Long SP, Bernacchi CJ. Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error. *J. Exp. Bot.* 2003; 54: 2393-401.
- Luciński R, Jackowski G. AtFtsH heterocomplex-mediated degradation of apoproteins of the major light harvesting complex of photosystem II (LHCII) in response to stresses. *J. Plant Physiol.* 2013; 170: 1082-9.
- Luciński R, Misztal L, Samardakiewicz S, Jackowski G. The thylakoid protease Deg2 is involved in stress-related degradation of the photosystem II lightharvesting protein Lhcb6 in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* 2011; 192: 74-86.
- Malet H, Canellas F, Sawa J, Yan J, Thalassinou K, Ehrmann M, Clausen T, Saibil HR. Newly folded substrates inside the molecular cage of the HtrA chaperone DegQ. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2012; 19: 152-7.
- Massonnet C, Vile D, Fabre J, Hannah MA, Caldana C, Lisec J, Beemster GT, Meyer RC, Messerli G, Gronlund JT, Perkovic J, Wigmore E, May S, Bevan MW, Meyer C, Rubio-Díaz S, Weigel D, Micol JL, Buchanan-Wollaston V, Fiorani F, Walsh S, Rinn B, Grissem W, Hilson P, Hennig L, Willmitzer L, Granier C. Probing the reproducibility of leaf

growth and molecular phenotypes: a comparison of three *Arabidopsis* accessions cultivated in ten laboratories. *Plant Physiol.* 2010; 152: 2142-57.

Mokry DZ, Abrahão J, Ramos CH. Disaggregases, molecular chaperones that resolubilize protein aggregates. *An. Acad. Bras. Cienc.* 2015; 87: 1273-92.

Moldavski O, Levin-Kravets O, Ziv T, Adam Z, Prag G. The hetero-hexameric nature of a chloroplast AAA+ FtsH protease contributes to its thermodynamic stability. *PLoS One* 2012; 7: e36008.

Moore T, Keegstra K. Characterization of a cDNA clone encoding a chloroplast-targeted Clp homologue. *Plant Mol. Biol.* 1993; 21: 525-37.

Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962; 15: 473-97.

Mymrikov EV, Daake M, Richter B, Haslbeck M, Buchner J. The chaperone activity and substrate spectrum of human small heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* 2017; 292: 672-84.

Myouga F, Motohashi R, Kuromori T, Nagata N, Shinozaki K. An *Arabidopsis* chloroplast-targeted Hsp101 homologue, APG6, has an essential role in chloroplast development as well as heat-stress response. *Plant J.* 2006; 48: 249-60.

Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 1988; 9: 255-62.

Niforou K, Cheimonidou C, Trougakos IP. Molecular chaperones and proteostasis regulation during redox imbalance. *Redox Biol.* 2014; 2: 323-32.

Nikkanen L, Rintamäki E. Thioredoxin-dependent regulatory networks in chloroplasts under fluctuating light conditions. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 2014; 369: 20130224.

Nillegoda NB, Kirstein J, Szlachcic A, Berynskyy M, Stank A, Stengel F, Arnsburg K, Gao X, Scior A, Aebersold R, Guilbride DL, Wade RC, Morimoto RI, Mayer MP, Bukau B. Crucial HSP70 co-chaperone complex unlocks metazoan protein disaggregation. *Nature* 2015; 524: 247-51.

Ögren E, Evans JR. Photosynthetic light response curves: I. The influence of CO₂ partial pressure and leaf inversion. *Planta* 1993; 189, 182-190.

Ögren E. Convexity of the photosynthetic light-response curve in relation to intensity and direction of light during growth. *Plant Physiol.* 1993; 101: 1013-1019.

- Ogura T, Tomoyasu T, Yuki T, Morimura S, Begg KJ, Donachie WD, Mori H, Niki H, Hiraga S. Structure and function of the *ftsH* gene in *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* 1991; 142: 279-82.
- Oh SE, Yeung C, Babaei-Rad R, Zhao R. Cosuppression of the chloroplast localized molecular chaperone HSP90.5 impairs plant development and chloroplast biogenesis in *Arabidopsis*. *BMC Res. Notes* 2014; 7: 643.
- Olejniki P, Nuc K. Cyklofiliny - białka o wielu funkcjach. *Postępy Biochem.* 2018; 64: 46-54.
- Orozco-Cardenas M, Ryan CA. Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999; 96: 6553-7.
- Ortega J, Iwanczyk J, Jomaa A. *Escherichia coli* DegP: a structure-driven functional model. *J. Bacteriol.* 2009; 191: 4705-13.
- Ostersetzer O, Kato Y, Adam Z, Sakamoto W. Multiple intracellular locations of Lon protease in *Arabidopsis*: evidence for the localization of AtLon4 to chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 2007; 48: 881-5.
- Paila YD, Richardson LGL, Schnell DJ. New insights into the mechanism of chloroplast protein import and its integration with protein quality control, organelle biogenesis and development. *J. Mol. Biol.* 2015; 427: 1038-60.
- Park CJ, Seo YS. Heat Shock Proteins: A review of the molecular chaperones for plant immunity. *Plant Pathol. J.* 2015; 31: 323-33.
- Pauling L, Corey HR, Branson HR. The structure of proteins; two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1951; 37: 205-11.
- Pemberton TJ, Kay JE. Identification and comparative analysis of the peptidyl-prolyl cis/trans isomerase repertoires of *H. sapiens*, *D. melanogaster*, *C. elegans*, *S. cerevisiae* and *Sz. pombe*. *Comp. Funct. Genomics* 2005; 6: 277-300.
- Ponting CP. Evidence for PDZ domains in bacteria, yeast, and plants. *Protein Sci.* 1997; 6: 464-8.
- Priya S, Sharma SK, Goloubinoff P. Molecular chaperones as enzymes that catalytically unfold misfolded polypeptides. *FEBS Lett.* 2013; 587: 1981-7.
- Pujar A, Jaiswal P, Kellogg EA, Ilic K, Vincent L, Avraham S, Stevens P, Zapata F, Reiser L, Rhee SY, Sachs MM, Schaeffer M, Stein L, Ware D, McCouch S. Whole-plant growth

stage ontology for angiosperms and its application in plant biology. *Plant Physiol.* 2006; 142: 414-28.

Pulido P, Leister D. Novel DNAJ-related proteins in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* 2018; 217: 480-90.

Qiu XB, Shao YM, Miao S, Wang L. The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cell Mol. Life Sci.* 2006; 63: 2560-70.

Rajani S, Sundaresan V. The *Arabidopsis* myc/bHLH gene *ALCATRAZ* enables cell separation in fruit dehiscence. *Curr. Biol.* 2001; 11: 1914-22.

Ramachandran GN, Sasisekharan V. Conformation of polypeptides and proteins. *Adv. Protein Chem.* 1968; 23: 283-438.

Reading DS, Hallberg RL, Myers AM. Characterization of the yeast *HSP60* gene coding for a mitochondrial assembly factor. *Nature* 1989; 337: 655-9.

Retkute R, Smith-Unna SE, Smith RW, Burgess AJ, Jensen OE, Johnson GN, Preston SP, Murchie EH. Exploiting heterogeneous environments: does photosynthetic acclimation optimize carbon gain in fluctuating light? *J. Exp. Bot.* 2015; 66: 2437-47.

Rosenzweig R, Farber P, Velyvis A, Rennella E, Latham MP, Kay LE. ClpB N-terminal domain plays a regulatory role in protein disaggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2015; 112: E6872-81.

Rouhier N. Plant glutaredoxins: pivotal players in redox biology and iron-sulphur centre assembly. *New Phytol.* 2010; 186: 365-72.

Rühle T, Leister D. Assembly of F₁F₀-ATP synthases. *Biochim. Biophys. Acta* 2015; 1847: 849-60.

Rühle T, Leister D. Photosystem II assembly from scratch. *Front. Plant Sci.* 2016; 6: 1234.

Saibil H. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2013; 14: 630-42.

Sakamoto W, Zaltsman A, Adam Z, Takahashi Y. Coordinated regulation and complex formation of *yellow variegated1* and *yellow variegated2*, chloroplastic FtsH metalloproteases involved in the repair cycle of photosystem II in *Arabidopsis* thylakoid membranes. *Plant Cell* 2003; 15: 2843-55.

Sawa J, Malet H, Krojer T, Canellas F, Ehrmann M, Clausen T. Molecular adaptation of the DegQ protease to exert protein quality control in the bacterial cell envelope. *J. Biol. Chem.* 2011; 286: 30680-90.

Scharf KD, Siddique M, Vierling E. The expanding family of *Arabidopsis thaliana* small heat stress proteins and a new family of proteins containing alpha-crystallin domains (Acid proteins). *Cell Stress Chaperones* 2001; 6: 225-37.

Schopf FH, Biebl MM, Buchner J. The HSP90 chaperone machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2017; 18: 345-60.

Schroda M, Vallon O, Wollman FA, Beck CF. A chloroplast-targeted heat shock protein 70 (HSP70) contributes to the photoprotection and repair of photosystem II during and after photoinhibition. *Plant Cell* 1999; 11: 1165-78.

Schubert M, Petersson UA, Haas BJ, Funk C, Schröder WP, Kieselbach T. Proteome map of the chloroplast lumen of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 8354-65.

Schuhmann H, Huesgen P, Adamska I. The family of Deg/HtrA proteases in plants. *BMC Plant Biol.* 2012; 12: 52.

Seidman CE, Struhl K, Sheen J, Jessen T. Introduction of plasmid DNA into cells. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2001; Chapter 1: Unit 1.8.

Shanklin J, DeWitt ND, Flanagan JM. The stroma of higher plant plastids contain ClpP and ClpC, functional homologs of *Escherichia coli* ClpP and ClpA: an archetypal two-component ATP-dependent protease. *Plant Cell* 1995; 7: 1713-22.

Sharkey TD. What gas exchange data can tell us about photosynthesis. *Plant Cell Environ.* 2016; 39: 1161-3.

Shrestha R, Gómez-Ariza J, Brambilla V, Fornara F. Molecular control of seasonal flowering in rice, arabidopsis and temperate cereals. *Ann. Bot.* 2014; 114: 1445-58.

Singsaas EL, Ort DR, DeLucia EH. Variation in measured values of photosynthetic quantum yield in ecophysiological studies. *Oecologia* 2001; 128: 15-23.

Sjögren LL, MacDonald TM, Sutinen S, Clarke AK. Inactivation of the *clpC1* gene encoding a chloroplast Hsp100 molecular chaperone causes growth retardation, leaf chlorosis, lower photosynthetic activity, and a specific reduction in photosystem content. *Plant Physiol.* 2004; 136: 4114-26.

Sjögren LL, Stanne TM, Zheng B, Sutinen S, Clarke AK. Structural and functional insights into the chloroplast ATP-dependent Clp protease in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2006; 18: 2635-49.

Sjögren LL, Tanabe N, Lympieropoulos P, Khan NZ, Rodermeel SR, Aronsson H, Clarke AK. Quantitative analysis of the chloroplast molecular chaperone ClpC/Hsp93 in *Arabidopsis* reveals new insights into its localization, interaction with the Clp proteolytic core, and functional importance. *J. Biol. Chem.* 2014; 289: 11318-30.

Skillman JB. Quantum yield variation across the three pathways of photosynthesis: not yet out of the dark. *J. Exp. Bot.* 2008; 59: 1647-61.

Skórko-Glonek J, Laskowska E, Sobiecka-Szkatuła A, Lipińska B. Characterization of the chaperone-like activity of HtrA (DegP) protein from *Escherichia coli* under the conditions of heat shock. *Arch. Biochem. Biophys.* 2007; 464: 80-9.

Skórko-Glonek J, Sobiecka-Szkatuła A, Narkiewicz J, Lipińska B. The proteolytic activity of the HtrA (DegP) protein from *Escherichia coli* at low temperatures. *Microbiology* 2008; 154: 3649-58.

Skórko-Glonek J, Żurawa D, Kuczwara E, Woźniak M, Wypych Z, Lipińska B. The *Escherichia coli* heat shock protease HtrA participates in defense against oxidative stress. *Mol. Gen. Genet.* 1999; 262: 342-50.

Song H, Fan P, Li Y. Overexpression of organellar and cytosolic *AtHSP90* in *Arabidopsis thaliana* impairs plant tolerance to oxidative stress. *Plant Mol. Biol. Rep.* 2009; 27: 342-9.

Spiess C, Beil A, Ehrmann M. A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell* 1999; 97: 339-47.

Srisutthisamphan K, Jirakanwisal K, Ramphan S, Tongluan N, Kuadkitkan A, Smith DR. Hsp90 interacts with multiple dengue virus 2 proteins. *Sci. Rep.* 2018; 8: 4308.

Strauch KL, Beckwith J. An *Escherichia coli* mutation preventing degradation of abnormal periplasmic proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 1988; 85: 1576-80.

Ströher E, Dietz KJ. The dynamic thiol-disulphide redox proteome of the *Arabidopsis thaliana* chloroplast as revealed by differential electrophoretic mobility. *Physiol. Plant.* 2008; 133: 566-83.

Su PH, Li HM. *Arabidopsis* stromal 70-kD heat shock proteins are essential for plant development and important for thermotolerance of germinating seeds. *Plant Physiol.* 2008; 146: 1231-41.

Subrini O, Betton JM. Assemblies of DegP underlie its dual chaperone and protease function. *FEMS Microbiol. Lett.* 2009; 296: 143-8.

Suetsugu N, Kagawa T, Wada M. An auxilin-like J-domain protein, JAC1, regulates phototropin-mediated chloroplast movement in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2005; 139: 151-62.

Sun R, Fan H, Gao F, Lin Y, Zhang L, Gong W, Liu L. Crystal structure of *Arabidopsis* Deg2 protein reveals an internal PDZ ligand locking the hexameric resting state. *J. Biol. Chem.* 2012; 287: 37564-9.

- Sun X, Ouyang M, Guo J, Ma J, Lu C, Adam Z, Zhang L. The thylakoid protease Deg1 is involved in photosystem-II assembly in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 2010; 62: 240-9.
- Sung DY, Vierling E, Guy CL. Comprehensive expression profile analysis of the *Arabidopsis Hsp70* gene family. *Plant Physiol.* 2001; 126: 789-800.
- Suss O, Reichmann D. Protein plasticity underlines activation and function of ATP-independent chaperones. *Front. Mol. Biosci.* 2015; 2: 43.
- Suzuki K, Nakanishi H, Bower J, Yoder DW, Osteryoung KW, Miyagishima SY. Plastid chaperonin proteins Cpn60 α and Cpn60 β are required for plastid division in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol.* 2009; 9: 38.
- Takahashi N, Hayano T, Suzuki M. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature* 1989; 337: 473-5.
- Tanz SK, Castleden I, Hooper CM, Small I, Millar AH. Using the SUBcellular database for *Arabidopsis* proteins to localize the Deg protease family. *Front. Plant Sci.* 2014; 5: 396.
- Trösch R, Mühlhaus T, Schroda M, Willmund F. ATP-dependent molecular chaperones in plastids—More complex than expected. *Biochim. Biophys. Acta* 2015; 1847: 872-88.
- Urantowka A, Knorpp C, Olczak T, Kolodziejczak M, Janska H. Plant mitochondria contain at least two i-AAA-like complexes. *Plant Mol. Biol.* 2005; 59: 239-52.
- Vitha S, Froehlich JE, Koksharova O, Pyke KA, Erp HV, Osteryoung KW. ARC6 is a J-domain plastid division protein and an evolutionary descendant of the cyanobacterial cell division protein Ftn2. *Plant Cell* 2003; 15: 1918-33.
- Vitlin Gruber A, Feiz L. Rubisco assembly in the chloroplast. *Front. Mol. Biosci.* 2018; 5: 24.
- Waller PR, Sauer RT. Characterization of *degQ* and *degS*, *Escherichia coli* genes encoding homologs of the DegP protease. *J. Bacteriol.* 1996; 178: 1146-53.
- Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci.* 2004; 9: 244-52.
- Waters ER. The evolution, function, structure, and expression of the plant sHSPs. *J. Exp. Bot.* 2013; 64: 391-403.
- Western TL, Skinner DJ, Haughn GW. Differentiation of mucilage secretory cells of the *Arabidopsis* seed coat. *Plant Physiol.* 2000; 122: 345-56.
- Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ. An “electronic fluorescent pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One* 2007; 2: e718.

Wise RR, Naylor AW. Chilling-enhanced photooxidation: evidence for the role of singlet oxygen and superoxide in the breakdown of pigments and endogenous antioxidants. *Plant Physiol.* 1987a; 83: 278-82.

Wise RR, Naylor AW. Chilling-enhanced photooxidation: the peroxidative destruction of lipids during chilling injury to photosynthesis and ultrastructure. *Plant Physiol.* 1987b; 83: 272-7.

Wu FH, Shen SC, Lee LY, Lee SH, Chan MT, Lin CS. Tape-*Arabidopsis* Sandwich - a simpler *Arabidopsis* protoplast isolation method. *Plant Methods* 2009; 24; 5: 16.

Wu G, Poethig RS. Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by miR156 and its target SPL3. *Development* 2006; 133: 3539-47.

Wyżewski Z, Gregorczyk KP, Szulc-Dąbrowska L, Struzik J, Szczepanowska J, Niemiałtowski M. Współdziałanie białek szoku cieplnego w organizowaniu struktury przestrzennej białek. *Postepy Hig. Med. Dosw. (online)* 2014; 68: 793-807.

Xanthoudakis S, Roy S, Rasper D, Hennessey T, Aubin Y, Cassady R, Tawa P, Ruel R, Rosen A, Nicholson DW. Hsp60 accelerates the maturation of pro-caspase-3 by upstream activator proteases during apoptosis. *EMBO J.* 1999; 18: 2049-56.

Xiao Y, Tholen D, Zhu XG. The influence of leaf anatomy on the internal light environment and photosynthetic electron transport rate: exploration with a new leaf ray tracing model. *J. Exp. Bot.* 2016; 67: 6021-6035.

Xin X, Chen W, Wang B, Zhu F, Li Y, Yang H, Li J, Ren D. *Arabidopsis* MKK10-MPK6 mediates red-light-regulated opening of seedling cotyledons through phosphorylation of PIF3. *J. Exp. Bot.* 2018; 69: 423-39.

Yang H, Liu J, Wen X, Lu C. Molecular mechanism of photosystem I assembly in oxygenic organisms. *Biochim. Biophys. Acta* 2015; 1847: 838-48.

Zadoks JC, Chang TT, Konzak FC. A decimal code for growth stages of cereals. *Weed Res.* 1974; 14: 415-21.

Zhao Q, Liu C. Chloroplast chaperonin: an intricate protein folding machine for photosynthesis. *Front. Mol. Biosci.* 2018; 4: 98.

Zhong L, Zhou W, Wang H, Ding S, Lu Q, Wen X, Peng L, Zhang L, Lu C. Chloroplast small heat shock protein HSP21 interacts with plastid nucleoid protein pTAC5 and is essential for chloroplast development in *Arabidopsis* under heat stress. *Plant Cell* 2013; 25: 2925-43.

Zienkiewicz M, Ferenc A, Wasilewska W, Romanowska E. High light stimulates Deg1-dependent cleavage of the minor LHCII antenna proteins CP26 and CP29 and PsbS protein in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 2012; 235: 279-88.