

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

Małgorzata Baranek

Funkcje fizjologiczne chloroplastowej proteazy AtDeg5

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

Poznań 2015

Serdecznie dziękuję

Mojemu Promotorowi, Panu Prof. dr hab. Grzegorzowi Jackowskiemu za przekazaną wiedzę, opiekę naukową, konstruktywne i cenne uwagi merytoryczne, poświęcony czas oraz nieocenioną pomoc, życzliwość i cierpliwość podczas pisania pracy,

Prof. nadzw. dr hab. Iwonie Ciereszko i dr Edycie Łukaszuk za podzielenie się doświadczeniem w obszarze oznaczeń poziomu akumulacji skrobi,

Dr hab. Tomaszowi Wyce za wprowadzenie w świat analiz aktywności fotosyntetycznej, pomoc oraz cenne rady dotyczące prowadzenia doświadczeń,

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

Moim Najbliższym za bycie dla mnie oparciem i za wyrozumiałość,

Wszystkim, którzy wspierali moje dążenia naukowe.

Spis treści

1	Wstęp	5
1.1	Analiza funkcjonalna genów - strategia odwrotnej genetyki	5
1.2	Regulacyjna rola hydrolizy białek katalizowanej przez proteazy	9
1.3	Klasyfikacja proteaz	10
1.3.1	Definicja klas, podklas, pod-podklas, klanów, rodzin i podrodzin	10
1.3.2	Mechanizmy katalizy enzymatycznej przeprowadzanej przez proteazy należące do najważniejszych klas według (nieoficjalnego) systemu klasyfikacyjnego zastosowanego do konstrukcji bazy <i>MEROPS</i>	11
1.4	Proteazy <i>Escherichia coli</i>	13
1.4.1	Clp <i>E. coli</i>	14
1.4.2	Deg <i>E. coli</i>	15
1.4.3	FtsH <i>E.coli</i>	17
1.4.4	Lon <i>E.coli</i>	19
1.5	Proteazy komórek roślinnych	19
1.5.1	UPS (ubikwityna – proteasom 26S)	20
1.5.2	Wakuole lityczne	22
1.5.3	Autofagia	22
1.5.4	Proteazy mitochondrialne	23
1.5.5	Proteazy peroksysomalne	26
1.5.6	Proteazy światła ER.....	26
1.5.7	Proteazy chloroplastowe Clp, Deg, FtsH, Lon <i>A. thaliana</i>	26
1.6	Przebieg ontogenezy <i>A. thaliana</i>	44
1.7	Fotosynteza.....	45
2	Cele pracy (cel strategiczny i cele cząstkowe)	48
3	Materiały i metody	51
3.1	Materiał roślinny	51
3.2	Izolacja genomowego DNA	51
3.3	PCR.....	52
3.4	Izolacja tylakoidów i błon zespolonych tylakoidów gran	53

3.5	Techniki elektroforetyczne	54
3.5.1	Elektroforeza DNA	54
3.5.2	Denaturująca elektroforeza białkowa (SDS-PAGE) i obliczanie liczby trimerów LHCII przypadających na monomeryczny rdzeń PSII	55
3.6	Doświadczenia typu „immunoblot”	57
3.6.1	Elektrotransfer białek na błonę PVDF.....	57
3.6.2	Immunodetekcja białek	58
3.6.3	Analiza obrazu błon PVDF po przeprowadzeniu procedury „immunoblot” ..	59
3.7	Analiza chronologii przebiegu faz i podfaz ontogenezy <i>A. thaliana</i>	59
3.8	Analizy morfologiczne	61
3.8.1	Analizy morfologiczne liści	61
3.8.2	Analizy morfologiczne organów generatywnych	61
3.9	Techniki mikroskopowe	61
3.9.1	Mikroskop świetlny.....	61
3.9.2	Transmisyjny mikroskop elektronowy (TEM).....	62
3.9.3	Skaningowy mikroskop elektronowy (SEM).....	64
3.10	Oznaczanie skrobi.....	64
3.11	Analizy aktywności fotosyntetycznej.....	65
3.11.1	Krzywa świetlna	66
3.11.2	Krzywa A/C _i ("dwutlenkowa")	67
3.12	Oznaczanie chlorofilu	68
3.12.1	Oznaczanie chlorofilu metodą Arnona	68
3.12.2	Oznaczanie chlorofilu z wykorzystaniem DMSO	69
3.13	Analizy statystyczne.....	70
4	Wyniki	71
4.1	Identyfikacja homozygotycznych mutantów, u których wyciszono <i>AtDEG5</i>	71
4.2.	Porównawcza analiza fenotypu roślin WT i mutantów <i>deg5</i>	73
4.2.1	Porównawcza analiza chronologii przebiegu faz i podfaz ontogenezy roślin WT i mutantów <i>deg5</i>	73
4.2.2	Porównawcza analiza wybranych cech fenotypowych mutantów <i>deg5</i> i roślin szczepu dzikiego, które osiągnęły podfazę 6.0 lub 8.9 ontogenezy	81

4.3	Interpretacja różnic między roślinami WT a mutantami <i>deg5</i> oraz różnic międzymutantowych w kategoriach wpływu dawki AtDeg5 i kompensacyjnego gromadzenia AtDeg8 na efekt fenotypowy	102
5	Dyskusja	106
	PODSUMOWANIE WYNIKÓW.....	120
	WNIOSKI.....	122
	Literatura.....	123

1 Wstęp

1.1 Analiza funkcjonalna genów - strategia odwrotnej genetyki

Jednym z obszarów zainteresowania kierowanego przez prof. dr hab. Grzegorza Jackowskiego zespołu badawczego (funkcjonującego w ramach Zakład Fizjologii Roślin Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu), w którym miałam możliwość przeprowadzenia badań, są funkcje proteaz chloroplastowych *Arabidopsis thaliana*. Wśród podejść metodycznych wykorzystywanych przez nasz zespół do rozszyfrowywania funkcji chloroplastowych enzymów proteolitycznych *A. thaliana* centralną pozycję zajmuje strategia badawcza określana jako odwrotna genetyka. Strategia odwrotnej genetyki jest jednym z filarów genomiki funkcjonalnej, której celem jest globalna funkcjonalna charakterystyka genomów; w przypadku *A. thaliana* wsparta ogromną kolekcją mutantów insercyjnych (Azpiroz-Leehan i Feldmann, 1997; Krysan i wsp., 1999; Parinov i wsp., 1999; Speulman i wsp., 1999; Tissier i wsp., 1999; Parinov i Sundaresan, 2000; Sussman i wsp., 2000).

Odwrotna genetyka odwraca klasyczny tok postępowania badawczego genetyki, polegający na identyfikowaniu genu odpowiedzialnego za określoną, precyzyjnie zdefiniowaną cechę fenotypową. Strategia odwrotnej genetyki zmierza do odkrywania funkcji dobrze scharakteryzowanych, w pełni zsekwencjonowanych genów poprzez analizę efektów fenotypowych mutacji wprowadzonych do tych genów, prowadzących do całkowitej inaktywacji, bądź zmniejszenia poziomu ekspresji. Narzędzia wykorzystywane do tworzenia populacji mutantów obejmują metody, które indukują mutacje w sposób losowy (nie umiemy przewidzieć z góry, jaki gen zostanie zmutowany): mutagenезę fizyczną (promieniowanie jonizujące – X, γ , α , β , protony oraz neutrony; elektromagnetyczne i ultrafioletowe), chemiczną (np. związki alkilujące; EMS) i genetyczną (np. mutagenезa insercyjna) i genetyczne metody mutagenезy ukierunkowanej (do ściśle określonego genu zostaje wprowadzona ściśle określona mutacja).

Mutagenезa insercyjna jest podejściem opartym na transformacji roślin rzodkiewnika zawiesiną bakterii glebowych *Agrobacterium* (głównie *A. tumefaciens*, dużo rzadziej - *A. rhizogenes*). *A. tumefaciens* to bakteria patogenna, wykazującą zdolność

do infekcji systemu korzeniowego wielu gatunków roślin (w tym *A. thaliana*) oraz integracji z DNA komórek gospodarza odcinka dwuniciowego DNA o długości ok. 20 kpz (określanego jako T-DNA), wchodzącego w skład struktury własnego plazmidu Ti (struktura kolista, dwuniciowa o długości ok. 200 kpz). W warunkach naturalnych integracja T-DNA z genomem gospodarza i ekspresja informacji genetycznej zawartej w T-DNA prowadzi do transformacji komórek gospodarza (Hwang i wsp., 2010), niekontrolowanego wzrostu komórek korzenia, czego końcowym efektem jest powstanie specyficznych, chorobowych narośli (guzów, tumorów) określanych w języku angielskim jako *crown-galls*. T-DNA zawiera geny kontrolujące syntezę auksyn i cytokinin, których ekspresja prowadzi do zaburzenia równowagi hormonalnej i utworzenia wspomnianych nowotworowatych narośli w miejscu zakażenia. Poza nimi zawiera także geny kontrolujące syntezę opin – produktów kondensacji aminokwasów z ketokwasami i cukrami (opiny są wykorzystywane przez *A. tumefaciens* jako źródło azotu i energii - Akiyoshi i wsp., 1984, Schröder i wsp., 1984). W proces integracji T-DNA z genomem gospodarza zaangażowane są

- a) dwa powtórzenia sekwencji granicznych (tzn. znajdujących się na lewej - LB i prawej - RB - granicy między T-DNA i resztą sekwencji plazmidu Ti) o długości 24-25pz,
- b) geny wirulencji (*Vir*) o długości ok. 30-40 kpz, zlokalizowane w obrębie Ti, ale poza T-DNA. Geny wirulencji są zgrupowane w sześć operonów (*Vir A - E* oraz *VirG*) i niosą informacje o czynnikach wirulencji niezbędnych dla dojścia do skutku sekwencji wydarzeń prowadzących do transformacji komórek gospodarza, tzn. syntezy włókienek celulozowych, które łączą komórkę *A. tumefaciens* z komórką gospodarza, powstania specyficznych pili niezbędnych do wprowadzenia T-DNA do cytoplazmy komórki gospodarza, wycięcia T-DNA i utworzenia przez ten odcinek kompleksu T-DNA/białko umożliwiającego wprowadzenie T-DNA do jądra komórkowego i integrację z genomem gospodarza (Gelvin, 2009),
- c) geny zlokalizowane poza plazmidem Ti.

Warto dodać, że plazmid Ti zawiera także rejon ORI (*origin of replication*), którego zadaniem jest kontrola namnażania plazmidu.

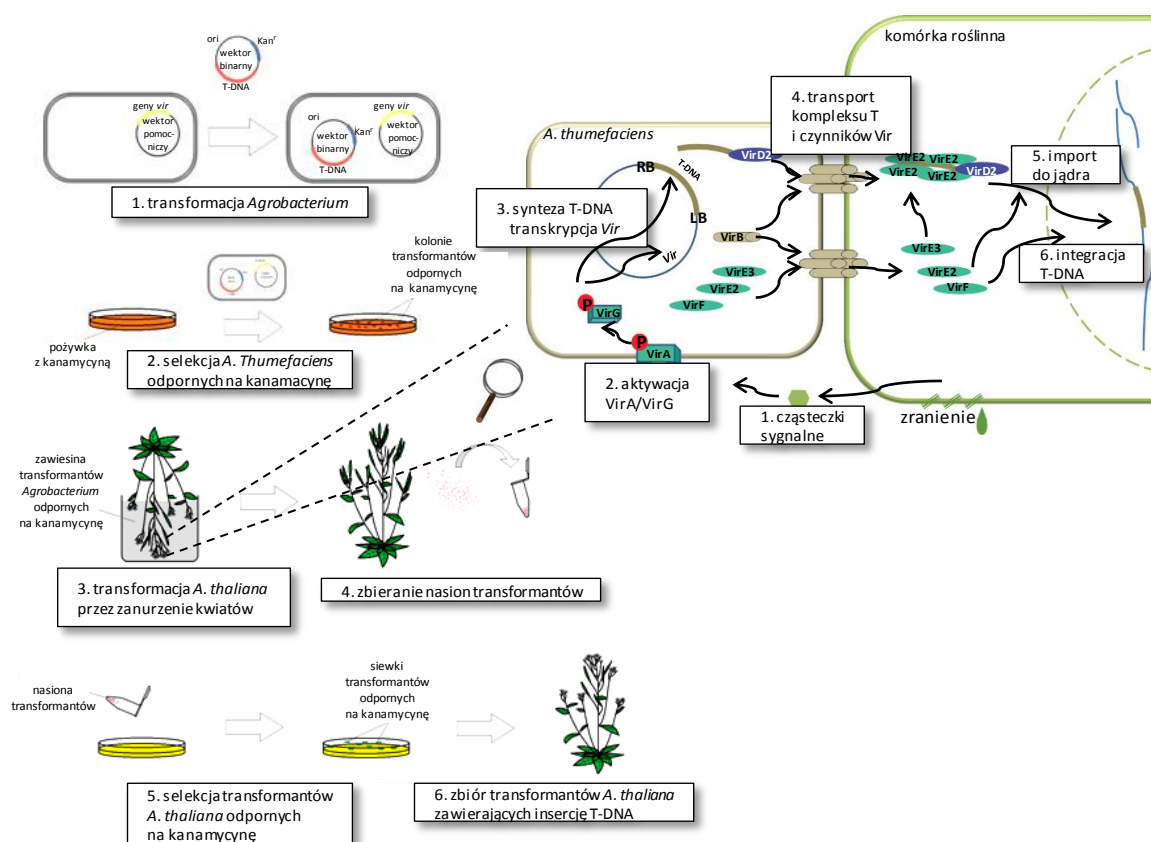
Komórki *A. tumefaciens* wnikają do korzeni roślin-gospodarzy przez zranione tkanki. Na skutek zranienia komórek gospodarza indukowane jest wydzielanie związków fenolowych, będących induktorami genów *Vir*, a przyłączone do komórek roślinnych

komórki bakteryjne zaczynają wydzielać białka VirA, które aktywują białka VirG, a dzięki nim z kolei aktywowane są pozostałe geny wirulencji zlokalizowane w plazmidzie Ti (Shimoda i wsp., 1990, Winans i wsp., 1988). W sytuacji, gdy w otoczeniu jest małe stężenie związków fenolowych, białko VirA współpracuje z transporterem monosacharydów ChvE, który uwrażliwia VirA na związki fenolowe (McCullen i Bins, 2006). VirD1 i VirD2 (endonukleazy) poprzez nacięcie jednej nici DNA wycinają T-DNA z plazmidu Ti w obszarze LB, a do miejsca nacięcia przyłączają się VirD2 i VirE2 tworząc białkowo-nukleinowy kompleks T, zawierający jądrowe sekwencje sygnałne NLS (*nuclear localization signal*), odpowiedzialne za transport DNA do jądra komórki roślinnej. VirD2 może asocjować z białkami roślinnymi - importynami α (Gelvin, 2003). Kompleks T-DNA/białko przenoszony jest kanałem transferowym utworzonym z białek VirB i VirD4, a proces ten jest stymulowany przez produkty genów *VirC1* i *VirC2*. W proces przenoszenia T-DNA oprócz genów plazmidowych zaangażowane są także geny *chv* (*chromosomal virulence*) zlokalizowane w chromosomie głównym bakterii - przede wszystkim *chvA*, *chvB* i *pscA*, które odpowiedzialne są za syntezę i sekrecję β -1,2 glukanów oraz inne geny (*cel*, *att*, *ChvE*, *chvD*, *acvB*) - biorą one udział w kontroli adhezji komórek bakteryjnych do powierzchni rośliny (Gelvin, 2003, McCullen i Binns, 2006). W proces integracji T-DNA z genomem roślinnym zaangażowane są białka kompleksu T-DNA - VirD2, VirE2 (Lacroix i wsp., 2006), VirE3 i VirF (Citovsky i wsp., 2007) wraz z białkami jądrowymi gospodarza, m.in. AtKu80 i ligazami DNA. Po syntezie komplementarnej nici DNA dochodzi do integracji (o charakterze rekombinacji nieuprawnionej), która zachodzi przede wszystkim w aktywnych transkrypcyjnie regionach genomu biorcy (McCullen i Binns, 2006) (Pitzschke i Hirt, 2010).

W eksperymentalnej mutagenie insercyjnej rośliny *A. thaliana* transformuje się komórkami *A. tumefaciens* w bardzo istotny sposób zmienionymi genetycznie w stosunku do szczepu dzikiego. Stosuje się mianowicie tzw. binarny system genetyczny powstały przez umieszczenie T-DNA oraz genów *Vir* w dwóch odrębnych replikonach (wektorach). Binarny system genetyczny współtworzą: wektor binarny (zawierający rejon T-DNA i umożliwiający jego replikację w komórkach zarówno pro-, jak i eukariotycznych) (Bulgakov i wsp., 2006) i wektor pomocniczy (*vir helper*, zawierający geny wirulencji) (Lee i Gelvin, 2008, O'Malley i Ecker, 2010). Integracja T-DNA wchodzącego w skład wektora binarnego do DNA gospodarza prowadzi do poważnych zakłóceń pracy polimerazy II RNA,

których skutki mogą być różne i polegać na: efekcie *knock-out* (= *null*) (całkowita utrata ekspresji przez gen ze wstawką T-DNA), efekcie *knock-down* (obniżenie ekspresji genu ze wstawką T-DNA), efekcie *knock-on* (wzmocnienie ekspresji genu ze wstawką T-DNA zawierającą dodatkowo silny promotor 35S CaMV) oraz *knock-knock* (zmiana ekspresji wielu genów) (Krysan i wsp., 1999, Azpiroz-Leehan i Feldmann, 1997). Oczywiście do realizacji zadań badawczych, jakie stawia przed sobą nasz zespół wykorzystujemy wyłącznie mutanty *knock-out* (= *null*) oraz *knock-down*.

Na rysunku 1 przedstawiono schemat etapów składających się na proces konstruowania mutantów insercyjnych *A. thaliana* z wykorzystaniem systemu binarnego *A. tumefaciens*. Mutanty insercyjne są produkowane na masową skalę przez centra biotechnologiczne (np. Nottingham Arabidopsis Stock Center - NASC), a badacze, w tym członkowie naszego zespołu, zakupują gotowe zmutowane linie *A. thaliana* jako nasiona, z których hoduje się dojrzałe rośliny przeznaczone do badań (po homozygotyzacji, jeśli okaże się ona niezbędna).



Rys. 1 Schemat transformacji roślin *A. thaliana* przez *A. tumefaciens* z wykorzystaniem systemu binarnego, wykonywanej w światowych centrach biotechnologicznych (na podstawie Pitzschke i Hirt, 2010).

Analizy cech fenotypowych stanowiące element postępowania badawczego związanego ze stosowaniem strategii odwrotnej genetyki mogą być prowadzone na poziomie transkryptomu, proteomu, komórkowym, tkankowym, czy organizmalnym. W tym ostatnim przypadku dotyczyć mogą one np. cech zarejestrowanych po osiągnięciu przez roślinę określonej fazy ontogenezy, ale też cech związanych z przebiegiem ontogenezy. Wielkoskalowe analizy fenotypowe polegają na jednoczesnej porównawczej analizie wielu cech roślin szczepu dzikiego (WT) i mutantów insercyjnych, i wymagają zastosowania wysokoprzepustowych, zautomatyzowanych platform fenotypujących, np. Phenoscope (Tisné i wsp., 2013) czy PHENOPSIS (Granier i wsp., 2006). Nasz zespół badawczy nie dysponuje takimi urządzeniami, dlatego szukając za pomocą strategii odwrotnej genetyki funkcji genów kodujących proteazy chloroplastowe prowadzimy analizy fenotypowe mutantów insercyjnych *A. thaliana* (z obniżonym poziomem ekspresji genów kodujących proteazy chloroplastowe) w znacznie mniejszej skali niż jest to możliwe z użyciem zautomatyzowanych platform.

1.2 Regulacyjna rola hydrolizy białek katalizowanej przez proteazy

Proteoliza uważana jest za istotny czynnik wpływający na strukturę i funkcje organizmu roślinnego w zmieniających się warunkach środowiskowych i w zmiennym kontekście ontogenetycznym (Pesquet, 2012). Regulacyjna hydroliza białek katalizowana przez enzymy proteolityczne jest bezpośrednio lub pośrednio zaangażowana w większość procesów komórkowych roślin (Schaller, 2004) - jest elementem obrotu metabolicznego białek, ważnym składnikiem systemu kontroli jakości białek oraz odgrywa istotną rolę w przebiegu szlaków sygnalizacyjnych uruchamianych w odpowiedzi na działanie rozmaitych bodźców egzo- i endogennych oraz regulujących wiele ważnych procesów komórkowych (m. in. ekspresję genów, cykl komórkowy, różnicowanie, kierowanie i sortowanie białek, przebieg programowanej śmierci komórkowej). Kontrola jakości białek polega głównie (choć nie wyłącznie) na hydrolizie tych białek, które zostały uszkodzone albo na skutek mutacji, albo kontaktu rośliny z czynnikami stresowymi, względnie są syntezowane w nadmiernych ilościach, bądź są sortowane do niewłaściwego przedziału komórkowego. Z kolei kontrola obrotu metabolicznego białek przejawia się hydrolizą białek, które w określonym kontekście czasoprzestrzennym przestały być potrzebne. Aminokwasy pozyskane w toku obrotu metabolicznego są niezbędne

dla syntezy nowych białek zużywanych w procesach permanentnej budowy i przebudowy komórek. Proteazowa baza danych *MEROPS* (wersja 9.12) wymienia dla *A. thaliana* aż 745 białek jako potwierdzone lub prawdopodobne enzymy proteolityczne, co stanowi ok. 3% proteomu tego taksonu.

1.3 Klasyfikacja proteaz

1.3.1 Definicja klas, podklas, pod-podklas, klanów, rodzin i podrodzin

Oficjalny podział enzymów proteolitycznych na podstawowe jednostki, tzn. klasy, wynika z regulacji zawartych w Enzyme Commission List of Nomenclature Committee of IUBMB i opiera się na **typie katalizowanej reakcji**. W oparciu o to kryterium wyróżnia się następujące klasy enzymów: oksydoreduktazy, transferazy, hydrolazy, liazy, izomerazy, ligazy. Według tej listy proteazy (w tym chloroplastowe) należą do klasy hydrolaz (EC 3), tzn. enzymów katalizujących rozkład wiązań chemicznych na drodze hydrolizy, których działanie można przedstawić w postaci zapisu: $AB + H_2O \rightarrow A-H + B-OH$. Jest to jedyna klasa enzymów, której przedstawiciele nie wymagają dla swojej aktywności współdziałania ze strony koenzymów. Według Enzyme Commission List of Nomenclature Committee of IUBMB hydrolazy dzielą się na podklasy, wśród których oprócz proteaz wyróżnia się: m. in. esterazy, glikozydazy, nukleazy, amylazy, amyloglukozydazy, inwertazy, fosfatazy, lipazy. Każdy enzym jest kodowany w tym systemie jako zestaw czterech cyfr/liczb rozdzielonych kropkami, z których pierwsza określa klasę, druga podklasę, trzecia pod-podklasę, a czwarta numer kolejny enzymu w jego pod-podklasie.

Niezależnie od istnienia powyższego, oficjalnego systemu klasyfikacyjnego funkcjonuje „nieoficjalny” system klasyfikacji enzymów proteolitycznych (zastosowany do konstrukcji wspomnianej wcześniej bazy proteazowej *MEROPS*), w ramach którego proteazy dzieli się na klasy (które mają zatem zupełnie inny sens niż w przypadku systemu oficjalnego), klany, rodziny i podrodziny. Podstawą wyróżniania klas w tym systemie są cechy **budowy centrum katalitycznego, a mianowicie aminokwasy (lub dwuwartościowe jony metali), które odgrywają kluczową rolę w katalizowaniu reakcji hydrolizy**. Zgodnie z tą metodą klasyfikacji wyróżnia się 9 klas enzymów proteolitycznych: asparaginylowe, aspartyłowe, cysteinowe, glutamylowe, serynowe, metaloproteazy, mieszane, treonyłowe oraz takie, których budowa centrum katalitycznego pozostaje nieznana (Hartley, 1960). Głębiej sięgająca klasyfikacja pozwala na podział klas enzymów proteolitycznych na klany,

rodziny i podrodziny (Rawlings i Barrett, 1993). Podstawą wyróżniania klanów jest **pokrewieństwo filogenetyczne, które przejawia się podobną strukturą trzeciorzędową** lub - gdy struktura ta nie jest znana - kolejnością w łańcuchu polipeptydowym reszt aminokwasowych pełniących funkcje katalityczne oraz często występowaniem popularnych motywów sekwencyjnych wokół reszt katalitycznych. Każdy klan opisany jest poprzez dwie litery - pierwsza z nich oznacza klasę, a druga - arbitralnie wyznaczone kolejne litery alfabetu. Rodzinę tworzy zestaw homologicznych enzymów proteolitycznych, których homologia przejawia się **znaczącym podobieństwem sekwencji aminokwasowej do holotypu, czyli reprezentanta typu białka należącego do danej rodziny**. Podobieństwo sekwencji aminokwasowej danego enzymu do holotypu musi się odnosić co najmniej do domeny proteazowej porównywanych białek. Każda rodzina oznaczona jest w *MEROPS* przez literę reprezentującą klasę oraz liczbę, która bardziej szczegółowo wskazuje podobieństwo sekwencji aminokwasowej do holotypu, np. S1 to rodzina chymotrypsyny należąca do klasy proteaz serynowych (klan PA), M41 to rodzina FtsH *Escherichia coli* należąca do klasy metaloproteaz (klan MA). Część rodzin dzieli się na podrodziny ze względu na bardzo odległą w czasie dywergencję (więcej niż 150 mutacji punktowych / 100 reszt aminokwasowych) w obrębie rodziny. Nazwy enzymów będących holotypami dla indywidualnych rodzin mają bardzo różne pochodzenie, często nawiązują do **pozycji w łańcuchu polipeptydowym substratu, w sąsiedztwie której dochodzi do hydrolizy wiązania peptydowego** (endopeptydazy, omega-peptydazy, egzo-peptydazy, aminopeptydazy, karboksypeptydazy, dipeptydylo-peptydazy, tripeptydylo-peptydazy, peptydylo-dipeptydazy i di-peptydazy).

1.3.2 Mechanizmy katalizy enzymatycznej przeprowadzanej przez proteazy należące do najważniejszych klas według (nieoficjalnego) systemu klasyfikacyjnego zastosowanego do konstrukcji bazy *MEROPS*

Mechanizm hydrolizy wiązań peptydowych angażuje reszty aminokwasowe proteaz cysteinowych, serynowych i treonylowych lub cząsteczkę wody (w przypadku proteaz asparaginylowych, aspartylowych, glutamylowych oraz metaloproteaz), które stają się nukleofilami i atakują węgiel karbonylowy wiązania peptydowego białka-substratu.

Proteazy **aspartyłowe** hydrolizują specyficznie wiązania peptydowe pomiędzy resztami aminokwasowymi posiadającymi reszty hydrofobowe, a katalizowana przez nie proteoliza przebiega jednoetapowo. Kataliza proteaz aspartyłowych opiera się na kwasowo-zasadowym mechanizmie związanym z oddziaływaniem cząsteczki wody pomiędzy dwoma kluczowymi dla działania enzymu resztami asparagianinu (Suguna i wsp., 1987, Brik i Wong, 2003). Jedna zdeprotonowana cząsteczka asparagianinu aktywuje cząsteczkę wody przez oderwanie od niej protonu i działa jako zasada, umożliwiając wodzie przeprowadzenie ataku nukleofilowego na węgiel karbonyłowy wiązania peptydowego substratu, natomiast druga cząsteczka asparagianinu, funkcjonująca jako kwas, jest donorem protonu, przez co umożliwia tworzenie tetraedrycznego produktu przejściowego (oksyanionu), którego rearanżacja prowadzi do protonacji amidu, czego skutkiem jest rozcięcie wiązania peptydowego.

Pierwszym krokiem w reakcjach katalizowanych przez proteazy **cysteinowe** jest deprotonacja reszty sulfydrylowej cysteiny w centrum katalitycznym enzymu przez sąsiadujący z cysteiną aminokwas o charakterze zasadowym (zwykle histydynę). Następnie dochodzi do ataku nukleofilowego przez zdeprotonowaną siarkę cysteiny na węgiel karbonyłowy substratu i do uwolnienia N-końcowego fragmentu substratu, reszcie histydynowej enzymu jest przywracana jest forma zdeprotonowana i powstaje tioestrowy produkt pośredni łączący C-końcowy fragment substratu z wiązaniem tiosiarczkowym cysteiny. Wiązanie to jest następnie hydrolizowane, a enzym regenerowany (Otto i Schirmeister, 1997)

W przypadku proteaz **serynowych**, których centrum katalitycznym jest triada HDS, kluczową rolę w mechanizmie hydrolizy wiązania peptydowego pełnią grupy hydroksylowe seryny i cząsteczki wody związane z ugrupowaniem imidazolowym reszty histydyny (Polgár, 2005). Hydroliza wiązania peptydowego przebiega dwuetapowo i rozpoczyna się od związania substratu przez centrum katalityczne enzymu. Wchodząca w skład katalitycznej triady reszta kwasu asparagiowego (D) nadaje wchodzącej w skład triady histydynie (H) charakter zasady, która deprotonuje serynę i następuje pierwszy etap reakcji, jakim jest acylacja. Reszta serynowa z centrum aktywnego atakuje nukleofilowo atom węgla grupy karbonyłowej wiązania peptydowego substratu i zmuszając atom tlenu grupy karbonyłowej do stania się akceptorem elektronu, prowadzi do powstania tetraedrycznego stanu przejściowego, który stabilizowany jest przez "dziurę

oksyanionową" (Polgár, 2005, Robertus i wsp., 1972). Wiązanie peptydowe zostaje przerwane. Azot pochodzący z wiązania peptydowego stanowi bazę do utworzenia tetraedrycznego intermediatu, a transfer protonu do odłączającej się grupy aminowej współtowarzyszy rozpadowi intermediatu, co skutkuje wytworzeniem przejściowego kompleksu acyloenzymu. Drugim etapem reakcji jest deacylacja, która polega na tym, że przejściowy kompleks acyloenzymu ulega hydrolizie pod wpływem wody. Częsteczka wody staje się donorem protonu dla histydyny, a reszta OH^- atakuje węgiel karbonylowy, tworząc kolejny tetraedryczny produkt przejściowy, który rozpada się uwalniając serynę oraz C-końcowy produkt (Hedstrom, 2002).

Kluczową rolę w mechanizmie katalitycznym **metaloproteaz** odgrywają jony metalu znajdujące się w centrum katalitycznym (najczęściej Zn^{2+} , rzadziej Co^{2+}). Jon metalu związany jest z pozostałą częścią centrum katalitycznego poprzez trzy reszty aminokwasowe (najczęściej stanowiące element motywu HEXXH) oraz z labilną cząsteczką wody. Częsteczka wody związana z jonem Zn^{2+} przeprowadza atak nukleofilowy na węgiel karbonylowy wiązania peptydowego. Powstaje tetraedryczny produkt przejściowy związany koordynacyjnie z jonem cynku. Reszta glutaminianu (E) wchodząca w skład motywu HEXXH w miejscu aktywnym działa jako zasada i dekomponuje produkt przejściowy przez protonację produktu N-końcowego (Erez i wsp., 2009, McCall i wsp., 2000).

1.4 Proteazy *Escherichia coli*

Szereg genów jądrowych *A. thaliana* kodujących proteazy chloroplastowe wykazuje ortologię względem genów kodujących różne proteazy bakteryjne, w tym proteazy *E. coli*, co nie jest zaskakujące w świetle hipotezy o endosymbiotycznym pochodzeniu chloroplastów. Powszechnie uważa się, że materiał genetyczny praeukariotycznego gospodarza tasował się w toku ewolucji bardzo intensywnie z materiałem genetycznym praprokariotycznego endosymbionta, czego wynikiem było przeniesienie do genomu jądrowego gospodarza części genów endosymbionta, w tym genów kontrolujących syntezę proteaz. Badania nad strukturą i funkcją proteaz dziś żyjących bakterii, zwłaszcza *E. coli* (przedstawiciela proteobakterii) są daleko bardziej zaawansowane niż analogiczne prace dotyczące ich chloroplastowych ortologów u *A. thaliana*.

1.4.1 Clp *E. coli*

Bakteryjny holoenzym Clp (*Caseinolytic protease*) *E. coli* jest oligomerycznym kompleksem obejmującym trzy typy białek: proteazy ClpP, białka opiekuńcze należące do rodziny HSP100 i białko adaptorowe (Kress i wsp., 2009). Holokompleks Clp ma postać rdzenia utworzonego z dwóch centralnych heptametrycznych pierścieni ClpP (wewnątrz którego tworzy się komora katalityczna z centrami katalitycznymi typu serynowego - Wang i wsp., 1997), otoczonego jednym lub dwoma heksamerycznymi pierścieniami białek opiekuńczych ClpA lub ClpX oraz pojedynczej cząsteczki białka adaptorowego ClpS, względnie RssB, SspB, UmuU lub YjbH (Horwich i Weber-Ban, 1999, Nishimura i van Wijk, 2014).

ClpP jest proteazą klasy serynowej, baza *MEROPS* klasyfikuje ją jako należącą do rodziny S14. Posiada domenę proteazową z centrum katalitycznym w postaci triady HDS (Kress i wsp., 2009). ClpA (83 kDa) i ClpX (46 kDa) są białkami opiekuńczymi zawierającymi dwa motywy AAA⁺, których zadaniem jest wiązanie i hydroliza ATP (Adam, 1996; Grimaud i wsp., 1998; Clarke 1999).

W obecności ATP podjednostki opiekuńcze formują heksameryczny pierścień, który wykazuje powinowactwo przestrzenne do pierścieni ClpP. Nieskompleksowana podjednostka proteolityczna ClpP jest zdolna jedynie do degradacji peptydów krótszych niż 6 aminokwasów; degradacja dłuższych peptydów jest możliwa po utworzeniu kompleksu ClpAP lub ClpXP (Nishimura i van Wijk, 2014). Ze względu na niewielki rozmiar dwóch otworów szczytowych rdzenia do wnętrza komory katalitycznej mogą dostać się jedynie rozfałdowane substraty, a ich rozfałdowywanie oraz wprowadzanie do komory katalitycznej katalizuje ClpA i ClpX w sposób ATP-zależny. Substraty są procesywnie degradowane na krótkie fragmenty wewnątrz rdzenia (Striebel i wsp., 2009), a podegradacyjne fragmenty są uwalniane przez wąskie pory znajdujące się w bocznych ścianach komory katalitycznej.

Przyłączanie małego białka adaptorowego ClpS (10 kDa), względnie innych, gorzej poznanych białek adaptorowych, nadaje dodatkową specyficzność substratową kompleksom ClpAP i ClpXP, ponieważ zmienia powinowactwo białek opiekuńczych do substratów w postaci agregatów białkowych (Dougan i wsp., 2002) i moduluje rozpoznanie, dostarczenie i degradację substratów noszących N-końcowy sygnał degradacji (Tobias i wsp., 1991, Wang i wsp., 2007, Dougan i wsp., 2010).

Proteaza Clp pełni ważne funkcje z zakresu kontroli jakości białek *E. coli*. Poza agregatami białkowymi, białkami posiadającymi na N-końcu sygnał degradacji, Clp katalizuje także hydrolizę białek niedokończonych, których synteza zaburzona została na skutek przerwy w translacji spowodowanej uszkodzeniem mRNA lub deficytem któregoś z komponentów aparatury translacyjnej. W momencie, gdy następuje przerwa w translacji, 11-aminokwasowy fragment nazywany SsrA-tag, dodawany jest do końca C powstającego łańcucha (Keiler i wsp., 1996). Znacznik SsrA rozpoznawany jest przez motywy AAA⁺ białek opiekuńczych ClpA i ClpX, które kierują substrat na drogę degradacji (Gottesman i wsp., 1998). Okazało się, że SspB - czynnik zwiększający specyficzność podnosi tempo degradacji białek oznaczonych SsrA (Levchenko i wsp., 2000).

1.4.2 Deg *E. coli*

Jakość periplazmatycznych białek *E. coli* kontrolowana jest przez trzy proteazy Deg (*Degradation of periplasmic proteins*) (Strauch i wsp., 1989), nazywane także proteazami HtrA (*High-temperature requirement A*) (Lipińska i wsp., 1989), a mianowicie DegP, DegQ i DegS, których struktura została rozwiązana, a funkcje szczegółowo opisane (Wilken i wsp., 2004; Jiang i wsp., 2008; Bai i wsp., 2011). Są to proteazy serynowe, które baza MEROPS umieszcza w rodzinie S1 (holotyp - chymotrypsyna wołu).

DegP to białko periplazmatyczne o charakterze hydrofilnym, którego masa cząsteczkowa to 46,8 kDa, a długość wynosi 448 reszt aminokwasowych. Strukturę tej proteazy tworzą począwszy od N-końca następujące domeny: proteazowa- zawierająca triadę HDS (reszty 114 - 269), PDZ1 (reszty 285 - 367) i PDZ2 (reszty 394 - 463). Domeny PDZ (nazwa pochodzi od białek: PSD-95, Dlg, ZO-1) zawierają zakonserwowane ewolucyjnie motywy umożliwiające rozpoznanie C-końca substratu i oddziaływanie z nim (Harris i Lim, 2001).

Analiza kryształów DegP ujawniła, że podstawową formą organizacji strukturalnej DegP jest beczkkształtny heksamer zbudowany z dwóch trimerycznych pierścieni (Krojer i wsp., 2002). Do środka komory katalitycznej, stanowiącej wewnątrz heksameru, eksponowane są aktywne katalitycznie reszty aminokwasowe domeny proteazowej, wieczko i dno natomiast budowane są przez inne odcinki domeny proteazowej. Ze względu na ścisłe upakowanie tych odcinków (Krojer i wsp., 2002) sugeruje się, że

wrota dla substratów pełnią boczne ściany beczki, budowane przez dwanaście domen PDZ - sześć PDZ1 i sześć PDZ2. Badania w ostatnich latach dowiodły jednak, że aktywną katalitycznie formą DegP *in vivo* jest oligomeryczna (12-mer lub 24-mer) beczka („sealed cage”) z trimerem, jako podstawową jednostką organizacji strukturalnej utrzymywaną poprzez oddziaływania pomiędzy domenami proteazowymi monomerów. Beczka powstaje przez oddziaływania PDZ1-PDZ2 pomiędzy czterema (powstaje dodekamer) lub ośmioma (powstaje 24-mer) sąsiadującymi ze sobą trimerami, do jakich dochodzi w obecności substratu. Sądzi się, że promowanie powstawania aktywnego katalitycznie oligomeru DegP tylko w obecności substratu pozwala uniknąć potencjalnie niebezpiecznej sytuacji, do jakiej mogłoby dojść, gdyby aktywna katalitycznie forma DegP akumulowała się pod nieobecność naturalnych substratów (Jiang i wsp., 2008). W większości przypadków domeny PDZ cząsteczki DegP rozpoznają hydrofobowe reszty aminokwasowe zlokalizowane na C-końcu białek periplazmatycznych *E. coli* zdenaturowanych działaniem stresu termicznego lub osmotycznego (Krojer i wsp., 2008), czego efektem jest wniknięcie substratu do wnętrza komory katalitycznej i rozpoczęcie procesywnej degradacji. Oparta jest ona na rundach hydrolizy zapoczątkowywanych przez sygnał pochodzący od C-końca każdego nowo zdegradowanego fragmentu substratu, prowadzących do powstania fragmentów o długości 9 - 20 aminokwasów (Krojer i wsp., 2008). Specyficzna budowa ścianek beczkowskiego heksameru DegP utworzonych przez ruchome domeny PDZ (duża przestrzeń wejściowa do komory katalitycznej) pozwala funkcjonować DegP w sposób niezależny od ATP (silne rozfałdowanie substratu przed degradacją staje się najprawdopodobniej zbędne). Interesującą cechą białka DegP *E. coli* jest jego umiejętność konwersji z proteazy w białko opiekuńcze w umiarkowanie podwyższonych temperaturach (28°C); w takich warunkach aktywność proteazowa DegP (wobec umiarkowanie zdenaturowanych białek periplazmatycznych) staje się bardzo niska, znacząco wzrasta natomiast aktywność opiekuńcza, wyrażająca się ułatwianiem umiarkowanie zdenaturowanym białkom odzyskiwania właściwej struktury drugo- i trzeciorzędowej. Aktywność opiekuńcza DegP jest natomiast znikoma w temperaturach powyżej 28°C (Spiess i wsp., 1999).

Aktywność katalityczna DegP jest niezbędna dla przeżycia komórek *E. coli* w warunkach stresu termicznego i osmotycznego, ponieważ enzym ten zaangażowany jest w degradację licznych białek periplazmatycznych denaturowanych pod wpływem

działania tych stresów (Spiess i wsp., 1999). Do substratów DegP zalicza się np. niewłaściwie sfałdowaną amylazę MalS (Spiess i wsp., 1999) czy zdenaturowane białka z grupy P pilin - PapSA i PapG (Jones i wsp., 1997).

Oprócz DegP w komórkach *E. coli* stwierdzono obecność także dwóch innych proteaz periplazmatycznych Deg - DegS i DegQ. Posiadają zlokalizowaną w pobliżu N-końca cząsteczki domenę proteazową oraz jedną (w przypadku DegS) lub dwie (w przypadku DegQ) C-końcowe domeny PDZ. DegS uczestniczy w tworzeniu uruchamianej w warunkach stresowych kaskady proteolitycznej, aktywującej czynnik σ^E polimerazy RNA i uczestniczącej w inicjacji transkrypcji genów warunkujących przywracanie właściwej struktury białkom uszkodzonym w wyniku działania warunków stresowych (Walsh i wsp., 2003); DegQ natomiast jest pod względem funkcjonalnym bardzo podobna do DegP (Pallen i Wren, 1997).

1.4.3 FtsH *E.coli*

Proteaza FtsH (*Filamentous temperature sensitive H*) z *E. coli* jest - według klasyfikacji zastosowanej w bazie MEROPS - holotypem rodziny M41 (metaloproteazy posiadające w centrum katalitycznym motyw HEXXH).

FtsH jest integralnym białkiem błonowym o masie 71 kDa i długości 647 aminokwasów. Strategicznymi pod względem pełnienia przez cząsteczkę FtsH funkcji biologicznych są zlokalizowane w obrębie długiej, eksponowanej do cytoplazmy, domeny C-końcowej, dwa rejony: motyw AAA⁺ (reszty 155 - 321) oraz centrum katalityczne (reszty 401 - 592) wchodzące w skład domeny proteazowej. W obrębie domeny AAA⁺ znajdują się specyficzne motywy sekwencyjne: Walker A i Walker B oraz rejon wtórnej homologii SRH (*second region of homology*). Wszystkie białka należące do superrodziny AAA⁺ posiadają w domenie AAA⁺ rejony Walker A i Walker B, natomiast białka, u których występuje motyw SRH stanowią wyróżniającą się wśród superrodziny AAA⁺ grupę AAA, której jedynym przedstawicielem wśród proteaz prokariotycznych jest właśnie FtsH.

Formą, jaką najprawdopodobniej przyjmuje holoenzym FtsH *E. coli in vivo* jest heksameryczny kompleks, na co wskazuje heksameryczna forma, jaką zidentyfikowano rozwiązując strukturę krystaliczną motywu AAA⁺ (Krzywda i wsp., 2002). Struktura krystaliczna kompletnego białka FtsH *E. coli* nie została jeszcze rozwiązana, ale w przypadku innej eubakterii (*Thermotoga maritima*) aktywna enzymatycznie FtsH jest heksamerem zbudowanym

z dwóch trimerycznych pierścieni, przy czym górną połowę pierścieni tworzą trzy domeny AAA⁺, a dolną - trzy domeny proteazowe. Sześć domen proteazowych ułożonych blisko siebie formuje w heksamerze FtsH komorę katalityczną (Bieniossek i wsp., 2009).

Sygnał do degradacji stanowić może znacznik SSrA, czyli sekwencja dodawana do niedokończonego białka po zatrzymaniu translacji (Herman i wsp., 1998), a także sekwencje znajdujące się wewnątrz w pobliżu C-końca substratu (Narberhaus, 2009). Najprawdopodobniej motywy Walker A i Walker B bezpośrednio rozpoznają i przeprowadzają hydrolizę ATP, będącą źródłem energii niezbędnej do rozfałdowania i wprowadzenia substratu do komory katalitycznej, podczas gdy tzw. palec argininowy wchodzący w skład motywu SRH pełni funkcje wspomagające działanie motywów Walker A i Walker B (Narberhaus, 2009). FtsH *E. coli*, podobnie jak DegP, przeprowadza degradację substratu w sposób procesywny. Substraty wbudowane w błonę komórkową, ze względu na niedostępność ich rejonów transmembranowych (oraz ewentualnych pętli periplazmatycznych) są dla centrum katalitycznego (zlokalizowanego w cytoplazmie) „trudniejszymi” substratami proteazy FtsH niż rozpuszczalne substraty białkowe, dlatego degradacja poprzedzona jest ich dyslokacją (wymagającą hydrolizy ATP) w poprzek błony przez kanał utworzony z transbłonowych odcinków FtsH (Kihara i wsp., 1999).

Lista substratów cytoplazmatycznych jest dość długa - należą do nich lipooksygenaza i transferaza KDO (białka zaangażowane w utrzymanie homeostazy lipidów błonowych), apoflawodoksyny, podjednostki RpoH polimerazy RNA (polimeraza o charakterze HSP - *heat shock protein* - białka szoku cieplnego), kilku białek λ C bakteriofaga λ (białka zaangażowane w udział w cyklu litycznym) (Narberhaus i wsp., 2009). Degradacja tych białek wpływa na kontrolę biosyntezy składników błony komórkowej, ekspresję genów kodujących HSP oraz decyzji odnośnie cyklu życiowego faga λ (kierowanie wirusa na szlak lityczny bądź lizogeniczny), a przez to na homeostazę komórki. Do błonowych substratów FtsH zaliczamy podjednostkę SecY translokazy SecYAE Γ , podjednostkę α syntazy ATP i białko YccA (Akiyama i wsp., 1996a, 1996b), a proces degradacji zachodzi w przypadku ich denaturacji wywołanej działaniem czynników stresowych lub niewłączenie ich w kompleksy wielobiałkowe. Efektem niemożności formowania przez podjednostki białkowe natywnych heterokompleksów może być tworzenie przez nie toksycznych dla komórki agregatów.

1.4.4 Lon *E.coli*

Proteaza Lon z *E. coli* jest najlepiej scharakteryzowanym i najbardziej typowym białkiem należącym do rodziny S16 (klasyfikacja zastosowana w bazie *MEROPS*); posiada centrum katalityczne w postaci (nietypowej wśród proteaz serynowych) diady SK (Botos i wsp., 2004a, Rotanova i wsp., 2003).

Lon jest białkiem cytoplazmatycznym, którego pojedynczy polipeptyd ma długość 784 aminokwasów i masę 87 kDa. W skład jego struktury liniowej wchodzi trzy zakonserwowane ewolucyjnie hydrofilne domeny: zlokalizowana na N-końcu domena LON (reszty 10 - 202), domena AAA⁺ (reszty 325 - 488) i C-końcowa domena LON_C (reszty 570 - 771). Za rozpoznawanie i wiązanie substratu odpowiada najprawdopodobniej domena LON, AAA⁺ wiąże i hydrolizuje ATP, natomiast funkcje proteolityczne sprawuje domena LON_C (Botos i wsp., 2004b). W strukturze domeny AAA⁺ zlokalizowane są motywy Walker A i B oraz zaangażowane w efektywne wiązanie i hydrolizę ATP "sensor1" i "palec argininowy", oraz "sensor-2" (Botos i wsp., 2004b). *In vivo* enzym przybiera strukturę homoheksameryczną. Domeny proteolityczne układają się w przestrzeni w strukturę przypominającą kształtem półkulę, wewnątrz której przecina por zawierający wewnątrz sześć diad katalitycznych, przez co posiada charakter komory katalitycznej (Botos i wsp., 2004b). W rozpoznawaniu i wiązaniu substratu uczestniczy najprawdopodobniej domena LON oraz domena AAA⁺ (Smith i wsp., 1999), natomiast za wiązanie i hydrolizę ATP odpowiadają motywy Walker A i B, „sensor-1” i „palec arginiowy” (Botos i wsp., 2004b, Hattendorf i Lindquist, 2002).

Bakteryjna proteaza Lon zaangażowana jest w procesy degradacji uszkodzonych przez działanie czynników środowiskowych białek cytoplazmy, np. białek charakteryzujących się niewłaściwą długością łańcucha polipeptydowego, czy nieprawidłową strukturą trzeciorzędową. Uczestniczy także w obrocie metabolicznym krótkożyjących białek regulatorowych, takich jak SulA podczas procesu naprawczego DNA (białko to wstrzymuje przedwczesną segregację uszkodzonego DNA do komórek potomnych) (Nishii i wsp., 2002).

1.5 Proteazy komórek roślinnych

W komórkach roślinnych stwierdza się obecność trzech odrębnych systemów enzymatycznej degradacji białek komórkowych. Większość białek degradowana jest

przez proteasomy 26S (system UPS), który bierze udział w hydrolizie białek poddanych wcześniej procesowi ubikwitynacji (Rock i wsp., 1994). Niezależnie od niego funkcjonuje w komórkach roślinnych szereg wariantów procesu autofagii, która polega na trawieniu fragmentów komórek w wakuoli litycznej (Thompson i wsp., 2005). Autonomiczne proteazy organelowe - to trzeci system proteolityczny komórek roślinnych, funkcjonujący w niektórych przedziałach komórkowych, takich jak chloroplasty, peroksosomy, mitochondria i światło retikulum endoplazmatycznego.

1.5.1 UPS (ubikwityna - proteasom 26S)

UPS jest cytoplazmatycznym systemem degradacji krótkożyjących białek (czas półtrwania: 3 - 120 min) Odpowiednie elementy systemu UPS rozpoznają określone motywy sekwencyjne białek lub elementy struktury wyższorzędowej białek i poddają posiadające je białka ubikwitynacji. Do sygnałów kierujących na szlak poliubikwitynacji należą: N-końcowa reszta aminokwasowa (Bachmair i wsp., 1986), jedna z wewnętrznych reszt lizyny (Jadhav i Wooten, 2009), sekwencja PEST (Won i Redd, 1996) lub nieprawidłowa struktura drugo- lub trzeciorzędowa (Jadhav i Wooten, 2009).

Do białek kierowanych na szlak degradacji UPS dołączanych jest kowalencyjnie kilka/kilkadziesiąt cząsteczek ubikwityny. Ubikwityna to niezwykle zachowawcze ewolucyjnie białko, którego cząsteczka (o długości 78 aminokwasów - 8.5 kDa) zawiera 7 reszt lizyny. Poliubikwitynacja substratu (tzn. dołączenie do specyficznych reszt lizyny substratu traktu składającego się z kilku/kilkudziesięciu cząsteczek ubikwityny połączonych między sobą wiązaniami izopeptydowymi C-koniec/Lizyna 48) ma miejsce w trakcie wieloetapowej reakcji prowadzonej kolejno przez enzymy należące do trzech grup: enzymy aktywujące ubikwitynę w sposób zależny od ATP (E1), enzymy koniugujące ubikwitynę (E2) i - kluczowe dla procesu - ligazy ubikwityny (E3), które rozpoznają białko docelowe i katalizują przeniesienie na to białko zaktywowanej ubikwityny z E2 (Ciechanover i wsp., 2000). Poddane poliubikwitynacji białka są rozpoznawane przez odpowiednie elementy struktury proteasomów 26S i degradowane w ich wnętrzu.

Na proteasom 26S składa się rdzeń utworzony z podjednostek 20S oraz część regulatorowa - 19S. Rdzeń tworzą cztery heptameryczne pierścienie - dwa zewnętrzne pierścienie składają się tzw. podjednostek α , wewnętrzne, pełniące funkcje katalityczne - z tzw. podjednostek β (Smith i wsp., 2007). Część regulatorowa 19S zbudowana jest z 19

białek, z czego 9 zasadniczych wiąże się bezpośrednio z pierścieniem α rdzenia 20S, a 9 tworzy wieczko. 6 z 9 zasadniczych białek pełni funkcje ATPazy, ponieważ hydroliza ATP wymagana jest do rozfałdowania naznaczonych poliubikwityną substratów. Rozpoznanie i degradacja substratów możliwa jest dzięki zmianom konformacyjnym części 19S, które mają miejsce w zależności od dostępności ATP czy substratu (Unverdorben i wsp., 2014). Proteasom 20S może asocjować także z inną częścią regulatorową – 11S. Jest to heptameryczna struktura promująca degradację krótkich peptydów (Förster i wsp., 2005). Kompleks regulatorowy 19S rozpoznaje i wiąże substrat w sposób zależny od ATP (Förster i wsp., 2005). Ze względu na wąskość kanału, przez który musi przedostać się białko do wnętrza rdzenia 20S, ulega ono częściowemu rozfałdowaniu z udziałem energii pochodzącej właśnie z hydrolizy ATP (Smith i wsp., 2005).

Degradacja ma miejsce wewnątrz centralnej komory katalitycznej utworzonej z dwóch pierścieni formowanych przez będące proteazami podjednostki β , a w jej wyniku powstają krótkie (7 - 9 aminokwasowe) produkty (Voges i wsp., 1999). Podjednostki β różnią się między sobą specyficznością względem substratów - wykazują aktywności chymotrypsyno- i trypsyno-podobne oraz aktywność hydrolizującą peptydy peptydylo-glutamylowe (Heinemeyer i wsp., 1997) (według klasyfikacji stosowanej w bazie *MEROPS* są to proteazy serynowe).

Sposób funkcjonowania systemu ubikwityna-proteasom 26S łączy w sobie elementy regulacji obrotu metabolicznego białek (degradacja zależna od motywów sekwencyjnych) z elementem kontroli jakości białek (degradacja zależna od denaturacji białka docelowego). Najliczniejsza populacja enzymów współtworzących system ubikwityna-proteasom 26S powiązana jest funkcjonalnie ze szlakami sygnalizacyjnymi przebiegającymi z udziałem tego systemu. Prawdopodobnie na szlak ubikwitynozależnej degradacji kierowane są takie białka krótkożyjące, będące elementami szlaków sygnałowych, które zawierają w swej strukturze sygnały determinujące obrót metaboliczny i kontrolę jakości substratów białkowych (Vierstra, 2009). W tym sensie, przynajmniej w aspekcie związanym z systemem ubikwityna-proteasom 26S, główne funkcje regulacyjnej hydrolizy białek są ze sobą powiązane w sposób ścisły i praktycznie nieodróżnialny.

1.5.2 Wakuole lityczne

Funkcjonowanie proteaz wakuolarnych (podobnie jak proteasomów) łączy elementy kontroli obrotu metabolicznego wraz z elementami kontroli jakości substratów białkowych. Nie istnieją dane, które opisywałyby motywy, które nadają cząsteczkom białek podatność na degradację przez proteazy wakuolarne. U niektórych gatunków roślin w wakuolach magazynujących białka w nasionach podczas embriogenezy zidentyfikowano proteazy uczestniczące w obróbce form prekursorowych białek zapasowych do form dojrziałych (Shimada i wsp., 2003).

1.5.3 Autofagia

Degradacja białek długożyjących (czas półtrwania: 24 - 72h) przebiega w sposób nieselektywny, angażując głównie szereg wariantów procesów autofagicznych, czyli masowych procesów degradacyjnych służących głównie odzyskiwaniu składników odżywczych, pozbywaniu się agregatów międzybiałkowych i odpowiedziom na zróżnicowane stresy. Dzięki permanentnym procesom autofagicznym w komórce utrzymuje się fizjologiczne stężenie składników odżywczych, a zwiększenie takiej aktywności pomaga w usuwaniu dysfunkcyjnych organelli (Bassham i wsp., 2006, Levine i Klionsky, 2004). W komórkach roślinnych funkcjonują co najmniej cztery szlaki autofagii: makroautofagia, mikroautofagia, szlak CVT (transport cytoplazma-wakuola) oraz mikropeksyfagia (Thompson i Vierstra, 2005, Bassham i wsp., 2006, Lee i wsp., 2012).

Makroautofagia polega na otoczeniu dużego fragmentu cytoplazmy (mogącego obejmować całe organelle) podwójną błoną i - dzięki skordynowanemu działaniu genów związanych z autofagią (*ATG*, *autophagy-related genes*) - wytworzeniu pęcherzyka autofagosomalnego, którego błona następnie podlega fuzji z centralną wakuolą lityczną, a nieobłoniony ładunek autofagosomu, teraz już określany jako ciało autofagiczne, jest degradowany (Levine i Klionsky, 2004). Szlak CVT przebiega bardzo podobnie, różnica w stosunku do makroautofagii polega na tym, że w obręb autofagosomu (bardzo małego w tym wariantie autofagii) przechwytywane są pojedyncze białka (Thompson i Vierstra, 2005).

W wariantie mikroautofagicznym mały fragment cytoplazmy zostaje wprowadzony do światła wakuoli litycznej w postaci pęcherzyka utworzonego poprzez lokalną inwaginację tonoplastu, a następnie pęcherzyk zostaje uwolniony do wnętrza wakuoli

lub lizosomu i jego łądunek ulega tam degradacji przez liczne enzymy hydrolityczne (w tym proteazy) (Bassham i wsp., 2006). Jeśli drogą inwaginacji tonoplastu do wakuoli litycznej trafiają selektywnie peroksosomy to mówimy o mikropeksosofagii (Thompson i Vierstra, 2005).

W wakuolach litycznych liści *A. thaliana* odkryto obecność 402 białek, z których 46.5% zidentyfikowano. Należą do nich proteazy cysteinowe, aspartylowe i serynowe (Müntz, 2007). Nie zostały one dotąd bliżej rozpoznane.

1.5.4 Proteazy mitochondrialne

Główne składniki mitochondrialnego systemu proteolitycznego są wysoce zachowane w ewolucji. Dzieli się je na trzy grupy: proteazy przetwarzające, proteazy zależne od ATP i oligopeptydazy (Käser i Langer, 2000, Koppen i Langer, 2007).

U *Arabidopsis* 77% mitochondrialnych białek kodowanych przez genom jądrowy posiada sekwencje kierujące, które po imporcie białek do mitochondriów są odcinane przez mitochondrialne **proteazy przetwarzające (MPP, mitochondrial-processing peptidase)** (Huang i wsp., 2009, Vögtle i wsp., 2009). U rzodkiewnika zbudowane są one z dwóch podjednostek α -MPP i jednej podjednostki β -MPP (Kalousek i wsp., 1993, Gakh i wsp., 2002, Glaser i Dessi, 1999, Millar i wsp., 2001). Obie są niezbędne dla aktywności proteaz przetwarzających, przy czym α -MPP odpowiada za specyficzność substratową, β -MPP natomiast jest podjednostką proteolityczną posiadającą w miejscu katalitycznym motyw HEXXH (Glaser i wsp., 1998). Miejsce lokalizacji roślinnych MPP stanowi wewnętrzna błona mitochondrialna i są one częścią kompleksu cytochromowego *bc1* łańcucha oddechowego, choć aktywność proteolityczna przebiega niezależnie od transferu elektronów (Braun i wsp., 1992, Eriksson i Glaser, 1992, Dessi i wsp., 2000). Romboidy są przetwarzającymi proteazami serynowymi uczestniczącymi w wewnątrzłonowej proteolizie substratów związanych z błoną w obrębie ich domeny transłonowej, czego efektem jest uwolnienie aktywnych biologicznie białek do przestrzeni międzyłonowej (Freeman, 2008). Mitochondrialne proteazy romboidowe zidentyfikowano u drożdży i na podstawie badań nad nimi prowadzonych stwierdzono, że pełnią one kluczową rolę w regulacji dynamiki i funkcjonowaniu mitochondriów (Chan i McQuibban, 2013). Zidentyfikowano zaledwie jedną proteazę romboidową *A. thaliana*

kierowaną do mitochondriów - AtRBL12 (*Arabidopsis thaliana rombold-like*) należąca do podrodziny AtPARL (Kmieć-Wiśniewska i wsp., 2008).

W roślinnych mitochondriach zidentyfikowano trzy typy **proteaz ATP-zależnych** Lon, Clp i FtsH (Jańska, 2005), z których dwa pierwsze są proteazami serynowymi, a FtsH są metaloproteazami. Ich cechą charakterystyczną jest obecność domeny ATPazowej (domeny AAA⁺) działającej jako białko opiekuńcze. W roślinnych mitochondriach zidentyfikowano trzy typy proteaz ATP-zależnych: Clp, FtsH i Lon.

Proteazy Clp należą do klasy serynowej (klasyfikacja *MEROPS*). Składają się z rdzenia proteolitycznego utworzonego przez ClpP2 i pierścienia podjednostek pełniących funkcje opiekuńcze (ClpX1-3) (Adam i wsp., 2001, Halperin i wsp., 2001, Peltier i wsp., 2001). Wnętrze rdzenia stanowi komora katalityczna, do której substraty przedostają się przez kanały w pierścieniu białek opiekuńczych; pierścień jest na tyle wąski, że substraty muszą zostać rozfałdowane i przetransportowane, aby dostać się do komory katalitycznej. W jej wnętrzu są trawione do fragmentów o długości 3 - 30 aminokwasów (Mogk i wsp., 2008, Striebel i wsp., 2009). Mitochondrialne białko opiekuńcze ClpB4 pełni swoje funkcje samodzielnie, nie wchodząc w kompleks z ClpP2 (Lee i wsp., 2007).

FtsH to proteazy posiadające centrum katalityczne charakterystyczne dla metaloproteaz zależnych od Zn²⁺ i stanowiące jedno białko. Do mitochondriów rzodkiewnika kierowane są cztery proteazy FtsH: AtFtsH3, AtFtsH4, AtFtsH10 i AtFtsH11 (ta ostatnia jest kierowana zarówno do mitochondriów, jak i chloroplastów - Jańska, 2005, Piechota i wsp., 2008, Urantówka i wsp., 2005). Odnośnie do submitochondrialnej lokalizacji proteaz FtsH u *A. thaliana* wiadomo, że w wewnętrznej błonie mitochochondrialnej znajdują się dwie proteazy określane jako m-AAA (zwrócone w stronę matriks) - AtFtsH3 i AtFtsH10 (Jańska, 2005, Piechota i wsp., 2008) oraz dwie i-AAA (w przestrzeni międzybłonowej) - AtFtsH4 i AtFtsH11 (Urantówka i wsp., 2005, Kołodziejczak i wsp., 2002). m-AAA tworzą hetero- i homooligomeryczne kompleksy, a wraz z prohibitynami - integralnymi białkami wewnątrzbłonowymi - heterokompleksy (2 MDa) (Piechota i wsp., 2008, 2010), natomiast i-AAA mogą tworzyć w wewnętrznej błonie homokompleksy (ok. 1,5 MDa). Proteazy m-AAA pełnią ponadto funkcje białek opiekuńczych podczas składania i stabilizowania systemu fosforylacji oksydacyjnej (Kołodziejczak i wsp., 2007). AtFtsH11 chroni aparat fotosyntetyczną przed uszkodzeniami

cieplnymi (Chen i wsp., 2006). AtFtsH4 natomiast zaangażowana jest w składanie i stabilizację kompleksu V (Kołodziejczak i wsp., 2007), a także ochrania kompleks V, a mianowicie zapobiega akumulacji uszkodzonych oksydacyjnie białek i agreguje je (Gibała i wsp., 2009). Ponadto degraduje utlenione białka lub bierze udział w ich dostarczeniu innym proteazom (Gibała i wsp., 2009, Kicia i wsp., 2010), bądź alternatywnie wykazuje funkcje opiekuńcze w stosunku do białek mitochondrialnych przed uszkodzeniami oksydacyjnymi.

U *A. thaliana* w mitochondriach odnajdujemy ponadto produkty dwóch genów kodujących ATP-zależne proteazy Lon - *AtLON1* i *AtLON4* (Ostersetzer i wsp., 2007, Rigas i wsp., 2009a), w strukturze liniowej których odnajduje się domenę proteazową (LON-C) (z nietypową dla klasy proteaz serynowych diadą katalityczną SK) oraz domenę AAA⁺. AtLon 4 charakteryzuje się podwójną lokalizacją, tzn. mitochondrialną i chloroplastową (Ostersetzer i wsp., 2007). Submitochondrialna lokalizacja Lon nie została rozpoznana w przypadku *A. thaliana*, u fasoli natomiast Lon4 jest połączona peryferycznie z wewnętrzną błoną mitochondrialną (Sarria i wsp., 1999).

Wykazano, że AtLon1 zaangażowana jest we wzrost i rozwój rośliny, a także biogenezę mitochondriów *A. thaliana* (Rigas i wsp., 2009a, 2009b). Poza tym bierze udział w trawieniu białka OFR239, obecnego wyłącznie w tkankach związanych reprodukcją, a nieobecnego w tkankach wegetatywnych z powodu szybkiego obrotu metabolicznego, w którym udział bierze proteaza Lon (Sarria i wsp., 1998).

W matriks mitochondrialnej zidentyfikowano **oligopeptydazy** PreP (*presequence protease*), które degradują sekwencje kierujące do mitochondriów (Ståhl i wsp. 2002, Moberg i wsp., 2003). U *A. thaliana* wyróżnia się dwie wysoce homologiczne, kodowane przez genom jądrowy izoformy PreP: AtPreP1 i AtPreP2 (Ståhl i wsp. 2002, Glaser i wsp., 2006, Bhushan i wsp., 2003). Obie izoformy posiadają odwrócony motyw wiążący Zn²⁺ i należą do rodziny metaloproteaz pitrylizyny (Ståhl i wsp. 2002). Związanie substratu wymaga otwarcia zupełnie zamkniętej komory katalitycznej, a przeprowadzenie proteolizy - jej zamknięcia (Johnson i wsp., 2006). Substratem AtPreP jest presekwencja podjednostki syntazy ATP βF1 (Ståhl i wsp. 2000). Generalnie aktywność AtPreP jest niezbędna do wydajnego wzrostu roślin i działania organelli, zwłaszcza na wczesnych etapach rozwoju (Kwaśniak i wsp., 2012).

1.5.5 Proteazy peroksysomalne

Do najlepiej poznanych proteaz peroksysomalnych należy AtLon2 oraz AtDeg15. AtLon2 to wielofunkcyjne białko, degradujące źle sfałdowane i nieskompleksowane z białkami – partnerami białka macierzy peroksysomalnej, a także agregaty białkowe (Aksam i wsp., 2007, Kikuchi i wsp., 2004). Może także pełnić funkcje białka opiekuńczego (Bartoszewska i wsp., 2012). AtDeg15 prawdopodobnie odcina N-końcową sekwencję sygnałową PTS2 (Schuhmann i wsp., 2008) od importowanych z cytoplazmy prekursorów białek peroksysomalnych (Swinkels i wsp., 1991, Kurochkin i wsp., 2007).

1.5.6 Proteazy światła ER

Białka światła ER syntetyzowane są na związanych z błoną polisomach i kotranslacyjnie kierowane do ER przez kanał translokacyjny składający się z kompleksu białkowego Sec61 (Rapoport i wsp., 1996). Nowo zsyntetyzowany łańcuch polipeptydowy przenoszony jest do światła ER w stanie wydłużonym i niesfałdowanym, proces fałdowania natomiast ma miejsce wewnątrz ER i odbywa się pod nadzorem maszynerii katalitycznej. Nieprawidłowy przebieg procesu fałdowania wiąże się z usunięciem takiego białka przez degradację proteolityczną i ma miejsce w miejscu syntezy (lub jego pobliżu) na ER, dlatego nazywany jest procesem proteolitycznym ERAD (*ER-associated degradation*), który zależy od komunikacji pomiędzy światłem ER a cytozolem. Zatem aktywności proteolityczne w obrębie ER mogą dotyczyć obrotu metabolicznego białek związanych z ERAD (Ivessa i wsp., 1999).

1.5.7 Proteazy chloroplastowe Clp, Deg, FtsH, Lon *A. thaliana*

Chloroplasty należą - obok mitochondriów, peroksysomów i siateczki śródplazmatycznej - do organelli, wewnątrz których odbywa się degradacja białek katalizowana przez własne proteazy. Proteazy chloroplastowe odkryto dzięki obserwacji, że podczas inkubacji *in vitro* chloroplastów wyizolowanych z liści grochu część białek ulegała degradacji zależnej od światła i ATP (Liu i Jagendorf, 1984). Wykazano, że degradacja w takim układzie eksperymentalnym może przebiegać także w sposób niezależny od ATP (Liu i Jagendorf, 1986).

1.5.7.1 Clp

U *A. thaliana* istnieje dość znaczna różnorodność chloroplastowych białek należących do rodziny Clp (S14 według klasyfikacji *MEROPS*), będących ortologami odpowiednich białek Clp *E. coli*. Informacje na temat genów kodujących poszczególne białka Clp i ich produktach białkowych zawarte są w Tabeli 1.

PROTEAZA CHLOROPLASTOWA	GEN	ZNACZNIK LOCUS	NUMER AKCESYJNY	DŁUGOŚĆ GENU (PZ)	LOKALIZACJA I ORIENTACJA GENU (PZ)	LICZBA EGZONÓW	DŁUGOŚĆ BIAŁKA PREKURSOROWEGO (LICZBA AMINOKWASÓW)	DŁUGOŚĆ DOJRZAŁEGO BIAŁKA (LICZBA AMINOKWASÓW)	DŁUGOŚĆ PEPTYDU TRANZYTOWEGO (PZ)	DŁUGOŚĆ PEPTYDU EKSPORTOWEGO (LICZBA AMINOKWASÓW)
AtClpB3	<i>AtCLPB3</i>	AT5G15450.1	NC_003076.8	4136	5018347 → 5014212	9	968	901	67	-
AtClpC1	<i>AtCLPC1</i>	AT5G50920.1	NC_003076.8	4906	20720374 → 20715469	10	929	891	38	-
AtClpC2	<i>AtCLPC2 (HSP93-III)</i>	AT3G48870.1	NC_003074.8	4546	18126742 → 18122197	10	952	907	45	-
AtClpC2	<i>AtCLPC2 (HSP93-III)</i>	AT3G48870.2	NC_003074.8	4546	18126742 → 18122197	10	921	907	14	-
AtClpD	<i>AtCLPD (ERD1)</i>	AT5G51070	NC_003076.8	4367	20764315 → 20768681	12	945	856	89	-
AtClpP1	<i>AtCLPP1</i>	ATCG00670	NC_003070.9	2095	4223030 → 4225124	9	-	196	-	-
AtClpP3	<i>AtCLPP3</i>	AT1G66670	NC_003070.9	1918	24865702 → 24863785	5	309	238	71	-
AtClpP4	<i>AtCLPP4</i>	AT5G45390	NC_003076.8	1815	18396302 → 18398116	3	292	232	60	-
AtClpP5	<i>AtCLPP5</i>	AT1G02560	NC_003070.9	2250	537860 → 540109	9	298	236	62	-
AtClpP6	<i>AtCLPP6</i>	AT1G11750.1	NC_003070.9	2402	3967476 → 3969877	9	271	220	51	-
AtClpP6	<i>AtCLPP6</i>	AT1G11750.2	NC_003070.9	2402	3967476 → 3969877	10	289	238	51	-
AtClpR1	<i>AtCLPR1</i>	AT1G49970	NC_003070.9	3040	18501570 → 18504609	9	387	346	41	-
AtClpR2	<i>AtCLPR2</i>	AT1G12410	NC_003070.9	2095	4223030 → 4225124	9	279	225	54	-
AtClpR3	<i>AtCLPR3</i>	AT1G09130.1	NC_003070.9	2719	2942288 → 2939570	10	330	287	43	-
AtClpR3	<i>AtCLPR3</i>	AT1G09130.2	NC_003070.9	2719	2942288 → 2939570	9	330	287	43	-
AtClpR3	<i>AtCLPR3</i>	AT1G09130.3	NC_003070.9	2719	2942288 → 2939570	10	370	327	43	-
AtClpR4	<i>AtCLPR4</i>	AT4G17040	NC_003075.7	3658	9589362 → 9585705	8	305	237	68	-
AtClpS1	<i>AtCLPS1</i>	AT1G68660.1	NC_003070.9	1311	25779161 → 25777851	4	159	115	44	-
AtClpS1	<i>AtCLPS1</i>	AT1G68660.2	NC_003070.9	1311	25779161 → 25777851	4	129	85	44	-

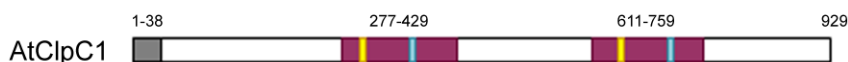
AtClpT1	<i>AtCLPT1</i>	AT4G25370	NC_003075.7	2163	12972708 → 12974870	6	238	175	63	-
AtClpT2	<i>AtCLPT2</i>	AT4G12060	NC_003075.7	1031	7229941 → 7228007	5	241	183	58	-
AtDeg1	<i>AtDEG1</i>	AT3G27925	NC_003074	2535	10368905 → 10366371	8	439	334	44	61
AtDeg2	<i>AtDEG2</i>	AT2G47940.1	NC_003071	4247	19622251 → 19617986	19	607	538	69	-
AtDeg2	<i>AtDEG2</i>	AT2G47940.2	NC_003071	4266	19622251 → 19617986	19	606	538	68	-
AtDeg5	<i>AtDEG5</i>	AT4G18370	NC_003075	2090	10149129 → 10151218	8	323	251	28	44
AtDeg7	<i>AtDEG7</i>	AT3G03380	NC_003074	8908	799615 → 808522	24	1097	-	-	-
AtDeg8	<i>AtDEG8</i>	AT5G39830.1	NC_003076	3031	15942797 → 15945827	13	448	358	26	64
AtDeg8	<i>AtDEG8</i>	AT5G39830.2	NC_003076	3031	15942797 → 15945827	13	434	408	26	?
AtFtsH1	<i>AtFTSH1</i>	AT1G50250	NC_003070	2855	18617063 → 18614209	5	716	668	48	-
AtFtsH2	<i>AtFTSH2 (VAR2)</i>	AT2G30950	NC_003071.7	2903	13174321 → 13177223	5	695	648	47	-
AtFtsH5	<i>AtFTSH5 (VAR1)</i>	AT5G42270	NC_003076.8	2809	16902486 → 16905294	5	704	646	58	-
AtFtsH6	<i>AtFTSH6</i>	AT5G15250.1	NC_003076.8	2445	4952803 → 4950359	5	688	613	75	-
AtFtsH6	<i>AtFTSH6</i>	AT5G15250.2	NC_003076.8	2445	4952803 → 4950359	4	709	636	73	-
AtFtsH7	<i>AtFTSH7</i>	AT3G47060	NC_003074.8	3982	17332985 → 17336966	13	802	747	55	-
AtFtsH8	<i>AtFTSH8</i>	AT1G06430	NC_003070.9	2954	1963011 → 1960058	5	685	648	37	-
AtFtsH9	<i>AtFTSH9</i>	AT5G58870	NC_003076.8	3970	23773780 → 23769811	13	806	744	62	-
AtFtsH11	<i>AtFTSH11</i>	AT5G5317	NC_003076.8	5266	21568012 → 21562747	17	806	733	63	-
AtFtsH12	<i>AtFTSH12</i>	AT1G79560	NC_003070.9	5792	29926794 → 29932585	19	1008	959	49	-
AtLon4	<i>AtLON4</i>	AT3G05790	NC_003074.8	5029	1725182 → 1720154	19	942	876	66	-

Tab. 1 Dane dotyczące genów kodujących chloroplastowe proteazy i białka opiekuńcze AtClp, AtDeg, AtFtsH i AtLon i ich produktów. Tabelę utworzono na podstawie danych o genach zawartych w bazie danych NCBI, informacje o długości peptydów tranzytowych pozyskiwano z użyciem serwera Target P 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>). Długości peptydów eksportowych określano manualnie. Wymienione w tabeli proteazy i białka opiekuńcze są kodowane przez genom jądrowy, poza AtClpP1, kodowaną przez gen chloroplastowy, nieposiadającą tym samym formy prekursorowej. pre-mRNA niektórych genów wymienionych w tabeli podlegają alternatywnemu składaniu, co może (ale nie musi) skutkować akumulacją dwóch izoform produktu białkowego.

AtClp są w zlokalizowane w stromie chloroplastowej; wyjątek stanowi AtClpC1, który jest białkiem o podwójnej lokalizacji: stroma + wewnętrzna błona otoczki chloroplastowej (Paila i wsp., 2014). Niemal wszystkie białka AtClp są kodowane przez geny jądrowe i syntezowane na rybosomach cytoplazmatycznych w postaci cząsteczek prekursorowych, zawierających N-końcowy peptyd tranzytowy kierujący formy prekursorowe przez otoczkę chloroplastową do stromy. Jedyny wyjątek stanowi ClpP1 - białko to jest kodowane przez genom chloroplastowy i syntezowane na rybosomach stromy od razu w formie dojrzałej (patrz Tab. 1- brak peptydu tranzytowego AtClpP1). Holoenzym Clp *A. thaliana* jest oligomerycznym kompleksem obejmującym pięć typów białek: proteazy AtClpP, nieaktywne proteolitycznie białka AtClpR (paralogi proteaz AtClpP), białka opiekuńcze należące do rodziny HSP100, białko adaptorowe AtClpS1 oraz białka ClpT o nieznannej funkcji (Nishimura i van Wijk, 2014). W sumie pojedynczą cząstkę holokompleksu AtClp współtworzy jedenaście indywidualnych białek. Rdzeń proteolityczny tworzą białka AtClpP1 oraz AtClpR1-R4 (tworzące heptameryczny pierścień R) oraz AtClpP3-ClpP6 w formie heptamerycznego pierścienia P. Pierścień R i P tworzą heterododekameryczny rdzeń prawdopodobnie oddziaływujący z heksamerycznym cylindrem zbudowanym z białek opiekuńczych AtClpC1, AtClpC2 i AtClpD, a on z kolei pozostaje w kontakcie z białkiem adaptorowym AtClpS1. Ponadto pierścień P oddziałuje luźno z białkami AtClpT1 i AtClpT2 (Olinares i wsp., 2011b, Nishimura i van Wijk, 2014). Stosunek stechiometryczny podjednostek w pierścieniu P to AtClpP3:P4:P5:P6=1:2:3:1, a w pierścieniu R AtClpP1:R1:R2:R3:R4=3:1:1:1:1 (Sjögren i wsp., 2006). Tak więc pierścień P zawiera siedem miejsc katalitycznych, a pierścień R tylko trzy. Według powszechnie przyjętych poglądów rola AtClpS1 polega na ułatwieniu oddziaływania przeznaczonego do degradacji substratu z cząsteczkami białek opiekuńczych, które z kolei w ATP-zależny sposób rozfałdowują substrat umożliwiając mu w ten sposób wejście do wnętrza katalitycznego rdzenia utworzonego przez pierścienie P i R, gdzie dochodzi do właściwej degradacji (Nishimura i van Wijk, 2014). Jak już wspomniano, funkcja białek ClpT pozostaje nieznana.

W liniowej strukturze **AtClpC1** (oraz AtClpC2 i AtClpD - cała trójka należy do rodziny białek opiekuńczych HSP100) odnajduje się dwie domeny AAA⁺ (Rys. 2). Zadanie tych domen (AAA⁺1 i AAA⁺2) polega na wiązaniu i hydrolizie ATP (w czym bezpośrednio uczestniczą motywy Walker A i Walker B) oraz wykorzystaniu energii

swobodnej Gibbsa uwolnionej w wyniku hydrolizy ATP do rozfałdowania substratu i wprowadzenia go do wnętrza katalitycznego rdzenia. Strukturalna rola AtClpC1 i AtClpC2 polega z kolei na umożliwieniu (wraz z AtClpD) prawdopodobnej interakcji z pierścieniem R rdzenia proteolitycznego (Nishimura i van Wijk, 2014).



Rys. 2 Liniowa struktura cząsteczki prekursora białka opiekuńczego AtClpC1 ukazująca lokalizację peptydu tranzytowego (kolor szary) i domen AAA⁺ (kolor purpurowy) wraz z motywami Walker A (kolor żółty) i Walker B (kolor niebieski). Dane niezbędne do sporządzenia rysunku pozyskano z bazy NCBI oraz serwera Target P 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>).

Poszukując funkcji fizjologicznych AtClpC1 analizowano fenotyp insercyjnych mutantów *clpC1 A. thaliana*. Uzyskane wyniki wskazują, że białko to pełni bardzo istotne funkcje, ponieważ mutanty *clpC1* charakteryzowały się silną chlorozą, były karłowate, a aparat fotosyntetyczny był znacząco zmieniony, zarówno w sensie ultrastruktury chloroplastu (gorzej rozwinięty system tylakoidowy), składu białek chloroplastowych (obniżony poziom akumulacji białek związanych z fotosyntetycznym transportem elektronów, pierwotnym metabolizmem węgla obejmującym cykl Calvina, glikolizę i fotooddychaniem oraz podwyższony poziom białek zaangażowanych w biogenezę białek i ekspresję genów plastydowych), jak i aktywności fotosyntetycznej liści (Sjögren i wsp., 2004, Kovacheva i wsp., 2005, Nishimura i wsp., 2013, Sjögren i wsp., 2014)

Podobieństwo sekwencji aminokwasowej AtClpC1 i **AtClpC2** sięga 90%, a mimo to fenotyp mutantów *clpC2* nie różni się od fenotypu roślin WT (Park i Rodermel, 2004), co oznacza, że wbrew podobieństwu sekwencyjnemu do AtClpC1 - AtClpC2 pełni znacznie mniej istotne funkcje niż AtClpC1.

AtClpD jest białkiem w normalnych warunkach środowiskowych reprezentowanym przez mniejsze ilości niż AtClpC1. Poziom mRNA AtClpD podlega silnej indukcji podczas starzenia liści (Nakashima i wsp., 1997), przez co starsze liście mają podwyższony poziom akumulacji AtClpD (Sjögren i wsp., 2014, Nakabayashi i wsp., 1999). Na podwyższenie akumulacji AtClpD wpływa także stres chłodu (Zheng i wsp., 2002).

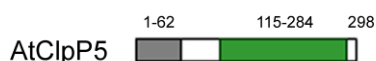
Produkt genu **AtCLPB3**, podobnie jak AtClpC1, AtClpC2 i AtClpD (do których wykazuje pewne podobieństwo sekwencyjne) jest białkiem chloroplastowym, należącym do rodziny białek opiekuńczych HSP100, jednak w odróżnieniu od AtClpC1/C2/D domena

AAA² AtClpB3 jest pozbawiona motywu I(L)GF (=PMB) umożliwiającego interakcję z rdzeniem proteolitycznym AtClp (Lee i wsp., 2007, Nishimura i van Wijk 2014). Oznacza to, że AtClpB3 może funkcjonować jako białko opiekuńcze całkowicie niezależnie od holokompleksu AtClp. Działanie AtClpB3 najprawdopodobniej polega na resolubilizacji agregatów międzybiałkowych, powstających w trakcie ekspozycji *A. thaliana* na stres termiczny (Lee i wsp., 2005) oraz na światło o podwyższonym natężeniu (Adamiec i wsp., 2011), a w bezstresowych warunkach środowiskowych AtClpB3 uczestniczy w biogenezie chloroplastów z proplastydów (Myouga i wsp., 2006).

AtClpP1 jest jedyną podjednostką systemu AtClp kodowaną przez gen plastydowy (Olinares i wsp., 2011b). W strukturze liniowej tego białka, podobnie jak wszystkich pozostałych chloroplastowych AtClpP, odnajduje się domenę proteazową zawierającą triadę katalityczną HDS, sytuującą to białko w rodzinie S14 (według bazy *MEROPS*). U tytoniu proteaza ta odgrywa istotną rolę w ontogenezie, na co wskazuje fakt, że wyciszenie *NtCLPP1* prowadzi od poważnego niedorozwoju pędu (Kuroda i Maliga, 2003), jednak indywidualne funkcje tego białka u *A. thaliana* nie są znane.

AtClpP3, podobnie jak podjednostki AtClpP4-6 i AtClpR1-4, posiada charakterystyczną C-końcową sekwencję (o długości do 52 aminokwasów) (Olinares i wsp., 2011a), która najprawdopodobniej wpływa na interakcję z białkami opiekuńczymi. Białko to odgrywa istotne funkcje w życiu rośliny na co wskazuje fakt, że mutanty *clpP3* charakteryzują się opóźnieniem embriogenezy, zarodki są białe i mniejsze niż u roślin WT (Kim i wp., 2013). Rozwój siewek mutantów zatrzymuje się na etapie liścieni, a dopiero dodanie cukrów do pożywki skutkuje powolnym rozwinięciem liści, zazielenieniem, zakwitnięciem i produkcją nasion (Kim i wsp., 2013).

Rysunek 3 przedstawia strukturę liniową cząsteczki **AtClpP5**, najobficiej reprezentowanej proteazy AtClpP. Jej brak uniemożliwia rozwój rośliny, mamy do czynienia z efektem letalnym w okresie embriogenezy (Kim i wsp., 2009).



Rys. 3 Liniowa struktura cząsteczki prekursora białka proteazy AtClpP5 ukazująca lokalizację peptydu tranzytowego (kolor szary) i domeny proteazowej (kolor zielony) Dane niezbędne do sporządzenia rysunku pozyskano z bazy NCBI oraz serwera Target P 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>).

Badania przeprowadzone z użyciem antysensownego mutantu *clpP6* wykazały, że brak białka **AtClpP6** skutkuje plejotropowymi zmianami dotyczącymi głównie liści dojrzałych, spośród których najbardziej znaczącą jest chloroza, osłabienie tempa wzrostu, pomarszczenie krawędzi blaszek liściowych, obniżenie tempa fotosyntezy i zaburzenia rozwoju chloroplastów. Chlorotyczne liście mutantu *clpP6* mają obniżony poziom akumulacji PSI, PSII, ATPazy, Rubisco i apobiałka Lhcb2 w porównaniu do liści WT (Sjögren i wsp., 2006). Efekty fenotypowe braku AtClpP6 są osłabione kompensacyjnym wzrostem poziomu AtClpP4 (Sjögren i wsp., 2006). Wśród białek, w regulacji obrotu metabolicznego których uczestniczy AtClpP6 zidentyfikowano: czynnik elongacyjny EF-Ts, białko wiążące RNA, aldolazę fruktozo 1,6-bisfosforanu, fosforybozylotransferazę uracylu, izomerazę cis-trans peptydylo-proliową, kinazę NDP i prawdopodobną izomerazę rybozo 5-fosforanu (Sjögren i wsp., 2006).

Fenotyp mutantów pozbawionych **AtClpR1** jest umiarkowany i charakteryzuje się słabą chlorozą oraz niewielkimi zmianami ultrastruktury chloroplastu (Kim i wsp., 2009, Koussevitzky i wsp., 2007).

Brak **AtClpR2** i **AtClpR4** powoduje dużo poważniejsze skutki niż brak AtClpR1, np. opóźnienie embriogenezy, brak zazielenienia siewek (których rozwój zatrzymuje się na etapie liścieni) i mniejsze niż u roślin WT nasiona (Rudella i wsp., 2006), które mogą dojrzewać w warunkach autotroficznych. W warunkach heterotroficznych powoli rozwijają się bladozielone siewki, ale rośliny produkują nieżywotne nasiona (Kim i wsp., 2009).

Jak już wspomniano białko **AtClpS1** najprawdopodobniej pełni funkcję adaptorową, która polega na ułatwieniu oddziaływania przeznaczonego do degradacji substratu z cząsteczkami białek opiekuńczych AtClpC1/AtClpC2/AtClpD, nie zostało to jednak w pełni udowodnione u roślin (Olinares i wsp., 2011a). Fenotyp mutantu *clpS1* zbliżony jest do fenotypu roślin WT, choć poziom chlorofilu mutantów jest nieco obniżony (Nishimura i wsp., 2013). Ze względu na większą podatność mutantu na działanie chloroplastowego inhibitora elongacji translacji - chloramfenikolu, ale nie na działanie cytozolowego inhibitora translacji - cykloheksamidu, sugeruje się związek pomiędzy plastydową translacją a proteolizą z udziałem AtClpS1 (Nishimura i wsp., 2013).

Pojedyncze mutanty pozbawione nierozpoznanych co do funkcji białek **AtClpT1** i **AtClpT2** mają fenotyp nieodbiegający od roślin WT (Sjögren i Clarke, 2011), fenotyp

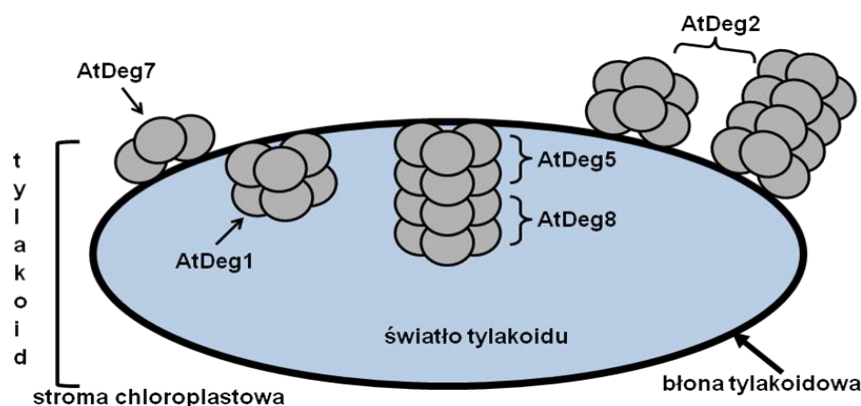
podwójnego mutantu natomiast jest już bardzo wyraźny (Nishimura i van Wijk, 2014), ale nie letalny (Sjögren i Clarke, 2011). Siła fenotypu podwójnego mutantu *clpT1/clpT2* może mieć związek z istotną rolą, jaką podjednostki AtClpT1 i AtClpT2 odgrywają w trakcie montażu cząstek holokompleksu AtClp - dowiedziono mianowicie, że przyłączenie pierścienia R do pierścienia P jest możliwe pod warunkiem wcześniejszego powstania przejściowego trójskładnikowego kompleksu: pierścień P-AtClpT1-AtClpT2 (Sjögren i Clarke, 2011).

1.5.7.2 Deg

W genomie jądrowym *A. thaliana* zidentyfikowano szesnaście genów kodujących białka ortologiczne do DegP, DegQ i DegS *E. coli*; nazwano je *AtDEG1-16* (Huesgen i wsp., 2005; Schuhmann i wsp., 2012). Dowiedziono eksperymentalnie, że pięć spośród tych genów - *AtDEG1, 2, 5, 7 i 8* - koduje białka kierowane do chloroplastów, *AtDEG10* - białko o lokalizacji mitochondrialnej, a *AtDEG15* - białko peroksysomalne. Pozostałe dziewięć genów *AtDEG* koduje białka, których lokalizację ustalono jedynie *in silico*, jako zarówno mitochondrialną, jak i chloroplastową lub lokalizacji ich nie udało się wyznaczyć (Schuhmann i Adamska, 2012). Znakomita większość genów *AtDEG* (obejmujących wszystkie pięć kodujących białka chloroplastowe) posiada swe ortologi wśród innych gatunków roślin modelowych, takich jak *Populus trichocarpa*, *Oryza sativa*, *Physcomitrella patens* and *Chlamydomonas reinhardtii* (Schuhmann i wsp., 2012).

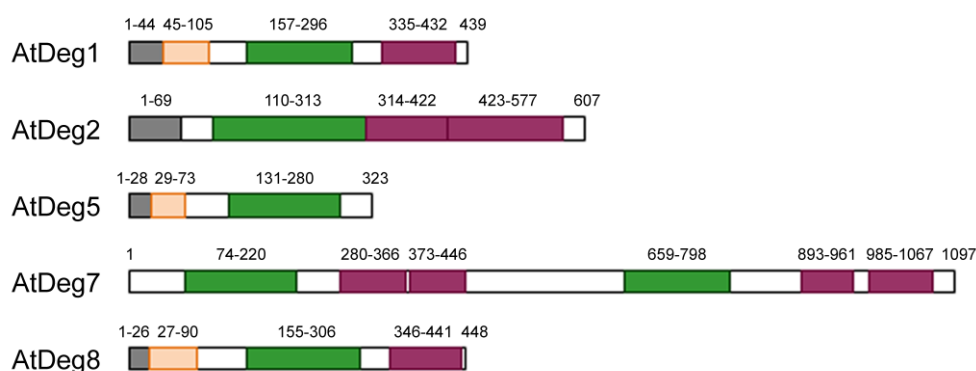
AtDeg to proteazy serynowe, które baza *MEROPS* umieszcza w rodzinie S1 (holotyp - chymotrypsyna wołu). Informacje na temat genów kodujących poszczególne chloroplastowe Deg, ich transkryptach i produktach białkowych zawarte są w Tab. 1.

Aktywna proteolitycznie forma **AtDeg1** jest najprawdopodobniej homoheksamerem (Kley i wsp., 2011) połączonym (peryferycznie) z błoną tylakoidową od strony światła tylakoidu (Huesgen i wsp., 2005) (Rys. 4).



Rys. 4 Rozmieszczenie proteaz AtDeg1, 2, 5, 7 i 8 wewnątrz chloroplastu. Rysunek wykonano w oparciu o dane z prac Huesgen i wsp. (2005) oraz Schuhmann i wsp. (2011).

Na strukturę pierwszorzędową AtDeg1 składa się domena proteazowa (z triadą katalityczną HDS) i pojedyncza domena PDZ (Rys. 5).



Rys. 5 Liniowa struktura cząsteczek prekursorów proteaz chloroplastowych AtDeg ukazująca lokalizację peptydów tranzytowych (kolor szary), peptydów eksportowych (kolor pomarańczowy), domen proteazowych (kolor zielony) i domen PDZ (kolor purpurowy). W przypadku AtDeg7 nie zidentyfikowano do tej pory peptydu tranzytowego, dlatego nie jest on zaznaczony na schemacie. Dane niezbędne do sporządzenia rysunku pozyskano z bazy NCBI, serwera Target P 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>) oraz pracy Sun i wsp. (2012).

Rozwiązanie struktury krystalicznej pozwoliło na stwierdzenie, że AtDeg1 funkcjonuje jako homoheksamer typu beczka składającą się z dwóch trimerycznych pierścieni ułożonych jeden nad drugim w taki sposób, że w ich wnętrzu utworzona zostaje komora katalityczna. Monomery AtDeg1 asocjują w trimery poprzez oddziaływania między domenami proteazowymi, natomiast heksamer powstaje przez oddziaływania pomiędzy pętlami LA domeny proteazowej i motywami IC1 i IC2 domeny PDZ. Szttywne ściany komory katalitycznej tworzy sześć domen PDZ wraz z sześcioma pętlami LA domen proteazowych, w ścianach formują się trzy wyraźne wejścia prowadzącymi do wnętrza komory (Kley

i wsp., 2011). Przejście między nieaktywnym proteolitycznie monomerem a aktywną formą heksameryczną jest promowane przez obniżenie pH światła tylakoidu (Kley i wsp., 2011).

Aktywność proteazową AtDeg1 potwierdza zdolność rekombinowanej wersji tego białka do hydrolizy *in vitro* substratu niefizjologicznego, jakim jest β -kazeina. Tempo hydrolizy zależy od temperatury i pH środowiska reakcyjnego - rośnie w zakresie temperatur 15-42°C, a w 55°C hydroliza zachodzi jeszcze intensywniej. Wzrost temperatury wpływa na podwyższenie aktywności enzymu, bądź wywołuje rozfałdowanie substratu, przez co staje się on łatwiej dostępny dla proteazy. Rekombinowana AtDeg1 najwydajniej degraduje β -kazeinę w przedziale pH między 5.5 a 7.0, przy czym maksymalna aktywność ma miejsce przy pH 6.0, a niewielka już alkalizacja środowiska reakcyjnego silnie obniża tempo degradacji (Chassin i wsp., 2002). Poziom ekspresji *AtDEG1* (akumulacja transkryptów) podlega modulacji w odpowiedzi na krótkoterminowe podwyższenie natężenia światła (Sinvány-Villalobo i wsp., 2004). Wyniki badań nad mutantami insercyjnymi *deg1 A. thaliana* wskazują, że AtDeg1 uczestniczy w degradacji białka PsbA (D1) uszkodzonego działaniem światła o podwyższonym natężeniu nacinając uszkodzoną cząsteczkę w dwóch miejscach - w obrębie dwóch pętli zlokalizowanych w świetle tylakoidu: tzw. pętli CD oraz pętli C-końcowej (Kapri-Pardes i wsp., 2007). Linie mutantów *deg1* okazały się wrażliwsze na fotoinhibicję od roślin WT (Kapri-Pardes i wsp., 2007), najprawdopodobniej właśnie ze względu na ich niezdolność do degradacji uszkodzonego PsbA, która jest niezbędnym warunkiem syntezy nowych kopii PsbA i przeprowadzenia pełnego cyklu naprawczego PSII (Andersson i Aro, 2001, Yamamoto, 2001). Dowiedziono, że w odpowiedzi na ekspozycję na światło o podwyższonym natężeniu AtDeg1 katalizuje także hydrolizę apobiałek peryferycznych anten energetycznych PSII CP26 i CP29 oraz zasocjowanego z PSII białka PsbS (Zienkiewicz i wsp., 2012). Sądzi się, że AtDeg1 może w warunkach bezstresowych być zaangażowana w utrzymywanie homeostazy w świetle tylakoidu poprzez udział w obrocie metabolicznym PsbO i plastocyaniny (Chassin i wsp., 2002).

Jednym z najbardziej interesujących dokonań w zakresie badań nad AtDeg1 jest udowodnienie, że proteaza ta może także funkcjonować jako białko opiekuńcze - uczestnicząc w składaniu i biogenezie PSII poprzez interakcje z białkiem PsbD (D2).

Aktywność opiekuńcza AtDeg1 jest związana z resztą S triady katalitycznej HDS (Sun i wsp., 2010b).

AtDeg1 pełni ważne funkcje na poziomie całej rośliny, na co wskazują obserwacje, że mutanty *deg1* charakteryzują się także ograniczonym wzrostem i wcześniejszym zakwitaniem, a obniżenie zawartość chlorofilu b powoduje, że liście mutantów są blade zielone (Kapri-Pardes i wsp., 2007).

Aktywna proteolitycznie proteaza **AtDeg2** jest najprawdopodobniej 12- lub 24-merem (Sun i wsp., 2012), połączonym peryferycznie z błoną tylakoidową od strony stromy (Haussühl i wsp., 2001) (Rys. 4). Na strukturę pierwszorzędową tego białka składa się domena proteazowa i dwie domeny PDZ (PDZ1 i PDZ2) (Rys. 5). 12- lub 24-mery powstają przez połączenie się ze sobą heksamerów (Rys. 4) (zapewne nieaktywnych proteolitycznie). Heksamer AtDeg2 jest beczką składającą się z dwóch trimerycznych pierścieni ułożonych na sobie w taki sposób, że formują one wewnętrzną komorę katalityczną; wejście do niej jest możliwe przez sześć porów (Sun i wsp., 2012). W łączeniu się monomerów w trimery pośredniczą domeny proteazowe i domena PDZ1, a w stabilizacji połączenia trimerów - wszystkie trzy domeny. Oligomeryzacja heksamerów AtDeg2 przebiega w sposób pH-niezależny. Dowiedziono, że ilość AtDeg2 w formie aktywnego 12- lub 24-meru wzrasta *in vitro* z czasem inkubacji ze sztucznym substratem - β -kazeiną, czemu towarzyszy wzrost poziomu produktu degradacji β -kazeiny (Sun i wsp., 2012).

Aktywność proteazową AtDeg2 potwierdza zdolność rekombinowanej wersji tego białka do hydrolizy *in vitro* nie tylko β -kazeiny (Sun i wsp., 2012), ale także innego niefizjologicznego substratu - żelatyny (Haussühl i wsp., 2001). Na aktywność proteolityczną AtDeg2 *in vitro* wpływa status redoks otoczenia, w którym aktywność jest mierzona (Stroher i Dietz 2008).

Wykazano, że krótkoterminowe (2 h) stresy: solny, oksydacyjny, wysokiej temperatury i desykcji wpływają hamująco na akumulację transkryptów *AtDEG2*, choć w przypadku stresu solnego i desykcji jednocześnie następuje 2-4-krotne zwiększenie poziomu akumulacji białka AtDeg2 (Haussühl i wsp., 2001). Z kolei w odpowiedzi na krótkoterminową (2,5 h) ekspozycję roślin na światło o podwyższonym natężeniu transkrypcja *AtDEG2* ulega 3-krotnemu wzmocnieniu (Sinvany-Villalobo i wsp., 2004), zaś

długoterminowa (5 h) ekspozycja na nadmierne natężenie światła skutkuje około 2-krotnym obniżeniem transkrypcji *AtDEG2* (Adamiec i wsp., 2011).

Niektórzy badacze sądzą, że *in vivo* AtDeg2 uczestniczy w degradacji fotouszkodzonego białka PsbA (D1) poprzez GTP-zależne trawienie w obrębie pętli DE wyeksponowanej w stronę stromy, w wyniku którego białko PsbA podzielone ma zostać na dwa fragmenty (Spetea i wsp., 1999, Lindahl i wsp., 2000, Haussühl i wsp., 2001). Istnieją jednak pewne wątpliwości odnośnie do faktycznego przebiegu takiej reakcji *in vivo*. Analiza dwóch linii mutantów *deg2 A. thaliana* typu *knock-out* (*deg2-1* i *deg2-2*) rosnących w warunkach podwyższonego natężenia światła nie wykazała różnic w porównaniu do roślin WT odnośnie do kinetyki degradacji białka PsbA oraz wartości parametru Fv/Fm (Huesgen i wsp., 2006). Ten ostatni wynik został z kolei zakwestionowany przez członków naszego zespołu badawczego (Luciński i wsp., 2011b). Z analizy wyników badań prowadzonych na mutantach *deg2-2* i *deg2-3* wynika, że AtDeg2 degradowuje *in vivo* także apobiałko Lhcb6; dzieje się tak w odpowiedzi na różne krótkoterminowe (3 h) stresy, w tym ekspozycję na światło o podwyższonym natężeniu (Luciński i wsp., 2011b).

Ostatnio (Sun i wsp., 2012) udowodniono, że AtDeg2, podobnie jak AtDeg1, może też pełnić funkcje białka opiekuńczego, jednak ta aktywność została na razie potwierdzona tylko w doświadczeniach *in vitro*.

Na poziomie całej rośliny w warunkach bezstresowych AtDeg2 uczestniczy w regulacji pola powierzchni liści i ultrastruktury chloroplastów, na co wskazują wyniki badań nad mutantami *deg2-2* i *deg2-3* - oba mutanty, hodowane w warunkach zarówno długiego, jak i krótkiego fotoperiodu charakteryzują się mniejszym polem powierzchni niektórych liści, a chloroplasty mutantów cechowała zmniejszona liczba plastoglobul i większa liczba tylakoidów zespolonych w stopy granowe (Luciński i wsp., 2011b).

Aktywna proteolitycznie proteaza **AtDeg5** najprawdopodobniej tworzy heksamer połączony z heksamerem AtDeg8 w heterododekamer zlokalizowany na powierzchni błony tylakoidowej od strony światła tylakoidu (Sun i wsp., 2007a) (Rys. 4). W liniowej strukturze cząsteczki tej proteazy odnajdujemy pojedynczą domenę protezową; brak domeny PDZ (Rys. 5). Heksameryczny charakter AtDeg5 w obrębie kompleksu AtDeg5/AtDeg8 nie jest jednak całkowicie pewny, ostatnio bowiem wykazano, że AtDeg5 w roztworze formuje trimer (który może wiązać dwa jony Ca²⁺), w kryształach natomiast formuje podwójne trimery (Sun i wsp., 2013). Co ciekawe, rekombinowana wersja AtDeg5

nie wykazuje *in vitro* aktywności proteolitycznej względem niefizjologicznych substratów (Sun i wsp., 2007a), co może potwierdzać, że *in vivo* AtDeg5 musi współpracować z AtDeg8 w formie heterokompleksu AtDeg5/AtDeg8, w którym dawcą centrów katalitycznych jest AtDeg8.

Informacje dotyczące fizjologicznych substratów AtDeg5 są bardzo skromne. Prawdopodobnie proteaza ta uczestniczy w degradacji białka PsbA uszkodzonego wskutek ekspozycji roślin na światło o podwyższonym natężeniu (Sun i wsp., 2007a) i wysoką temperaturę (Sun i wsp., 2007b). W warunkach fotoinhibicyjnych rola AtDeg5 może polegać na nacinaniu fotouszkodzonego PsbA w obrębie zlokalizowanej w świetle tylakoidu pętli CD, z wytworzeniem fragmentów 18 i 16 kDa (Sun i wsp., 2007a). Mutanty *deg5* charakteryzują się podwyższoną wrażliwością na fotoinhibicję (Sun i wsp., 2007a), ponieważ - podobnie jak mutanty *deg1* - najprawdopodobniej nie są zdolne do degradacji uszkodzonego PsbA. Z badań tych wynika, że AtDeg5 może odgrywać ważną rolę w ochronie rośliny przed fotoinhibicją *in vivo*. Wyniki niedawno przeprowadzonych badań wskazują, że AtDeg5 uczestniczy także w degradacji podjednostki podjednostki β cytochromu b_{559} (PsbF) w odpowiedzi na stres zranienia liścia (Luciński i wsp., 2011a). W warunkach bezstresowych AtDeg5 bierze udział w kształtowaniu się właściwej morfologii i struktury anatomicznej liści, ultrastruktury chloroplastów i w regulacji metabolizmu skrobi w chloroplastach (Luciński i wsp., 2011a). W mojej pracy przedstawione zostaną uszczegółowione dane o tej proteazie, wzbogacone o analizy drugiego mutanta *deg5* oraz dużo bardziej szczegółowe (dokładniejsza analiza większej liczby cech) porównanie fenotypu roślin rosnących w optymalnych warunkach z uwzględnieniem dla badanych cech wątku ontogenetycznego.

Aktywna proteolitycznie forma **AtDeg7** jest najprawdopodobniej trimerym (Schuhmann i wsp., 2011) zlokalizowanym na powierzchni błony tylakoidowej od strony stromy (Sun i wsp., 2010a) (Rys. 4) jednak nieopublikowane dane pochodzącej z laboratorium prof. Iwony Adamskiej sugerują, że może to być białko jądrowe (!). Mogłoby to pozostawać w zgodzie z faktem, iż program Target P 1.1 nie wykrywa w strukturze prekursora AtDeg7 peptydu tranzytowego.

W pierwszorzędowej strukturze AtDeg7 odnajdujemy (Rys. 5) dwie domeny proteazowe, przy czym druga z nich jest formą nieaktywną katalitycznie (zdegenerowaną) oraz cztery

domeny PDZ (Schuhmann i wsp., 2011). Proces trymeryzacji opiera się na interakcjach pomiędzy zdegenerowanymi domenami proteazowymi (Schuhmann i wsp., 2011).

Z badań przeprowadzonych na rekombinowanej proteazie AtDeg7 wynika, że enzym ten wykazuje aktywność proteolityczną *in vitro* wobec niefizjologicznego substratu, jakim jest β -kazeina, przy czym aktywności takiej nie zaobserwowano w stosunku do form α i κ kazeiny (Sun i wsp., 2010a).

Informacje dotyczące fizjologicznych substratów AtDeg7 są bardzo skromne. Prawdopodobnie proteaza ta współdziała z AtDeg1, AtDeg2 (?) i AtDeg5/AtDeg8 w degradacji fotouszkodzonego białka PsbA oraz reguluje degradację innych białek rdzenia PSII (PsbB, PsbC i PsbD) w warunkach fotoinhibicyjnych (Sun i wsp., 2010a).

Aktywna proteolitycznie proteaza **AtDeg8** najprawdopodobniej tworzy heksamer połączony z heksamerem AtDeg5 w heterododekamer zlokalizowany na powierzchni błony tylakoidowej od strony światła tylakoidu (Sun i wsp., 2007a) (Rys. 4). Najnowsze badania wskazują, że AtDeg8 rzeczywiście przyjmuje formę heksameryczną zarówno w roztworze, jak i w formie krystalicznej (Sun i wsp., 2013).

Badania przeprowadzone na rekombinowanej proteazie AtDeg8 dowodzą, że wykazuje ona wykazuje aktywność proteolityczną *in vitro* wobec niefizjologicznego substratu, jakim jest β -kazeina (Sun i wsp., 2007a).

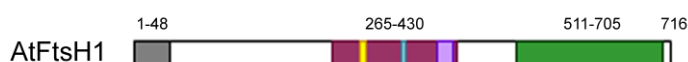
Krótkoterminowa (2,5 h) ekspozycja roślin *A. thaliana* na światło o wysokim natężeniu skutkuje 4-krotnym wzrostem poziomu transkryptyu *AtDEG8* (Sinvany-Villalobo i wsp., 2004). W tych warunkach AtDeg8 prawdopodobnie współdziała z AtDeg1, AtDeg2(?), AtDeg5 i AtDeg7 (?) w degradacji fotouszkodzonego białka PsbA (Sun i wsp., 2007a). W warunkach stresu wysokiej temperatury uczestniczy w degradacji PsbA (Sun i wsp., 2007b). Całkowicie nieznana pozostaje rola AtDeg8 w komfortowych warunkach środowiskowych.

1.5.7.3 FtsH

Genom jądrowy *Arabidopsis thaliana* zawiera 12 genów (Tab. 1) kodujących białka AtFtsH ortologicznych względem FtsH *E. coli* (Sokolenko i wsp., 2002, Adam i wsp., 2005). Do chloroplastów kierowane są najprawdopodobniej następujące spośród nich: AtFtsH1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 12, a AtFtsH11 jest kierowana zarówno do chloroplastów, jak i mitochondriów (Sakamoto i wsp., 2003, Urantówka i wsp., 2005).

Produkty genów kodujących chloroplastowe **AtFtsH1, 2, 5 i 8** są białkami integralnie związanymi z błoną tylakoidową (Sakamoto i wsp., 2003), tworzącymi heterooligomeryczny kompleks (nazywany heterokompleksem AtFtsH) zawierający AtFtsH1/5 (typ A AtFtsH) i AtFtsH2/8 (typ B AtFtsH) (Yu i wsp., 2004, Zaltsman i wsp., 2005b). W normalnych warunkach FtsH2 to najobficiej reprezentowana chloroplastowa izoforma AtFtsH, FtsH5 jest druga co do obfitości, a FtsH8 i FtsH1 są reprezentowane przez bardzo niewielkie ilości (Sakamoto i wsp., 2003, Zaltsman i wsp., 2005b).

W strukturze pierwszorzędowej AtFtsH1, 2, 5 i 8 odnajdujemy domenę AAA⁺, która zawiera motywy Walker A i Walker B (uczestniczące w wiązaniu i hydrolizie ATP niezbędnej do rozfałdowania substratu) i rejon SRH (funkcja pomocnicza w wiązaniu i hydrolizie ATP) oraz C-kończącą domenę proteazową. Centrum katalityczne z motywem HEXXH wiążącym Zn²⁺ sytuuje - według klasyfikacji *MEROPS* - wszystkie AtFtsH w rodzinie M41(holotyp – FtsH *E coli*).



Rys. 6 Liniowa struktura cząsteczki prekursora proteazy chloroplastowej AtFtsH1 ukazująca lokalizację peptydu tranzytowego (kolor szary), domeny proteazowej (kolor zielony) i domeny AAA⁺ (kolor purpurowy) wraz z motywami Walker A (kolor żółty), Walker B (kolor niebieski) i rejonem SRH (kolor fioletowy). Dane niezbędne do sporządzenia rysunku pozyskano z bazy NCBI i serwera Target P 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>).

Niefizjologicznym substratem rekombinowanej proteazy AtFtsH1 jest w warunkach *in vitro* β-kazeina (Lindahl i wsp., 2000).

Liczne dane eksperymentalne wskazują, że heterokompleks AtFtsH uczestniczy *in vivo* w degradacji fotouszkodzonego białka PsbA oraz w biogenezie chloroplastów (Bailey i wsp., 2002, Zaltsman i wsp., 2005b).

Wyciszenie *AtFTSH2* i *AtFTSH5* ze względu na wysoki poziom akumulacji ich produktów w roślinach WT skutkuje poważnymi zaburzeniami fenotypu mutantów *ftsH2* (*var2*) i *ftsH5* (*var1*) (Sakamoto i wsp., 2003).

Cechą charakterystyczną *var2* (*yellow-variegated 2*) jest obecność zielonych i biało-żółtych sektorów na blaszce liściowej, określana jako pstrolistność (Chen i wsp., 2000, Martinez-Zapater, 1993, Sakamoto, 2003, Takechi i wsp., 2000). Cecha ta nie dotyczy liścieni, pierwszy liść jednak jest już na ogół biały, a kolejne biało-żółto-zielone, przy czym

stopniowo, wraz z upływem czasu, obniża się stosunek sektorów przebarwionych do zielonych (Zaltsman i wsp., 2005a). Komórki w zielonych sektorach liści zawierają chloroplasty o normalnej strukturze, plastidy białych sektorów natomiast wykazują nieodróżnicowaną strukturę, słabo rozwinięty system błon wewnętrznych i silną wakuolizację, co wskazuje na istotne znaczenie AtFtsH2 dla wczesnych stadiów biogenezy tych błon (Chen i wsp., 2000, Kato i wsp., 2007). Chloroplasty w zielonych sektorach funkcjonują w warunkach stresu fotooksydacyjnego, a działanie czynników stresowych wpływa na wzmocnienie ekspresji genów kodujących mitochondrialną alternatywną oksydazę, co wskazuje na udział AtFtsH2 w ekspresji genów mitochondrialnych metabolizmu oddechowego (Yoshida i wsp., 2008).

Mutant *var1* (*yellow-variegated 1*) charakteryzuje się fenotypem zbliżonym do *var2*, ale ze względu na niższy poziom akumulacji AtFtsH5 *in vivo* jest on słabiej wyrażony (Sakamoto i wsp., 2002, Sinvany-Villalobo i wsp., 2004). Liścienie są zielone, ale już pierwsze liście pstre, a stosunek obszarów pstrych do zielonych zmniejsza się wraz z upływem czasu i dojrzałe rośliny *var1* nie różnią się od WT (Sakamoto i wsp., 2002). W chloroplastach zielonych sektorów występuje większa niż u roślin WT liczba plastoglobuli (Sakamoto i wsp., 2002). Plastidy białych sektorów wyglądają jak u mutantu *var2*, co świadczy o niezbędności AtFtsH5 dla prawidłowego rozwoju systemu tylakoidów (Sakamoto i wsp., 2002). Badania z wykorzystaniem mutantu *var1-1* (Martinez-Zapater, 1993) wskazują, że w warunkach długoterminowego stresu zasolenia (6h) oraz zimna i wysokiego natężenia światła (24 h) substratami heterokompleksu AtFtsH są apobiałka głównej peryferycznej anteny energetycznej PSII Lhcb1-3 (Luciński i Jackowski, 2013).

Wewnątrzchloroplastowa lokalizacja **AtFtsH6** (Ferro i wsp., 2010), jak i jej oligomeryczny stan wciąż pozostają nieznane.

Z badań przeprowadzonych z wykorzystaniem mutantów *ftsh6* wnioskowano, że do fizjologicznych substratów AtFtsH6 należą dwa apobiałka głównej peryferycznej anteny energetycznej PSII - Lhcb1 i Lhcb3. AtFtsH6 była uważana za odpowiedzialną za degradację Lhcb1 w warunkach 24 h ekspozycji roślin na podwyższone natężenie światła oraz degradację Lhcb3 związaną ze starzeniem się zaciemnianych liści (Garcia-Lorenzo i wsp., 2005, Żelisko i wsp., 2005), jednak nowsze dane podważają tę interpretację (Wagner i wsp., 2011).

AtFtsH7 i AtFtsH9 tworzą w otocze chloroplastowej heterokompleks (Wagner i wsp., 2011). Każda z tych izoform posiada dwie transmembranowe domeny (Ferro i wsp., 2010).

W odpowiedzi na krótkoterminową (2,5 h) ekspozycję na podwyższone natężenie światła transkrypcja *AtFTSH7* i *AtFTSH9* wzmacniana jest przejściowo 2-4-krotnie (Sinvány-Villalobo i wsp., 2004).

Obserwowano niewielkie wzmocnienie akumulacji transkryptów **AtFTSH8** w odpowiedzi na krótkoterminową ekspozycję na podwyższoną temperaturę (Sinvány-Villalobo i wsp., 2004).

Z analizy fenotypowej mutantów *ftsh11* wynika, że **AtFtsH11** zaangażowana jest w kształtowanie się odporności roślin na podwyższoną temperaturę i nabywanie termotolerancji (Chen i wsp., 2006), mimo iż ekspozycja na podwyższoną temperaturę nie stymuluje transkrypcji *FTSH11* (Sinvány-Villalobo i wsp., 2004).

Nie zidentyfikowano do tej pory fizjologicznych substratów dla AtFtsH11.

AtFtsH12 zlokalizowana jest w otocze chloroplastowej w postaci kompleksu współtworzonego z nieaktywną izoformą AtFtsHi (*inactive*), w której brakuje wszystkich trzech aminokwasów niezbędnych dla wiązania cynku. AtFtsH12 posiada dwie domeny transmembranowe (Ferro i wsp., 2010), chociaż ich topologia w tej błonie nadal nie jest znana.

Nie udało się zidentyfikować fizjologicznych substratów AtFtsH12.

1.5.7.4 Lon

Aktywna proteolityczna forma **AtLon4** jest białkiem związanym silnymi oddziaływaniami z błoną tylakoidową od strony stromy (Ostersetzer i wsp., 2007); białku temu przypisuje się jednocześnie lokalizację mitochondrialną. W strukturze pierwszorzędowej AtLon4 odnajdujemy domenę AAA⁺, która zawiera motywy Walker A i Walker B (uczestniczące w wiązaniu i hydrolizie ATP niezbędnej do rozfałdowania substratu) oraz C-końcową domenę proteazową. Centrum katalityczne z motywem SK sytuuje - według klasyfikacji *MEROPS* - AtLon4 w rodzinie S16 (holotyp - Lon *E coli*).

Brak jakichkolwiek danych o organizacji strukturalnej i funkcjach AtLon4.



Rys. 7 Liniowa struktura cząsteczki prekursora proteazy chloroplastowej AtLon4 ukazująca lokalizację peptydu tranzytowego (kolor szary), domeny proteazowej (kolor zielony) i domeny AAA⁺ (kolor purpurowy) wraz z motywami Walker A (kolor żółty) i Walker B (kolor niebieski). Dane niezbędne do sporządzenia rysunku pozyskano z bazy NCBI i serwera Target P 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>).

1.6 Przebieg ontogenezy *A. thaliana*

Ontogenezę *A. thaliana*, podobnie jak wszystkich innych roślin nasiennych, tradycyjnie dzieli się na kiełkowanie nasion, embriogenezę, rozwój wegetatywny, rozwój generatywny i starzenie. Jednak w celu umożliwienia precyzyjnych analiz porównawczych przebiegu ontogenezy np. roślin WT *A. thaliana* i dowolnych mutantów stosuje się system zmodyfikowany - dostosowany do tego gatunku (tzw. skala BBCH - Lancashire i wsp., 1991, Boyes i wsp., 2001 - szerzej opisana w rozdziale Wyniki), a pierwotnie opracowany dla celów komercyjnych (usystematyzowanie stadiów ontogenetycznych roślin uprawnych miało na celu ułatwienie i obiektywizację porównawczych analiz działania herbicydów). Opierając się na dostosowanej do *A. thaliana* skali BBCH można ontogenezę tego gatunku podzielić na szereg faz, a wśród nich: kiełkowanie nasion, rozwój liści, wzrost rozety liściowej, pojawienie się kwiatostanu, dojrzewanie owoców (łuszczynek), starzenie (Boyes i wsp., 2001). W odniesieniu do tradycyjnego podziału zwraca uwagę brak fazy embriogenezy, która nie była ani istotna, ani dostępna dla szczegółowych analiz w momencie tworzenia skali BBCH.

Jak wspomniano wcześniej (str. 32 - 34, 38 - 40, 42, 43) istnieją dane wskazujące, że proteazy chloroplastowe *A. thaliana* uczestniczą w regulacji przebiegu ontogenezy roślin tego gatunku, w szczególności wzrostu i rozwoju liści, kwitnienia i rozwoju organów generatywnych. Wzrost i rozwój liści *A. thaliana* podlegają ścisłej kontroli ze strony czynników genetycznych regulujących wzrost i podziały komórek epidermalnych; czynniki te regulują zarazem przejście przez roślinę z fazy wegetatywnej do generatywnej (Ashby, 1984, Cookson i wsp., 2007). Istotną rolę pełni miRNA 156, który poprzez represję mRNA czynników transkrypcyjnych z rodziny SPL opóźnia osiągnięcie przez liść dojrzałości oraz kwitnienie (Gandikota i wsp., 2007). Z kolei miRNA 172 działa antagonistycznie - poprzez udział w degradacji mRNA czynników transkrypcyjnych (kodowanych przez geny *AP2*)

uczestniczących w opóźnieniu dojrzewania liści i zakwitania (Wu i wsp., 2009). W regulacji zakwitania *A. thaliana* uczestniczą też geny *APETALA1 (AP1)*, *APETALA3 (AP3)*, *AGAMOUS*, *PISTILLATA (PI)* oraz *SEPALLATA 1-4 (SEP1-4)* (Pelaz i wsp., 2000).

Dojrzewanie owoców (pęknięcie łuszczynek) pozostaje u *A. thaliana* pod kontrolą genów kodujących czynniki transkrypcyjne *SHAETTERPROOF (SHP1/2)*, *INDEHISCENT (IND)* oraz *ALCATRAZ (ALC)* (Liljegren i wsp., 2000, 2004; Rajani i Subdaresan, 2001).

Literatura światowa nie zawiera żadnych danych odnoszących się do udziału proteaz chloroplastowych *A. thaliana* w szlakach sygnałnych zaangażowanych w regulację wzrostu i rozwoju liści, kwitnienia i rozwoju organów generatywnych.

1.7 Fotosynteza

Fotosynteza jest najważniejszym procesem biosyntetycznym przebiegającym w ziemskiej biosferze.

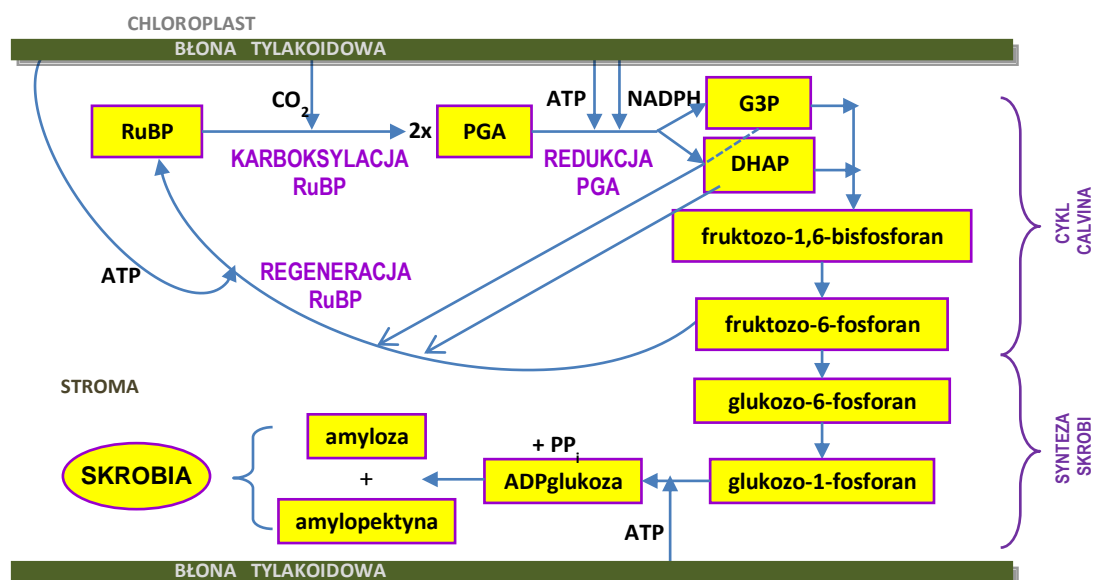
W toku fazy jasnej fotosyntezy energia kwantów energii promienistej światła słonecznego zostaje - w wyniku współdziałania PSII, kompleksu cytochromowego *b6f*, PSI i syntazy ATP przekształcona w energię chemiczną reprezentowaną przez wysokoenergetyczne wiązania w cząsteczce ATP (nośnik energii chemicznej) oraz wiązania w cząsteczce NADPH₂ (czynnik redukujący). W toku fazy ciemnej fotosyntezy ATP i NADPH₂, będące produktami fazy jasnej, zostają wykorzystane do redukcji węgla z poziomu charakterystycznego dla CO₂ (pobieranego z atmosfery jako substrat) do poziomu właściwego dla cukrów - podstawowym produktem fazy ciemnej jest skrobia. Faza jasna przebiega w tylakoidach, a faza ciemna w stromie chloroplastowej.

Jak już wspomniano wcześniej (str. 32, 34, 37, 39 - 43) istnieją doniesienia wskazujące, iż proteazy chloroplastowe *A. thaliana* uczestniczą w regulacji fazy jasnej fotosyntezy, a mianowicie katalizują hydrolizę niektórych białek PSII, uszkodzonych działaniem różnych stresów abiotycznych.

Cząstki PSII roślin wyższych i glonów są wbudowane w zespolone błony tylakoidowe chloroplastu w formie dimerycznych tzw. superkompleksów PSII-LHCII składających się z dwóch monomerycznych rdzeni i zmiennej liczby peryferycznych anten energetycznych otaczających każdy z rdzeni. Peryferyczne anteny energetyczne są kompleksami zbudowanymi z sześciu typów apobiałek (Lhcb1-6) związanych z barwnikami i lipidami. Apobiałka Lhcb1-3 wraz cząsteczkami barwników i lipidów współtworzą LHCII - najobficiej

reprezentowaną peryferyczną antenę energetyczną PSII, na którą przypada ok. 70% całkowitej puli chlorofilu PSII. Z kolei apobiałka Lhcb4, 5 i 6 budują - wraz z barwnikami i lipidami - cząstki anten energetycznych określanych jako, odpowiednio, CP29, CP26 i CP24 (Jansson 1994). LHCII jest heterogeniczną populacją trimerów, w skład których wchodzi homo- i heterotrimeryczne kombinacje apobiałek Lhcb1-3 (+ barwniki i lipidy) (Jackowski i Jansson, 1998; Jackowski i wsp., 2001), które łącząc się w różnych stosunkach stechiometrycznych z cząstkami CP29, CP26 i CP24 oraz rdzeniem PSII tworzą indywidualne wersje superkompleksu PSII - LHCII. Sądzi się, że w zespolonych tylakoidach gran *A. thaliana* zdecydowanie najobficiej reprezentowaną wersją superkompleksów PSII-LHCII jest tzw. C₂S₂M₂ (Broess i wsp., 2008, Caffarri i wsp., 2011) (C₂ oznacza dimeryczny rdzeń PSII, M₂ oznacza dwa trimery LHCII oddziaływujące z rdzeniem w miejscu M, tzn. w sposób umiarkowanie silny, a S₂ oznacza dwa trimery LHCII oddziaływujące z rdzeniem w miejscu S, tzn. w sposób silny). Dowiedziono, że trimery S zawierają wyłącznie apobiałka Lhcb1 i Lhcb2, podczas gdy w skład trimerów M wchodzi także Lhcb3 (Caffarri i wsp., 2009, Croce and van Amerongen 2011). Podstawową rolą LHCII jest absorpcja kwantów promieniowania elektromagnetycznego w zakresie widzialnym przez cząsteczki barwników tego kompleksu, osiągnięcie stanu wzbudzenia elektronowego i przekazywanie energii wzbudzenia do CP29, CP26 i CP24 względnie bezpośrednio do rdzenia PSII. Poza trimerami LHCII wchodzącymi w skład superkompleksów PSII-LHCII istnieje stosunkowo niewielka pula trimerów LHCII (0.18 trimera na rdzeń PSII - Gibasiewicz i wsp., 2015) określanych jako „dodatkowe” - oddziałują one z rdzeniem PSII dużo słabiej niż trimery M i S. Pełnią ważną funkcję w odpowiedzi aparatu fotosyntetycznego na ekspozycję roślin na światło o niskim natężeniu (Kouřil i wsp., 2013) oraz w czasie tzw. przejść fazowych (Wientjes i wsp., 2013). Opisane wcześniej (str. 37, 39 - 41, 43) publikacje wskazujące na udział proteaz chloroplastowych *A. thaliana* w stresu-zależnej degradacji apobiałek peryferycznych anten energetycznych PSII (np. Luciński i wsp., 2011a, 2011b, Luciński i Jackowski 2013) nie odnoszą się jednak do potencjalnych rearanżacji organizacji strukturalnej superkompleksów PSII-LHCII oraz „dodatkowych” trimerów LHCII - jakie mogą być skutkiem degradacji części puli apobiałek peryferycznych anten PSII, uszkodzonych działaniem stresów abiotycznych. Ten rozdział badań nad rolą fizjologiczną proteaz chloroplastowych jest całkowicie niezapisany.

Faza ciemna fotosyntezy roślin typu C_3 przebiega w stromie chloroplastowej i obejmuje cykl Calvina (karboksylacja akceptora CO_2 1,5-bisfosforybulozy - pierwotnego akceptora CO_2 , redukcja kwasu 3-fosfoglicerynowego i regeneracja 1,5-bisfosforybulozy) oraz szlak syntezy skrobi, odgałęziający się od cyklu Calvina na poziomie fruktozo-6-fosforanu (Rys. 8). Zgromadzono bardzo niewiele danych sugerujących, iż proteazy chloroplastowe uczestniczą także w regulacji przebiegu fazy ciemnej fotosyntezy. Jednym z nielicznych przykładów tego rodzaju doniesień jest praca wskazująca na udział AtClpP3 w regulacji obrotu metabolicznego obydwu podjednostek Rubisco (Kim i wsp., 2013) oraz publikacje wskazujące, że AtDeg5 i AtClpP3 (oraz AtClpR2 i AtClpR4) uczestniczą w regulacji metabolizmu skrobi (Luciński i wsp., 2011b, Kim i wsp., 2013).



Rys. 8 Cykl Calvina i szlak syntezy skrobi w chloroplastach roślin typu C_3 .

2 Cele pracy (cel strategiczny i cele cząstkowe)

Wśród najczęściej badanych proteaz chloroplastowych *A. thaliana* będących ortologami proteaz *E. coli* grupa Deg jest jedną z gorzej rozpoznanych. Szczególnie skromna jest wiedza na temat funkcji fizjologicznych AtDeg5 (interesującej przez to, że pozbawiona jest domen PDZ i działa w heterokompleksie z AtDeg8) - zwłaszcza tych funkcji, które AtDeg5 spełnia w komfortowych warunkach środowiskowych poprzez regulację obrotu metabolicznego białek chloroplastowych oraz przebiegu szlaków sygnalnych. Niemal całkowicie białą kartą jest np. regulacyjny wpływ AtDeg5 na przebieg ontogenezy *A. thaliana*, morfologii organów wegetatywnych i generatywnych, aktywności fotosyntetycznej liści czy na wartość przystosowawczą roślin. Pozyskanie całkowicie nowych danych w odniesieniu do tego obszaru pozwoliłoby nie tylko na dużo głębsze zrozumienie zadań, jakie AtDeg5 pełni w komfortowych warunkach środowiskowych, ale - w szerszym kontekście - poszerzyłoby skromny zasób wiedzy o funkcjach fizjologicznych proteaz chloroplastowych *A. thaliana*.

W tej sytuacji celem strategicznym mojej pracy doktorskiej, wspartej na wykorzystaniu strategii odwrotnej genetyki, stało się zbadanie wybranych funkcji fizjologicznych proteazy AtDeg5 poprzez porównawczą analizę wybranych cech fenotypowych roślin szczepu dzikiego (WT) oraz dwóch insercyjnych mutantów *deg5* różniących się stopniem wyciszenia *AtDEG5* (brak vs deficyt). Wykorzystanie dwóch mutantów różniących się stopniem wyciszenia *ATDEG5* stwarzało możliwość ustalenia, jaki jest wpływ dawki badanej proteazy na skalę efektów fenotypowych. Dla osiągnięcia celu strategicznego zaplanowano wykonanie szeregu celi cząstkowych (zadań badawczych). Na bardzo wczesnym etapie opracowywania wizji przyszłych doświadczeń rozważano dwie alternatywne koncepcje zarysowania celów cząstkowych przy ustalonym celu strategicznym:

- 1) wykrycie - poprzez zastosowanie strategii odwrotnej genetyki - wąskiego katalogu kilku spektakularnych efektów fenotypowych wywołanych brakiem/deficytem AtDeg5 i podjęcie próby szczegółowego wyjaśnienia molekularnych aspektów roli AtDeg5 w regulacji kształtowania się cech, które zostały zmienione u mutantów *deg5*,

- 2) stworzenie - poprzez zastosowanie strategii odwrotnej genetyki - znacznie szerszego katalogu efektów fenotypowych wywołanych brakiem/deficytem AtDeg5 i podjęcie prób wnikięcia w molekularne aspekty tylko najbardziej interesujących spośród tych efektów.

Ostatecznie zdecydowano o wyborze koncepcji 2, jej wdrożenie pozwoliłoby bowiem nie tylko na znaczące pogłębienie stanu wiedzy o funkcjach fizjologicznych AtDeg5, ale także na stworzenie szerszej bazy cech fenotypowych regulowanych przez tę proteazę - dla przyszłych dogłębnych analiz molekularnych. Dla wykonania celu strategicznego pracy postanowiono zrealizować następujące zadania badawcze:

1. Pozyskanie homozygotycznych mutantów, u których wyciszono *AtDEG5*, a mianowicie
 - identyfikacja homozygotycznych mutantów, u których wyciszono *AtDEG5* (*deg5-2* i *deg5-1*),
 - określenie skutków wyciszenia *AtDEG5* poprzez analizę poziomu białka AtDeg5 (oraz - porównawczo - AtDeg1, 2, 8) u mutantów *deg5-2* i *deg5-1*.
2. Porównawcza analiza przebiegu faz i podfaz ontogenezy roślin szczepu WT i mutantów *deg5* (wg skali BBCH) poprzez analizę chronologii
 - kiełkowania nasion,
 - pojawiania się liści,
 - wzrostu liści,
 - pojawiania się kwiatostanu,
 - kwitnienia,
 - dojrzewania owoców (łuszczynek),
 - starzenia się liści .
3. Porównawcza analiza cech morfologicznych liścia 3 i liścia 5 roślin WT i mutantów *deg5*, które osiągnęły tę samą podfazę ontogenezy poprzez określenie
 - pola powierzchni, obwodu, długości, szerokości i współczynnika kształtu blaszki liściowej.
4. Porównawcza analiza cech ultrastruktury chloroplastów liści, które osiągnęły tę samą podfazę ontogenezy poprzez określenie
 - pola przekroju poprzecznego chloroplastu,

-
- szerokości stosów granowych, liczby tylakoidów zespolonych w granum i średnicy granów,
 - frekwencji chloroplastów z ziarnami skrobiowymi obserwowanymi pod koniec okresu nocy.
5. Porównawcza analiza metabolizmu skrobi chloroplastów liści roślin WT i mutantów *deg5*, które osiągnęły tę samą podfazę ontogenezy poprzez określenie
- zmiany poziomu skrobi w cyklu dobowym w liściu 3 i 5.
6. Porównawcza analiza aktywności fotosyntetycznej liścia 3 i liścia 5 roślin WT i mutantów *deg5*, które osiągnęły tę samą podfazę ontogenezy poprzez sporządzenie
- krzywej świetlnej fotosyntezy,
 - krzywej dwutlenkowej (A/Ci) fotosyntezy.
7. Porównawcza analiza cech morfologicznych organów generatywnych roślin WT i mutantów *deg5*, które osiągnęły tę samą podfazę ontogenezy poprzez
- określenie liczby węzłów na pędzie kwiatostanowym i jego rozgałęzieniach, wysokości rośliny, liczby nasion przypadających na roślinę, liczby łuszczynek przypadających na roślinę, liczby nasion przypadających na łuszczynekę, długości i szerokości nasion.

3 Materiały i metody

3.1 Materiał roślinny

Doświadczenia prowadzono na roślinach typu dzikiego i mutantach *deg5-1* i *deg5-2* rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana* L., var. Columbia) uzyskanych drogą mutagenезы insercyjnej. Nasiona *Arabidopsis thaliana* linii SAIL_645_D07 (mutant *deg5-2*) i SALK_099162 (mutant *deg5-1*) otrzymano z NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Centre, Nottingham, Wielka Brytania). Wysiewano je na pożywkę 1/2 Murashige-Skoog (1962) z dodatkiem witamin oraz agarozą (w celu analizy chronologii przebiegu kiełkowania nasion) lub do doniczek torfowych typu Jiffy (we wszystkich pozostałych doświadczeniach; średnica doniczek - 42 mm, pH 6; AgroWit, Przylep, Polska). Nasiona na podłożu poddawane były 3-dniowej stratyfikacji w temperaturze 4°C. Następnie rośliny hodowano w pokoju hodowlanym (NEMA, Netzschkau, Niemcy) w warunkach długiego dnia (16 h światła : 8 h ciemności), przy natężeniu światła 110 μmol kwantów $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (światło o niskim natężeniu), w temperaturze 22°C i wilgotności względnej 68 %.

Z nasion każdego z dwóch mutantów uzyskiwano rośliny, które poddawano analizie zmierzającej do określenia homozygotyczności/heterozygotyczności w odniesieniu do insercji T-DNA w genie *DEG5* (At4g18370), co zostało szczegółowo opisane w podrozdziale 3.2 i 3.3 oraz sekcji 3.5.1. W przypadku wykrycia osobników heterozygotycznych w pokoleniu F1 poddawano je samozapyleniu (poprzez umieszczenie w ARASYSTEMACH) i wśród roślin pokolenia F2 poszukiwano homozygot.

3.2 Izolacja genomowego DNA

Genomowy DNA izolowano z liści (ok. 0,3 - 0,5 g) roślin szczepu dzikiego oraz mutantów *deg5-2* i *deg5-1*, które osiągnęły podfazę 6.0 ontogenezy (definicja tej podfazy znajduje się w podrozdziale 3.7). Tkankę liści rozdrabniano wewnątrz probówek typu eppendorf plastikową końcówką do pipet, a następnie do rozdrobnionych liści dodawano 450 μl buforu o następującym składzie:

- 200 mM Tris/HCl pH 7.5,
- 250 mM NaCl,
- 25 mM EDTA,

10% SDS.

Powstałą zawiesinę inkubowano 45 min w 32°C, wytrząsając co 5 min. Do zawiesiny dodawano 200 µl fenolu i wytrząsano oraz 200 µl mieszaniny chloroform : alkohol izoamylowy (w stosunku 24:1) i wytrząsano ponownie. Tak przygotowany preparat wirowano przez 12 min przy 10 000 g. Do nadsącza dodawano 400 µl mieszaniny chloroform : alkohol izoamylowy (24:1). Całość ponownie wytrząsano i wirowano przez 12 min przy 10 000 g. Następnie przenoszono ok. $\frac{3}{4}$ objętości nadsącza do nowych próbek i wytrącano DNA poprzez dodanie izopropanolu w objętości równej $\frac{3}{5}$ objętości zebranego nadsącza i wytrząsanie. Mieszaninę inkubowano 10 min w temperaturze pokojowej, a następnie osadzano wytrącony DNA wirując 12 min przy 10 000 g. Otrzymany osad, zawierający DNA, suszono w temperaturze pokojowej do momentu całkowitego zaniku zapachu alkoholu. Do wysuszonego osadu dodawano 200 µl wody i pozostawiano w 4°C do całkowitego rozpuszczenia DNA (przez około 24 h).

Jakość wyizolowanego DNA sprawdzano poprzez rozdział elektroforetyczny w 1,2% żelu agarozowym, nakładając 5 µl próbki do kieszonki żelu (patrz podrozdział 3.5.1). Pozostałą część próbki zamrażono w -18°C.

Wszystkie opisane w tym podrozdziale wirowania wykonywano z zastosowaniem mikrowirówki (Mini Spin, Eppendorf, Niemcy).

3.3 PCR

Obecność insercji T-DNA w genie *DEG5* (At4g18370) oraz homo-/heterozygotyczność mutantów potwierdzano z zastosowaniem techniki PCR. Korzystając z programu Primer 3 (dostępnego na stronie internetowej primer3.ut.ee) zaprojektowano startery zgodnie z następującymi zasadami:

- długość starterów: 17-28 pz,
- skład zasad: 50-60% (G+C),
- temperatura topnienia: - 55 - 80°C,
- unikanie tworzenia przez startery struktury spinki oraz palindromu.

PCR przeprowadzano przy użyciu następujących par starterów dla sekwencji *DEG5*:

dla mutantu *deg5-2*:

lewy 5' - GAGGATGAAGAAGAGAGAAATG - 3'

i prawy 5' - CCCAACCCACTTACTACCTAC - 3',

dla mutantu *deg5-1* :

lewy 5' - GCTTTTTCTCAATCTTCAATAC - 3'

i prawy: 5' - AGGATTTAGTTCACGTCCCTC - 3'

oraz dla insercji LbB 5' - GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT - 3'.

Amplifikację inicjowano przez dodanie 3 µl DNA genomowego roślin WT i obu mutantów do mieszaniny reakcyjnej o następującym składzie:

1x bufor Taq zawierający (NH₄)₂SO₄ (Fermentas, Burlington, Kanada),
 mieszanina dNTP: 0,2mM dATP, dGTP, dTTP, dCTP,
 1,5 mM MgCl₂,
 0,25 µM DNA reprezentowany przez starter lewy,
 0,25 µM DNA reprezentowany przez starter prawy,
 0,25 µM DNA reprezentowany przez starter zlokalizowany w rejonie insercji,
 25U/ml polimerazy Taq.

Po zmieszaniu składników i ich wytrząsaniu mieszaninę reakcyjną umieszczano w termocyklerze (Labnet International, MultiGene II, Wielka Brytania).

PCR przebiegała w następujących warunkach:

wstępna denaturacja: 96°C przez 2 min,	} 35 cykli
denaturacja nici: 95°C przez 30s	
przyłączanie starterów: 58°C przez 30s,	
polimeryzacja: 72°C przez 80s,	
ostatnie wydłużanie: 72°C przez 5min,	
schłodzenie do 4°C, kończąca reakcję.	

3.4 Izolacja tylakoidów i błon zespolonych tylakoidów gran

Chloroplasty izolowano z 10 g liści roślin szczepu dzikiego i mutantów *deg5-2* i *deg5-1*, które osiągnęły podfazę 6.0 ontogenezy, z wykorzystaniem Sigma Chloroplast Isolation Kit (CIB, Percoll; SigmaAldrich, St. Louis, USA). Odcięte liście homogenizowano (Homogenizator type 302, Mechanika Precyzyjna, Warszawa, Polska) dwukrotnie przez 5 s w 40 ml buforu CIB zawierającego 0,1% BSA. Homogenat sączono przez filtr Mesh 100

i wirowano przez 7 min przy 1 000 g w 4°C (wirówka 3K30, Sigma, Monachium, Niemcy). Osad zawieszano w niewielkiej ilości buforu CIB z BSA, nakładano na gradient Percollu (przygotowany wcześniej przez wirowanie 50% Percollu w buforze CIB z BSA przez 30 min przy 43 000 g z wyłączonym hamulcem - ultrawirówka L7-55, Beckman, Palo Alto, USA) i wirowano przez 6 min w temperaturze 4°C przy 13 300 g z wyłączonym hamulcem (wirówka L7-55). Dolną warstwę, zawierającą nienaruszone chloroplasty, zbierano i rozcieńczano 3-krotnie za pomocą buforu CIB, a następnie wirowano przez 90 s przy 3 300 g w temperaturze 4°C (wirówka 3K30). Tylakoidy izolowano poprzez zawieszenie osadu chloroplastów w wodzie (liza osmotyczna), odwirowanie zawiesiny przez 10 min przy 12 500 g i zawieszenie otrzymanego osadu w 10% glicerolu. Zawiesinę tylakoidów zamrażano i przechowywano w -18°C.

Błony zespolonych tylakoidów gran izolowano z preparatów tylakoidów według metody opisanej przez Bertholda i wsp. (1981) stosując modyfikacje opisane przez Dunahaya i wsp. (1984). Zawiesinę tylakoidów odwirowywano (10 min, 12 500 g), a powstały osad zawieszano w niewielkiej objętości buforu MNH zawierającego 20 mM Hepes/KOH (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 15 mM NaCl i 10% glicerol do stężenia 2 mg chlorofilu/ml i upłynniano przez inkubację powstałej zawiesiny w ciemności przez 25 min w temp. 0°C w obecności Tritonu X-100 (detergentu niejonowego) stosując proporcję Triton X-100 : chlorofil równą 21.2 : 1 (v/v). Zawiesinę wirowano (10 min, 3 000g), odrzucono osad skrobi, a nadsącz wirowano ponownie (30 min, 40 000 g). Otrzymany osad (zespolone błony tylakoidów gran) zawieszano w niewielkiej objętości buforu MNH zawierającego 10% glicerol, zamrażano i przechowywano w -20°C.

3.5 Techniki elektroforetyczne

3.5.1 Elektroforeza DNA

Zamplifikowane DNA rozdzielano elektroforetycznie w 1,2% żelu agarozowym w systemie buforowym opisanym przez Peacock i Dingman (1968). Żel zawierał 7,3% (w/v) bromku etydyny. Przed wprowadzeniem do kieszonek żelu próbki DNA obciążano 6x stężonym buforem obciążającym (Fermentas, Burlington, Kanada). Równoległe z preparatami DNA rozdzielano preparaty markerów masy cząsteczkowej wyznaczających przedział 100 - 1500 pz (Fermentas, Burlington, Kanada). Elektroforezę przeprowadzano 30 - 40 min przy napięciu 130 V w obecności buforu elektrodowego (TBE) zawierającego:

44,5 mM Tris/HCl pH 8.0,
0,5 M EDTA,
44,5 mM kwas borowy.

Po wzbudzeniu przez źródło UV emisji fluorescencji kompleksu bromek etydyny-DNA żele analizowano i fotografowano przy użyciu urządzenia Biostep Dark Hood DH-40/50 (Biostep GmbH, Jahnsdorf, Niemcy).

3.5.2 Denaturująca elektroforeza białkowa (SDS-PAGE) i obliczanie liczby trimerów LHCII przypadających na monomeryczny rdzeń PSII

Preparaty tylakoidów i błon zespolonych tylakoidów gran izolowanych z liści *A. thaliana* mieszano z zagęszczonym buforem upłynniającym (w stosunku 3:1, v/v) o następującym składzie:

0,096 M Tris/HCl pH 6.8,
9,6 M mocznik,
24% sacharoza,
3,2% SDS,
5% β -merkaptoetanol,
10% BBF (błękit bromofenolowy).

Preparaty inkubowano przez 2 min w temperaturze 100°C, schładzano w lodzie, krótko wirowano i nakładano na żel.

Następnie prowadzono elektroforezę w systemie buforowym opisanym przez Laemmli (1970) (tylakoidy) lub w systemie buforowym opisanym przez Schaggera (2006) (błony zespolone tylakoidów gran).

W przypadku analiz prowadzonych w systemie buforowym Laemmli (1970) rozdział przebiegał w żelu o następującym składzie:

14% akrylamid + 0,04% bisakrylamid,
0,375 M Tris/HCl pH 8.8,
0,1% SDS,
6 M mocznik,

który polimeryzowano w obecności 0,02% nadsiarczanu amonu oraz 0,08% TEMEDu (*N,N,N',N'*-tetrametyloetylenodiamina).

Żel zagęszczający zawierający

5% akrylamid + 0,01% bisakrylamid,
0,125 M Tris/HCl pH 6.8,
0,1% SDS,
6M mocznik

polimeryzowano w obecności 0,04% nadsiarczanu amonu i 0,1% TEMEDu.

Elektroforezę prowadzono 2 h przy stałym napięciu 200 V w obecności buforu elektrodowego zawierającego:

0,5 M Tris/HCl pH 8.5,
0,192 M glicynę,
0,1% SDS.

W przypadku analiz prowadzonych w systemie buforowym Schagger (2006) rozdział przebiegał w żelu o następującym składzie:

14,5% akrylamid + 0.04% biaskrylamid,
1M Tris/HCl pH 8.45,
0,1% SDS.

Żel polimeryzowano w obecności 0,0075% nadsiarczanu amonu oraz 0,0075% TEMEDu.

Żel zagęszczający, zawierający:

4% akrylamid + 0,01% bisakrylamid,
1M Tris/HCl pH 8.45,
0,1% SDS

polimeryzowano w obecności 0,003% nadsiarczanu amonu i 0,003% TEMEDu.

Elektroforezę prowadzono przez 6h początkowo przy napięciu 30V. W momencie wejścia preparatu w żel rozdzielający napięcie zwiększano do 200V, a następnie stopniowo zwiększano, aż do osiągnięcia 300V w końcowym etapie rozdziału.

Elektroforeza prowadzona była w obecności buforu anodowego o składzie:

0,1M Tris/HCl pH 8.9

oraz buforu katodowego o składzie:

0,1M Tris,

0,1M Tricine, pH 8.25.

Żele po elektroforezie wybarwiano za pomocą Coomassie Brilliant Blue G-250, dokładnie tak jak to opisano w pracy Schagger (2006). Wybarwione żele skanowano z wykorzystaniem oprogramowania Gelix One (Biostep, Jahnsdorf, Niemcy), a liczbę trimerów LHCI przypadających na monomeryczny rdzeń PSII obliczano jako $[(Lhcb1 + Lhcb2 + Lhcb3) / Lhcb4] / 3$ (apobiałka Lhcb1, 2, 3 i 4 identyfikowano immunologicznie - patrz podrozdział 3.6). W obliczeniach uwzględniano fakt, że Lhcb4 wiąże Coomassie Brilliant Blue G-250 1.1 razy silniej niż Lhcb1/2/3 (Hogewoning i wsp., 2012).

Równoległe z preparatami tylakoidów lub błon tylakoidów zespolonych gran rozdzielano preparaty barwnych markerów masy cząsteczkowej wyznaczające przedział 8 - 220 kDa (Sigma Aldrich, Monachium, Niemcy).

3.6 Doświadczenia typu „immunoblot”

3.6.1 Elektrotransfer białek na błonę PVDF

Rozdzielone elektroforetycznie polipeptydy tylakoidów lub błon zespolonych tylakoidów gran przenoszono z żelu na błonę PVDF (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Niemcy) metodą elektrotransferu mokrego. Membranę PVDF poddawano preinkubacji i aktywacji w 100% metanolu i zanurzano w buforze transferowym o następującym składzie:

25 mM Tris/HCl pH 8.3,

192 mM glicyna,

0,1% SDS,

20% metanol.

Elektrotransfer białek z żelu poliakrylamidowego prowadzono w aparacie do elektrotransferu (BioRad, Mini-PROTEAN Tetra Cell, 165-8000, Hercules, USA) wypełnionym buforem o składzie podanym powyżej przez 16 h przy napięciu 30 V, w temperaturze 4°C.

3.6.2 Immunodetekcja białek

Kolejne etapy procedury "immunoblot" polegały na poddawaniu błon PVDF następującym czynnościom:

- a) przepłukiwanie (10 min) buforem transferowym,
- b) przepłukiwanie (10 min) buforem TBS-T o następującym składzie:
 - 25 mM Tris/HCl pH 7.6,
 - 70 mM NaCl,
 - 0,05% Tween-20,
- c) przepłukiwanie (2 x 10 min) wodą bidestylowaną,
- d) blokowanie – inkubacja (60 min) błon PVDF w buforze o następującym składzie:
 - 25 mM Tris/HCl pH 7.6,
 - 70 mM NaCl,
 - 0,05% Tween-20,
 - 3% BSA,
- e) przepłukiwanie (2 x 10 min) buforem TBS-T,
- f) inkubacja (90 min) z pierwotnymi przeciwciałami króliczymi zawieszonymi w buforze TSB-T zawierającym 1% BSA:
 - anty PscC (rozcieńczenie 1:3000; Agrisera, Vannas, Szwecja),
 - anty AtDeg1 (rozcieńczenie 1:1000; Antibodies on-line GmbH, Aachen, Germany),
 - anty AtDeg2 (rozcieńczenie 1:1000; Antibodies on-line GmbH, Aachen, Germany),
 - anty AtDeg5 (rozcieńczenie 1:1000; GenScript, Nowy Jork, USA),
 - anty AtDeg8 (rozcieńczenie 1:1000; Antibodies on-line GmbH, Aachen, Germany),
 - anty Lhcb1 (rozcieńczenie 1:3000; Agrisera, Vannas, Szwecja),
 - anty Lhcb2 (rozcieńczenie 1:5000; Agrisera, Vannas, Szwecja),
 - anty Lhcb3 (rozcieńczenie 1:2000; Agrisera, Vannas, Szwecja),
 - anty Lhcb4 (rozcieńczenie 1:7000; Agrisera, Vannas, Szwecja),

- anty Lhcb5 (rozcieńczenie 1:1000; Agrisera, Vannas, Szwecja),
- anty Lhcb6 (rozcieńczenie 1:5000; Agrisera, Vannas, Szwecja),
- g) przepłukiwanie (4 x 6 min) buforem TBS-T,
- h) inkubacja (60 min) z wtórnymi przeciwciałami kozimi skierowanymi przeciwko króliczym IgG, sprzężonymi z peroksydazą chrzanową (Agrisera, Vannas, Szwecja), zawieszonymi w buforze TSB-T z 1% BSA (rozcieńczenie 1: 25000),
- i) przepłukiwanie (2 x 10 min) buforem TBS-T,
- j) inkubacja (1 min) w mieszaninie ECL (Lumi-Light Plus Western Blotting Substrate, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Niemcy) zawierającej 50% Luminol/ Enhancer Solution oraz 50% Stable Peroxide Solution,
- k) ekspozycja kliszy rentgenowskiej (FujifilmSuper RX, Fujifilm, Tokio, Japonia) na chemiluminescencję błony w kasie rentgenowskiej,
- l) wywoływanie kliszy przy użyciu automatycznej wywoływarki do klisz (Protec, OPTIMAX X-Ray Film Processor, 1170-1-0000, Oberstenfeld, Niemcy).

3.6.3 Analiza obrazu błon PVDF po przeprowadzeniu procedury „immunoblot”

Wywołane klisze rentgenowskie fotografowano przy użyciu urządzenia Biostep Dark Hood DH-40/50 (Biostep, Jahnsdorf, Niemcy), a następnie przeprowadzano analizę obrazu z wykorzystaniem programu GelixOne (Biostep, Jahnsdorf, Niemcy).

Dla każdego „immunoblotu” uzyskanego z użyciem przeciwciał anty-Deg1, anty-Deg2, anty-Deg5, anty-Deg8, anty-Lhcb1, anty-Lhcb2, anty-Lhcb3, anty-Lhcb4, anty-Lhcb5, anty-Lhcb6 oraz anty-PsbC ustalano przedział, w którym istniała liniowa zależność pomiędzy ilością chlorofilu w rozdzielonej elektroforetycznie próbce tylakoidów izolowanych z liści (które osiągnęły podfazę 6.0 ontogenezy) a intensywnością sygnału immunologicznego na kliszy.

3.7 Analiza chronologii przebiegu faz i podfaz ontogenezy *A. thaliana*

Analizy chronologii przebiegu faz i podfaz ontogenezy roślin WT i mutantów polegały na obserwacjach, zliczeniach i fotografowaniu roślin. Moment, kiedy roślina

osiągała określoną podfazę ontogenezy określano w dniach, licząc od momentu rozpoczęcia hodowli w warunkach opisanych w podrozdziale **3.1**.

Analiza chronologii przebiegu **kiełkowania nasion (faza 0**, Boyes i wsp., 2001) polegała na obserwacjach nasion za pomocą mikroskopu świetlnego (AxioScope.A1, SteREO Discovery.V8, kamera AxioCam MRc5; Carl Zeiss, Jena, Niemcy), które wysiano na płytkach agarozowych z pożywką 1/2 Murashige-Skoog (1962). Obserwacje prowadzono 2 razy dziennie i określano moment, w którym stwierdzano spęcznienie nasion, pojawienie się korzenia zarodkowego oraz hipokotyła i liścieni.

Analizując chronologię **pojawiania się liści (faza 1**, Boyes i wsp., 2001) obserwowano 2 razy dziennie siewki rosnące w doniczkach torfowych Jiffy i mierzono pojawiające się liście. Określano moment, w którym liścienie ulegały pełnemu rozprostowaniu, a następnie pierwsza para liści oraz liście 3 - 9 osiągały kolejno długość > 1 mm.

Analizując chronologię **wzrostu liści (faza 3)** zdefiniowano tę fazę inaczej niż według Boyes i wsp. (2001), a mianowicie w sposób umożliwiający badanie chronologii wzrostu indywidualnych liści, a nie całej rozetki liściowej. Dla każdego liścia określano moment, kiedy osiągał on 10, 50, i 100% końcowej wielkości (rozumianej jako długość blaszki liściowej).

Analiza chronologii **pojawiania się kwiatostanu (faza 5**, Boyes i wsp., 2001) polegała na obserwacjach roślin 2 razy dziennie. Określano moment, w którym pierwszy pąk kwiatowy osiągał długość > 1 mm.

Chronologię przebiegu **kwitnienia (faza 6**, Boyes i wsp., 2001) i dojrzewania owoców (faza 8, Boyes i wsp., 2001) określano przeprowadzając 2 razy dziennie obserwacje. W przypadku przebiegu kwitnienia wyznaczano moment, gdy pierwszy kwiat, a następnie 10%, 50% i 100% kwiatów otworzyło się.

W przypadku **dojrzewania owoców (faza 8**, Boyes i wsp., 2001) wyznaczano moment, w którym pierwsza łuszczyнка, a następnie 10%, 50% i 100% łuszczynek było pękniętych.

Analizując chronologię **starzenia się liści (faza 9)** zdefiniowano tę fazę inaczej niż według Boyesa i wsp. (2001). W okresie między 25 i 35 dniem ontogenezy oznaczano poziom chlorofilu w każdym liściu i określano moment kiedy poziom chlorofilu był we wszystkich liściach niższy niż poziom maksymalny.

3.8 Analizy morfologiczne

3.8.1 Analizy morfologiczne liści

Liście roślin mutantów i szczepu dzikiego, które osiągnęły podfazę 6.0 ontogenezy odcinano, skanowano (EPSON PERFECTION V700 PHOTO, Dual Lens System, Epson, Suwa, Japonia) i przy pomocy programu AxioVision Rel. 4.8 (Carl Zeiss, Jena, Niemcy) obliczano następujące parametry morfologiczne blaszek liściowych: długość, szerokość, pole powierzchni, obwód i współczynnik kształtu (zdefiniowany przez Kincaid i Schneider, 1983). Współczynnik kształtu liścia opisuje następujący wzór:

$$\text{współczynnik kształtu liścia} = \frac{4 \pi \text{ pole powierzchni liścia}}{\text{obwód liścia}^2}$$

3.8.2 Analizy morfologiczne organów generatywnych

Rośliny szczepu dzikiego i mutantów hodowano do momentu, aż pęknięciu uległy wszystkie łuszczyнки (podfaza 8.9). Wówczas poprzez obserwacje i zliczenia określano morfologiczne parametry organów generatywnych, a mianowicie: liczbę węzłów na pędzie kwiatostanowym i jego rozgałęzieniach, wysokość rośliny, liczbę łuszczynek przypadających na roślinę, liczbę nasion przypadających na łuszczynekę, liczbę nasion przypadających na roślinę, długość i szerokość nasion.

Nasiona oglądano i fotografowano za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego. Długość i szerokość nasion mierzono w programie AxioVision Rel 4.8 (Carl Zeiss, Jena, Niemcy).

3.9 Techniki mikroskopowe

3.9.1 Mikroskop świetlny

Materiał roślinny oglądano używając różnych modeli mikroskopu:

kiełkujące nasiona:

- a) pęcznienie nasion - mikroskop AxioScope.A1, kamera AxioCam MRc5 (Carl Zeiss, Jena, Niemcy), powiększenie 10x; nasiona oglądano bezpośrednio na szalce z pożywką;
- b) pojawienie się korzenia zarodkowego, hipokotyła i liścieni - mikroskop stereoskopowy SteREO Discovery.V8, kamera AxioCam ICC3 (Carl Zeiss, Jena, Niemcy), powiększenie 8x

i 4x; nasiona oglądano na szalce z pożywką, pod którą umieszczano czarną podkładkę, co pozwoliło uzyskać lepszy kontrast pomiędzy oglądanym preparatem a tłem;

liście – mikroskop stereoskopowy SteREO Lumar.V12, kamera AxioCamMR5 (Carl Zeiss, Jena, Niemcy), powiększenie 6.4x.

Obrazy analizowano przy pomocy programu AxioVision Rel 4.8 (Carl Zeiss, Jena, Niemcy).

3.9.2 Transmisyjny mikroskop elektronowy (TEM)

Analizy z użyciem TEM wykonywano wg Lucińskiego i wsp. (2011a). Liście roślin WT i mutantów, które osiągnęły podfazę 6.0 ontogenezy zbierano na początku dnia, bezpośrednio po zakończeniu 8-godzinnej nocy. W kropli 50 mM buforu kakodylowego pH 6.8 zawierającego:

0,1 M kakodylan sodu,

0,1 M HCl,

wycinano z nich małe skrawki, które umieszczano natychmiast w roztworze 2% (w/v) glutaraldehydu i 3% paraformaldehydu w tym samym buforze i utrwalano w nim przez 2 h w temp. pokojowej. Następnie skrawki przepłukiwano zimnym buforem kakodylowym 3 razy przez 15 min i przeprowadzono utrwalanie następcze w roztworze 1% (w/v) czterotlenku osmu w 0,1 M buforze kakodylowym przez 2 h w temp. 4°C. Kolejnym etapem przygotowania preparatów było kontrastowanie następcze w 2% roztworze octanu uranylu pH 5.0 przez noc. Następnie skrawki odwadniano w acetonie o następującym szeregu stężeń:

10%, 30%, 50% - 2 razy przez 5 min w temp. 4°C

70%, 80%, 90%, 96% - przez 10 min w temp. pokojowej,

100% - 3 razy przez 10 min w temp. pokojowej.

Odwodnione preparaty zatapiano w żywicy epoksydowej o niskiej lepkości wg Spurra (1969), której skład jest następujący:

41 g ERL-4221 (3,4-epoksycykloheksanokarboksylan 3,4-epoksycykloheksylometylu),

14,3 g DER (eter diglicydylowy glikolu propylenowego),

59 g NSA (bezwodny bursztynian nonenylowy),

2 g DMAE (dimetylaminoetanol).

Zatapanie odbywało się 4-etapowo:

- Po odwodnieniu preparatów w 100% acetonie usuwano jego większość i dodawano równą ilość żywicy (proporcja 1:1), mieszano i odstawiano na 30 min w temp. pokojowej.
- Usuwano połowę roztworu i ponownie dodawano żywicę w proporcji 1:1, mieszano i odstawiano na 30 min w temp. pokojowej.
- Usuwano prawie cały roztwór i zastępowano go 100% żywicą, mieszano i odstawiano na noc w temp. 4°C.
- Usuwano prawie cały roztwór i zastępowano go 100% żywicą, mieszano i odstawiano na noc w temp. pokojowej.

Następnie skrawki wraz z żywicą przenoszono do kapsułek, układano je na środku, równoległe do dłuższego boku kapsułek i po ok. 30 min dopełniano kapsułki żywicą. Polimeryzacja żywicy z zatopionym w niej materiałem przebiegała w następujących warunkach:

Pierwsza doba - w temp. 30°C,

Druga doba - w temp. 45°C,

Trzecia doba - w temp. 70°C.

Preparaty cięto ostrzem diamentowym na ultramikrotomie EM UC6 (Leica, Wetzlar, Niemcy) na ultracienkie skrawki (80 nm), które umieszczano na miedzianych siatkach (150 mesh) pokrytych formwarem (*Formvar* - nazwa handlowa zarejestrowana przez Monsanto Chemical Company, St. Louis, USA, modyfikowana żywica poliwinylowo-acetalowa), barwiono 9% octanem uranylu i 0,5% cytrynianem ołowiu przez 20 min w temp. pokojowej. Uzyskane preparaty komórek mięksiszu liściowego oglądano pod transmisyjnym mikroskopem elektronowym (JEM 1200 EXII, JEOL, Tokio, Japonia) pod napięciem 80 kV, wykonywano zdjęcia pod powiększeniem 12 000, negatywy skanowano i poddawano analizie przy pomocy programu AxioVision Rel 4.8.

Analiza ultrastruktury chloroplastów polegała na obliczeniu pola przekroju poprzecznego chloroplastu, policzeniu tylakoidów zespolonych w granum, pomiarze szerokości tylakoidów (odległości pomiędzy skrajnymi błonami tylakoidu) oraz określeniu frekwencji chloroplastów z ziarnami skrobiowymi.

3.9.3 Skaningowy mikroskop elektronowy (SEM)

Liście roślin WT i obydwu mutantów znajdujące się w podfazie 6.0 ontogenezy krojono na skrawki o powierzchni ok. 6 mm² i odwadniano w szeregu stężeń acetonu:

10%, 30%, 50% - 2 razy przez 5 min w temp. 4°C

70%, 80%, 90%, 96% - przez 10 min w temp. pokojowej,

100% - 3 razy przez 10 min w temp. pokojowej.

Na preparaty odwodnionych liści oraz suchych nasion napyłano powłokę ze złota i oglądano pod skaningowym mikroskopem elektronowym EVO 40 (Carl Zeiss, Jena, Niemcy) przy 400- (liście) i 40-krotnym (nasiona) powiększeniu.

3.10 Oznaczanie skrobi

Liście roślin WT i mutantów, które osiągnęły podfazę 6.0 ontogenezy zbierano w określonych punktach czasowych w trakcie dnia, nocy i wydłużonej nocy, a następnie zamrażano je w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -18°C do momentu przeprowadzania analiz. Zawartość skrobi w liściach oznaczano wg Fredeen i wsp. (1989), rozpoczynając od ekstrakcji cukrów rozpuszczalnych. 50 mg materiału roślinnego homogenizowano w ciekłym azocie, następnie homogenat zalewano wrzącym 80% etanolem i inkubowano kolejno przez 5 min w temp. 70°C i przez 18-20 h w 37°C. Po tym czasie próbki wirowano przez 10 min przy 8 000 g przemywano w celu uwolnienia cukrów rozpuszczalnych, a mianowicie:

wylewano supernatant,	}	3-krotnie
do osadu dodawano 80% etanol,		
wytrząsano,		
wirowano przez 10 min przy 8 000 g.		

Kolejnym etapem było suszenie osadu (zawierającego cukry nierozpuszczalne) przez 2 h w temp. 60°C (do momentu aż odparował etanol). Osad rozpuszczano gotując go przez 1,5 h w 2 ml 0,2 N KOH. Po ostudzeniu ekstrakt zakwaszono kwasem octowym do pH 5.0, dodawano 10 U/ml amyloglukozydazy (EC 3.2.1.3) rozpuszczonej w 50 mM buforze octanowym pH 4.6, którego skład jest następujący:

25,5 ml 0,2 M roztworu kwasu octowego,

24,5 ml 0,2 M octanu sodu,

H₂O do 100 ml

i inkubowano przez dobę w temperaturze 55°C. Reakcję enzymatyczną zatrzymywano gotując ekstrakt przez 10 min. Po odwirowaniu prób przez 3 min przy 8 000 g pobierano do oznaczeń kolorymetrycznych 0,05 ml nadsącza, uzupełniano do 0,5 ml roztworem 0,127 N KOH, 0,19 N kwasu octowego i 15,9 mM buforu octanowego, i dodawano 2,5 ml odczynnika barwiącego o następującym składzie:

0,1 M bufor fosforanowy pH 7.0,
1 U/ml peroksydaza (EC 1.11.1.7),
5 U/ml oksydaza glukozy (EC 1.1.3.4),
12,6 mM dichlorowodorek *o*-dianizydyny,

a kontrolę stanowił roztwór 0,127 N KOH, 0,19 N kwasu octowego i 15,9 mM buforu octanowego. Próbki inkubowano 30 min w temp. 37°C, a reakcję zatrzymywano przez 5 min inkubacją w temp. 70°C. Do oznaczeń kolorymetrycznych pobierano 1 ml mieszaniny reakcyjnej. Stężenie glukozy w próbce obliczano w oparciu o wyniki pomiaru absorpcji przy długości fali $\lambda=445$ nm - w oparciu o sporządzono wcześniej krzywą wzorcową - i przeliczano na zawartość glukozy w świeżej masie liści. Aby określić poziom skrobi w świeżej masie liści mnożono poziom glukozy przez współczynnik 0.9, który wynika z faktu, że masa cząsteczkowa skrobi jest wielokrotnością mas reszt glukoźowych, a nie pełnych cząsteczek glukozy (masa cząsteczkowa glukozy to 180 Da, reszty glukoźowej - 162 Da; $0.9 = 162/180$).

Wymienione w tym podrozdziale wirowania przeprowadzano z wykorzystaniem wirówki Sigma3K30, Sigma, Monachium, Niemcy, producentem użytych enzymów natomiast była SigmaAldrich, St. Louis, USA.

3.11 Analizy aktywności fotosyntetycznej

Charakterystyka funkcjonowania aparatu fotosyntetycznego liści roślin WT i mutantów, które osiągnęły podfazę 6.0 ontogenezy przeprowadzona została poprzez analizy wymiany gazowej, które prowadziły do wykreślenia krzywych – świetlnej i A/Ci ("dwutlenkowej").

Intensywność fotosyntezy wyrażano w $\mu\text{molach CO}_2$ pochłoniętych przez jednostkę powierzchni asymilacyjnej liścia w jednostce czasu. Aby sporządzić krzywe

światłne i krzywe A/Ci używano przyrządu do pomiaru wymiany gazowej Li-6400 wyposażonego w komorę o powierzchni 6 cm² z wbudowanym źródłem światła czerwonego i niebieskiego typu LED (Li-Cor Inc., Lincoln, USA). Przyrząd przy pomocy analizatora gazowego w podczerwieni (IRGA – *Infra Red Gas Analysers*) analizował absorpcję powietrza w podczerwieni (miara stężenia CO₂). Analizy takie przeprowadzano w systemie przepływowym, tzn. stężenie CO₂ i jego zmiany wywołane fotosyntetyczną asymilacją liści rejestrowane były wewnątrz komory (zawierającej badany liść), przez którą cały czas przepływało powietrze.

3.11.1 Krzywa świetlna

Aby sporządzić krzywą świetlną mierzono intensywność fotosyntezy (A) jako funkcję natężenia światła, na które eksponowany był liść. Około 0,5 h przed pomiarami roślinę eksponowano na światło o nasycającym natężeniu 500 μmoli kwantów światła m⁻² s⁻¹, a następnie na światło o natężeniu 1800 μmoli kwantów światła m⁻² s⁻¹. Po ustabilizowaniu się intensywności fotosyntetycznej obniżano natężenie światła. Kolejno eksponowano liście na następujące poziomy natężenia światła: 1500, 1000, 750, 500, 400, 300, 200, 150, 100, 75, 50 i 0 μmoli kwantów światła m⁻² s⁻¹. Ekspozycja liści na różne natężenia światła przebiegała w następujących warunkach:

- temp. liścia utrzymywana na poziomie 22°C,
- deficyt ciśnienia pary nieprzekraczający 1,4 MPa.

Dla każdego poziomu natężenia światła zbierano dane dotyczące asymilacji CO₂.

Powierzchnię liści określano używając skanera i programu do cyfrowej obróbki zdjęć AxioVision Rel. 4.8 (Carl Zeiss, Jena, Germany).

Dla każdego liścia funkcja hiperboliczna opisana wzorem:

$$A = 0,5 \{ \phi \text{ PPF}D + A_{\text{max}} - [(\phi \text{ PPF}D + A_{\text{max}})^2 - 4 \theta \phi \text{ PPF}D A_{\text{max}}]^{1/2} \} \theta^{-1} - R_d,$$

gdzie :

- PPFD (*photosynthetic photon flux density*) - natężenie światła,
- A_{max} - maksymalna intensywność fotosyntezy,
- φ (CO₂) - kwantowa wydajność fotosyntetycznego wiązania CO₂,
- R_d - oddychanie ciemnościowe,

θ - wypukłość krzywej świetlnej

dopasowywana była do wartości intensywności fotosyntetycznej w oparciu o nieliniowe maksymalne prawdopodobieństwo za pomocą funkcji dopasowania krzywej, wykorzystując program SigmaPlot 11 (Systat Software, San Jose, USA). Wypukłość krzywej świetlnej (θ) estymowano jako wynik dopasowania krzywej, a parametry takie jak maksymalna intensywność fotosyntezy (A_{max}) i oddychanie ciemnościowe (Rd) odczytywano z wykresu krzywej eksperymentalnej. Kwantową wydajność fotosyntetycznego wiązania CO_2 obliczano natomiast jako współczynnik regresji liniowej z liniowego odcinka krzywej eksperymentalnej.

3.11.2 Krzywa A/C_i ("dwutlenkowa")

Aby sporządzić krzywą A/C_i (A - *assimilation*, C_i - CO_2 *internal concentration*) mierzono intensywność fotosyntezy (A) jako funkcję stężenia CO_2 w atmosferze otaczającej roślinę. Około 0,5 h przed pomiarami roślinę eksponowano na światło o nasycającym natężeniu 500 μmol kwantów światła $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a pomiarów dokonywano przy natężeniu 1500 μmol kwantów światła $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Pomiary intensywności fotosyntezy rozpoczynano od stężenia 400 $\mu\text{mol mol}^{-1} CO_2$, oczekiwano do momentu ustabilizowania się intensywności fotosyntezy i kolejno zmieniano na stężenia 300, 200, 100, 75, 50 $\mu\text{mol mol}^{-1} CO_2$, a następnie ponownie 400 $\mu\text{mol mol}^{-1} CO_2$ i 500, 750, 1000, 1500 i 1800 $\mu\text{mol mol}^{-1} CO_2$. Po każdej zmianie poziomu CO_2 czekano na ustabilizowanie się intensywności fotosyntezy.

Pomiary prowadzono w następujących warunkach:

temp. liścia utrzymywana na poziomie 22°C,

deficyt ciśnienia pary nieprzekraczający 1,4 MPa.

Wartości intensywności fotosyntetycznej korygowano przez wykonanie pomiarów dla pustej komory używając takich samych stężeń CO_2 (ze względu na nieszczelności dyfuzyjne).

Powierzchnię liści określano używając skanera i programu do cyfrowej obróbki zdjęć AxioVision Rel. 4.8 (Carl Zeiss, Jena, Niemcy). Ze względu na mniejszy rozmiar liści niż pole powierzchni komory oraz zróżnicowanie ich rozmiaru i kształtu, wyznaczano przewodnictwo warstwy granicznej dla indywidualnych liści. Wykonywano fotokopię

liścia, obrysowywano jego kształt na bibule filtracyjnej Whatman i wycinano z niej kształt liścia. Wzorec liścia na bibule filtracyjnej nasączano wodą i mierzono jego parowanie. Przewodnictwo warstwy granicznej obliczano stosując procedurę podaną w instrukcji Li-6400 (Li-Cor 2005). Wewnętrzne stężenie CO₂ (C_i) obliczano za pomocą równań podanych w instrukcji Li-6400.

Stężenie CO₂ w atmosferze otaczającej roślinę (C_a - *ambient concentration*) przeliczano na stężenie CO₂ wewnętrzne (=w przestworach międzykomórkowych, C_i) przy pomocy parametrów, jakie mierzył przyrząd (intensywność transpiracji, wilgotność względna w atmosferze otaczającej liść, intensywność fotosyntezy).

W ten sposób powstawała krzywa pokazująca zależność intensywności fotosyntetycznej od stężenia CO₂ w przestworach międzykomórkowych.

Równania dwufazowego modelu opisane przez Farquhar i wsp. (1980) dopasowano do danych A/C_i, przy czym pomiary dla C_i < 400 μmol mol⁻¹ CO₂ traktowano jako ograniczone przez ilość, kinetykę i aktywność Rubisco, natomiast dla C_i > 400 μmol mol⁻¹ CO₂ - przez transport elektronów wykorzystany do regeneracji RuBP (Tanaka i wsp., 2013). Dopasowania przeprowadzano w oparciu o maksymalne prawdopodobieństwo za pomocą funkcji dopasowania krzywej, wykorzystując program SigmaPlot 11 (Systat Software, San Jose, Kalifornia, USA) przy użyciu parametrów kinetycznych Rubisco według Long i Bernacchi (2003). Otrzymano w ten sposób następujące parametry: maksymalną wydajność karboksylacji limitowanej wyłącznie przez właściwości Rubisco (V_{c,max}) i maksymalną szybkość transportu elektronów wykorzystywaną do regeneracji RuBP (J_{max}). V_{c,max} i J_{max} normalizowano do wartości temp. 25°C, stosując równania podane przez Sharkey i wsp. (2007).

3.12 Oznaczanie chlorofilu

3.12.1 Oznaczanie chlorofilu metodą Arnona

Stężenie chlorofilu w preparatach tylakoidów oznaczano kolorymetrycznie metodą Arnona (1949), z wykorzystaniem acetonu jako rozpuszczalnika organicznego.

2 μl preparatu tylakoidów rozcieńczano z wodą do objętości 80 μl i dodawano 320 μl schłodzonego 100% acetonu, wytrząsano przez 1 min i wirowano przez 1 min przy 10 000 g. Następnie mierzono absorpcję nadsącza przy długości fali λ=663nm

i $\lambda=645\text{nm}$ odpowiednio, wobec kontroli, jaką stanowił 80% aceton. Pomiary dokonywano na 96-dołkowych płytkach ELISA w aparacie SUMAL PE2 (Carl Zeiss, Jena, Niemcy) – do dołków nakładano po 100 μl preparatu. Obliczano stężenie chlorofilu *a* (C_{chla}) i *b* (C_{chlb}) oraz całkowite stężenie chlorofilu (C_{chl}). Korzystano z następujących wzorów:

$$C_{\text{(chl)}} = (C_{\text{chla}}) + (C_{\text{chlb}})$$

$$C_{\text{chla}} = (12,7 \times A_{663} - 2,6 \times A_{645}) \times V_1/V_2$$

$$C_{\text{chlb}} = (22,9 \times A_{645} - 4,68 \times A_{663}) \times V_1/V_2,$$

gdzie:

A_{663} – średnia pomiarów absorpcji przy $\lambda=663\text{nm}$,

A_{645} – średnia pomiarów absorpcji przy $\lambda=645\text{nm}$,

V_1 – objętość całkowita próbki (400 μl),

V_2 – objętość próbki brana do pomiaru (2 μl).

3.12.2 Oznaczanie chlorofilu z wykorzystaniem DMSO

Stężenie chlorofilu w całych liściach oznaczano kolorymetrycznie, z wykorzystaniem dimetylosulfotlenku (DMSO; SigmaAldrich, St. Louis, USA) jako rozpuszczalnika organicznego metodą opisaną przez Hiscox i Israelstam (1979). Jest to metoda, której rezultatem jest bardziej wydajna ekstrakcja chlorofilu – w przypadku materiały badawczego, jakim są liście - niż metoda Arnona.

Liście odcinano, ważono, umieszczano w probówce typu eppendorf i zalewano 1,5 ml DMSO. Inkubowano przez 2 h w temp. 65°C, a następnie usuwano z probówki tkankę liścia całkowicie pozbawioną chlorofilu. Następnie mierzono absorpcję nadsącza przy długości fali $\lambda=665\text{ nm}$ i $\lambda=649\text{ nm}$ wobec kontroli, jaką stanowił DMSO.

Obliczano stężenie chlorofilu *a* (C_{chla}) i *b* (C_{chlb}) oraz całkowite stężenie chlorofilu (C_{chl}).

Korzystano z następujących wzorów:

$$C_{\text{(chl)}} = (C_{\text{chla}}) + (C_{\text{chlb}})$$

$$C_{\text{chla}} = (12,9 \times A_{665} - 3,45 \times A_{649}) \times V/m$$

$$C_{\text{chlb}} = (21,99 \times A_{649} - 5,32 \times A_{665}) \times V/m,$$

gdzie:

V – objętość całkowita nadsącza (1,5 ml),

m – masa liścia.

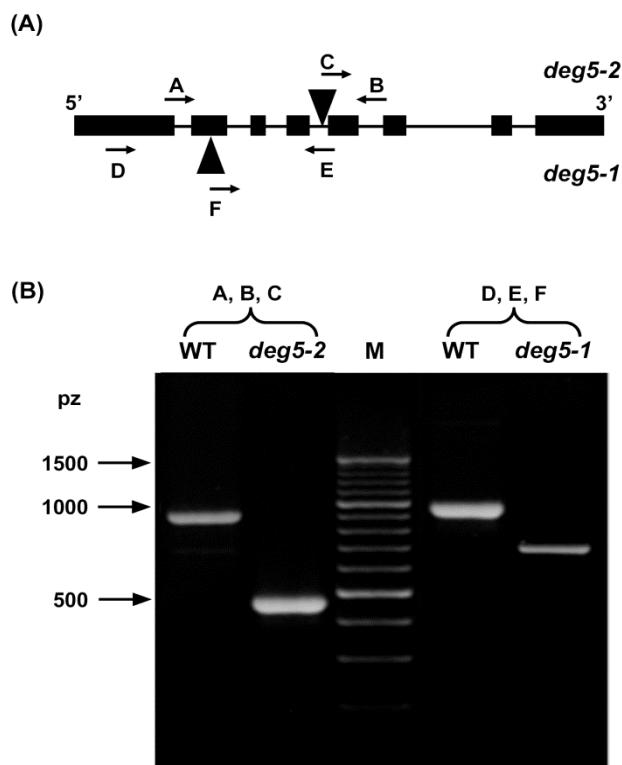
3.13 Analizy statystyczne

Istotność statystyczną różnic mierzonych parametrów analizowano w oparciu o analizę wariancji (ANOVA) i test Tukey'a-Kramera wielokrotnych porównań. Istotność statystyczna określana była na poziomie $P < 0,01$.

4 Wyniki

4.1 Identyfikacja homozygotycznych mutantów, u których wyciszono *AtDEG5*

Aby przeanalizować funkcje, jakie pełni w roślinie proteaza AtDeg5 pozyskano (Nottingham Arabidopsis Stock Centre) nasiona nigdy dotąd niebadanej linii insercyjnej SAIL_645_D07 (mutant *deg5-2*) oraz linii SALK_099162, wstępnie scharakteryzowanej przez Sun i wsp. (2007a) i Lucińskiego i wsp. (2011b) (mutant *deg5-1*). Miejsce insercji T-DNA u *deg5-2* znajduje się w 4 intronie, 872 pz od kodonu start ATG, natomiast u *deg5-1* – w 2 egzonie, 429 pz od kondonu ATG. Rysunek 9A przedstawia lokalizację miejsc insercji.



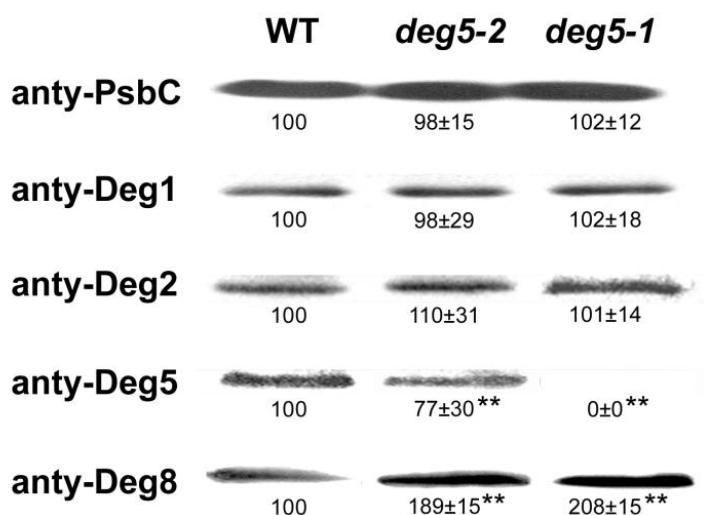
Rys. 9 Identyfikacja mutantów *deg5*.

(A) Schematyczny rysunek genu *AtDEG5*. Czarne kasety reprezentują egzony, linie - introny, trójkąty - miejsca insercji T-DNA. Strzałki wskazują miejsca przyłączenia starterów użytych do analizy PCR genomowego DNA roślin WT i mutantów *deg5-2* i *deg5-1*.

(B) Potwierdzenie homozygotyczności mutantów *deg5-2* i *deg5-1* poprzez elektroforetyczny rozdział produktów PCR genomowego DNA roślin WT oraz mutantów. Amplifikacja przeprowadzona została z użyciem starterów A, B, C oraz D, E i F (zgodnie z opisem na Rys. 9A). WT - amplifikacja genomowego DNA roślin WT, *deg5-2*, *deg5-1* - amplifikacja genomowego DNA homozygotycznych mutantów, M - markery masy cząsteczkowej DNA

Kiełkowanie nasion linii SAIL_645_D07 i SALK_099162 doprowadziło do uzyskania segregujących populacji roślin heterozygotycznych. Osobniki homozygotyczne obu linii identyfikowano w pokoleniu F2 stosując genotypowanie oparte o PCR (Rys. 9B).

W celu określenia w jakim stopniu insercja T-DNA zahamowała akumulację produktu białkowego *AtDEG5* oraz czy miała wpływ na poziom akumulacji pozostałych proteaz *AtDeg* kierowanych do chloroplastu (*AtDeg1*, *AtDeg2*, *AtDeg8*) poziom czterech *AtDeg* sondowano za pomocą techniki „immunoblot” z wykorzystaniem wcześniej scharakteryzowanych przeciwciał skierowanych przeciwko tym proteazom (Luciński i wsp., 2011b). Wyniki tej analizy przedstawia rysunek 10.



Rys. 10 Określenie poziomu równowagowego białek chloroplastowych *AtDeg5* oraz *AtDeg1*, 2, 8 u mutantów *deg5-2* i *deg5-1* oraz roślin WT za pomocą analizy typu „immunoblot” z użyciem przeciwciał anty-Deg1, 2, 5, 8 oraz anty-PsbC.

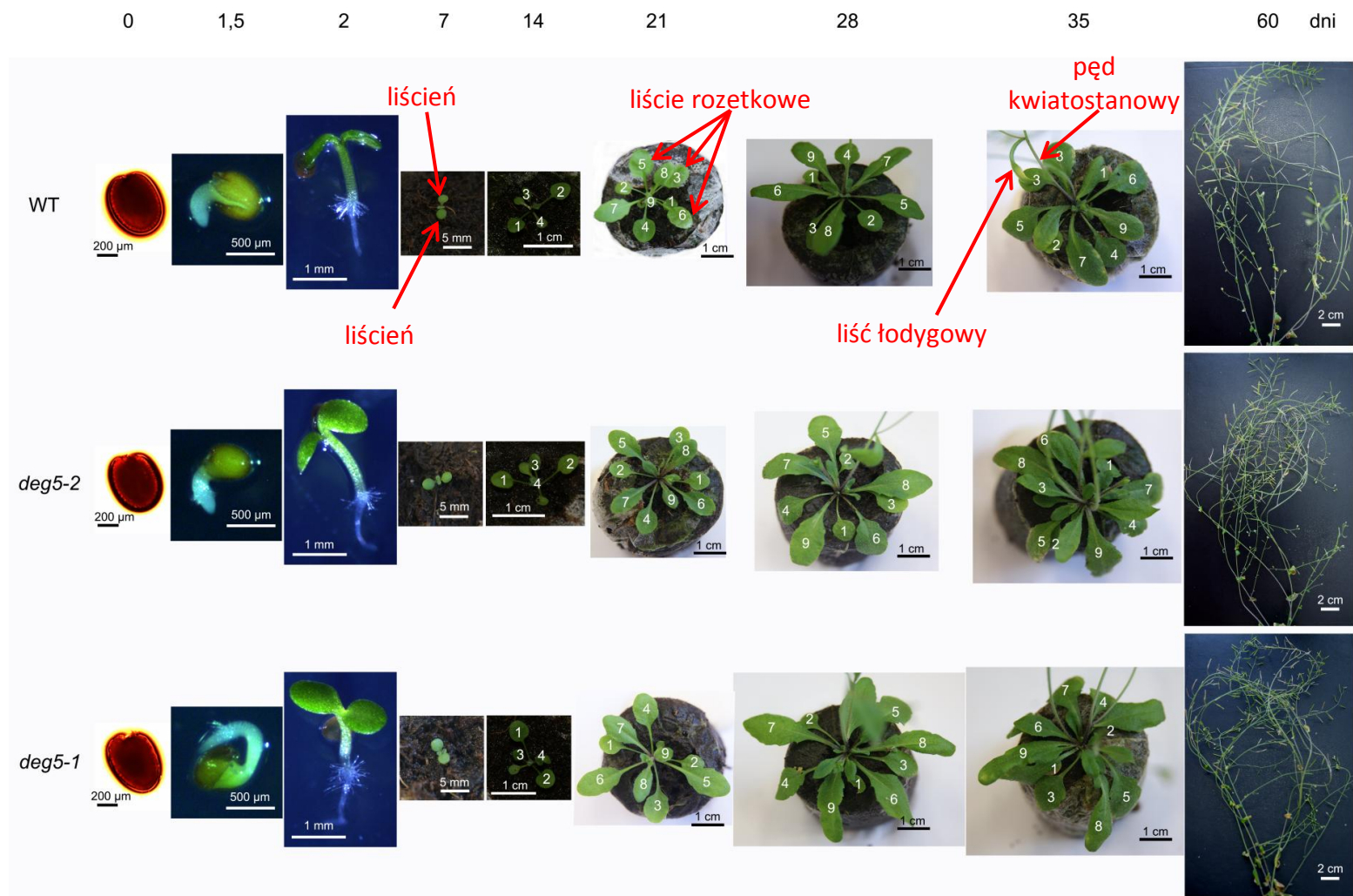
Próbki tylakoidów wyizolowanych z liści roślin WT i mutantów *deg5-2* i *deg5-1*, które osiągnęły podfazę 6.0 ontogenezy rozdzielano elektroforetycznie i poddawano procedurze typu „immunoblot” z przeciwciałami anty-Deg1, 2, 5, 8 i PsbC. Ilości tylakoidów wprowadzanych do kieszonek normalizowano w oparciu o taką samą ilość chlorofilu. „Immunoblotty” skanowano, a intensywność indywidualnych sygnałów apobiałek Deg1, 2, 5, 8 i PsbC w tylakoidach mutantów określano względem sygnałów zidentyfikowanych dla tylakoidów roślin WT (100%) z wykorzystaniem oprogramowania Gelix One (Biostep, Jahnsdorf, Niemcy). Średnie intensywności sygnałów ± SD pokazano pod odpowiednimi ścieżkami; określono je w oparciu o wyniki analizy sześciu „immunoblotów” reprezentujących dwa doświadczenia biologiczne. Dla każdego indywidualnego „immunoblotu” określano zakres liniowości odpowiedzi immunologicznej. Pod uwagę brane były tylko „immunoblotty” charakteryzujące się liniową zależnością pomiędzy ilością nakładanego preparatu tylakoidów a odpowiedzią immunologiczną. Gwiazdki oznaczają istotność statystyczną różnic pomiędzy mutantami *deg5* a roślinami WT ($P < 0,01$).

Zgodnie z wynikami wcześniejszych badań (Luciński i wsp., 2001b) ustalono, że mutant *deg5-1* jest całkowicie pozbawiony białka AtDeg5 (jest zatem mutantem *null*); z kolei mutant *deg5-2* wykazuje niewielkie, aczkolwiek istotne statystycznie obniżenie poziomu akumulacji tego białka, do 77% wartości charakterystycznej dla roślin WT (Rys. 10). Nie stwierdzono istotnych zmian poziomu akumulacji AtDeg1 i AtDeg2 u żadnego z mutantów względem roślin WT, poziom białka AtDeg8 był natomiast niemal dwukrotnie wyższy w roślinach zmutowanych w stosunku do WT.

4.2. Porównawcza analiza fenotypu roślin WT i mutantów *deg5*

4.2.1 Porównawcza analiza chronologii przebiegu faz i podfaz ontogenezy roślin WT i mutantów *deg5*

Pierwszym elementem porównawczej analizy fenotypowej było porównanie chronologii przebiegu wybranych faz ontogenezy (od momentu spęcznienia nasion do pełnego dojrzewania owoców) mutantów i roślin WT, hodowanych w warunkach długiego fotoperiodu (16: 8h). Rysunek 11 ilustruje, jak zmienia się pokrój mutantów *deg5* i roślin WT w ciągu pierwszych sześćdziesięciu dni ich ontogenezy.



Rys. 11 Porównanie morfologii roślin WT i mutantów *deg5* w wybranych punktach czasowych pierwszych sześćdziesięciu dni ontogenezy. Liście rozetkowe oznaczono numerami 1 - 9, zgodnie z kolejnością ich pojawiania się. Zaznaczono także liścień, liść łodygowy i pęd kwiatostanowy.

U roślin WT hodowanych w warunkach długiego dnia od momentu rozpoczęcia kiełkowania w przeciągu pierwszych 20 dni ontogenezy kolejno rozwija się dziewięć liści tworzących rozetę (liście te były numerowane w kolejności pojawiania się). Nieco później na pędzie kwiatostanowym rozwijają się liście łodygowe, które ze względu na znaczną zmienność liczby, kształtów i czasu pojawiania się nie stały się przedmiotem badań.

Porównawcze badania nad fenotypem mutantów i roślin WT obejmowały chronologię przebiegu ontogenezy zdefiniowaną dokładnie według skali BBCH opracowanej dla roślin hodowlanych (Lancashire i wsp., 1991), później zaś zaadaptowanej przez Boyesa i wsp. (2001) do *Arabidopsis thaliana*. Skala BBCH dzieli ontogenezę roślin na fazy i podfazy, a do ich zapisu używa kodu wyrażającego się dwoma cyframi rozdzielonymi kropką. Cyfra przed kropką oznacza numer fazy, cyfra po kropce - numer podfazy, którą roślina osiągnęła, np. zapis 0.1 oznacza podfazę 0.1 fazy 0. Porównawcze badania chronologii przebiegu ontogenezy roślin WT i mutantów *deg5* odnosiły się do pięciu faz zdefiniowanych dokładnie według skali BBCH, a mianowicie: fazy 0 - kiełkowanie nasion, fazy 1 - pojawianie się liści rozetkowych, fazy 5 - pojawianie się kwiatostanu, fazy 6 - kwitnienie, fazy 8 - dojrzewanie owoców oraz dwóch faz (3 i 9), które dla potrzeb niniejszego projektu zdefiniowano inaczej niż to zostało opisane przez Lancashire i wsp. (1991) i Boyes i wsp. (2001) jakkolwiek w sposób inspirowany tymi definicjami.

Faza 0 ontogenezy *Arabidopsis thaliana* (kiełkowanie nasion) (Boyes i wsp., 2001) obejmuje następujące podfazy: pęcznienie nasion (podfaza 0.1), pojawienie się korzenia zarodkowego (podfaza 0.5) oraz jednoczesne pojawienie się hipokotyła i liścieni (podfaza 0.7).

Faza 1 ontogenezy *Arabidopsis thaliana* (pojawianie się liści) (Boyes i wsp., 2001) i obejmuje podfazy 1.0, 1.2 oraz 1.3 - 1.9, które oznaczają: rozprostowanie się liścieni (1.0), jednoczesne pojawienie się liści 1 i 2 (1.2) oraz pojawianie się liści 3 - 9 (1.3 - 1.9). Przez „pojawianie się” liści rozumie się osiągnięcie długości > 1 mm.

Faza 3 ontogenezy *Arabidopsis thaliana* została zdefiniowana przez Boyesa i wsp., 2001, jako wzrost rozetki liściowej i podzielona na podfazy odpowiadające stopniowemu zbliżaniu się przez rozetkę do swoich końcowych rozmiarów. Ze względu na niejasność pojęcia „rozmiar rozetki liściowej” dla potrzeb niniejszego projektu przyjęliśmy inną definicję fazy 3 i jej podfaz – przypisaliśmy je każdemu liściowi z osobna (a nie całej

rozetce) jako momenty, gdy liście osiągają 10% (3.1), 50% (3.5) lub 100% (3.9) końcowej długości. Według zmienionej definicji każda z podfaz została zapisana (zakodowana) przez trzy cyfry oznaczające odpowiednio fazę (pierwsza cyfra przed kropką), podfazę (pierwsza cyfra po kropce) i numer liścia (druga cyfra po kropce), np. 3.45 oznacza moment, kiedy podfaza 4 fazy 3 została osiągnięta została przez liść 5.

Faza 5 ontogenezy *Arabidopsis thaliana* (pojawianie się kwiatostanu) (Boyes i wsp., 2001) jest reprezentowana przez jedną podfazę (5.1), oznaczającą moment, w którym widoczny staje się pierwszy pąk kwiatowy

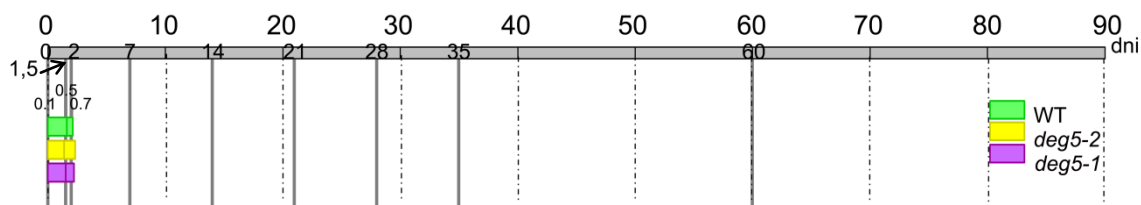
Faza 6 ontogenezy *Arabidopsis thaliana* (kwitnienie) (Boyes i wsp., 2001) obejmuje następujące podfazy: otwarcie się pierwszego kwiatu (6.0), otwarcie się 10% kwiatów (6.1), otwarcie się 50% kwiatów (6.5) oraz otwarcie się 100% kwiatów (6.9).

Faza 8 ontogenezy *Arabidopsis thaliana* (dojrzewanie owoców) (Boyes i wsp., 2001) obejmuje następujące podfazy: pęknięcie pierwszej łuszczyнки (8.0), pęknięcie 10% łuszczynek (8.1), pęknięcie 50% łuszczynek (8.5) i pęknięcie 100% łuszczynek (8.9).

Faza 9 ontogenezy *Arabidopsis thaliana* (starzenie) (Boyes i wsp., 2011) obejmuje podfazę 9.7, która została zdefiniowana w sposób zawierający pewną dawkę subiektywizmu („osiągnięcie takiego stanu zaawansowania starzenia, że jest możliwe uwolnienie się nasion z łuszczynek”), dlatego przyjęto zmienioną definicję podfazy 9.7, a mianowicie uznano, że jest to moment, w którym 100% liści posiada poziom chlorofilu statystycznie istotnie obniżony w stosunku do jego poziomu maksymalnego, co daje możliwość łatwego i obiektywnego rozpoznania tej podfazy poprzez serię oznaczeń poziomu chlorofilu w indywidualnych liściach.

Rysunki 12 - 18 przedstawiają czas (w dniach) niezbędny do tego, aby osiągnięte zostały indywidualne fazy i podfazy ontogenezy. Analizom poddawano rośliny, które rosły i rozwijały się z nasion zbieranych z łuszczynek roślin wszystkich trzech genotypów bezpośrednio po osiągnięciu przez łuszczyńki dojrzałości (tzn. bezpośrednio po pęknięciu). Nie zaobserwowano istotnych zmian w chronologicznej progresji faz i podfaz ontogenezy u mutantu *deg5-2* (u którego pula *AtDeg5* jest zmniejszona o 23% w porównaniu z roślinami WT - por. Rys. 10), natomiast u mutantu *deg5-1 (null)* - Rys. 10) czas niezbędny do osiągnięcia określonych podfaz faz 1, 3, 6 i 8 różni się istotnie w zestawieniu z roślinami WT.

Analiza chronologii przebiegu kiełkowania nasion (faza 0) (Boyes i wsp., 2001) (Rys. 12) wykazała, że rośliny WT i mutanty osiągają podfazy 0.1 (pęcznienie nasion), 0.5 (pojawienie się korzenia zarodkowego) oraz 0.7 (pojawienie się hipokotyla i liścieni) w tym samym czasie, tzn. w 0, 1.6 i 2.1 drugim dniu ontogenezy.

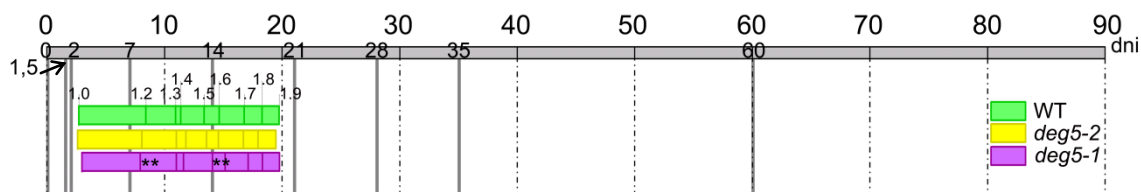


Rys. 12 Analiza chronologii przebiegu fazy 0 u roślin WT oraz mutantów *deg5*.

Poziome kolorowe kasetki wskazują czas (w dniach), który jest niezbędny, aby rośliny WT i mutanty *deg5-2* i *deg5-1* osiągnęły indywidualne podfazy fazy 0 (zaznaczone jako małe pionowe kreski wewnątrz kolorowych kasetek). Oznaczenia umieszczone nad kolorowymi kasetkami oznaczają symbole podfaz fazy 0. Pełne pionowe kreski wskazują punkty czasowe, w których rośliny fotografowano, a fotografie zaprezentowano na rysunku 11. Wartości są średnimi uzyskanymi po przeanalizowaniu sześćdziesięciu roślin każdego genotypu, reprezentujących dwa doświadczenia biologiczne.

Z kolei zaobserwowano, że liście rozetkowe 1+2 oraz 5 mutantu *deg5-1* pojawiały się (tzn. rośliny osiągały podfazę 1.2 i 1.5) o ok. pół dnia wcześniej (podfaza 1.2) bądź pół dnia później (podfaza 1.5) w stosunku do odpowiadających im liści roślin WT (Rys. 13), co wskazuje na fakt, że całkowite wyciszenie AtDeg5 prowadziło do zmiany tempa pojawiania się liści 1+2 oraz 5.

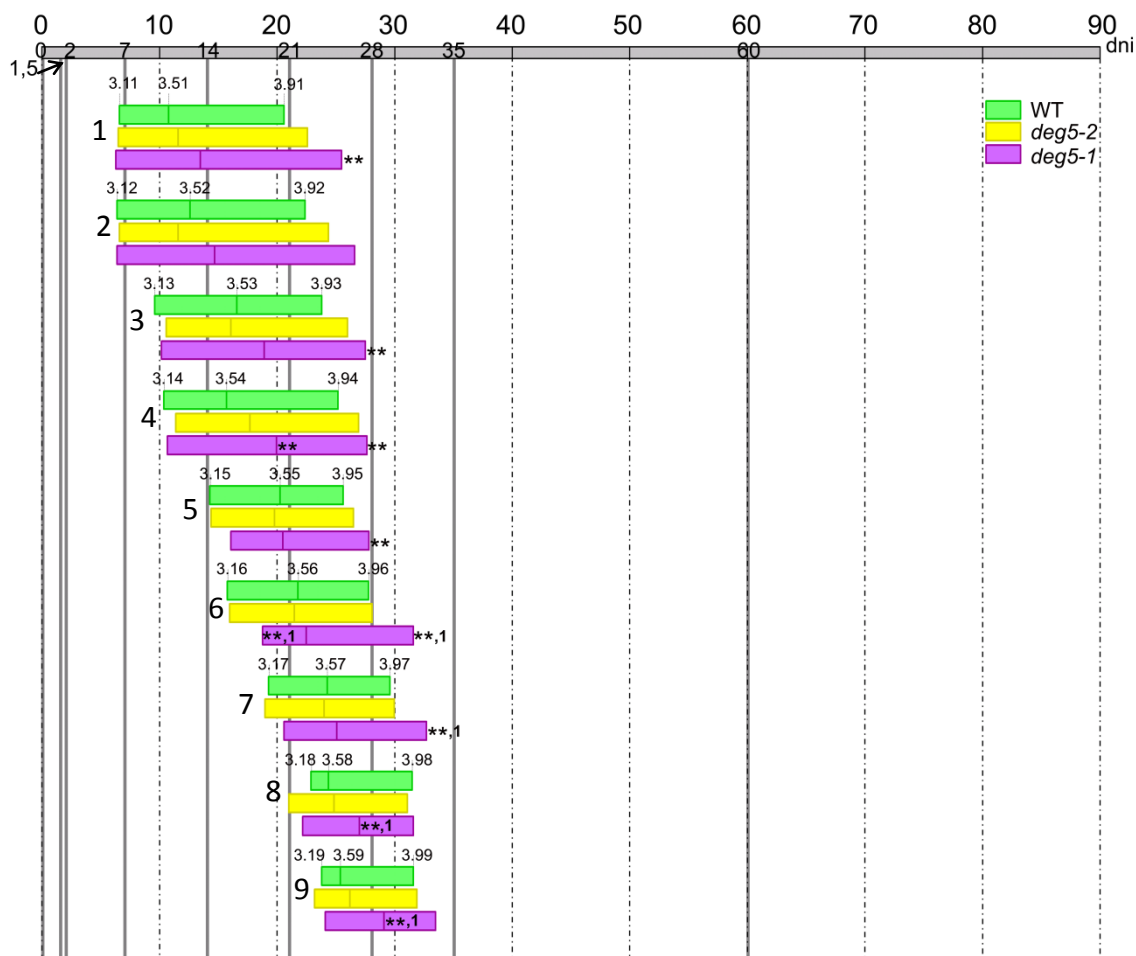
Analiza chronologii przebiegu procesu kiełkowania (fazy 0) prowadzona była z użyciem nasion kiełkujących na podłożach *in vitro*, natomiast analiza pojawiania się liści (fazy 1) – na roślinach rosnących w doniczkach torfowych (podobnie jak analiza wszystkich pozostałych faz ontogenezy), dlatego nie jest możliwe bezpośrednie porównywanie chronologii progresji fazy 0 i fazy 1 – a także fazy 0 i żadnej z pozostałych faz osiągniętych przez badane rośliny.



Rys. 13 Analiza chronologii przebiegu fazy 1 u roślin WT i mutantów *deg5*.

Poziome kolorowe kasetki wskazują czas (w dniach), który jest niezbędny, aby rośliny WT i mutanty *deg5-2* i *deg5-1* osiągnęły indywidualne podfazy fazy 1 (zaznaczone jako małe pionowe kreski wewnątrz kolorowych kasetek). Oznaczenia umieszczone nad kolorowymi kasetkami oznaczają symbole podfaz fazy 1. Pełne pionowe kreski wskazują punkty czasowe, w których rośliny fotografowano, a fotografie zaprezentowano na rysunku 11. Gwiazdki oznaczają istotność statystyczną różnic pomiędzy mutantami *deg5* a roślinami WT ($P < 0,01$). Wartości są średnimi uzyskanymi po przeanalizowaniu sześćdziesięciu roślin każdego genotypu, reprezentujących dwa doświadczenia biologiczne.

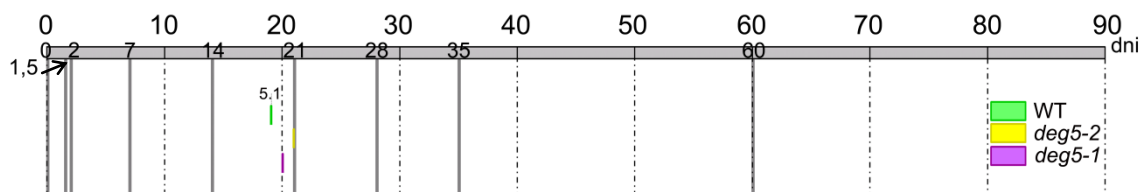
Analiza chronologii przebiegu wzrostu liści (faza 3) (Rys. 14) pozwala zaobserwować, że większość liści rozetkowych mutantu *deg5-1* (tzn. liście 1, 3, 4, 5, 6 i 7) osiągała swoją końcową wielkość 2 - 6 dni później niż liście roślin WT; dla przykładu liść 1 uzyskiwał swoją końcową wielkość (= roślina osiągała podfazę 3.91) 4.5 dnia później niż ten sam liść u roślin WT (25 vs 20.5 dni). Pozostałe liście rozetkowe (2, 8 i 9) tego mutantu również osiągały końcową wielkość z pewnym opóźnieniem w porównaniu z liśćmi roślin WT, ale opóźnienie to nie było istotne statystycznie. Ponadto u części liści (4, 8 i 9) mutantu *deg5-1* miało miejsce opóźnienie o 2.7 - 5 dni momentu, w którym osiągały one 50% końcowej wielkości (podfaza 3.54, 3.58 i 3.59). Tak więc wzrost liścia 4 został najsilniej zmieniony w odpowiedzi na wyciszenie AtDeg5, opóźnienia dotyczyły bowiem dwóch z trzech podfaz fazy 3 (3.54 i 3.94). W niektórych przypadkach moment osiągnięcia określonych podfaz (3.16, 3.96, 3.97, 3.58 i 3.59) był u mutantu *deg5-1* opóźniony w sposób istotny statystycznie nie tylko wobec roślin WT, ale także w stosunku do mutantu *deg5-2*; w pozostałych przypadkach istotnych różnic międzymutantowych nie obserwowano.



Rys. 14 Analiza chronologii przebiegu fazy 3 u roślin WT i mutantów *deg5*.

Poziome kolorowe kasetki wskazują czas (w dniach), który jest niezbędny, aby liście WT i mutantów *deg5-2* i *deg5-1* osiągnęły indywidualne podfazy fazy 3 (zaznaczone jako małe pionowe kreski wewnątrz kolorowych kasetek). Każda grupa trzech kasetek przedstawia wyniki analizy chronologii przebiegu podfaz fazy 3 dla indywidualnego liścia rozetkowego, numery liści rozetkowych zaznaczono po lewej stronie każdej grupy trzech kasetek. Oznaczenia umieszczone nad kolorowymi kasetkami oznaczają symbole podfaz fazy 3. Pełne pionowe kreski wskazują punkty czasowe, w których rośliny fotografowano, a fotografie zaprezentowano na rysunku 11. Gwiazdki oznaczają istotność statystyczną różnic pomiędzy mutantami *deg5* a roślinami WT ($P < 0,01$). Jedynki oznaczają istotność statystyczną różnic międzymutantowych (*deg5-1/deg5-2*). Wartości są średnimi uzyskanymi po przeanalizowaniu sześćdziesięciu roślin każdego genotypu, reprezentujących dwa doświadczenia biologiczne.

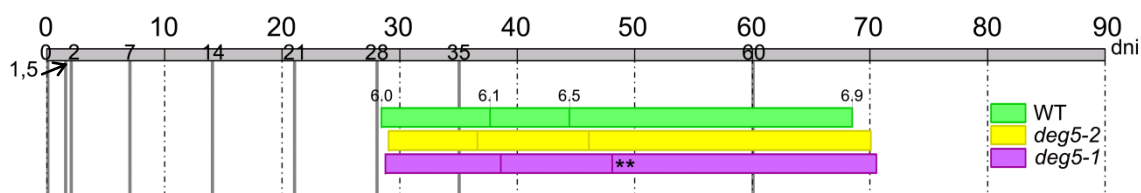
Analiza chronologii przebiegu fazy 5 (pojawianie się kwiatostanu) (Boyes i wsp., 2001) (Rys. 15) wykazała, że rośliny WT i mutanty osiągają podfazę 5.1 (moment, w którym widoczny staje się pierwszy pąk kwiatowy) w tym samym czasie; różnice, jakie odnotowano (WT - 19 dni, *deg5-2* - 21 dni, *deg5-1* - 20 dni) okazały się nieistotne statystycznie.



Rys. 15 Analiza chronologii przebiegu fazy 5 u roślin WT i mutantów *deg5*.

Pionowe kolorowe kreski wskazują czas (w dniach), który jest niezbędny, aby rośliny WT i mutanty *deg5-2* i *deg5-1* osiągnęły podfazę 5.1 fazy 5. Pełne pionowe kreski wskazują punkty czasowe, w których rośliny fotografowano, a fotografie zaprezentowano na rysunku 11. Wartości są średnimi uzyskanymi po przeanalizowaniu sześćdziesięciu roślin każdego genotypu, reprezentujących dwa doświadczenia biologiczne.

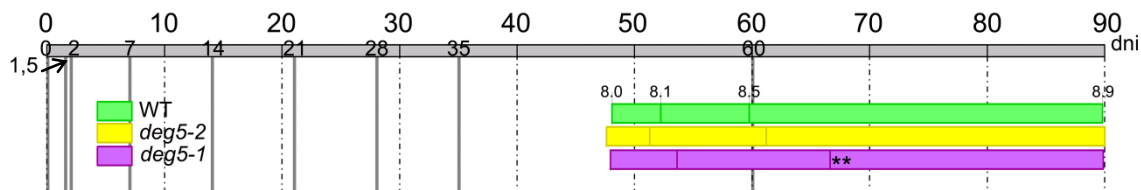
Analiza chronologii przebiegu fazy 6 (kwitnienie) pozwoliła na stwierdzenie, że moment, w którym 50% kwiatów jest już otwartych (podfaza 6.5) jest u mutantu *deg5-1* o 3.7 dnia opóźniony w porównaniu z roślinami WT (Rys. 16), podczas gdy pozostałe podfazy fazy 6 były osiągane u mutantów i roślin WT w tym samym momencie (niewielkie różnice nie były istotne statystycznie).



Rys. 16 Analiza chronologii przebiegu fazy 6 u roślin WT i mutantów *deg5*.

Poziome kolorowe kasetki wskazują czas (w dniach), który jest niezbędny, aby rośliny WT i mutanty *deg5-2* i *deg5-1* osiągnęły indywidualne podfazy fazy 6 (zaznaczone jako małe pionowe kreski wewnątrz kolorowych kasetek). Oznaczenia umieszczone nad kolorowymi kasetkami oznaczają symbole podfaz fazy 6. Pełne pionowe kreski wskazują punkty czasowe, w których rośliny fotografowano, a fotografie zaprezentowano na rysunku 11. Gwiazdki oznaczają istotność statystyczną różnic pomiędzy mutantami *deg5* a roślinami WT ($P < 0,01$). Wartości są średnimi uzyskanymi po przeanalizowaniu sześćdziesięciu roślin każdego genotypu, reprezentujących dwa doświadczenia biologiczne.

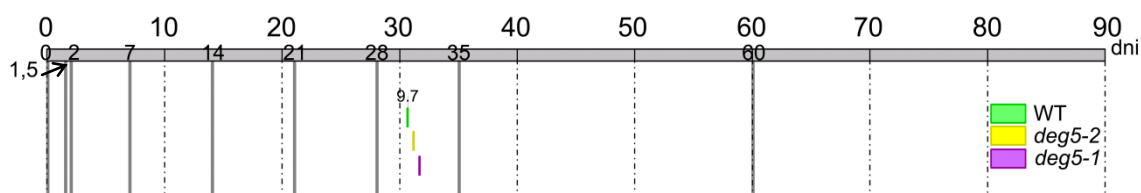
Opóźnieniu wzrostu większości liści i przejściowemu opóźnieniu kwitnienia towarzyszy u mutantu *deg5-1* przejściowe opóźnienie dotyczące dojrzewania owoców (= pęknięcia łuszczynek) (faza 8), mianowicie moment, w którym 50% łuszczynek było otwartych (podfaza 8.5) był u tego mutantu opóźniony aż o 7 dni w porównaniu z roślinami WT (WT - 59.5 dnia vs *deg5-1* - 66.5 dnia - Rys. 17).



Rys. 17 Analiza chronologii przebiegu fazy 8 u roślin WT i mutantów *deg5*.

Poziome kolorowe kasetki wskazują czas (w dniach), który jest niezbędny, aby rośliny WT i mutanty *deg5-2* i *deg5-1* osiągnęły indywidualne podfazy fazy 8 (zaznaczone jako małe pionowe kreski wewnątrz kolorowych kasetek). Oznaczenia umieszczone nad kolorowymi kasetkami oznaczają symbole podfaz fazy 8. Pełne pionowe kreski wskazują punkty czasowe, w których rośliny fotografowano, a fotografie zaprezentowano na rysunku 11. Gwiazdki oznaczają istotność statystyczną różnic pomiędzy mutantami *deg5* a roślinami WT ($P < 0,01$). Wartości są średnimi uzyskanymi po przeanalizowaniu sześćdziesięciu roślin każdego genotypu, reprezentujących dwa doświadczenia biologiczne.

Ostatnią fazą, której chronologię przebiegu badano było starzenie (faza 9, reprezentowana przez pojedynczą podfazę 9.7). Rysunek 18 ilustruje moment, w którym mutanty i rośliny WT osiągają podfazę 9.7. Analizując moment osiągnięcia podfazy 9.7 nie zaobserwowano różnic pomiędzy mutantami *deg5* a roślinami WT.

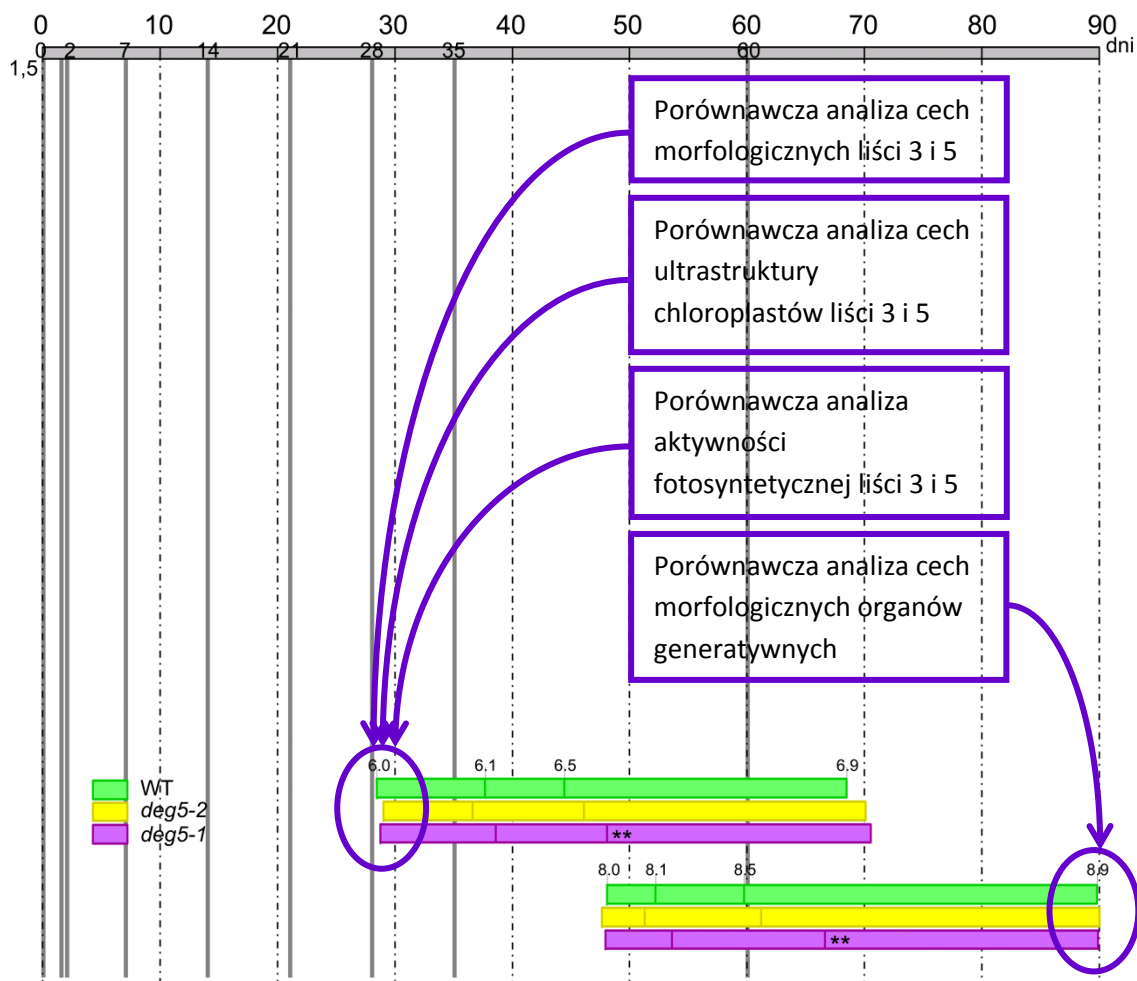


Rys. 18 Analiza chronologii przebiegu fazy 9 u roślin WT i mutantów *deg5*.

Pionowe kolorowe kreski wskazują czas (w dniach), który jest niezbędny, aby rośliny WT i mutanty *deg5-2* i *deg5-1* osiągnęły podfazę 9.7 fazy 9. Pełne pionowe kreski wskazują punkty czasowe, w których rośliny fotografowano, a fotografie zaprezentowano na rysunku 11. Wartości są średnimi uzyskanymi po przeanalizowaniu sześćdziesięciu roślin każdego genotypu, reprezentujących dwa doświadczenia biologiczne.

4.2.2 Porównawcza analiza wybranych cech fenotypowych mutantów *deg5* i roślin szczepu dzikiego, które osiągnęły podfazę 6.0 lub 8.9 ontogenezy

Dalsza część badań polegała na porównaniu fenotypu mutantów *deg5* i roślin szczepu dzikiego poprzez analizę wybranych cech strukturalnych i funkcjonalnych roślin reprezentujących trzy genotypy, wykonywaną w momencie, gdy badane rośliny osiągnęły tę samą podfazę ontogenezy, a mianowicie podfazę 6.0 (moment otwarcia pierwszego kwiatu).

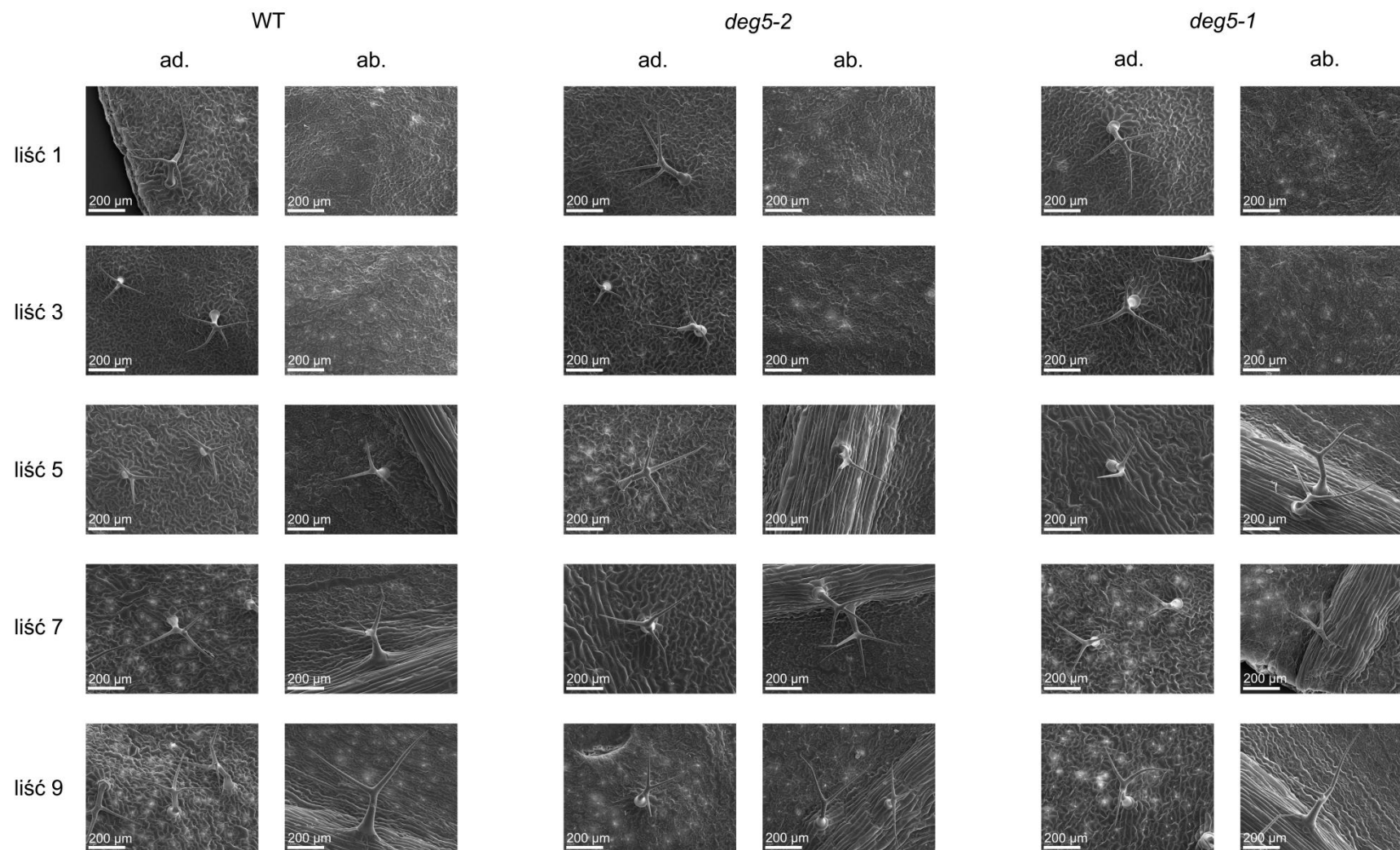


Rys. 19 Punkty czasowe w ontogenezie *A. thaliana*, w których przeprowadzono analizy fenotypowe roślin WT i mutantów *deg5* na tle schematu chronologii przebiegu podfaz faz 6 i 8.

Przyjęto założenie, że analizy fenotypowe odnoszące się do liści będą dotyczyć osobno liści młodocianych i dojrzałych, można było bowiem oczekiwać innej reakcji liści młodocianych i dojrzałych na deficyt/brak AtDeg5 (Jung, 2004, Sjögren i wsp., 2006). Rozróżnienie liści młodocianych i dojrzałych opiera się na rozmieszczeniu trichomów na blaszce liściowej - epiderma strony adaksjalnej (doosiowej) zarówno liści młodocianych, jak i dojrzałych jest pokryta trichomami, natomiast epiderma strony abaksjalnej (odosiowej) wytwarza trichomy jedynie w przypadku liści dojrzałych (Telfer i wsp., 1997). Ze względu na istnienie silnego wpływu ekotypu rzodkiewnika oraz warunków hodowli (fotoperiod) na rozmieszczenie trichomów (Chien i Sussex, 1996; Telfer i wsp., 1997) zbadano, jak są one rozmieszczone po obydwu stronach blaszki liści 1, 3, 5, 7 i 9 mutantów *deg5* oraz roślin WT w momencie osiągnięcia podfazy 6.0. Analiza dystrybucji trichomów (Rys. 20) jednoznacznie wskazuje, że liście 1 i 3 należą do populacji liści młodocianych (tylko epiderma strony doosiowej jest pokryta trichomami), podczas

gdy liście 5, 7 i 9 reprezentują populację dojrzałą (epiderma obydwu stron jest pokryta trichomami). Analiz większości cech liści dokonywano zatem na liściach 3 i 5, jedynie badania aktywności fotosyntetycznej zostały ograniczone do liścia 5 - dla przyczyn wyjaśnionych w podsekcji 4.2.2.3 (patrz str. 25-27). Analizy prowadzono w momencie, gdy doszło do otwarcia się pierwszego kwiatu (podfaza 6.0), tj. w 29 dniu ontogenezy (podfaza ta przypadała na 29 dzień u wszystkich trzech porównywanych genotypów). Liście 3 i 5 kończą wzrost przed wejściem rośliny w podfazę 6.0 (por. Rys. 14 i 16).

Z kolei badania dotyczące cech morfologii organów generatywnych były wykonywane na roślinach, u których doszło do pęknięcia wszystkich łuszczynek (podfaza 8.9), tj. w 90 dniu ontogenezy (Rys. 19).

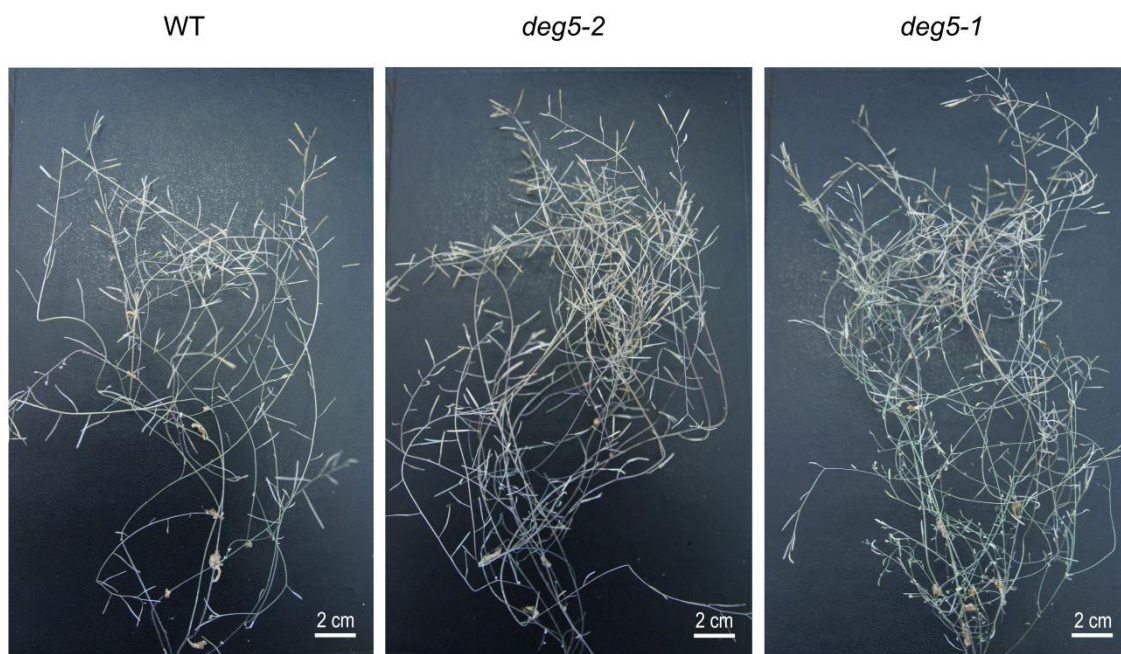


Rys. 20 Rozmieszczenie trichomów po obu stronach epidermy blaszek liściowych rozetkowych roślin WT i mutantów *deg5*. Liście obserwowano za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego. Skrót ad. i ab. oznaczają odpowiednio adaksjalną i abaksjalną stronę blaszki liściowej.

Rysunek 21 przedstawia pokrój liści roślin WT i mutantów *deg5* w momencie osiągnięcia podfazy 6.0, a rysunek 22 - pokrój całych roślin trzech badanych genotypów w momencie osiągnięcia przez rośliny podfazy 8.9.



Rys. 21 Liście rozetkowe roślin WT i mutantów *deg5* znajdujących się w podfazie 6.0 ontogenezy. Liście zaznaczone obwódką reprezentują populację liści młodocianych (3) oraz dojrzałych (5).

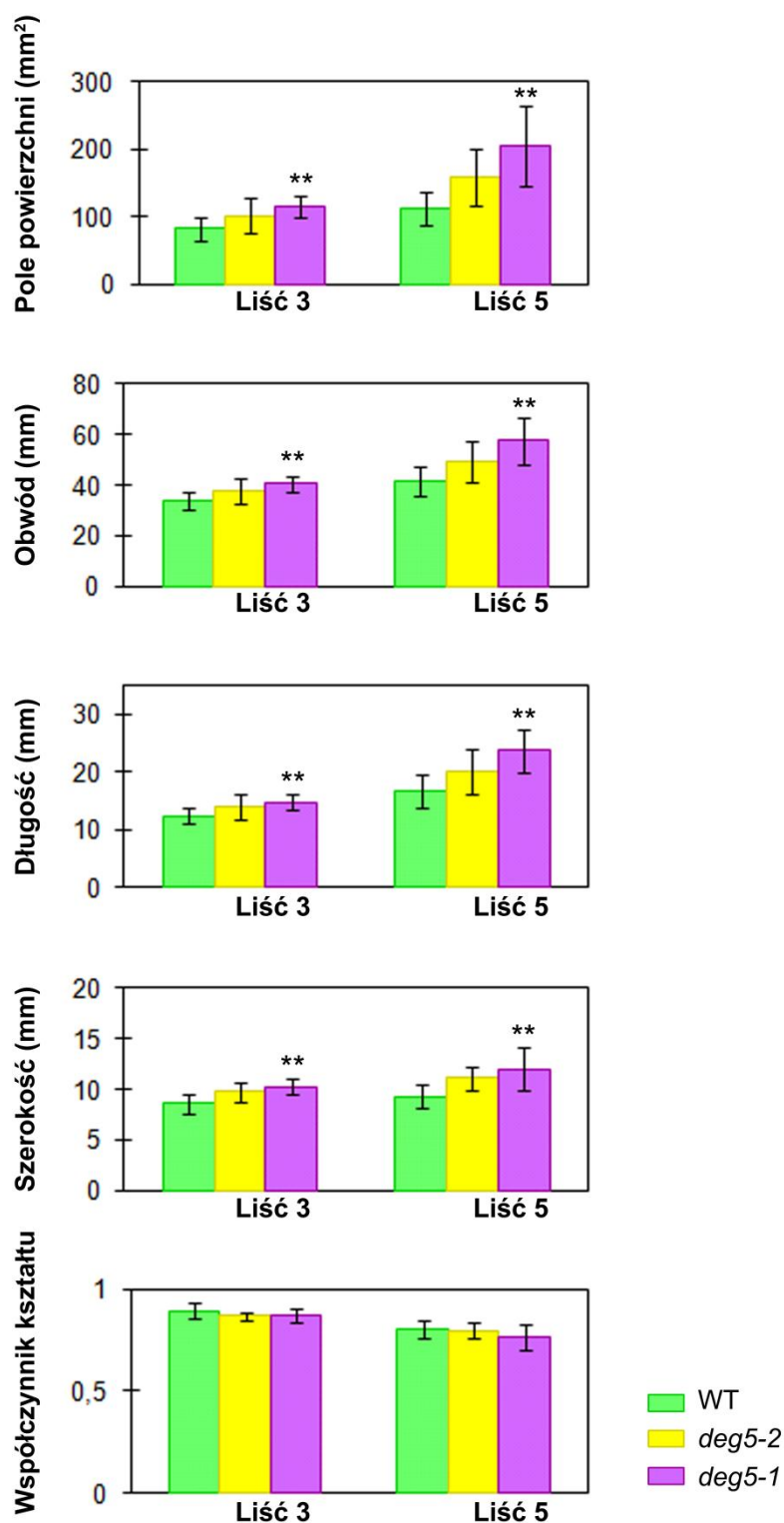


Rys. 22 Rośliny WT i mutantów *deg5*, które osiągnęły podfazę 8.9 ontogenezy.

4. 2. 2. 1 Porównawcza analiza cech morfologicznych liści roślin WT i mutantów *deg5*, które osiągnęły podfazę 6.0

Aby przekonać się, czy częściowe - względnie całkowite - wyciszenie proteazy AtDeg5 prowadzi do zmian cech morfologicznych liści młodocianych i dojrzałych analizowano cyfrowe obrazy liści mutantów *deg5* oraz roślin WT znajdujących się w podfazie 6.0 ontogenezy.

Liście mutantu *deg5-2* nie różniły się w zakresie badanych cech morfologicznych od liści roślin WT, jakkolwiek zaobserwowano umiarkowane, nieistotne statystycznie zmiany polegające na zwiększeniu pola powierzchni, obwodu, długości i szerokości liści, zarówno młodocianych, jak i dojrzałych (Rys. 23).



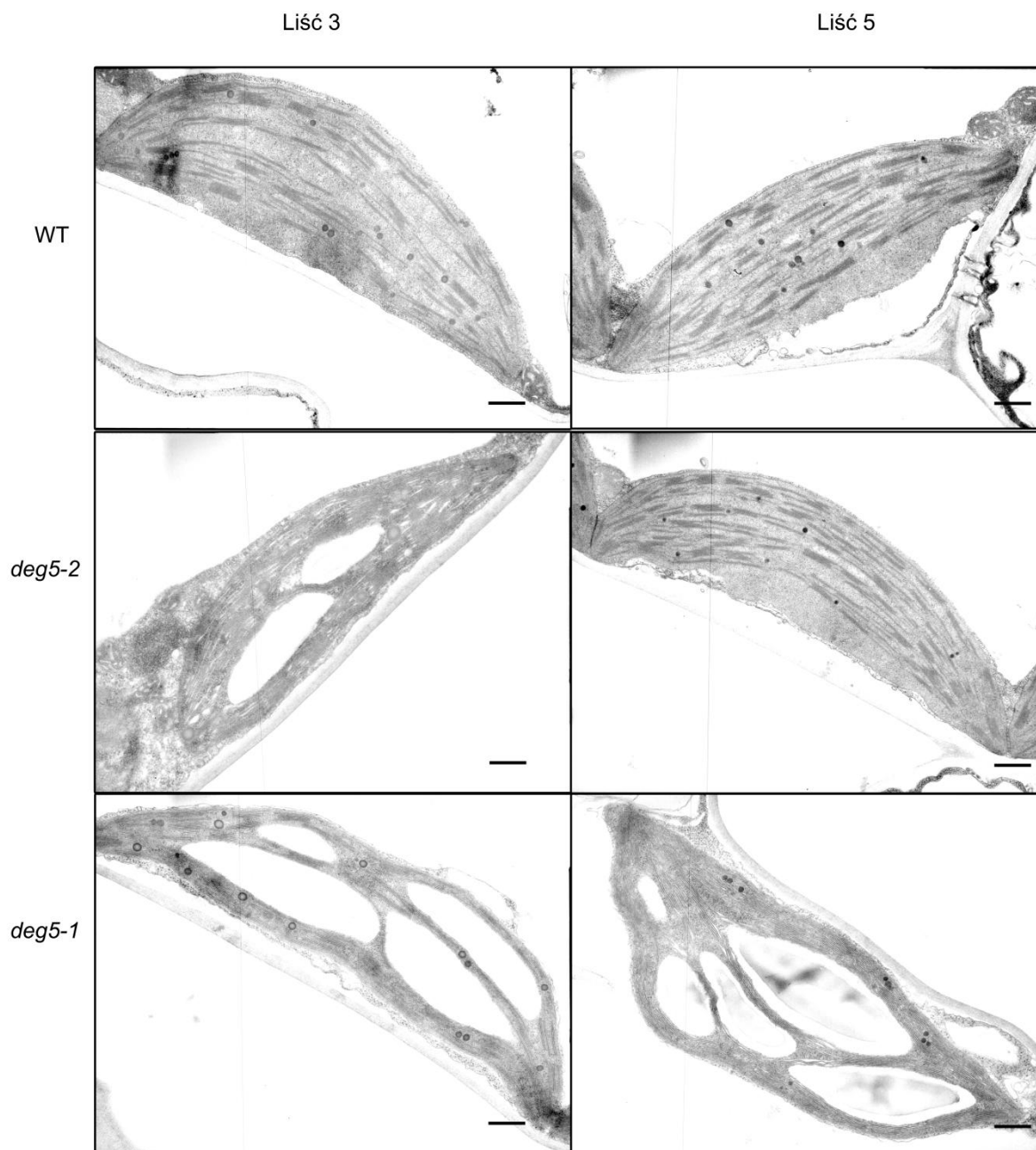
Rys. 23 Analiza morfologii liścia 3 i 5 roślin WT i mutantów *deg5*, które osiągnęły podfazę 6.0 ontogenezy.

Wartości są średnimi \pm SD uzyskanymi po przeanalizowaniu liści dziewiętnastu roślin każdego genotypu, reprezentujących trzy doświadczenia biologiczne. Gwiazdki oznaczają istotność statystyczną różnic pomiędzy mutantami *deg5* a roślinami WT ($P < 0,01$).

W przeciwieństwie do tego, co obserwowano w przypadku *deg5-2*, liście mutantów *deg5-1* (zarówno młodociane, jak i dojrzałe) miały większą powierzchnię (o, odpowiednio, 42 i 84%) i większy obwód (o, odpowiednio, 21 i 39%) w stosunku do roślin WT, co było konsekwencją stosownego zwiększenia długości i szerokości tych liści (Rys. 23). Długość i szerokość liści mutantów *deg5-1* były zwiększone (w stosunku do liści roślin WT) mniej więcej w tym samym stopniu (o ok. 30%) i dlatego współczynniki kształtu liści mutantów i roślin WT nie różniły się. Stwierdzono brak istotnych statystycznie różnic *deg5-1/deg5-2* w odniesieniu do cech morfologicznych liści młodocianych i dojrzałych.

4. 2. 2. 2 Porównawcza analiza cech ultrastruktury oraz składu biochemicznego chloroplastów liści roślin WT i mutantów deg5, które osiągnęły podfazę 6.0

Aby lepiej zrozumieć konsekwencje braku chloroplastowej proteazy AtDeg5 analizowano z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej wybrane elementy ultrastruktury chloroplastów dojrzałych i młodocianych liści obu mutantów i roślin WT, które osiągnęły podfazę 6.0 ontogenezy (Rys. 24).

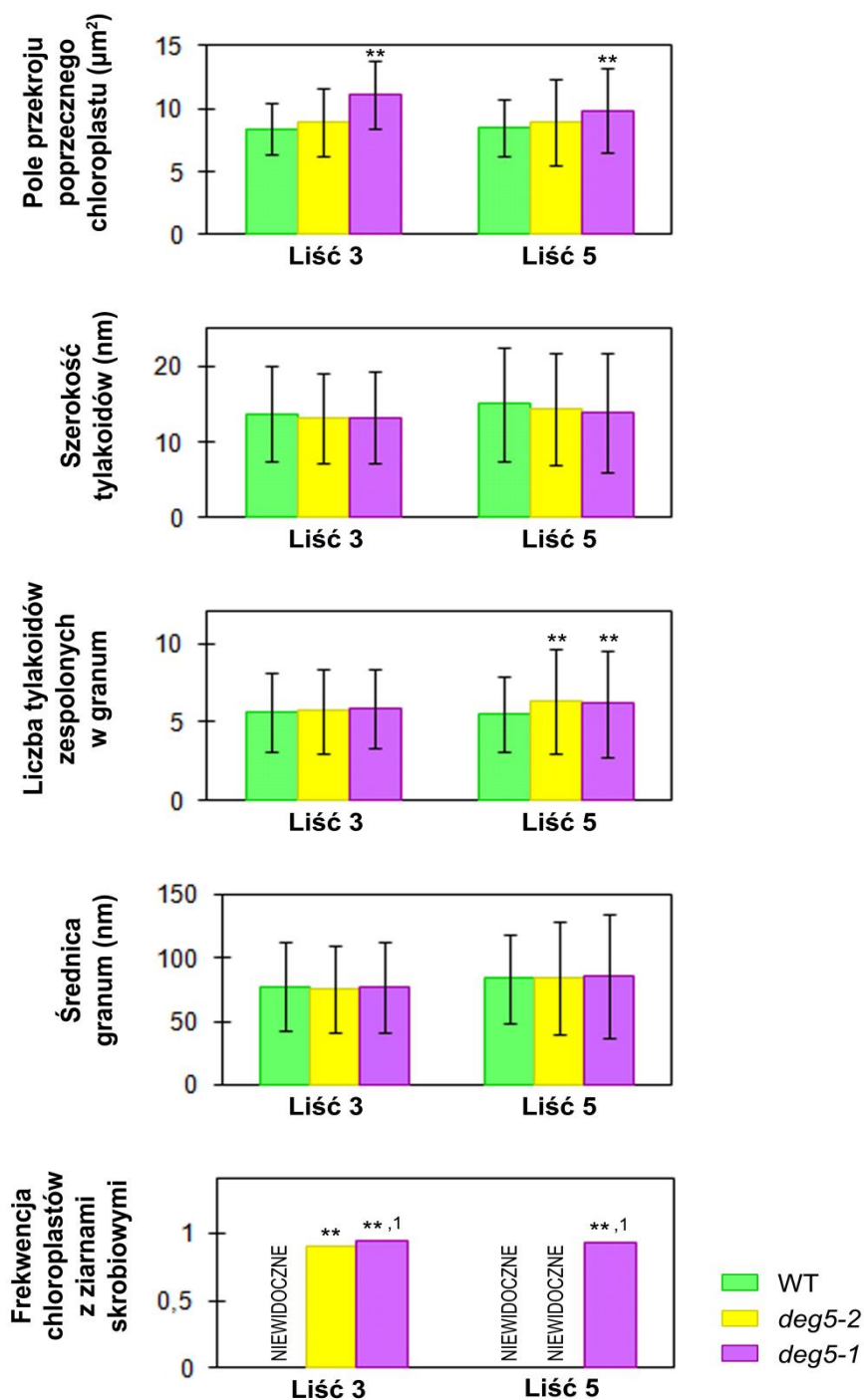


Rys. 24 Analiza elektronmikroskopowa chloroplastów 3 i 5 liścia roślin WT i mutantów *deg5*, znajdujących się w podfazie 6.0 ontogenezy.

Liście pobierano do analizy pod koniec okresu nocy. Mikrofotografie przedstawiają chloroplasty najbardziej typowe spośród stu dla każdego genotypu, które przeanalizowano, reprezentujących trzy doświadczenia biologiczne. Jednostka długości - 500nm.

Zaobserwowano różnice dotyczące wielkości pola przekroju poprzecznego chloroplastów odnoszące się do liści młodocianych i dojrzałych, a mianowicie mutanty *deg5-1* posiadały chloroplasty o większym polu przekroju poprzecznego (stwierdzono brak różnic międzymutantowych) (Rys. 24 i 25). Różnice dotyczyły także architektury systemu

tylakoidowego - dojrzałe liście (ale nie młodociane) mutantów (nie zaobserwowano różnic międzymutantowych pod względem tej cechy) posiadały średnio większą liczbę tylakoidów zespolonych w granum (6.2/6.3) w porównaniu z roślinami WT (5.6), podczas gdy szerokość indywidualnych tylakoidów (mierzona jako odległość od dolnej krawędzi błony do górnej krawędzi błony tego samego tylakoidu) była taka sama w chloroplastach liści mutantów i roślin WT i mieściła się w przedziale 13.18 - 15.09 nm. Nie zaobserwowano także istotnych statystycznie różnic pomiędzy średnicami granów roślin WT i mutantów. Z kolei stwierdzono bardzo interesujące, poważne różnice odnoszące się do akumulacji ziaren skrobiowych w chloroplastach. Jak to zilustrowano na rysunkach 24 i 25 zdecydowana większość (ponad 90%) chloroplastów młodocianych liści mutantu *deg5-2* oraz chloroplastów młodocianych i dojrzałych liści mutantu *deg5-1* wykazywała bardzo silną akumulację skrobi tranzytorycznej pod koniec nocy, podczas gdy w chloroplastach roślin WT - zgodnie z oczekiwaniami - nie obserwowano ziaren skrobiowych (kompletnie zhydrolizowanych w ciągu nocy).



Rys. 25 Analiza cech ultrastruktury chloroplastów 3 i 5 liścia roślin WT i mutantów *deg5* znajdujących się w podfazie 6.0 ontogenezy.

Liście pobierano do analizy pod koniec okresu nocy. Chloroplasty oglądano przy pomocy transmisyjnego mikroskopu elektronowego, fotografowano, a negatywy poddawano analizie przy użyciu programu do cyfrowej obróbki obrazu. Wartości są średnimi \pm SD uzyskanymi po przeanalizowaniu stu chloroplastów dla każdego genotypu, reprezentujących trzy doświadczenia biologiczne. Gwiazdki oznaczają istotność statystyczną różnic pomiędzy mutantami *deg5* a roślinami WT ($P < 0,01$); liczba 1 oznacza istotność statystyczną różnic pomiędzy *deg5-1* a *deg5-2* ($P < 0,01$).

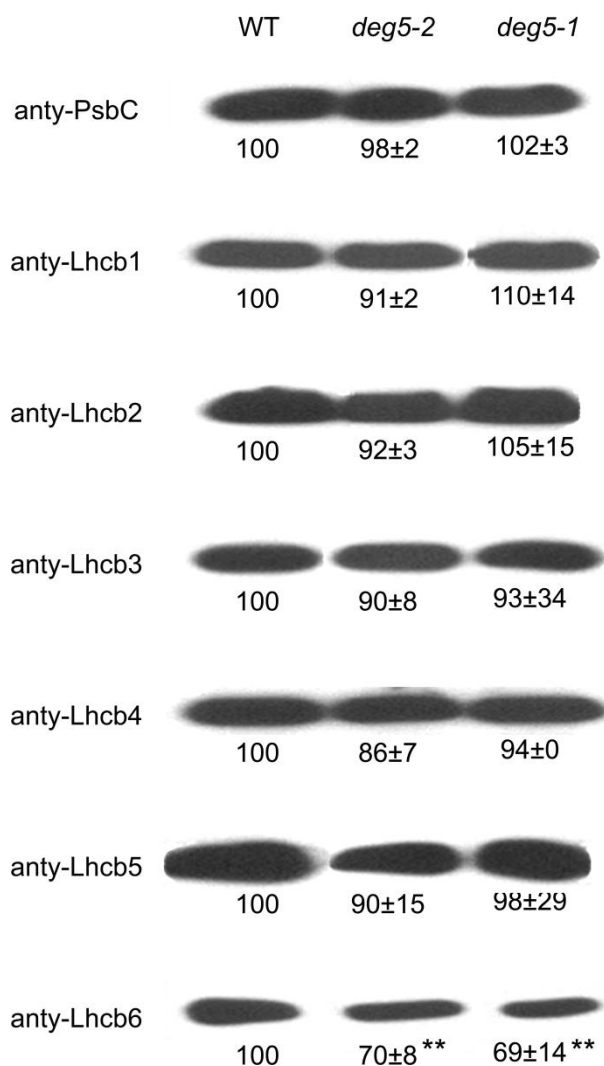
W dalszej części doświadczeń podjęto próbę bardziej szczegółowego wniknięcia w mechanizmy decydujące o tym, że brak/deficyt AtDeg5 prowadzi do zmian architektury systemu tylakoidowego chloroplastów oraz akumulacji skrobi tranzytorycznej pod koniec nocy.

Obserwacja wskazująca, że w chloroplastach roślin WT, które osiągnęły podfazę 6.0 ontogenezy, stopy granowe składają się z mniejszej liczby zespolonych ze sobą tylakoidów niż w przypadku mutantów *deg* może oznaczać, w chloroplastach roślin WT znajdujących się w podfazie 6.0 już rozpoczął się związany ze starzeniem proces dekompozycji systemu tylakoidowego. Dane literaturowe wskazują, że istotną rolę w zespalaniu tylakoidów w stopy granowe odgrywają apobiałka PSII, a mianowicie apobiałka LHCI (Anderson, 1986) oraz, być może, apobiałko Lhcb5 (Andersson i wsp., 2001), dlatego zbadano poziom apobiałek Lhcb1-6 w liściach roślin WT i mutantów *deg5* znajdujących się w podfazie 6.0 ontogenezy. Zweryfikowano w ten sposób hipotezę zakładającą, że w momencie osiągnięcia podfazy 6.0 mutanty utrzymują wyższy poziom apobiałek promujących zespalanie tylakoidów w grana (Lhcb1, 2, 3 i 5) w porównaniu z roślinami WT. Wyniki uzyskane z użyciem procedury „immunoblot” dowodzą, że poziom apobiałek Lhcb1-5 u roślin WT i mutantów nie różni się, podczas gdy - co było wynikiem nieoczekiwanym, ale zarazem bardzo interesującym - obydwa mutanty mają obniżony poziom apobiałka Lhcb6, do 69-70% wartości charakterystycznej dla roślin WT (Rys. 26). W celu sprawdzenia jaki wpływ ma ograniczenie poziomu apobiałka Lhcb6 u mutantów *deg5* na istotny element organizacji strukturalnej PSII, jakim jest liczba trimerów LHCI przypadająca na monomeryczny rdzeń PSII, liczbę tę określano w oparciu o wyniki pomiarów poziomu apobiałek Lhcb1, 2, 3 i 4 obecnych w preparatach błon zespolonych tylakoidów gran - rozdzielonych za pomocą SDS-PAGE i zidentyfikowano za pomocą procedury „immunoblot”. Wspomniane pomiary wykonano w oparciu o wyniki analizy obrazu wybarwionych żeli (Rys. 27). Ustalono, że średnie liczby trimerów LHCI w przeliczeniu na monomeryczny rdzeń PSII są jednakowe u roślin wszystkich trzech badanych genotypów (drobne różnice nie są istotne statystycznie) i wynoszą dla WT, *deg5-2* i *deg5-1*, odpowiednio, 2.17 : 1 ± 0.03, 2.15 : 1 ± 0.01 i 2.11 : 1 ± 0.02. Wyniki te w pełni potwierdzają rezultaty podobnych oznaczeń wcześniej wykonanych w naszym zespole dla roślin WT i mutantów *deg5-1* (Gibasiewicz i wsp., 2015) i wskazują, że mutant

deg5-2 nie różni się pod względem liczby trimerów LHCII przypadających na rdzeń PSII ani od roślin WT, ani od *deg5-1*.

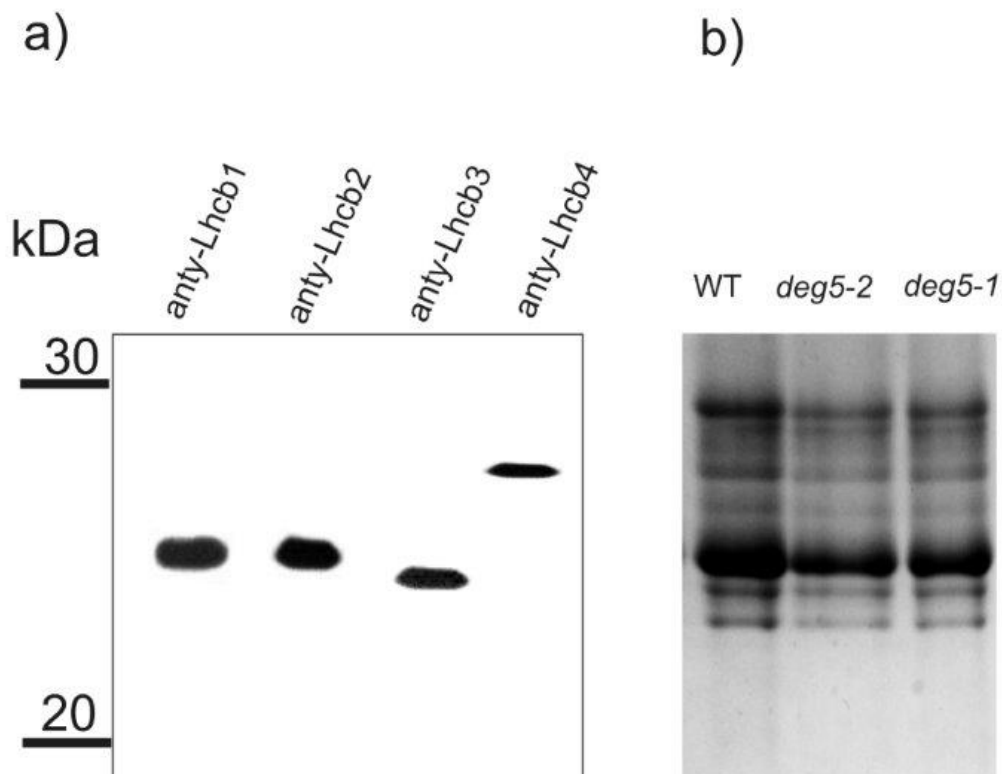
Opierając się na bardzo dobrze udokumentowanej eksperymentalnie tezie, że zdecydowana większość cząstek superkompleksów PSII-LHCII obecnych w błonach tylakoidowych gran *A. thaliana* to wersja C₂S₂M₂ (Broess i wsp., 2008; Caffari i wsp., 2011), można uznać, że dla każdego z trzech genotypów na pojedynczy rdzeń PSII przypadają po dwa trimery LHCII związane z cząstkami superkompleksów PSII-LHCII oraz jednakowa liczba (0.11 - 0.17) „dodatkowych” trimerów LHCII. Zważywszy, że apobiałko Lhcb6 stanowi niezbędny łącznik pomiędzy trimerami LHCII-M a rdzeniem PSII (Kovacs i wsp., 2006; de Bianchi i wsp., 2008) utrata 29% puli Lhcb6 przez obydwaj mutanty *deg5* musi oznaczać utratę 29% puli trimerów LHCII-M (odłączonych od rdzenia PSII pod nieobecność Lhcb6), tzn. liczba trimerów LHCII związanych z cząstkami superkompleksów PSII-LHCII spada u mutantów do ok. 1.71 na monomeryczny rdzeń. Dysponując taką samą liczbą trimerów LHCII na monomeryczny rdzeń PSII jak rośliny WT mutanty muszą dysponować większą (o ok. 0.29) liczbą „dodatkowych” trimerów LHCII w przeliczeniu na rdzeń PSII.

Dla uzyskania bardziej szczegółowych informacji o wpływie braku/deficytu AtDeg5 na akumulację skrobi tranzytorycznej pod koniec nocy przeanalizowano dobowe zmiany poziomu skrobi oraz kształtowanie się poziomu skrobi w warunkach przedłużonej nocy w liściach młodocianych oraz dojrzałych roślin WT i mutantów *deg5* (Rys. 28).



Rys. 26 Określenie równowagowego poziomu apobiałek Lhcb1-6 w tylakoidach roślin WT i mutantów *deg5* znajdujących się w podfazie 6.0 ontogenezy za pomocą analizy typu „immunoblot” z użyciem przeciwciał anty-PsbC i anty-Lhcb1-6.

Próbki tylakoidów rozdzielano elektroforetycznie, normalizując ich ilość w oparciu o jednakowy sygnał immunologiczny apobiałka PsbC i poddawano procedurze typu „immunoblot” z przeciwciałami anty-Lhcb1-6 i PsbC. „Immunobloty” skanowano, a intensywność indywidualnych sygnałów apobiałek Lhcb1-6 i PsbC w tylakoidach mutantów określano względem sygnałów zidentyfikowanych dla tylakoidów roślin WT (100%) z wykorzystaniem oprogramowania Gelix One (Biostep, Jahnsdorf, Niemcy). Średnie intensywności sygnałów \pm SD pokazano pod odpowiednimi ścieżkami; określono je w oparciu o wyniki analizy sześciu „immunoblotów” reprezentujących dwa doświadczenia biologiczne. Dla każdego indywidualnego „immunoblotu” określano zakres liniowości odpowiedzi immunologicznej. Pod uwagę brane były tylko „immunobloty” charakteryzujące się liniową zależnością pomiędzy ilością nakładanego preparatu tylakoidów a odpowiedzią immunologiczną. Gwiazdki oznaczają istotność statystyczną różnic pomiędzy mutantami *deg5* a roślinami WT ($P < 0,01$).



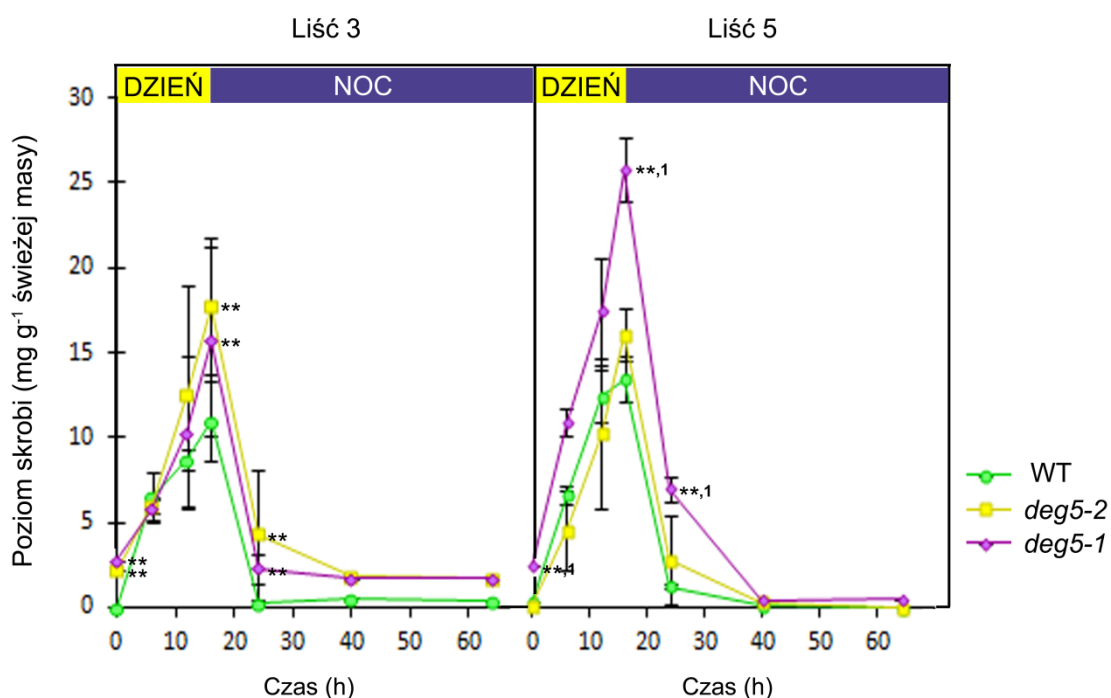
Rys. 27 Identyfikacja apobiałek Lhcb1, 2, 3 i 4 oraz określenie liczby trimerów LHCII przypadających na monomeryczny rdzeń PSII w błonach zespolonych tylakoidów gran roślin WT i mutantów *deg5* znajdujących się w podfazie 6.0 ontogenezy.

(a) Identyfikacja apobiałek Lhcb1, 2, 3 i 4. Próbkę błon zespolonych tylakoidów gran rozdzielano elektroforetycznie i poddawano procedurze typu „immunoblot” z przeciwciałami anty-Lhcb1, 2, 3 i 4.

(b) Określenie liczby trimerów LHCII przypadających na monomeryczny rdzeń PSII. Próbkę błon zespolonych tylakoidów gran rozdzielano elektroforetycznie, normalizując ich ilość w oparciu o jednakową ilość chl, żełe wybarwiano za pomocą Coomassie Brilliant Blue G-250 i poddawano analizie obrazu. Liczbę trimerów LHCII przypadających na monomeryczny rdzeń PSII obliczano jako $[(Lhcb1 + Lhcb2 + Lhcb3) / Lhcb4] / 3$. W obliczeniach uwzględniano fakt, że Lhcb4 wiąże Coomassie Brilliant Blue G-250 1.1 razy silniej niż Lhcb1/2/3 (Hogewoning i wsp., 2012).

Tempo dziennej akumulacji skrobi oraz poziom akumulacji skrobi obserwowany pod koniec dnia (16 h) w dojrzałych liściach mutantu *deg5-1* i młodocianych liściach mutantów *deg5-1* i *deg5-2* były istotnie wyższe niż w liściach roślin WT (Rys. 27). Tempo obniżania się puli skrobi w ciągu nocy było natomiast podobne w liściach młodocianych i podobne w liściach dojrzałych wszystkich badanych genotypów i dlatego pod koniec nocy (24 h) w chloroplastach mutantów pozostawało istotnie więcej nierozłożonej skrobi (w zgodzie z wynikami analiz elektronmikroskopowych), mimo iż mutanty były zdolne do całkowitej hydrolizy skrobi w warunkach przedłużonej nocy (40 i 64 h, Rys. 27). Co interesujące, w przypadku liści młodocianych nie stwierdzono różnic

międzymutantowych, natomiast takie różnice obserwowano w odniesieniu do liści dojrzałych. Można zatem wnioskować, że fenotyp mutantów *deg5* charakteryzujący się gromadzeniem nadmiaru skrobi pod koniec nocy jest odzwierciedleniem zdolności mutantów do aktywniejszej syntezy skrobi w ciągu dnia, a nie obniżenia zdolności do hydrolizy skrobi w ciągu nocy.



Rys. 28 Dobowe zmiany poziomu skrobi w 3 i 5 liściu roślin WT i mutantów *deg5*, które osiągnęły podfazę 6.0 ontogenezy.

Pomiary prowadzono w wybranych punktach czasowych doby oraz przedłużonej nocy. Brak odchyłeń standardowych w niektórych punktach wykresów oznacza, że były one mniejsze niż graficzny symbol (kwadrat) wartości dla danego wariantu. Gwiazdki oznaczają istotność statystyczną różnic pomiędzy mutantami *deg5* a roślinami WT ($P < 0,01$). Wartości są średnimi \pm SD uzyskanymi po przeanalizowaniu stu osiemdziesięciu roślin każdego genotypu, reprezentujących trzy doświadczenia biologiczne.

Mimo aktywniejszej dziennej syntezy skrobi mutanty nie różniły się świeżą masą jednostki powierzchni liści 3 i 5 od roślin WT (Tab. 2), co potwierdza słuszność tezy o jednakowej efektywności nocnej hydrolizy skrobi.

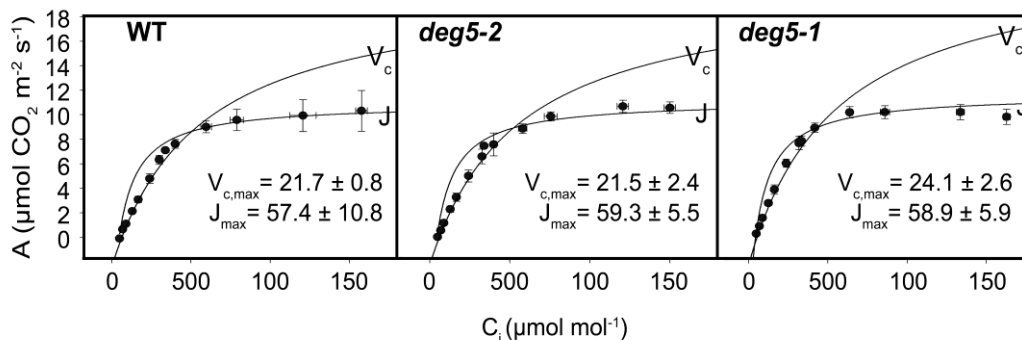
genotyp	MASA LIŚCI ($\mu\text{g}/\text{mm}^2$)	
	liść 3	liść 5
WT	145 \pm 19	150 \pm 15
<i>deg5-2</i>	152 \pm 20	151 \pm 18
<i>deg5-1</i>	148 \pm 19	156 \pm 21

Tab. 2 Świeża masa jednostki powierzchni liści 3 i 5 roślin WT i mutantów *deg5*, które osiągnęły podfazę 6.0 ontogenezy.

Wartości są średnimi \pm SD uzyskanymi po przeanalizowaniu liści sześćdziesięciu roślin każdego genotypu, reprezentujących dwa doświadczenia biologiczne.

4. 2. 2. 3 Porównawcza analiza cech funkcjonalnych liści roślin WT i mutantów *deg5*, które osiągnęły podfazę 6.0

Aby lepiej zrozumieć powody, dla których mutanty *deg5* syntetyzują nadmierne ilości skrobi podczas dnia, sporządzono krzywe odpowiedzi A/C_i przy wysycającym natężeniu światła dla dojrzałych liści obu mutantów i roślin WT (ze względu na małą powierzchnię nie było możliwe przeprowadzenie wiarygodnych pomiarów fotosyntetycznej wymiany gazowej dla liści młodocianych). Dane 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}). Dojrzałe liście roślin WT i mutanty *deg5* charakteryzowały się bardzo podobnym przebiegiem krzywej A/C_i oraz wartościami $V_{c,max}$ i J_{max} , które nie różniły się istotnie pomiędzy trzema genotypami (Rys. 29).



Rys. 29 Uśrednione krzywe A/C_i dla 5 liścia roślin WT i mutantów *deg5*, które osiągnęły podfazę 6.0 ontogenezy wraz z dopasowaniem średniej do modelu Farquhara i wsp. (1980).

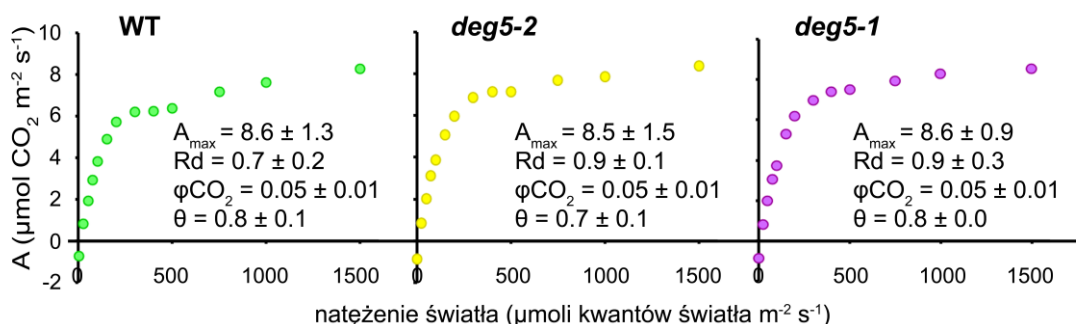
Czarne punkty reprezentują wyniki rzeczywistych pomiarów intensywności asymilacji CO_2 (A), podczas gdy ciągłe krzywe otrzymano poprzez dopasowania fotosyntetycznego modelu równań Farquhara i wsp. (1980) do danych eksperymentalnych. Pomiary dla $C_i < 400 \mu\text{mol mol}^{-1}$ używano do sporządzenia krzywej przedstawiającej intensywność fotosyntezy limitowanej przez ilość, kinetykę i aktywność Rubisco, podczas gdy pomiary dla $C_i > 400 \mu\text{mol mol}^{-1}$ wykorzystywano do sporządzenia krzywej przedstawiającej intensywność fotosyntezy limitowanej przez intensywność transportu elektronów wykorzystanego do regeneracji RuBP. Każdy panel zawiera liczby przedstawiające maksymalne tempo karboksylacji limitowanej przez ilość, kinetykę i aktywność Rubisco ($V_{c,\text{max}}$) i maksymalne tempo karboksylacji limitowanej przez transport elektronów wykorzystywany do regeneracji RuBP (J_{max}). Wartości są średnimi \pm SD uzyskanymi po przeanalizowaniu piętnastu oznaczeń dla każdego genotypu, reprezentujących dwa doświadczenia biologiczne.

Sprawdzono także, czy mutanty *deg5* i rośliny WT różnią się wartościami parametrów charakteryzujących intensywność fotosyntezy, jakie można wyliczyć poprzez sporządzenie krzywych świetlnych fotosyntezy. Krzywe świetlne udało się sporządzić jedynie dla liści dojrzałych (liść 5) trzech porównywanych genotypów, z takich samych względów, jakie zdecydowały o wykonaniu krzywych odpowiedzi A/C_i tylko dla liści dojrzałych. Uzyskane wyniki przedstawiono na rysunku 30. Dane pozyskane z krzywej świetlnej pozwoliły na obliczenie maksymalnej intensywności fotosyntetycznej (A_{max}), kwantowej wydajności fotosyntetycznego wiązania CO_2 (ϕCO_2) i wypukłości krzywej świetlnej (θ).

Maksymalną intensywność fotosyntetyczną (A_{max}) odczytywano bezpośrednio z wykresu krzywej eksperymentalnej. Odzwierciedla ona sprawność wszystkich elementów aparatu fotosyntetycznego, związanych zarówno z przebiegiem fazy jasnej jak i fazy ciemnej fotosyntezy jednak pozostaje szczególnie silnie skorelowana z poziomem Rubisco w liściu (Björkman, 1981).

Kwantowa wydajność fotosyntetycznego wiązania CO₂ (ϕCO_2) to liczba cząsteczek CO₂, do powstania których doszło w wyniku zaabsorbowania 1 kwantu energii promienistej światła; teoretycznie liczba ta powinna przyjmować maksymalną wartość 0.125, co jest konsekwencją faktu, że 8 kwantów fotonów jest niezbędnych dla wprowadzenia dwóch elektronów na szlak liniowego transportu elektronów, niezbędnych dla asymilacji 1 cząsteczki CO₂, pod nieobecność fotorespiracji i cyklicznego transportu elektronów. Różne czynniki mogą powodować, iż rzeczywiste wartości ϕCO_2 są niższe (niekiedy znacząco) od 0.125 (Singsaas i wsp., 2001). ϕCO_2 obliczano jako współczynnik regresji liniowej z liniowego odcinka krzywej eksperymentalnej.

Wypukłość krzywej świetlnej (θ) otrzymywano przez estymację, jako wynik dopasowania krzywej świetlnej. Im bardziej „kanciasta” jest krzywa (chodzi o przegięcie między prostoliniowym odcinkiem krzywej i odcinkiem krzywoliniowym), tym wartość (θ) bliższa 1. 1 jest bowiem najwyższą możliwą wartością θ i odpowiada sytuacji polegającej na tym, że krzywa świetlna przechodzi z odcinka prostoliniowego (którego przebieg określa wartość ϕCO_2) bezpośrednio w plateau, którego poziom jest określany przez wartość A_{max} (Ögren, 1993).



Rys. 30 Krzywe świetlne fotosyntezy dla 5 liścia roślin WT i mutantów *deg5*, które osiągnęły podfazę 6.0 ontogenezy.

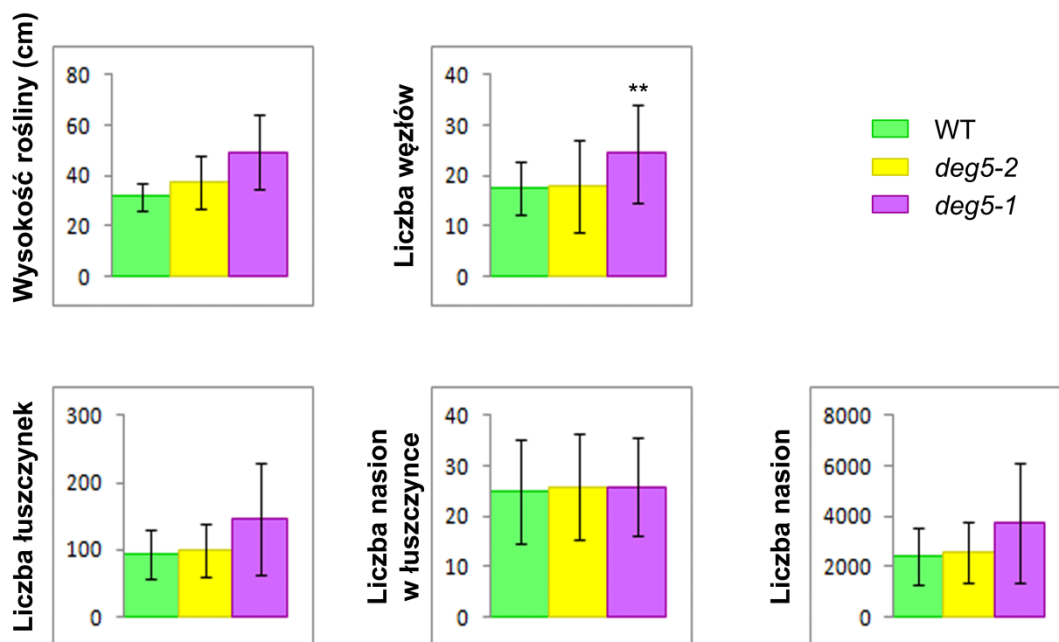
Punkty reprezentujące wyniki pomiarów intensywności fotosyntezy układają się w krzywą eksperymentalną, z której bezpośrednio odczytywano maksymalną intensywność fotosyntezy (A_{max}) i intensywność oddychania ciemnościowego (R_d). Kwantową wydajność fotosyntetycznego wiązania CO₂ obliczano jako współczynnik regresji liniowej liniowego odcinka krzywej eksperymentalnej. Do wartości przedstawionych w postaci punktów na wykresach dopasowywano funkcję hiperboliczną w oparciu o nieliniowe maksymalne prawdopodobieństwo i na jej podstawie estymowano wypukłość krzywej świetlnej (θ). Wartości są średnimi \pm SD uzyskanymi po przeanalizowaniu piętnastu oznaczeń dla każdego genotypu, reprezentujących dwa doświadczenia biologiczne.

Porównawcza analiza krzywych świetlnych wskazuje, że krzywe te są bardzo podobne dla roślin reprezentujących wszystkie trzy badane genotypy, a wartości A_{\max} , ϕCO_2 i θ są jednakowe we wszystkich trzech przypadkach.

Z krzywych eksperymentalnych odczytywano także wartość R_d (intensywność oddychania ciemnościowego liści) - wartości tego parametru dla wszystkich trzech genotypów także nie różniły się w sposób istotny.

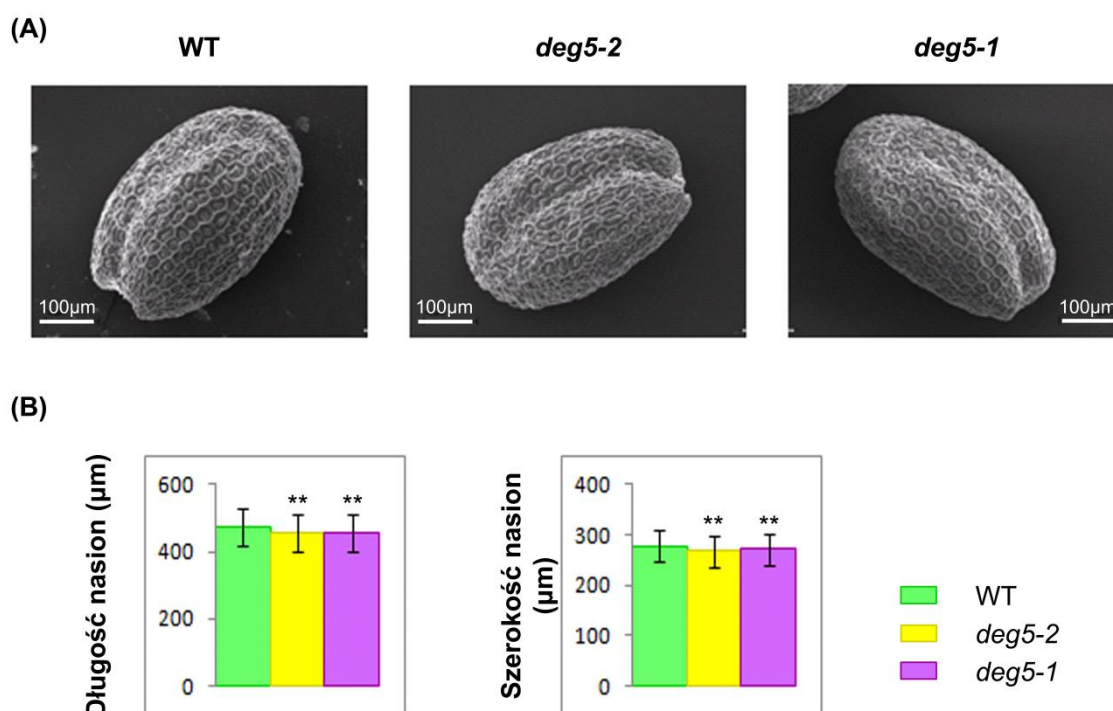
4. 2. 2. 4 Porównawcza analiza cech morfologicznych organów generatywnych roślin WT i mutantów *deg5*, które osiągnęły podfazę 8.9

W celu sprawdzenia, czy *AtDeg5* jest niezbędna dla prawidłowego przebiegu cyklu reprodukcyjnego przeprowadzono szereg pomiarów na roślinach WT i mutantach *deg5*, które osiągnęły podfazę 8.9 ontogenezy, to jest w momencie, kiedy wszystkie łuszczyнки były już pęknięte. Określano następujące cechy morfologiczne roślin trzech badanych genotypów: wysokość rośliny (z uwzględnieniem pędu kwiatostanowego), liczba łuszczynek przypadających na roślinę, liczba nasion przypadających na łuszczynekę, liczba nasion przypadających na roślinę, liczba węzłów na pędzie kwiatostanowym i jego rozgałęzieniach oraz długość i szerokość nasion. Wśród sześciu badanych cech jedynie w odniesieniu do liczby węzłów na pędzie kwiatostanowym i jego rozgałęzieniach oraz długości i szerokości nasion stwierdzono różnice między roślinami WT i mutantami *deg5* (Rys. 31 i 32), a mianowicie mutant *deg5-1* posiada więcej węzłów na pędzie kwiatostanowym i jego rozgałęzieniach niż rośliny WT (stwierdzono brak różnic międzymutantowych), natomiast nasiona obu mutantów *deg5* są krótsze i węższe niż u WT (nie stwierdzono różnic międzymutantowych).



Rys. 31 Analiza morfologii organów generatywnych roślin WT i mutantów *deg5*, które osiągnęły podfazę 8.9 ontogenezy.

Wartości są średnimi \pm SD uzyskanymi po przeanalizowaniu sześćdziesięciu roślin każdego genotypu, reprezentujących dwa doświadczenia biologiczne. Gwiazdki oznaczają istotność statystyczną różnic pomiędzy mutantami *deg5* a roślinami WT ($P < 0,01$).



Rys. 32 Analiza budowy nasion roślin WT i mutantów *deg5*.

Nasiona obserwowano z wykorzystaniem skaningowego mikroskopu elektronowego (A), następnie fotografowano, a negatywy analizowano przy użyciu programu do cyfrowej obróbki obrazów (B). Wartości są średnimi \pm SD uzyskanymi po przeanalizowaniu trzystu nasion roślin każdego genotypu, reprezentujących dwa doświadczenia biologiczne. Gwiazdki oznaczają istotność statystyczną różnic pomiędzy mutantami *deg5* a roślinami WT ($P < 0,01$).

4.3 Interpretacja różnic między roślinami WT a mutantami *deg5* oraz różnic międzymutantowych w kategoriach wpływu dawki AtDeg5 i kompensacyjnego gromadzenia AtDeg8 na efekt fenotypowy

Aby ułatwić interpretację różnic, jakie obserwowano pomiędzy roślinami WT i mutantami *deg5* oraz różnic międzymutantowych - w sposób uwzględniający znaczenie dawki AtDeg5 i kompensacyjnej akumulacji AtDeg8 dla efektu fenotypowego, 37 cech fenotypowych, które uznane zostały za zależne od AtDeg5 (ponieważ wartości tych cech różnią się istotnie przynajmniej pomiędzy roślinami WT i mutantami *deg5-1* - typu *null*) podzielono na 3 grupy zgodnie z podobieństwem wzorca zmian (Tab. 3). Pozostałe cechy, czyli te, co do których nie stwierdzono różnic między roślinami WT i mutantami *deg5*,

potraktowano, jako kształtujące się w sposób niezależny od AtDeg5, bądź jako zależne od AtDeg5, ale całkowicie kompensowalne przez nadmiar AtDeg8.

Dla zdecydowanej większości cech zależnych od AtDeg5 (29 spośród 37) stwierdzono brak różnic WT/*deg5-2* i jednocześnie obecność znaczących różnic WT/*deg5-1*; są to zarazem cechy, których wartości nie wykazują (grupa 1; 20 cech) lub wykazują różnice międzymutantowe (grupa 2; 9 cech). Można wnioskować, że AtDeg8 jest w stanie funkcjonalnie zastępować AtDeg5 pod względem ekspresji tych cech, tzn. nadmiarowa akumulacja AtDeg8 może kompensować deficyt 23% puli AtDeg5, lecz nie całkowity brak tego białka. W konsekwencji dawka AtDeg5 decyduje czy różnice międzymutantowe są identyfikowalne (grupa 2), czy nie (grupa 1). Jednakże nie można także wykluczać innej możliwości, a mianowicie takiej, że AtDeg8 nie jest w stanie kompensować 23% utraty puli AtDeg5, ale AtDeg5 posiada wystarczający nadmiar liczby centrów katalitycznych w heterokompleksie enzymatycznym AtDeg5/AtDeg8, aby zapewnić jego normalne funkcjonowanie, nawet jeśli pula AtDeg5 jest zredukowana do 23% w stosunku do poziomu tego białka u roślin WT - w zależności od tego, czy centra katalityczne AtDeg5 występują w istotnym czy tylko nieznacznym nadmiarze w stosunku do potrzeb funkcjonalnych, cechy fenotypowe których dotyczy to rozważanie można podzielić na grupy 1 lub 2, odpowiednio.

Mniej cech fenotypowych (8/37) przyporządkowano do grupy 3, obejmującej te, dla których stwierdzono istotne różnice pomiędzy roślinami WT a *deg5-2* oraz między WT a *deg5-1*, przy braku różnic międzymutantowych. Taki wzorzec różnic można uważać za spowodowany faktem, iż w odniesieniu do tej grupy cech brak nadmiarowej liczby centrów katalitycznych AtDeg5, brak efektu dawki AtDeg5, a deficyt lub brak AtDeg5 nie może być kompensowany przez nadmiar AtDeg8.

GRUPA CECH	CECHA	ISTOTNOŚĆ RÓŻNIC WT/ <i>deg5-2</i> , WT/ <i>deg5-1</i> i <i>deg5-1/deg5-2</i>			INTERPRETACJA
		WT	<i>deg5-2</i>	<i>deg5-1</i>	
1	Podfaza 1.2 Podfaza 1.5 Podfaza 3.54 Podfaza 3.91 Podfaza 3.93 Podfaza 3.94 Podfaza 3.95 Podfaza 6.5 Podfaza 8.5 Powierzchnia liścia 3 Powierzchnia liścia 5 Obwód liścia 3 Obwód liścia 5 Długość liścia 3 Długość liścia 5 Szerokość liścia 3 Szerokość liścia 5 Pole przekroju poprzecznego chloroplastu liścia 3 Pole przekroju poprzecznego chloroplastu liścia 5 Liczba węzłów	100	100	**	Chloroplast dysponuje znaczącym nadmiarem centrów katalitycznych AtDeg5 w stosunku do potrzeb, a efekt dawki AtDeg5 nie odgrywa istotnej roli lub nadmiar AtDeg8 efektywnie kompensuje deficyt 23% puli AtDeg5
2	Podfaza 3.16 Podfaza 3.58 Podfaza 3.59 Podfaza 3.96 Podfaza 3.97 Frekwencja chloroplastów z ziarnami skrobiowymi w liściu 5 Poziom skrobi w 0h w liściu 5 Poziom skrobi w 16h w liściu 5 Poziom skrobi w 24h w liściu 5	100	100	** , 1	Chloroplast dysponuje niewielkim nadmiarem centrów katalitycznych AtDeg5 w stosunku do potrzeb, a istotną rolę odgrywa efekt dawki AtDeg5 lub nadmiar AtDeg8 efektywnie kompensuje deficyt 23% puli AtDeg5
3	Frekwencja chloroplastów z ziarnami skrobiowymi w liściu 3 Liczba tylakoidów przypadających na granum w liściu 5 Poziom skrobi w 0h w liściu 3 Poziom skrobi w 16h w liściu 3 Poziom skrobi w 24 w liściu 3 Poziom białka Lhcb6 Długość nasion Szerokość nasion	100	**	**	Chloroplast nie dysponuje nadmiarem centrów katalitycznych AtDeg5 w stosunku do potrzeb, a efekt dawki AtDeg5 nie odgrywa istotnej roli, nadmiar AtDeg8 nie kompensuje deficytu 23% puli AtDeg5

Tab. 3 Cechy fenotypowe, których wartości liczbowe są zmienione u mutantów *deg5* w stosunku do roślin WT.

Tabela zawiera takie cechy, których wartości różnią się w sposób istotny od wartości zidentyfikowanych u roślin WT (traktowanych jako 100) przynajmniej u mutantu *deg5-1*. Cechy, odnośnie, których nie zaobserwowano istotnych różnic *deg5-2*/WT oznaczono także jako 100. Gwiazdki wskazują cechy, dla których różnice mutant/roślina WT były istotne statystycznie ($P < 0.01$), natomiast liczba 1 wskazuje dane, dla których stwierdzono istnienie istotnych różnic *deg5-1/deg5-2*.

5 Dyskusja

W pierwszej serii eksperymentów, których wyniki składają się na niniejszą pracę potwierdzono, że mutant opisywany wcześniej jako *deg5* (a teraz określony jako *deg5-1*) jest całkowicie pozbawiony białka AtDeg5 (Sun i wsp., 2007a, Luciński 2011b, Gibasiewicz 2015) oraz ustalono, że obecność insercji T-DNA w czwartym intronie, 872 pz poniżej kodonu startu transkrypcji (ATG) genu At4g18379 (mutant *deg5-2*) skutkuje obniżeniem poziomu białka AtDeg5 do 77% wartości stwierdzonej w przypadku roślin WT (Rys. 9 i 10). U wielu mutantów insercyjnych, u których T-DNA został wprowadzony do intronu jest możliwa akumulacja transkryptów identycznych z tymi, jakie są produkowane przez rośliny WT, ponieważ intron może zostać wycięty wraz z T-DNA w toku składania transkryptów. Taką sytuację opisano np. w odniesieniu do mutantów insercyjnych *AGL104* (Verelst i wsp., 2007), *ASP2* (Miesak i Coruzzi, 2002), *AtEXP7* (Cho i Cosgrove, 2002), *AtGA2ox6* (Wang i wsp., 2004), *AtMIS12* (Sato i wsp., 2005), *ETA2* (Chuang i wsp., 2004), *FATB* (Bonaventure i wsp., 2003), *MRH1* (Jones i wsp., 2006), *SPDS2* (Imai i wsp., 2004) i *ULT2* (Carles i wsp., 2005); w części tych przypadków poziom odpowiednich transkryptów był niższy niż u roślin WT (Sato i wsp., 2005). Jednak szeroki przegląd danych zgromadzonych w literaturze światowej wskazuje, że większości przypadków introny zawierające T-DNA nie są wycinane, co najczęściej prowadzi do całkowitego zahamowania produkcji prawidłowych transkryptów i braku akumulacji białkowego produktu, rzadziej zaś (w 13% przypadków) do obniżenia poziomu akumulacji produktu białkowego (Wang, 2008). Do tej ostatniej grupy przypadków (tzn. do 13% ujętych w publikacji Wang, 2008) należy mutant *deg5-2*; niniejsza prac doktorska przedstawia wyniki pierwszych badań nad roślinami będącymi nosicielami tego genotypu. Dysponowanie dwoma mutantami, u których gen kodujący proteazę AtDeg5 został wyciszony z różnym skutkiem (*deg5-2* i *deg5-1*) pozwoliło na analizę wpływu dawki białkowego produktu tego genu na ekspresję szerokiego spektrum cech fenotypowych *A. thaliana*.

Ani obniżenie poziomu akumulacji białka AtDeg5 do 0%, ani do 77% wartości zidentyfikowanej dla roślin WT nie prowadzi do zmiany poziomu akumulacji dwóch innych chloroplastowych proteaz z grupy AtDeg - AtDeg1 i AtDeg2, natomiast poziom AtDeg8 wzrósł niemal dwukrotnie u obydwu mutantów *deg5* (Rys. 10). Uważa się, że AtDeg5 wraz

AtDeg8 tworzą funkcjonalny heterokompleks, w strukturze którego proteazy te są powiązane stosunkiem stechiometrycznym 1 : 1 (Sun i wsp., 2007a), dlatego można przypuszczać, że hiperakumulacja AtDeg8 stanowi nierozpoznaną co do mechanizmów molekularnych kompensacyjną odpowiedź mutantów na obniżenie poziomu akumulacji lub całkowity brak białka AtDeg5. Taka interpretacja hiperakumulacji AtDeg8 może oznaczać, że AtDeg5 i AtDeg8 są funkcjonalnie wymienne, nadmiarowe cząsteczki AtDeg8 mogłyby bowiem być włączane w strukturę heterokompleksu AtDeg5/AtDeg8 - z wytworzeniem heterokompleksów z przewagą ilościową AtDeg8 lub homokompleksów AtDeg8 - i przejmować funkcje nieobecnych cząsteczek AtDeg5. Nie byłoby w tym nic zaskakującego, zważywszy, że opisano już wcześniej przypadki strukturalnego i funkcjonalnego zastępowania się przez podjednostki innych chloroplastowych heterokompleksów proteolitycznych, a mianowicie przez pary proteaz AtFtsH1/5 i AtFtsH2/8, wchodzące w skład heterokompleksu AtFtsH (Yu i wsp., 2004, 2005) oraz podjednostki ClpR1 i ClpR3 systemu Clp (Stanne i wsp., 2009).

Wyniki zawarte w niniejszej pracy wskazują, że rzeczywiście AtDeg8 może, przynajmniej częściowo, zastępować AtDeg5 w jej katalitycznych funkcjach, ponieważ w przypadku zdecydowanej większości (29/37) cech fenotypowych podlegających regulacji z udziałem AtDeg5 obserwowano znaczące różnice WT/*deg5-1*, a zarazem brak różnic WT/*deg5-2* (wartości niektórych spośród tych 29 cech wykazują istotne różnice międzymutantowe, inne zaś takich różnic nie wykazują, co decyduje o przynależności do, odpowiednio, grupy cech 1 i 2, Tab. 3). Takie obserwacje oznaczają bowiem, że w odniesieniu do ekspresji owych 29 cech AtDeg8 może zastępować AtDeg5; inaczej mówiąc nadmiarowa pula AtDeg8 może funkcjonalnie kompensować deficyt 23% puli AtDeg5 (lecz nie całkowity brak tego białka). Alternatywną możliwością wyjaśnienia tych obserwacji jest przyjęcie, że AtDeg8 nie zastępuje AtDeg5 w jej funkcjach katalitycznych, ale pula AtDeg5, jaką dysponują chloroplasty roślin WT obejmuje nadmiar centrów katalitycznych, znaczny lub niewielki w zależności od przynależności do, odpowiednio, grupy 1 lub 2. Nadmiar ten jest wystarczający do zapewnienia normalnej ekspresji cech regulowanych przez heterokompleks AtDeg5/AtDeg8, nawet jeśli pula cząsteczek AtDeg5 wchodzących w skład cząstek heterokompleksu zostaje zmniejszona o 23% w stosunku do roślin WT. Ta możliwość wydaje się jednak mniej prawdopodobna w zestawieniu z koncepcją zastępowania funkcjonalnego AtDeg5 przez AtDeg8, bo stawia pod znakiem zapytania

sensowność uruchamiania u mutantów mechanizmów prowadzących do hiperakumulacji AtDeg8, a hiperakumulacja AtDeg8 jest przecież dobrze udokumentowana wynikami zawartymi na rysunku 10. Tak czy inaczej zaprezentowane w niniejszej pracy wyniki z pewnością nie wykluczają możliwości zastępowania strukturalnego i katalitycznego AtDeg5 przez AtDeg8, przynajmniej w odniesieniu do 29 cech fenotypowych składających się na grupę 1 i 2 (Tab. 3). Należy ponadto podkreślić, że - niezależnie od tego czy zidentyfikowanie 29 cech fenotypowych, co do wartości których obserwowano znaczące różnice WT/*deg5-1*, a zarazem brak różnic WT/*deg5-2* - powinny być interpretowane w kategoriach istnienia u roślin WT nadmiaru centrów katalitycznych AtDeg5, czy też w kategoriach zastępowania funkcjonalnego AtDeg5 przez AtDeg8 - uzyskane wyniki jednoznacznie dowodzą istnienia efektu dawki AtDeg5 na ekspresję szeregu cech fenotypowych *A. thaliana*. Efekt ten jest widoczny w przypadku cech należących do grupy 2, których wartości zmierzone dla roślin posiadających 0% dawki AtDeg5 (*deg5-1*) różnią się w sposób istotny od wartości zmierzonych dla roślin posiadających 77% dawki tej proteazy (*deg5-2*).

W kolejnej serii eksperymentów analizowano porównawczo chronologię przebiegu kilku wybranych faz ontogenezy (0, 1, 3, 5, 6, 8 i 9) i ich podfaz u roślin WT oraz mutantów *deg5*. Wyniki pomiarów wykonanych dla roślin WT pozostają w większości (choć nie we wszystkich przypadkach) w dość dobrej zgodności z danymi literaturowymi odnoszącymi się do tego roślin samego ekotypu *A. thaliana* (*Columbia*), hodowanych w bardzo podobnych warunkach oświetleniowo/temperaturowo/wilgotnościowych (Boyes i wsp., 2001). Szczególnie znaczące podobieństwo między naszymi wynikami i danymi literaturowymi dotyczy momentu osiągnięcia przez rośliny WT podfazy fazy 1 (różnice między wynikami naszych pomiarów i wynikami pomiarów zespołu Boyes i wsp. stanowią 1.8 – 18% naszych wartości) oraz podfazy 6.0 (1.4%). Z kolei dane Boyesa i wsp. (2001) i nasze bardzo znacząco różnią się w odniesieniu do momentu osiągnięcia podfazy 6.9 (jest ona osiągnięta w naszych warunkach 22 dni później), jednak dowiedziono, że międzylaboratoryjna powtarzalność wyników pomiarów dotyczących różnych cech fenotypowych określonych ekotypów *A. thaliana* hodowanych w identycznych warunkach może być bardzo niska (Massonnet i wsp., 2010).

Wyniki analiz przedstawione w niniejszej pracy wskazują, że proteaza AtDeg5 zaangażowana jest w przebieg rozwoju i wzrostu liści, a także kwitnienia i dojrzewania

owoców (= fazy 1, 3, 6 i 8, odpowiednio), na co wskazuje szereg przykładów znacznych opóźnień w chronologicznej progresji poszczególnych podfaz wymienionych czterech faz do jakich dochodzi u mutantu *deg5-1* w porównaniu do roślin WT (Rys. 12 - 18, Tab. 3). Mutant *deg5-2* natomiast nie wykazywał istotnych różnic w porównaniu z roślinami WT w odniesieniu do momentu osiągnięcia żadnej z analizowanych podfaz. Zaobserwowano jednak istnienie istotnych różnic międzymutantowych w odniesieniu do pięciu cech związanych z chronologią przebiegu ontogenezy, co dowodzi znaczenia, jakie odgrywa dawka białka AtDeg5 w ekspresji tych cech (Tab. 3).

Dowodzono, że rozwój (produkcja) liści *A. thaliana* i ich wzrost są kontrolowane przez czynniki genetyczne (Tisné i wsp., 2009; Massonnet i wsp., 2010) związane z rozwojem komórek epidermalnych i ich podziałami komórkowymi, a kluczową rolę odgrywa interakcja pomiędzy QTL na markerze *ERECTA* a dwoma innymi QTL na markerach SNP295 (zlokalizowanym w 4 chromosomie) i SNP21 (zlokalizowanym w 5 chromosomie). Ze względu na dość niejasne i skomplikowane powiązania funkcjonalne między tymi czynnikami niełatwo określić regulacyjną rolę AtDeg5 wśród tej sieci zależności.

Możliwe, że opóźnienia dotyczące przebiegu wzrostu liści (faza 3) zidentyfikowane u mutantu *deg5-1* w zestawieniu z roślinami WT (Rys. 14) wiążą się w sposób przyczynowo-skutkowy ze zmianami w przebiegu kwitnienia (produkcji kwiatów, faza 6) wywołanymi brakiem AtDeg5 (Rys. 16), zważywszy, że pole powierzchni komórek epidermy jest kontrolowane przez działający na poziomie całego organizmu mechanizm powiązany z przejściem przez roślinę z fazy wegetatywnej do generatywnej (Ashby, 1948; Cookson i wsp., 2007). Kluczową rolę w przejściu do fazy generatywnej odgrywają dwa wysoce konserwatywne miRNA - miR156 i miR172 (Huijser i Schmid, 2011). Docelowymi transkryptami dla miR156 (długość – 20 zasad) są mRNA genów kodujących czynniki transkrypcyjne należące do rodziny SPL (*SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE*), (Klein i wsp., 1996), a mianowicie *SPL3* (Gandikota i wsp., 2007, Wang i wsp., 2009, Wu i wsp., 2009), *SPL4* (Gandikota i wsp., 2007, Wu i wsp., 2009), *SPL5* (Gandikota i wsp., 2007, Wu i wsp., 2009) oraz *SPL9* (Wang i wsp., 2009, Wu i wsp., 2009).

Docelowymi transkryptami miR172 (długość - 21 zasad) są natomiast mRNA genów kodujących czynniki transkrypcyjne należące do rodziny AP2 (*APETALA 2*), które zaangażowane są w regulację zarówno przejścia do fazy generatywnej, jak i rozwoju kwiatów (Aukerman i Sakai, 2003, Jung i wsp., 2007, Mathieu i wsp., 2009, Schmid i wsp.,

2003) oraz genów kontrolujących syntezę małej grupy czynników AP2-podobnych, wykazujących funkcje represora zakwitania, takich jak *SMZ*, *SNZ* (Jung i wsp., 2007, Mathieu i wsp., 2009, Schmid i wsp., 2003, Yant i wsp., 2010), *TOE1*, *TOE2* (Aukerman i Sakai, 2003, Jung i wsp., 2007, Mathieu i wsp., 2009, Wu i wsp., 2009, Yant i wsp., 2010), *TOE3* (Jung i wsp., 2007)).

Wykazano, że powierzchnia, jaką liście osiągają po zakończeniu wzrostu zależy w bardzo istotny sposób od pola powierzchni komórek epidermy oraz ich liczby (Tisné i wsp., 2008, Cookson i wsp., 2007), co oznacza, że proteaza AtDeg5 musi być zaangażowana w stojące za tą zależnością wydarzenia regulacyjne, ponieważ w przypadku liści mutantów *deg5-1*, które zakończyły wzrost, zarówno młodych jak i dojrzałych, obserwowano istotne statystycznie zmiany (zwiększenie) długości i szerokości oraz będące tego konsekwencją zmiany (zwiększenie) obwodu i pola powierzchni (Rys. 23). Już wcześniej nasz zespół badawczy wykazał, że średnia powierzchnia liści dojrzałych 7 i 8 (mieszana populacja) mutantu *deg5-1* była większa od średniej powierzchni odpowiedniej populacji liści roślin WT (Luciński i wsp., 2011b). Z kolei liście młode (liść 3 i 4) mutantów całkowicie pozbawionych białka AtDeg2 były znacznie mniejsze niż odpowiadające im liście roślin WT (Luciński i wsp., 2011a). Obserwacje te wyraźnie wskazują, że nie tylko AtDeg5, ale także AtDeg2 uczestniczy – choć z zupełnie odmiennym skutkiem - w regulacji końcowej powierzchni liści rozetkowych, zapewne poprzez regulację powierzchni i liczby komórek epidermy.

Dojrzewanie (pęknięcie) łuszczynek *A. thaliana* pozostaje pod kontrolą genów kodujących trzy czynniki transkrypcyjne z rodziny bHLH – *SHAETTERPROOF (SHP1/2)*, *INDEHISCENT (IND)* oraz *ALCATRAZ (ALC)* (Liljegren i wsp., 2000, 2004; Rajani i Sundaresan, 2001). Dowiedziono, przynajmniej w odniesieniu do IND i ALC, że czynniki te w istotny sposób wpływają na przebieg szlaku GA/DELLA w sposób prowadzący do destabilizacji represora DELLA z udziałem kwasu giberelinowego jako czynnika sprawczego (szlak GA-GID-DELLA – Davière i Achard, 2013). Umożliwia to uwolnienie czynników transkrypcyjnych PIF3 i PIF4 spod represyjnego działania DELLA (de Lucas i wsp., 2008) i uruchomienie kontrolowanych przez PIF3 i PIF4 wydarzeń prowadzących do wyróżnicowania się w łuszczyńce grupy komórek uczestniczących w wymuszeniu pęknięcia łuszczyńki (Arnaud i wsp., 2010). AtDeg5 musi w jakiś sposób wchodzić w „cross-talk” z tego rodzaju szlakiem sygnalizacyjnym (AtDeg5 jest dość intensywnie ekspresjonowana w niedojrzałych

tuszczynkach *A. thaliana* - eFP Browser <http://www.bar.utoronto.ca/>, Schmid i wsp., 2005, Winter i wsp., 2007), całkowite zablokowanie akumulacji AtDeg5 (mutant *deg5-1*) skutkuje bowiem przejściowym opóźnieniem chronologii przejścia przez roślinę fazy 8 (opóźnienie momentu osiągnięcia podfazy 8.5), co pokazano na rysunku 17.

W kolejnej serii analiz poszukiwano cech ultrastruktury chloroplastów, które mogą być zmienione na skutek wyciszenia genu kodującego proteazę AtDeg5. Badania te, podobnie jak analizy morfologii liści, prowadzono na chloroplastach liści roślin, które osiągnęły podfazę 6.0, osobno dla reprezentanta populacji liści młodocianych (liść 3) i liści dojrzałych (liść 5) (Rys. 20). Uzasadnieniem dla poddania osobnym analizom liści młodocianych i dojrzałych jest istnienie danych wskazujących, że wyciszenie należącej do systemu Clp chloroplastowej proteazy ClpP6 prowadzi do zupełnie innych skutków na poziomie ultrastruktury chloroplastów liści młodocianych i dojrzałych. Ultrastruktura chloroplastów młodocianych liści mutantów *clpP6* nie różniła się pod żadnym względem od ultrastruktury chloroplastów tej kategorii liści roślin WT, podczas gdy chloroplasty dojrzałych liści mutantów charakteryzowały się poważnym niedorozwojem systemu tylakoidowego, a ich skład biochemiczny (np. zawartość chlorofilu) bardzo zasadniczo odbiegał od składu chloroplastów dojrzałych liści roślin WT (Sjögren i wsp., 2006).

Wyniki analiz wykonanych w ramach niniejszej pracy pozwoliły na stwierdzenie, że skutkiem wyciszenia genu kodującego proteazę AtDeg5 są zmiany odnoszące się do pola przekroju poprzecznego chloroplastu, architektury systemu tylakoidowego chloroplastów oraz metabolizmu skrobi tranzytorycznej (Rys. 24 i 25). Średnie wartości pola powierzchni przekroju poprzecznego chloroplastów roślin WT (6.4/6.5 μm^2 dla liści młodocianych i dojrzałych, odpowiednio) były bardzo podobne do wartości opisanych przez innych autorów dla roślin WT *A. thaliana* hodowanych w podobnych warunkach (6.7 μm^2 - Aronsson i wsp., 2006). Liście młodociane i dojrzałe mutantu *deg5-1* posiadały chloroplasty o polu przekroju poprzecznego większym (o 16 - 32%) w porównaniu z chloroplastami odpowiednich liści roślin WT, co jest równoznaczne ze zwiększeniem objętości chloroplastów u mutantów. Pęcznienie chloroplastów może być wynikiem zmian intensywności transportu wody i jonów przez otoczkę chloroplastową, z kolei intensywność ta podlega regulacji między innymi przez natężenie światła i temperaturę (Packer i Sigenthaler, 1965; Sigenthaler i Packer, 1965, Xu i wsp., 2006; Zhang i wsp., 2010). Można zatem wnioskować, że AtDeg5 uczestniczy w regulacji kontrolowanego

przez czynniki środowiskowe transportu wody i jonów przez błony otoczki chloroplastowej. Inną interesującą zmianą fenotypową odnoszącą się do ultrastruktury chloroplastów była istotna statystycznie wyższa liczba tylakoidów zespolonych w granum obserwowana w dojrzałych liściach obydwu mutantów *deg5* (6.2/6.3) w porównaniu do odpowiedniej wartości określonej dla roślin WT (5.6 – liczba mieszcząca się w przedziale, który ustalono w oparciu o analizę danych literaturowych: 5.5 - 8.1, Rock i wsp., 1992; Anderson i wsp., 2012). Jedną z możliwości interpretacji tej obserwacji jest przyjęcie, iż w chloroplastach roślin WT, które osiągnęły podfazę 6.0 (29 dzień ontogenezy) pojawiają się wczesne symptomy dezintegracji systemu tylakoidowego związanej ze starzeniem się chloroplastów, podczas gdy u obu mutantów *deg5* starzenie się chloroplastów jest opóźnione. Idea taka zgodna byłaby z zaobserwowanym przez nas opóźnieniem pojawiania się symptomów wczesnej fazy starzenia się chloroplastów, którego odzwierciedleniem były niższe wartości pola przekroju poprzecznego plastoglobul w dojrzałych liściach 28-dniowych mutantów *deg5-1* w stosunku do roślin WT (Luciński i wsp., 2011b). Istotną rolę regulacyjną w oddziaływaniach tylakoid-tylakoid prowadzących do ich zespalania odgrywają dwa najważniejsze apobiałka LHCI - Lhcb1 i 2 (Allen i Forsberg, 2001) oraz apobiałko Lhcb5 (Andersson i wsp., 2001). Sugeruje się, że dezintegracja błon tylakoidowych związana ze starzeniem podlega kontroli ze strony reduktazy chlorofilu *b*, która katalizując redukcję chlorofilu *b* do chlorofilu *a* toruje drogę do destabilizacji apobiałek LHCI (Kusaba i wsp., 2007; Horie i wsp., 2009). Jednak równowagowy poziom apobiałek Lhcb1, 2 i 5 w chloroplastach liści roślin WT i obu mutantów *deg5*, które osiągnęły podfazę 6.0 jest taki sam (Rys. 26), co stawia pod znakiem zapytania tezę o powiązaniu różnic w liczbie tylakoidów zespolonych w granum między roślinami WT i mutantami *deg5* z różnicami w tempie destabilizacji apobiałek Lhcb1, 2 i 5. Alternatywną możliwością interpretacji różnic mutanty/rośliny WT w odniesieniu do liczby tylakoidów przypadających na granum jest sugestia, iż mutanty mogłyby różnić się od roślin WT wyższym poziomem zlokalizowanego w błonach brzegowych tylakoidów gran białka CURT1, które odgrywa kluczową rolę w kształtowaniu architektury tylakoidów poprzez indukcję krzywizny błon brzegowych (Armbruster i wsp., 2013). Wyższy poziom białka CURT1 u mutantów wymuszałby podwyższenie, w stosunku do roślin WT, liczby tylakoidów zespolonych w pojedynczym granum, ale zarazem musiałby skutkować zmniejszeniem średnicy granum (Albertsson i Andreasson, 2004),

a takiego efektu nie potwierdzają wyniki naszych analiz (Rys. 24 i 25). Dlatego powód, dla którego mutanty charakteryzują się występowaniem większej liczby tylakoidów zespolonych w grana pozostaje niejasny.

Szczególnie interesująca (jednocześnie zupełnie nieoczekiwana) jest obserwacja, że równowagowy poziom apobiałek Lhcb6 w chloroplastach liści obu mutantów *deg5*, które osiągnęły podfazę 6.0 jest o 29-30% niższy niż u roślin WT (Rys. 26). Nie jest jasne dlaczego mutanty *deg5* mają obniżony poziom apobiałka Lhcb6 - prawdopodobnie AtDeg5 jest bezpośrednio zaangażowana w obrót metaboliczny Lhcb6, względnie kontroluje obrót metaboliczny innej proteazy, której zadaniem jest katalizowanie hydrolizy Lhcb6. CP24, którego apobiałkiem jest Lhcb6 odgrywa niezmiernie istotną rolę w stabilizacji struktury wersji $C_2S_2M_2$ cząstek superkompleksu PSII-LHCII, stanowiąc łącznik, poprzez który trimery LHCII-M oddziałują z rdzeniem PSII. Wskazują na to wyniki prac nad mutantem *koCP24* (całkowity brak apobiałka Lhcb6), u którego w obrębie błon zespolonych tylakoidów gran obserwuje się superkompleksy PSII-LHCII wyłącznie w formie C_2S_2 , rozdzielone rejonami bogatymi w „dodatkowe” trimery LHCII (Kovacs i wsp., 2006, de Bianchi i wsp., 2008). Znaczna pula „dodatkowych” trimerów LHCII mutantu *koCP24* to najprawdopodobniej trimery LHCII-M, które odłączyły się od rdzenia PSII na skutek destabilizującego efektu nieobecności Lhcb6. Można zatem z bardzo dużym prawdopodobieństwem domniemywać, że utrata części puli Lhcb6 u mutantów *deg5* prowadzi do sytuacji, w której albo ok. 25% cząstek superkompleksów PSII-LHCII tych mutantów ma formę C_2S_2 (pozostałe ok. 75% - oczywiście formę $C_2S_2M_2$) albo 50% cząstek superkompleksów jest reprezentowana przez wersję C_2S_2M (pozostałe 50% to forma $C_2S_2M_2$). Tak czy inaczej - wobec identyczności liczby wszystkich trimerów LHCII przypadających na rdzeń PSII oznacza to obniżenie poziomu trimerów LHCII związanych bezpośrednio z rdzeniem PSII w formie superkompleksów oraz wzrost poziomu „dodatkowych” trimerów LHCII. Te poważne rearanżacje strukturalne mogą być bezpośrednią przyczyną obserwowanego u mutantu *deg5-1* czasu pułapkowania energii wzbudzenia elektronowego w cząstkach superkompleksów PSII-LHCII (Gibasiewicz i wsp., 2015), bowiem nadmiarowa pula „dodatkowego” LHCII może być reprezentowana przez zagregowane trimery. Istnieją liczne doniesienia wskazujące, że *in vitro* agregacja trimerów LHCII prowadzi do znacznego przyspieszenia zaniku fluorescencji w porównaniu z niezagregowanymi trimerami LHCII (np. van Oort i wsp., 2007).

Równie interesującą wydaje się obserwacja, dokonana z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej, wskazująca, że pod koniec nocy w ponad 90% chloroplastów młodocianych liści mutantu *deg5-2* oraz młodocianych i dojrzałych liściach mutantu *deg5-1* gromadziła się znaczna liczba ziaren skrobiowych, podczas gdy w chloroplastach liści WT nie obserwowano ich wcale (zgodnie z oczekiwaniem - Rys. 24 i 25). Obserwacja ta została w pełni potwierdzona przez wyniki analiz poziomu skrobi pod koniec nocy metodą enzymatyczną (Rys. 27). Ustalono, że przyczyną akumulacji skrobi w chloroplastach mutantów pod koniec nocy jest wyższe niż u roślin WT tempo dziennej syntezy skrobi (Rys. 28). Tempo hydrolizy skrobi w ciągu nocy roślin wszystkich trzech genotypów było mniej więcej równe, ale mutanty „nie nadążały” z nocną hydrolizą nadmiernej ilości skrobi i pod koniec nocy część puli skrobi ciągle pozostawała obecna - w formie nienaruszonych ziaren (Rys. 24 i 27). Wyniki te wykluczają wpływ mutacji *deg5* na aktywność enzymów zaangażowanych w nocny rozkład skrobi, sugerują natomiast, że mutacja może mieć wpływ na aktywność którychś/któregoś z enzymów cyklu Calvina, bądź szlaku fruktozo-6-fosforan - skrobia. Taką linię rozumowania potwierdza fakt, że świeża masa obu typów liści mutantów *deg5* i roślin WT jest taka sama (Tab. 2) – mutanty posiadające defekty w zakresie funkcji genów kontrolujących enzymy nocnej hydrolizy skrobi często mają liście o masie niższej niż u roślin WT na skutek niedożywienia spowodowanego nieumiejętnością hydrolizowania skrobi w nocy (np. mutant *sex1* – Zeeman i wsp., 1998). Zważywszy, że maksymalne tempo karboksylacji limitowanej przez ilość, kinetykę i aktywność Rubisco ($V_{c,max}$) przyjmowało w dojrzałych liściach mutantów *deg5* i roślin WT takie same wartości (krzywe A/C_i - Rys. 29) nie należy jednak szukać przyczyn podwyższonego tempa syntezy skrobi u mutantów w stymulacji tempa cyklu Calvina, ale reakcjach szlaku syntezy skrobi (amylozy i amylopektyny) na odcinku od fruktozo-6-fosforanu (Rys. 8). Przyszłe porównawcze analizy poziomu mRNA i białek enzymów operujących na tym odcinku biosyntezy skrobi u roślin WT i mutantów *deg5* mogłyby pozwolić na zidentyfikowanie enzymu docelowego dla AtDeg5.

Poszukując potencjalnych różnic aktywności fotosyntetycznej dla dojrzałych liści roślin WT i mutantów *deg5*, które osiągnęły podfazę 6.0 sporządzono - poza krzywymi A/C_i - także krzywe świetlne fotosyntezy. W oparciu o przebieg krzywych świetlnych estymowano lub odczytywano trzy parametry, w istotny sposób charakteryzujące aktywność fotosyntetyczną dojrzałych liści, a mianowicie maksymalną intensywność

fotosyntetyczną (A_{\max}), kwantową wydajność fotosyntetycznego wiązania CO_2 (ϕCO_2) i wypukłość krzywej świetlnej (θ) (Rys. 30).

Wartości A_{\max} dojrzałych liści WT ($8.6 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) były podobne lub nieco niższe niż opisywane wcześniej dla roślin tego samego ekotypu hodowanych w podobnych warunkach w innych laboratoriach (np. Athanasiou i wsp., 2010 – $12.5 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Ze względu na wysoką korelację poziomu A_{\max} z ilością Rubisco w liściu (Björkman, 1981) identyczność wartości A_{\max} roślin trzech porównywanych genotypów sugeruje, że dysponują one takimi samymi ilościami tego enzymu, w zgodzie z identycznością wartości $V_{c,\max}$, przedstawionymi na rysunku 29. Pewien wpływ na wartość A_{\max} ma jednak także wiele innych parametrów funkcjonalnych liścia, dlatego nie można wykluczyć, choć wydaje się to bardzo mało prawdopodobne, że parametry te przyjmują nieco inne wartości dla roślin WT i mutantów *deg5*, ale „kompensują się” do jednakowych wartości A_{\max} .

Obserwowana w przypadku dojrzałych liści roślin WT wartość ϕCO_2 - 0.05 - jest znacząco niższa od 0.125, to jest wartości maksymalnej. Jednak tak wysokiej wartości (0.125) nie obserwuje się nigdy, a przyczyną rejestracji zawsze niższych liczb jest aktywność procesów fotorespiracyjnych, cyklicznego transportu elektronów oraz, ewentualnie, fotoinhibicji. Singaas i wsp. (2001) przeprowadzili dokładne analizy porównawcze wartości ϕCO_2 dla dziesięciu wybranych gatunków roślinnych, bez *A. thaliana* (w komorze z atmosferycznym stężeniem O_2 – tak jak w doświadczeniach wykonanych w ramach niniejszej pracy) i uzyskali 0.085 jako wartość średnią. Z kolei przegląd 39 zestawów danych literaturowych odnoszących się do ponad 30 gatunków roślinnych (wśród nich także nie było *A. thaliana*) dokonany przez tych samych autorów pozwolił na ustalenie 0.053 jako wartości średniej. Zdaniem Singaasa i wsp. (2001) rejestracja wartości ϕCO_2 ok. 0.085 jest skutkiem wpływu fotorespiracji i cyklicznego transportu elektronów w liściach badanych roślin, ale rejestracja wartości jeszcze niższych może być częściowo spowodowana błędami pomiarowymi popełnianymi podczas określania przedziału liniowości krzywej świetlnej fotosyntezy. Wydaje się to jednak mało prawdopodobne, zważywszy że wartość ϕCO_2 zmierzona dla roślin WT *A. thaliana* w innym laboratorium – 0.020 (Athanasiou i wsp., 2010) była znacząco niższa nawet od średniej wielogatunkowej 0.053. Uważamy za prawdopodobne, że obliczona przez nas wartość ϕCO_2 dla roślin WT – 0.050 jest obniżona w porównaniu do maksymalnego poziomu (0.125) jedynie na skutek

aktywności procesów fotorespiracyjnych i cyklicznego transportu elektronów; procesy te zachodzą u mutantów *deg5* i roślin WT zapewne z bardzo podobną aktywnością, bo wartości ϕCO_2 roślin wszystkich trzech genotypów nie różnią się (Rys. 29).

Wartość wypukłości krzywej świetlnej (θ) jest w dość złożony sposób uzależniona od kompozycji aparatu fotosyntetycznego, ale także od grubości liścia, jego stanu fizjologicznego i absorpcji światła przez cały liść (Ögren i Evans, 1993, Ögren, 1993). Istotny wpływ na wyniki pomiarów θ ma także natężenie światła, na jakie rośliny były eksponowane przed pomiarami (Ögren, 1993) oraz stężenie CO_2 w atmosferze otaczającej roślinę w trakcie pomiarów (Akhkha i wsp., 2001). W uproszczeniu przyjmuje się, że dla roślin hodowanych w identycznych warunkach świetlnych θ jest silnie skorelowana z relacją między aktywnością Rubisco i tempem fotosyntetycznego transportu elektronów – relatywnie niska aktywność Rubisco skutkuje podwyższaniem wartości θ (Ögren, 1993). Identyczność wartości θ roślin trzech porównywanych w niniejszej pracy genotypów sugeruje, że wyciszenie genu *AtDEG5* nie zmienia globalnej charakterystyki aktywności fotosyntetycznej liści.

Również ciemnościowa aktywność oddechowa trzech badanych grup roślin (Rd) jest taka sama (Rys. 30).

Nie jest zatem zaskoczeniem, że wyciszenie genu *AtDEG5* nie zmienia w istotny sposób wartości przystosowawczej roślin (fitness), której miarą jest całkowita liczba nasion wyprodukowana przez pojedynczą roślinę (Kühlheim i wsp., 2002) (Rys. 31). Również większość innych cech morfologii organów generatywnych (badanych po osiągnięciu przez roślinę podfazy 8.9) przyjmuje wartości takie same u wszystkich trzech badanych genotypów - wyjątkiem jest liczba węzłów pędu generatywnego (mutant *deg5-1* ma ich więcej niż rośliny WT - Rys. 31) oraz długość i szerokość nasion (wyższe wartości u obu mutantów *deg5* w porównaniu z roślinami WT - Rys. 31). Ustalono, że stopień rozgałęzienia pędu generatywnego (liczba węzłów) jest kontrolowany przez geny *APETALA1 (AP1)* i *LEAFY (LFY)* (kodujące odpowiednie czynniki transkrypcyjne), a także geny MADS-box (kodujące czynniki transkrypcyjne zawierające domenę MADS), do których należą *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1)*, *AGAMOUS-LIKE 24 (AGL24)*, *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)* i *SEPALLATA 4 (SEP4)* (Liu i wsp., 2013). Odgrywają one rolę w specyficznej supresji *TERMINAL FLOWER1 (TFL1)* w pojawiających się merystemach bocznych, przez co wpływają na architekturę całego pędu

kwiatostanowego u *A. thaliana* poprzez regulację wzoru jego rozgałęzień (Bradley i wsp., 1997; Liljegren i wsp., 1999; Ratcliffe i wsp., 1999). Mianowicie dominacja aktywności AP1 i LFY nad TFL1 determinuje określone rozmieszczenie merystemów kwiatowych wywodzących się z merystemu pędu kwiatostanowego, podczas gdy przewaga aktywności TLF1 zapobiega tworzeniu merystemów kwiatowych i odpowiada za nieokreślony wzrost pędu kwiatostanowego. AP1 i LFY ulegają wzmożonej ekspresji podczas pojawiania się merystemów kwiatowych, podczas gdy TLF1 ekspresjonowany jest tylko wewnątrz głównego i bocznych merystemów pędu kwiatostanowego (Ratcliffe i wsp., 1998, 1999). Geny *SOC1*, *AGL24*, *SVP* i *SEP4* także wpływają na regulację architektury pędu kwiatostanowego przez pośrednią supresję TFL1 podczas pojawiania się merystemów kwiatowych. Trudno ocenić dlaczego mutant *deg5-1* może mieć więcej rozgałęzień pędu kwiatostanowego niż rośliny WT - w każdym razie cecha ta odzwierciedla udział proteazy AtDeg5 w regulacji ekspresji/funkcji któregoś/którychś z opisanych powyżej genów.

Zidentyfikowano wiele genów zaangażowanych w regulację rozwoju nasion, wpływających na rozmiar/masę nasion. Za rozwój bielma, odpowiadają głównie geny *SHB1* (Zhou i wsp., 2009), *IKU1* (Wang i wsp., 2010), *MINI3*, *IKU2* (Luo i wsp., 2005), *AP2* (Ohto i wsp., 2009, Jofuku i wsp., 2005, Ohto i wsp., 2005) i czynniki transkrypcyjne kodowane przez geny MADS-box *AGL61* (Steffen i wsp., 2008, Bemer i wsp., 2008), *AGL62* (Kang i wsp., 2008) i *AGL80* (Portereiko i wsp., 2006). Z kolei geny *FIS2*, *FIE*, *MEA*, *MSI1*, *SWN* (Pien i Grossniklaus., 2007) i *MET1* (Xiao i wsp., 2006) wpływają na rozwój nasion poprzez epigenetyczną regulację rozwoju bielma i imprinting ojcowski. Kluczową rolę w rozwoju nasion odgrywają hormony, takie jak auksyny, cytokininy, gibereliny i brassinosteroidy (Jiang i Lin, 2013). Ze względu na dość skomplikowane powiązania funkcjonalne między tymi czynnikami na aktualnym etapie badań trudno określić udział AtDeg5 w regulacji długości i szerokości nasion *A. thaliana*, której skutkiem jest zwiększenie długości i szerokości nasion mutantów *deg5* w porównaniu z nasionami roślin WT (Rys. 32).

Jeden z dwóch sposobów globalnej interpretacji różnorodności cech fenotypowych regulowanych przez AtDeg5 zakłada, że cechy, których wartości uległy zmianie przynajmniej u mutantu null *deg5-1* w zestawieniu z roślinami WT (grupy 1 i 2, Tab. 3) to te, dla których chloroplast posiada znaczący (grupa 1) lub niewielki (grupa 2) nadmiar centrów katalitycznych AtDeg5 w stosunku do potrzeb regulacyjnych, nawet jeśli pula

AtDeg5 zredukowana jest do 23% w stosunku do roślin WT. Grupa 3 (Tab. 3) natomiast obejmuje cechy, w stosunku do których chloroplast nie dysponuje nadmiarem AtDeg5 i nie występuje efekt dawki białka AtDeg5, bo wartości cech należących do tej grupy zmierzone dla roślin posiadających 0% dzikiej dawki AtDeg5 (*deg5-1*) nie różnią się w sposób istotny od wartości zmierzonych dla roślin posiadających 77% dzikiej dawki tej proteazy (*deg5-2*). Różnorodność cech fenotypowych kontrolowanych przez AtDeg5 pod względem ich powiązania z dawką/nadmiarem centrów katalitycznych tej proteazy nie jest nieoczekiwana, ponieważ podobną różnorodność opisano wcześniej dla innych proteaz chloroplastowych. Wykazano, że mutanty *var1-1* charakteryzujące się obniżonym poziomem chloroplastowego heterokompleksu proteolitycznego AtFtsH, zachowują wystarczającą ilość centrów katalitycznych AtFtsH do przeprowadzenia części procesów służących prawidłowemu rozwojowi (biogeneza chloroplastów), ale ilość ta jest niewystarczająca dla innych procesów zapewniających prawidłowe funkcjonowanie roślin (stresozależna degradacja apobiałek Lhcb1-3; Luciński i Jackowski, 2013).

Alternatywnym sposobem interpretacji globalnej różnorodności cech fenotypowych regulowanych przez AtDeg5 jest założenie, że o przynależności do grup 1, 2 lub 3 (Tab. 3) decyduje efektywna (grupa 1 i 2) lub nieefektywna (grupa 3) kompensacja funkcjonalna deficytu 23% puli cząsteczek AtDeg5 przez AtDeg8. O przynależności cechy do grupy 1 lub 2 decyduje w tym modelu efekt dawki AtDeg5 w połączeniu z efektem nadmiaru centrów katalitycznych AtDeg5.

Zgodnie z oczekiwaniem (Sjögren i wsp., 2006) niektóre cechy (pięć) fenotypowe podlegające regulacji ze strony AtDeg5, a odnoszące się do liści były u mutantów *deg5* niejednakowo ekspresjonowane w liściach dojrzałych i młodocianych. Dotyczy to następujących cech :

- 1) frekwencja chloroplastów z ziarnami skrobiowymi pod koniec nocy; liść 5 reaguje zmianami tylko u *deg5-1*, liść 3 - zmianami u obydwu mutantów,
- 2) poziom skrobi po 0, 16 i 24h: liść 5 reaguje zmianami tylko u *deg5-1*, liść 3 - zmianami u obydwu mutantów,
- 3) liczba tylakoidów zespolonych w granum: tylko liść 5 reaguje zmianami – u obydwu mutantów , liść 3 zapewne nie podlega regulacyjnej roli AtDeg5.

Uwzględniając fakt, że całkowita liczba cech regulowanych przez AtDeg5 odnoszących się do liści zidentyfikowanych w niniejszej pracy wynosi 11 (patrz Tab. 3), rola przynależności liścia do populacji młodocianej lub dojrzałej w kształtowaniu się indywidualnych cech AtDeg5-zależnych jest słabsza niż można było oczekiwać.

PODSUMOWANIE WYNIKÓW

- 1) Liście roślin mutantów *deg5-1* są całkowicie pozbawione białka AtDeg5, natomiast liście mutantów *deg5-2* wykazują obniżenie poziomu akumulacji tego białka do 77% wartości charakterystycznej dla roślin WT.
- 2) Rośliny mutantów *deg5-2* nie wykazują istotnych zmian w chronologii progresji faz i podfaz ontogenezy w porównaniu z roślinami WT. Z kolei u mutantów *deg5-1* czas niezbędny do osiągnięcia trzynastu podfaz 1, 3, 6 i 8 jest istotnie dłuższy od czasu charakterystycznego dla roślin WT (1.5, 3.16, 3.54, 3.58, 3.59, 3.91, 3.93, 3.94, 3.95, 3.96, 3.97, 6.5 i 8.5), a w przypadku jednej podfazy (1.2) czas ten jest dłuższy.
- 3) Zarówno młode, jak i dojrzałe liście roślin mutantów *deg5-2*, które osiągnęły podfazę 6.0 nie różnią się w zakresie badanych cech morfologicznych od liści roślin WT, natomiast długość, szerokość i obwód obu populacji liści mutantów *deg5-1* są większe niż długość, szerokość i obwód liści roślin WT. Współczynnik kształtu liści *deg5-1* i roślin WT jest jednakowy.
- 4) Młode i dojrzałe liście mutantów *deg5-1*, które osiągnęły podfazę 6.0 posiadają chloroplasty różniące się od chloroplastów odpowiednich liści roślin WT większym polem przekroju poprzecznego, a liście dojrzałe tego mutantu dodatkowo większą liczbą tylakoidów zespolonych w granum. Większość chloroplastów młodych liści mutantów *deg5-2* oraz chloroplastów młodych i dojrzałych liści mutantów *deg5-1* wykazuje silną akumulację skrobi tranzytorycznej pod koniec nocy, podczas gdy w chloroplastach roślin WT - zgodnie z oczekiwaniami - nie obserwowano w tym momencie ziaren skrobiowych. Przyczyną tego efektu jest wyższe tempo dziennej akumulacji skrobi u obu mutantów w porównaniu z roślinami WT; tempo obniżania się puli skrobi w ciągu nocy jest natomiast podobne w liściach młodych i dojrzałych wszystkich badanych genotypów i dlatego pod koniec nocy w chloroplastach mutantów pozostaje więcej nierozłożonej skrobi, mimo iż są one zdolne do całkowitej hydrolizy skrobi w warunkach przedłużonej nocy.
- 5) Liście roślin obydwu mutantów, które osiągnęły podfazę 6.0 mają obniżony poziom apobiałka Lhcb6 w stosunku do roślin WT co skutkuje zwiększeniem liczby

„dodatkowych” trimerów LHCII, słabo związanych ze strukturą superkompleksów PSII-LHCII.

- 6) Dojrzałe liście roślin WT i roślin obu mutantów *deg5*, które osiągnęły podfazę 6.0 charakteryzują się podobnym przebiegiem krzywej A/C_i oraz krzywej świetlnej fotosyntezy. Nie stwierdzono różnic rośliny WT/mutantów *deg5* w odniesieniu do wartości $V_{c,max}$, J_{max} , A_{max} , ϕCO_2 , θ i Rd .
- 7) Rośliny mutantów *deg5-1*, które osiągnęły podfazę 8.9 posiadają więcej węzłów na pędzie kwiatostanowym i jego rozgałęzieniach niż rośliny WT, a nasiona obu mutantów *deg5* są krótsze i węższe niż u WT.
- 8) Wśród 37 cech fenotypowych, których wartości są zmienione u roślin mutantów *deg5-1* w porównaniu z roślinami WT można, w zależności od istotności różnic WT/*deg5-1* i *deg5-1/deg5-2*, wyróżnić trzy grupy:
 - a) cechy zmienione tylko u mutantów *deg5-1*, brak różnic międzymutantowych,
 - b) cechy zmienione tylko u mutantów *deg5-1*, istnieją różnice międzymutantowe,
 - c) cechy zmienione u obydwu mutantów, brak różnic międzymutantowych.

WNIOSKI

1. Chloroplastowa proteaza AtDeg5 bierze udział w regulacji:
 - chronologii pojawiania się niektórych liści rozetkowych,
 - chronologii wzrostu większości liści rozetkowych,
 - chronologii kwitnienia (otwierania się kwiatów),
 - chronologii dojrzewania łuszczynek,
 - kształtowania się cech morfologicznych blaszki liściowej, takich jak: długość, szerokość, obwód i pole powierzchni,
 - kształtowania się cech ultrastruktury chloroplastów, takich jak: pole przekroju poprzecznego chloroplastu i liczba tylakoidów zespolonych w granum,
 - metabolizmu skrobi w chloroplastach,
 - akumulacji apobiałka Lhcb6 w chloroplastach i organizacji strukturalnej części PSII,
 - kształtowania się rozgałęzień pędu kwiatostanowego oraz długości i szerokości nasion.
2. W odniesieniu do 37 cech fenotypowych regulowanych przez AtDeg5 chloroplast
 - 1) dysponuje znaczącym nadmiarem centrów katalitycznych AtDeg5 w stosunku do potrzeb, a efekt dawki AtDeg5 nie odgrywa istotnej roli lub nadmiar AtDeg8 efektywnie kompensuje deficyt 23% puli AtDeg5 (20 cech),
 - 2) dysponuje niewielkim nadmiarem centrów katalitycznych AtDeg5 w stosunku do potrzeb, a istotną rolę odgrywa efekt dawki AtDeg5 lub nadmiar AtDeg8 efektywnie kompensuje deficyt 23% puli AtDeg5 (9 cech),
 - 3) nie dysponuje nadmiarem centrów katalitycznych AtDeg5 w stosunku do potrzeb, a efekt dawki AtDeg5 nie odgrywa istotnej roli, nadmiar AtDeg8 nie kompensuje deficytu 23% puli AtDeg5 (8 cech).

Literatura

Adam Z, Adamska I, Nakabayashi K, Ostersetzer O, Haussuhl K, Manuell A, Zheng B, Vallon O, Rodermeel SR, Shinozaki K, Clarke AK (2001) Chloroplast and mitochondrial proteases in *Arabidopsis*. A proposed nomenclature. *Plant Physiol* 125: 1912-1918.

Adam Z, Protein stability and degradation in chloroplasts (1996) *Plant Mol Biol* 32: 773-783.

Adam Z, Zaltsman A, Sinvany-Villalobo G, Sakamoto W (2005) FtsH proteases in chloroplasts and cyanobacteria. *Physiol Plant* 123: 386-390.

Adamiec M, Luciński R, Jackowski G (2011) The irradiance dependent transcriptional regulation of AtCLPB3 expression. *Plant Science* 181: 449-456.

Akhkha A, Reid I, Clarke DD, Dominy PJ (2001) Photosynthetic light response curves determined with the leaf oxygen electrode: minimization of errors and significance of convexity term. *Planta* 214: 135-141.

Akiyama Y, Kihara A, Ito K (1996a) Subunit α of proton ATPase F_0 sector is a substrate of the FtsH protease in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 399: 26-28.

Akiyama Y, Kihara A, Tokuda H, Ito K (1996b) FtsH(HflB) is an ATP-dependent protease selectively acting on SecY and some other membrane proteins. *J Biol Chem* 271: 31196-31201.

Akiyoshi DE, Klee H, Amasino RM, Nester EW, Gordon MP (1984) T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81: 5994-5998.

Aksam EB, Koek A, Kiel JA, Jourdan S, Veenhuis M, van der Klei IJ (2007) A peroxisomal lon protease and peroxisome degradation by autophagy play key roles in vitality of *Hansenula polymorpha* cells. *Autophagy* 3: 96-105.

Albertsson PA, Andreasson E (2004) The constant proportion of grana and stroma lamellae in plant chloroplasts. *Physiol Plant* 121: 334-342.

Allen JF, Forsberg J (2001) Molecular recognition in thylakoid structure and function. *Trends Plant Sci* 6: 317-326.

Anderson JM (1986) Photoregulation of the composition, function, and structure of thylakoid membranes. *Annu Rev Plant Physiol* 37: 93-136.

Anderson JM, Horton P, Kim E H, Chow W S (2012) Towards elucidation of dynamic structural changes of plant thylakoid architecture. *Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367: 3515-3524.

- Andersson B, Aro EM (2001) Photodamage and D1 protein turnover in photosystem II. In: Aro EM, Andersson B (eds) Regulation of Photosynthesis, Vol. 11. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 377-393.
- Andersson J, Walters RG, Horton P, Jansson S (2001) Antisense inhibition of the photosynthetic antenna proteins CP29 and CP26: implications for the mechanism of protective energy dissipation. *Plant Cell* 13:1193-1204.
- Armbruster U, Labs M, Pribil M, Viola S, Xu W, Scharfenberg M, Hertle AP, Rojahn U, Jensen PE, Rappaport F, Joliot P, Dörmann P, Wanner G, Leister D (2013) *Arabidopsis* CURVATURE THYLAKOID1 proteins modify thylakoid architecture by inducing membrane curvature. *Plant Cell* 25: 2661-2678.
- Arnaud N, Girin T, Sorefan K, Fuentes S, Wood TA, Lawrenson T, Sablowski R, Østergaard L (2010) Gibberellins control fruit patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* 24:2127-2132.
- Arnon D, Copper enzymes in isolated chloroplasts (1949) Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* 24: 1-15.
- Aronsson H, Combe J, Patel R, Jarvis P (2006) *In vivo* assessment of the significance of phosphorylation of the *Arabidopsis* chloroplast protein import receptor, atToc33. *FEBS Lett* 580: 649-655.
- Ashby E (1948) Studies in the morphogenesis of leaves. 2. The area, cell size and cell number of leaves of *Ipomoea* in relation to their position on the shoot. *New Phytol* 47: 177-195.
- Athanasiou K, Dyson BC, Webster RE, Johnson GN (2010) Dynamic acclimation of photosynthesis increases plant fitness in changing environments. *Plant Physiol* 152: 366-73.
- Aukerman M J, Sakai H (2003) Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its *APETALA2*-like target genes. *Plant Cell* 15: 2730-2741.
- Azpiroz-Leehan R, Feldmann KA (1997) T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: Going back and forth. *Trends Genet* 13:152-159.
- Bachmair A, Finley D, Varshavsky A (1986) *In vivo* half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* 234: 179-196.
- Bai X C, Pan X J, Wang X J, Ye Y Y, Chang L F, Leng D, Lei J, Sui SF (2011) Characterization of the structure and function of *Escherichia coli* DegQ as a representative of the DegQ-like proteases of bacterial HtrA family proteins. *Structure* 19: 1328-1337.

- Bailey S, Thompson E, Nixon PJ, Horton P, Mullineaux CW, Robinson C, Mann NH (2002) A critical role for the Var2 FtsH homologue of *Arabidopsis thaliana* in the photosystem II repair cycle *in vivo*. *J Biol Chem* 277: 2006-2011.
- Bartoszewska M, Williams C, Kikhney A, Opaliński L, van Roermund CW, de Boer R, Veenhuis M, van der Klei IJ (2012) Peroxisomal proteostasis involves a Lon family protein that functions as protease and chaperone. *J Biol Chem* 287: 27380-27395.
- Bassham DC, Laporte M, Marty F, Moriyasu Y, Ohsuni Y, Olsen L, Yoshimoto K (2006) Autophagy in development and stress responses of plants. *Autophagy* 2: 2-11.
- Bemer M, Wolters-Arts M, Grossniklaus U, Angenent GC (2008) The MADS domain protein DIANA acts together with AGAMOUS-LIKE80 to specify the central cell in *Arabidopsis* ovules. *Plant Cell* 20: 2088-2101.
- Berthold DA, Babcock GT, Yocum CF (1981) A highly resolved, oxygen-evolving Photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes. *FEBS Lett* 134: 231-234.
- Bhushan S, Lefebvre B, Stahl A, Wright SJ, Bruce BD, Boutry M, Glaser E (2003) Dual targeting and function of a protease in mitochondria and chloroplasts. *EMBO Rep* 4: 1073-1078.
- de Bianchi S, Dall'Osto L, Tognon G, Morosinotto T, Bassi R (2008) Minor antenna proteins CP24 and CP26 affect the interactions between Photosystem II subunits and the electron transport rate in grana membranes of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20: 1012-1028.
- Bieniossek C, Niederhauser B, Baumann UM (2009) The crystal structure of apo-FtsH reveals domain movements necessary for substrate unfolding and translocation. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 21579-21584.
- Björkman O (1981) Responses to different quantum flux densities. In *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, Vol. 12A, Lange OL, Nobel PS, Osmond CB, Zeigler H (eds) Springer, Berlin, 57-107.
- Bonaventure G, Salas JJ, Pollard MR, Ohlrogge JB (2003) Disruption of the *FATB* gene in *Arabidopsis* demonstrates an essential role of saturated fatty acids in plant growth. *Plant Cell* 15: 1020-1033.
- Botos I, Melnikov E, Cherry S, Khalatova A, Rasulova F, Tropea JE, Maurizi MR, Rotanova TV, Gutchina A, Wlodawer A (2004a) Crystal structure of the AAA⁺ domain of *E. coli* Lon protease at 1.9Å resolution. *J Struct Biol* 146: 113-122.
- Botos I, Melnikov E, Cherry S, Tropea JE, Khalatova A, Rasulova F, Dauter Z, Maurizi MR, Rotanova TV, Wlodawer A, Gutchina A, (2004b) The catalytic domain of *Escherichia coli* Lon protease has a unique fold and Ser-Lys dyad in the active site. *J Biol Chem* 279: 8140-8148.

- Boyes DC, Zayed AM, Ascenzi R, McCaskill AJ, Hoffman NE, Davis KR, Görlach J (2001) Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell* 13: 1499-1510.
- Bradley D, Ratcliffe O, Vincent C, Carpenter R, Coen E (1997) Inflorescence commitment and architecture in *Arabidopsis*. *Science* 275: 80-83.
- Braun HP, Emmermann M, Kruft V, Schmitz UK (1992) The general mitochondrial processing peptidase from potato is an integral part of cytochrome c reductase of the respiratory chain. *EMBO J* 11: 3219-3227.
- Brik A, Wong CH (2003) HIV-1 protease: mechanism and drug discovery. *Org Biomol Chem* 1: 5-14.
- Broess K, Trinkunas G, van Hoek A, Croce R, van Amerongen H (2008) Determination of the excitation migration time in Photosystem II. Consequences for the membrane organization and charge separation parameters. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 1777: 404-409.
- Bulgakov VP, Kiselev KV, Yakovlev KV, Zhuravlev YN, Gontcharov AA, Odintsova NA (2006) *Agrobacterium*-mediated transformation of sea urchin embryos. *Biotechnol J* 1: 454-461.
- Caffarri S, Broess K, Croce R, Van Amerongen H (2011) Excitation energy transfer and trapping in higher plant Photosystem II complexes with different antenna sizes. *Biophys J* 100: 2094-2103.
- Caffarri S, Kouřil R, Kereiče S, Boekema EJ, Croce R (2009) Functional architecture of higher plant Photosystem II supercomplexes. *EMBO J* 28: 3052-3063.
- Carles CC, Choffnes-Inada D, Reville K, Lertpiriyapong K, Fletcher JC (2005) ULTRAPETALA1 encodes a SAND domain putative transcriptional regulator that controls shoot and floral meristem activity in *Arabidopsis*. *Development* 132: 897-911.
- Chan EYL, McQuibban GA (2013) The mitochondrial rhomboid protease: Its rise from obscurity to the pinnacle of disease-relevant genes. *Biochim Biophys Acta Biomembranes* 1828: 2916-2925.
- Chassin Y, Kapri-Pardes E, Sinvany G, Arad T, Adam Z (2002) Expression and characterization of the thylakoid lumen protease DegP1 from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 130: 857-864.
- Chen J, Burke JJ, Velten J, Xin Z (2006) FtsH11 plays a critical role in *Arabidopsis* thermotolerance. *Plant J* 48: 73-84.

- Chen M, Choi YD, Voytas D, Rodermeil S (2000) Mutations in the Arabidopsis VAR2 locus causes leaf variegation due to the loss of a chloroplastic FtsH protease. *Plant J* 22: 303-313.
- Chien JC, Sussex LM (1996) Differential regulation of trichome formation on the adaxial leaf surface by gibberellins and photoperiod in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiol* 111: 1321-1328.
- Cho HT, Cosgrove DJ (2002) Regulation of root hair initiation and expansin gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: 3237-3253.
- Chuang HW, Zhang W, Gray WM (2004) Arabidopsis ETA2, an apparent ortholog of the human cullin-interacting protein CAND1, is required for auxin responses mediated by the SCFTIR1 ubiquitin ligase. *Plant Cell* 16: 1883-1897.
- Ciechanover A, Orian A, Schwartz AL (2000). Ubiquitin-mediated proteolysis: Biological regulation via destruction. *BioEssays* 22: 442-451.
- Citovsky V, Kozlovsky SV, Lacroix B, Zaltsman A, Dafny-Yelin M, Vyas S, Tovkach A, Tzfira T (2007) Biological systems of the host cell involved in *Agrobacterium* infection. *Cell Microbiol* 9: 9-20.
- Clarke AK (1999) ATP-dependent Clp protease in photosynthetic organisms - A cut above the rest! *Ann Bot* 83: 593-599.
- Cookson SJ, Chenu K, Granier C (2007) Day-length affects the dynamics of leaf expansion and cellular development in *Arabidopsis thaliana* partially through floral transition timing. *Ann Bot* 99: 703-711.
- Croce R, van Amerongen H (2011) Light-harvesting and structural organization of Photosystem II: from individual complexes to thylakoid membrane. *J Photochem Photobiol B Biol* 104: 142-153.
- Davière JM, Achard P (2013) Gibberellin signaling in plants. *Development* 140:1147-1151.
- Dessi P, Rudhe C, Glaser E (2000) Studies on the topology of the protein import channel in relation to the plant mitochondrial processing peptidase integrated into the cytochrome bc1 complex. *Plant J* 24: 637-644.
- Dougan DA, Reid BG, Horwich AL, Bukau B (2002) ClpS, a substrate modulator of the ClpAP machine. *Mol Cell* 9: 673-683.
- Dougan DA, Truscott KN, Zeth K (2010) The bacterial N-end rule pathway: expect the unexpected. *Mol Microbiol* 76: 545-558.

Dunahay T, Staehelin LA, Seibert M, Ogilvie PD, Berg SP (1984) Structural, biochemical and biophysical characterization of four oxygen evolving Photosystem II preparations from spinach. *Biochim Biophys Acta* 764: 179-193.

Erez E, Fass D, Bibi E (2009) How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane. *Nature* 459 :371-378.

Eriksson AC, Glaser E (1992) Mitochondrial processing proteinase: a general processing proteinase of spinach leaf mitochondria is a membrane-bound enzyme. *Biochim Biophys Acta* 1140: 208-214.

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

Ferro M, Brugière S, Salvi D, Seigneurin-Berny D, Court M, Moyet L, Ramus C, Miras S, Mellal M, Le Gall S, Kieffer-Jaquinod S, Bruley C, Garin J, Joyard J, Masselon C, Rolland N (2010) AT CHLORO, a comprehensive chloroplast proteome database with subplastidial localization and curated information on envelope proteins. *Mol Cell Proteomics* 9: 1063-1084.

Förster A, Masters EI, Whitby FG, Robinson H, Hill CP (2005) The 1.9 Å Structure of a Proteasome-11S Activator Complex and Implications for Proteasome-PAN/PA700 Interactions. *Mol Cell* 18: 589-599.

Fredeen AL, Rao IM, Terry N (1989) Influence of Phosphorus Nutrition on Growth and Carbon Partitioning in Glycine max. *Plant Physiol* 89: 225-230.

Freeman M (2008) Rhomboid proteases and their biological functions. *Annu Rev Genet* 42: 191-210.

Gakh O, Cavadini P, Isaya G (2002) Mitochondrial processing peptidases. *Biochim Biophys Acta* 1592: 63-77.

Gandikota M, Birkenbihl RP, Höhmann S, Cardon GH, Saedler H, Huijser P (2007) The miRNA156/157 recognition element in the 3'UTR of the *Arabidopsis* SBP box gene *SPL3* prevents early flowering by translational inhibition in seedlings. *Plant J* 49: 683-693.

Garcia-Lorenzo M, Želisko A, Jackowski G, Funk C (2005) Degradation of the main photosystem II light-harvesting complex. *Photochem Photobiol Sci* 4: 1065-1071.

Gelvin SB (2003) *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the 'gene-jockeying' tool. *Microbiol Mol Biol Rev* 67: 16-37.

Gelvin SB (2009) *Agrobacterium* in the genomics age. *Plant Physiol* 150: 1665-1676.

- Gibala M, Kicia M, Sakamoto W, Gola EM, Kubrakiewicz J, Smakowska E, Janska H (2009) The lack of mitochondrial AtFtsH4 protease alters *Arabidopsis* leaf morphology at the late stage of rosette development under short-day photoperiod. *Plant J* 59: 685-699.
- Gibasiewicz K, Adamiec M, Luciński R, Giera W, Chełminiak P, Szewczyk S, Sipińska W, Głów E, Karolczak J, van Grondelle R, Jackowski G (2015) Monte Carlo simulations of excitation and electron transfer in grana membranes. *Biochim Biophys Acta* 1848: 314-327.
- Glaser E, Dessi P (1999) Integration of the mitochondrial processing peptidase into the cytochrome bc1 complex in plants. *J Bioenerg Biomembr* 31: 259-274.
- Glaser E, Nilsson S, Bhushan S (2006) Two novel mitochondrial and chloroplastic targeting-peptidodegrading peptidasomes in *A. thaliana*, AtPreP1 and AtPreP2. *Biol Chem* 387: 1441-1447.
- Glaser E, Sjöling S, Tanudji M, Whelan J (1998) Mitochondrial protein import in plants. Signals, sorting, targeting, processing and regulation. *Plant Mol Biol* 38: 311-338.
- Gottesman S, Roche E, Zhou Y, Sauer RT (1998) The ClpXP and ClpAP proteases degrade proteins with carboxyl-terminal peptide tails added by the SsrA-tagging system. *Genes Dev* 12:1338-1347.
- Granier C, Aguirrezabal L, Chenu K, Cookson SJ, Dauzat M, Hamard P, Thioux JJ, Rolland G, Bouchier-Combaud S, Lebaudy A, Muller B, Simonneau T, Tardieu F (2006) PHENOPSIS, an automated platform for reproducible phenotyping of plant responses to soil water deficit in *Arabidopsis thaliana* permitted the identification of an accession with low sensitivity to soil water deficit. *New Phytol* 169: 623-635.
- Grimaud R, Kessel L, Beuron F, Steve AC, Maurizi MR (1998) Enzymatic and structural similarities between the *Escherichia coli* ATP-dependent proteases. ClpXP and ClpAP. *J Biol Chem* 273: 12476-12481.
- Halperin T, Zheng B, Itzhaki H, Clarke AK, Adam Z (2001) Plant mitochondria contain proteolytic and regulatory subunits of the ATP-dependent Clp protease. *Plant Mol Biol* 45: 461-468.
- Harris BZ, Lim WA (2001) Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *J Cell Sci* 114: 3219-3231.
- Hartley BS (1960) Proteolytic enzymes. *Annu Rev Biochem* 29: 45-72.
- Hattendorf DA, Lindquist SI (2002) Analysis of the AAA sensor-2 motif in the C-terminal ATPase domain of Hsp104 with a site-specific fluorescent probe of nucleotide binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 2732-2737.

- Haussühl K, Andersson B, Adamska I (2001) A chloroplast DegP2 protease performs the primary cleavage of the photodamaged D1 protein in plant photosystem II. *EMBO J* 20: 713-722.
- Hedstrom L (2002) Serine protease mechanism and specificity. *Chem Rev* 102: 4501-4524.
- Heinemeyer W, Fischer M, Krimmer T, Stachon U, Wolf DH (1997) The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *J Biol Chem* 272: 25200-25209.
- Herman C, Thevenet D, Bouloc P, Walker GC, D'Ari R (1998) Degradation of carboxyterminal- targeted cytoplasmic proteins by the *Escherichia coli* protease HflB (FtsH). *Genes Dev* 12: 1348-1355.
- Hiscox JD, Israelstam GF (1979) A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Can J Bot* 57: 1332-1334.
- Hogewoning SW, Wientjes E, Douwstra P, Trouwborst G, van Ieperen W, Croce R, Harbinson J (2012) Photosynthetic quantum yield dynamics: from photosystems to leaves. *Plant Cell* 24: 1921-1935.
- Horie Y, Ito H, Kusaba M, Tanaka R, Tanaka A (2009) Participation of chlorophyll *b* reductase in the initial step of the degradation of light-harvesting chlorophyll *a/b*-protein complexes in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 284: 17449-17456.
- Horwich AL, Weber-Ban EU (1999) Chaperone rings in protein folding and degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 11033-11040.
- Huang S, Taylor NL, Whelan J, Millar AH (2009) Refining the definition of plant mitochondrial presequences through analysis of sorting signals, N-terminal modifications, and cleavage motifs. *Plant Physiol* 150: 1272-1285.
- Huesgen PF, Schuhmann H, Adamska I (2005) The family of Deg proteases in cyanobacteria and chloroplast of higher plants. *Physiol Plant* 123: 413-420.
- Huesgen PF, Schuhmann H, Adamska I (2006) Photodamaged D1 protein is degraded in *Arabidopsis* mutants lacking the Deg2 protease. *FEBS Lett* 580: 6929-6932.
- Huijser P, Schmid M (2011) The control of developmental phase transitions in plants. *Development* 138: 4117-4129.
- Hwang HH, Wang MH, Lee YL, Tsai YL, Li YH, Yang FJ, Liao YC, Lin SK, Lai EM (2010) *Agrobacterium*-produced and exogenous cytokinin-modulated *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Mol Plant Pathol* 11: 677-690.

- Imai A, Matsuyama T, Hanzawa Y, Akiyama T, Tamaoki M, Saji H, Shirano Y, Kato T, Hayashi H, Shibata D, Tabata S, Komeda Y, Takahashi T (2004) Spermidine synthase genes are essential for survival of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 135: 1565-1573.
- Ivessa NE, Kitzmüller C, de Virgilio M (1999) Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation inside and outside of the endoplasmic reticulum. *Protoplasma* 207: 16-23.
- Jackowski G, Jansson S (1998) Characterization of photosystem II antenna complexes separated by non-denaturing isoelectric focusing. *Z Naturforschung C* 53: 841-848.
- Jackowski G, Kacprzak K, Jansson S (2001) Identification of Lhcb1/Lhcb2/Lhcb3 heterotrimers of the main light-harvesting chlorophyll *a/b*-protein complex of photosystem II (LHCII). *Biochim Biophys Acta* 1504: 340-345.
- Jadhav T, Wooten MW (2009) Defining an embedded code for protein ubiquitination. *J Proteomics Bioinform* 2: 316-333.
- Janska H (2005) ATP-dependent proteases in plant mitochondria: what do we know about them today? *Physiol Plant* 123: 399-405.
- Jansson S (1994) The light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1184:1-19.
- Jiang J, Zhang X, Chen Y, Wu Y, Zhou ZH, Chang Z, Sui SF (2008) Activation of DegP chaperone-protease via formation of large cage-like oligomers upon binding to substrate proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 11939-11944.
- Jiang WB, Lin WH (2013) Brassinosteroid functions in *Arabidopsis* seed development. *Plant Signal Behav* 8: 25928.
- Jofuku KD, Omidyar PK, Gee Z, Okamura JK (2005) Control of seed mass and seed yield by the floral homeotic gene *APETALA2*. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 3117-3122.
- Johnson KA, Bhushan S, Ståhl A, Hallberg BM, Frohn A, Glaser E, Eneqvist T (2006) The closed structure of presequence protease PreP forms a unique 10 000 Å³ chamber for proteolysis. *EMBO J* 25: 1977-1986.
- Jones CH, Danese PN, Pinkner JS, Silhavy TJ, Hultgren SJ (1997) The chaperone-assisted membrane release and folding pathway is sensed by two signal transduction systems. *EMBO J* 16: 6394-6406.
- Jones MA, Raymond MJ, Smirnov N (2006) Analysis of the root hair morphogenesis transcriptome reveals the molecular identity of six genes with roles in root-hair development in *Arabidopsis*. *Plant J* 45: 83-100.

Jung JH, Seo YH, Seo PJ, Reyes JL, Yun J, Chua NH, Park CM (2007) The GIGANTEA-regulated microRNA172 mediates photoperiodic flowering independent of CONSTANS in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 2736-2748.

Jung S (2004) Variation in antioxidant metabolism of young and mature leaves of *Arabidopsis thaliana* subjected to drought. *Plant Science* 166: 459-466.

Kalousek F, Neupert W, Omura T, Schatz G, Schmitz UK (1993) Uniform nomenclature for the mitochondrial peptidases cleaving precursors of mitochondrial proteins. *Trends Biochem Sci* 18: 249.

Kang IH, Steffen JG, Portereiko MF, Lloyd A, Drews GN (2008) The AGL62 MADS domain protein regulates cellularization during endosperm development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20: 635-647.

Kapri-Pardes E, Naveh L, Adam Z (2007) The thylakoid lumen protease Deg1 is involved in the repair of photosystem II from photoinhibition in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 1039-1047.

Käser M, Langer T (2000) Protein degradation in mitochondria. *Semin Cell Dev Biol* 11: 181-190.

Kato Y, Miura E, Matsushima R, Sakamoto W (2007) White leaf sectors in *yellow variegated2* are formed by viable cells with undifferentiated plastids. *Plant Physiol* 144: 952-960.

Keiler KC, Sauer RT (1996) Sequence determinants of C-terminal substrate recognition by the Tsp protease. *J Biol Chem* 271: 2589-2593.

Kicia M, Gola EM, Janska H (2010) Mitochondrial protease AtFtsH4 protects ageing *Arabidopsis* rosettes against oxidative damage under short-day photoperiod. *Plant Signal Behav* 5: 126-128.

Kihara A, Akiyama Y, Ito K (1999) Dislocation of membrane proteins in FtsH-mediated proteolysis. *EMBO J* 18: 2970-2981.

Kikuchi M, Hatano N, Yokota S, Shimosawa N, Imanaka T, Taniguchi H (2004) Proteomic analysis of rat liver peroxisome: presence of peroxisome-specific isozyme of Lon protease. *J Biol Chem* 279: 421-428.

Kim J, Olinares PD, Oh SH, Ghisaura S, Poliakov A, Ponnala L, van Wijk KJ (2013) Modified Clp protease complex in the ClpP3 null mutant and consequences for chloroplast development and function in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 162: 157-179.

Kim J, Rudella A, Ramirez Rodriguez V, Zybailov B, Olinares PD, van Wijk KJ (2009) Subunits of the Plastid ClpPR Protease Complex Have Differential Contributions to

Embryogenesis, Plastid Biogenesis, and Plant Development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21: 1669-1692.

Kincaid DT, Schneider RB (1983) Quantification of leaf shape with a microcomputer and Fourier transform. *Can J Bot* 61: 2333-2342.

Klein J, Saedler H, Huijser P (1996) A new family of DNA binding proteins includes putative transcriptional regulators of the *Antirrhinum majus* floral meristem identity gene *SQUAMOSA*. *Mol Gen Genet* 250: 7-16.

Kley J, Schmidt B, Boyanov B, Stolt-Bergner PC, Kirk R, Ehrmann M, Knopf RR, Naveh L, Adam Z, Clausen T (2011) Structural adaptation of plant protease Deg1 enables repair of photosystem II during light exposure. *Nat Struct Mol Biol* 18: 728-731.

Kmiec-Wisniewska B, Krumpke K, Urantowka A, Sakamoto W, Pratje E, Janska H (2008) Plant mitochondrial rhomboid, AtRBL12, has different substrate specificity from its yeast counterpart. *Plant Mol Biol* 68: 159-171.

Kolodziejczak M, Gibala M, Urantowka A, Janska H (2007) The significance of *Arabidopsis* AAA proteases for activity and assembly/stability of mitochondrial OXPHOS complexes. *Physiol Plant* 129: 135-142.

Kolodziejczak M, Kolaczowska A, Szczesny, Urantowka, Knorpp C, Kieleczawa J, Janska H (2002) A higher plant mitochondrial homologue of the yeast mAAA protease. Molecular cloning, localization, and putative function. *J Biol Chem* 277: 43792-43798.

Koppen M, Langer T (2007) Protein degradation within mitochondria: versatile activities of AAA proteases and other peptidases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 42: 221-242.

Kouřil R, Wientjes E, Bultema JB, Croce R, Boekema EJ (2013) High-light vs. low-light: effect of light acclimation on Photosystem II composition and organization in *Arabidopsis thaliana*. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 1827: 411-419.

Koussevitzky S, Stanne TM, Peto CA, Giap T, Sjögren LL, Zhao Y, Clarke AK, Chory J (2007) An *Arabidopsis thaliana* virescent mutant reveals a role for ClpR1 in plastid development. *Plant Mol Biol* 63: 85-96.

Kovacheva S, Bedard J, Patel R, Dudley P, Twell D, Rios G, Koncz C, Jarvis P (2005) *In vivo* studies on the roles of Tic110, Tic40 and Hsp93 during chloroplast protein import. *Plant J* 41: 412-428.

Kovacs L, Damkjaer J, Kereiche S, Illoaia C, Ruban AV, Boekema EJ, Jansson S, Horton P (2006) Lack of the light-harvesting complex CP24 affects the structure and function of the grana membranes of higher plant chloroplasts. *Plant Cell* 18: 3106-3120.

- Kress W, Maglica Z, Weber-Ban E (2009) Clp chaperone-proteases: structure and function. *Res Microbiol* 160: 618-628.
- Krojer T, Garrido-Franco M, Huber R, Ehrmann M, Clausen T (2002) Crystal structure of DegP (HtrA) reveals a new protease-chaperone machine. *Nature* 416: 455-459.
- Krojer T, Pangerl K, Kurt J, Sawa J, Stingl C, Mechtler K, Huber R, Ehrmann M (2008) Interplay of PDZ and protease domain of DegP ensures efficient elimination of misfolded proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 7702-7707.
- Krysan PJ, Young JC, Sussman MR (1999) T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 11: 2283-2290.
- Krzywda S, Brzozowski AM, Verma C, Karata K, Ogura T, Wilkinson A (2002) The crystal structure of the AAA domain of the ATP-dependent protease FtsH of *Escherichia coli* at 1.5Å resolution. *Structure* 10: 1073-1083.
- Külheim C, Agren J, Jansson S (2002) Rapid regulation of light harvesting and plant fitness in the field. *Science* 297: 91-93.
- Kurochkin IV, Mizuno Y, Konagaya A, Sakaki Y, Schönbach C, Okazaki Y (2007) Novel peroxisomal protease Tysnd1 processes PTS1- and PTS2-containing enzymes involved in β -oxidation of fatty acids. *EMBO J* 26: 835-845.
- Kuroda H, Maliga P (2003) The plastid clpP1 protease gene is essential for plant development, *Nature* 425: 86–89.
- Kusaba M, Ito H, Morita R, Iida S, Sato Y, Fujimoto M, Kawasaki S, Tanaka R, Hirochika H, Nishimura M, Tanaka A (2007) Rice NON-YELLOW COLORING1 is involved in light-harvesting complex II and grana degradation during leaf senescence. *Plant Cell* 19: 1362-75.
- Kwasniak M, Pogorzelec L, Migdal I, Smakowska E, Janska H (2012) Proteolytic system of plant mitochondria. *Physiol Plant* 145: 187-195.
- Lacroix B, Li J, Tzfira T, Citovsky V (2006) Will you let me use your nucleus? How *Agrobacterium* gets its T-DNA expressed in the host plant cell. *Can J Physiol Pharmacol* 84: 333-345.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lancashire PD, Bleiholder H, van den Boom T, Langeluddeke P, Stausss R, Weber E, Witzenberger A (1991) A uniform decimal code for growth stages of crops and weeds, *Ann Appl Biol* 119: 561-601.

- Lee J, Giordano S, Zhang J (2012) Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *Biochem J* 441: 523-540.
- Lee LY, Gelvin SB (2008) T-DNA binary vectors and systems. *Plant Physiol* 146: 325-332.
- Lee U, Riolfido I, Hong SW, Larkindale J, Waters E, Vierling E (2007) The *Arabidopsis* ClpB/Hsp100 family of proteins: chaperones for stress and chloroplast development. *Plant J* 49: 115-127.
- Lee U, Wie C, Escobar M, Williams B, Hong SW, Vierling E (2005) Genetic analyses reveals domain interactions of *Arabidopsis* Hsp/ClpB and cooperation with the sHsp chaperone system. *Plant Cell* 17: 559-571.
- Levchenko I, Seidel M, Sauer RT, Baker TA (2000) A specificity-enhancing factor for the ClpXP degradation machine. *Science* 289:2354-2356.
- Levine B, Klionsky DJ (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 6: 463-77.
- Liljegren SJ, Ditta GS, Eshed Y, Savidge B, Bowman JL, Yanofsky MF (2000) *SHATTERPROOF MADS*-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis*. *Nature* 404: 766-770.
- Liljegren SJ, Gustafson-Brown C, Pinyopich A, Ditta GS, Yanofsky MF (1999) Interactions among *APETALA1*, *LEAFY*, and *TERMINAL FLOWER1* specify meristem fate. *Plant Cell* 11: 1007-1018.
- Liljegren SJ, Roeder AH, Kempin SA, Gremski K, Østergaard L, Guimil S, Reyes DK, Yanofsky MF (2004) Control of fruit patterning in *Arabidopsis* by *INDEHISCENT*. *Cell* 116: 843-853.
- Lindahl M, Spetea C, Hundal T, Oppenheim AB, Adam Z, Andersson B (2000) The thylakoid FtsH protease plays a role in the light-induced turnover of the photosystem II D1 protein. *Plant Cell* 12: 419-431.
- Lipinska B, Fayet O, Baird L, Georgopoulos C (1989) Identification, characterization, and mapping of the *Escherichia coli* *htrA* gene, whose product is essential for bacterial growth only at elevated temperatures. *J Bacteriol* 171: 1574-1584.
- Liu C, Teo ZWN, Bi Y, Song S, Xi W, Yang X, Yin Z, Yu H (2013) A conserved genetic pathway determines inflorescence architecture in *Arabidopsis* and rice. *Dev Cell* 24: 612-622.
- Liu X, Jagendorf A (1984) ATP-dependent proteolysis in pea chloroplasts. *FEBS Lett* 166: 248-252.
- Liu X, Jagendorf A (1986) Neutral peptidases in the stroma of pea chloroplasts. *Plant Physiol* 81: 603-608.

- Long SP, Bernacchi CJ (2003) Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error. *J Exp Bot* 54: 2393-2401.
- de Lucas M, Davière JM, Rodríguez-Falcón M, Pontin M, Iglesias-Pedraz JM, Lorrain S, Fankhauser C, Blázquez MA, Titarenko E, Prat S (2008) A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature* 451: 480-4.
- Luciński R, Jackowski G (2013) AtFtsH heterocomplex-mediated degradation of apoproteins of the major light harvesting complex of photosystem II (LHCII) in response to stresses. *J Plant Phys* 170: 1082-1089.
- Luciński R, Misztal L, Samardakiewicz S, Jackowski G (2011a) Involvement of Deg5 protease in wounding-related disposal of PsbF apoprotein. *Plant Physiol Biochem* 49: 311-320.
- Luciński R, Misztal L, Samardakiewicz S, Jackowski G (2011b) The thylakoid protease Deg2 is involved in stress-related degradation of the photosystem II light-harvesting protein Lhcb6 in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 192: 74-86.
- Luo M, Dennis ES, Berger F, Peacock WJ, Chaudhury A (2005) *MINISEED3 (MINI3)*, a *WRKY* family gene, and *HAIKU2 (IKU2)*, a leucine-rich repeat (*LRR*) *KINASE* gene, are regulators of seed size in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 17531-17536.
- Martinez-Zapater JM (1993) Genetic analysis of variegated mutants in *Arabidopsis*. *J Hered* 84: 138-140.
- 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 (2010) Probing the reproducibility of leaf growth and molecular phenotypes: a comparison of three *Arabidopsis* accessions cultivated in ten laboratories. *Plant Physiol* 152: 2142-2157.
- Mathieu J, Yant LJ, Murdter F, Kuttner F, Schmid M (2009) Repression of flowering by the miR172 target SMZ. *PLoS Biol* 7:1000148.
- McCall KA, Huang CC, Fierke CA (2000) Function and Mechanism of Zinc Metalloenzymes. *J Nutr* 130: 1437S-1446S.
- McCullen CA, Binns AN (2006) *Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 101-127.

- Miesak BH, Coruzzi GM (2002) Molecular and physiological analysis of *Arabidopsis* mutants defective in cytosolic or chloroplastic aspartate aminotransferase. *Plant Physiol* 129: 650-660.
- Millar AH, Sweetlove LJ, Giegé P, Leaver CJ (2001) Analysis of the *Arabidopsis* mitochondrial proteome. *Plant Physiol* 127: 1711-1727.
- Moberg P, Ståhl A, Bhushan S, Wright SJ, Eriksson A, Bruce BD, Glaser E (2003) Characterization of a novel zinc metalloprotease involved in degrading targeting peptides in mitochondria and chloroplasts. *Plant J* 36: 616-628.
- Mogk A, Haslberger T, Tessarz P, Bukau B (2008) Common and specific mechanisms of AAA+ proteins involved in protein quality control. *Biochem Soc Trans* 36: 120-125.
- Müntz K (2007) Protein dynamics and proteolysis in plant vacuoles. *J Exp Biol* 58: 2391-2407.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.
- Myouga F, Motohashi R, Kuromori T, Nagata N, Shinozaki K (2006) An *Arabidopsis* chloroplast-targeted Hsp101 homologue, APG6, has an essential role in chloroplast development as well as heat-stress response. *Plant J* 48: 249-260.
- Nakabayashi K, Ito M, Kiosue T, Shinozaki K, Watanabe A (1999). Identification of clp genes expressed in senescing *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell Physiol* 40: 504-514.
- Nakashima K, Kiyosue T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1997) A nuclear gene, *erd1*, encoding a chloroplast-targeted Clp protease regulatory subunit homolog is not only induced by water stress but also developmentally up-regulated during senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 12: 851-861.
- Narberhaus F, Obrist M, Fuhrer F, Langklotz S (2009) Degradation of cytoplasmic substrates by FtsH, a membrane- anchored protease with many talents. *Res Microbiol* 160: 652-659.
- Nishii W, Maruyama T, Matsuoka R, Muramatsu T, Takahashi K (2002) The unique sites in SulA protein preferentially cleaved by ATP-dependent Lon protease from *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 269: 451-457.
- Nishimura K, Asakura Y, Friso G, Kim J, Oh SH, Rutschow H, Ponnala L, van Wijk KJ (2013) Clps1 is a conserved substrate selector for the chloroplast Clp protease system in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25: 2276-2301.
- Nishimura K, van Wijk KJ (2014) Organization, function and substrates of the essential Clp protease system in plants. *Biochim Biophys Acta pii: S0005-2728(14)00657-4*.

- O'Malley R, Ecker J (2010) Linking genotype to phenotype using the *Arabidopsis* unimutant collection. *Plant J* 61: 928-940.
- Ögren E (1993) Convexity of the photosynthetic light-response curve in relation to intensity and direction of light during growth. *Plant Physiol* 101: 1013-1019.
- Ögren E, Evans JR (1993) Photosynthetic light response curves. 1. The influence of CO₂ partial pressure and leaf inversion. *Planta* 189, 182-190.
- Ohto MA, Fischer RL, Goldberg RB, Nakamura K, Harada JJ (2005) Control of seed mass by *APETALA2*. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 3123-3128.
- Ohto MA, Floyd SK, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ (2009) Effects of *APETALA2* on embryo, endosperm, and seed coat development determine seed size in *Arabidopsis*. *Sex Plant Reprod* 22: 277-289.
- Olinares PD, Kim K, Davis JI, van Wijk KJ (2011a) Subunit stoichiometry, evolution, and functional implications of an asymmetric plant plastid ClpP/R protease complex in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23: 2348-2361.
- Olinares PD, Kim J, van Wijk KJ (2011b) The Clp protease system; a central component of the chloroplast protease network. *Biochim Biophys Acta* 1807: 999-1011.
- Ostersetzer O, Kato Y, Adam Z, Sakamoto W (2007) Multiple intracellular locations of Lon protease in *Arabidopsis*: evidence for the localization of AtLon4 to chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 48: 881-885.
- Otto HH, Schirmeister T (1997) Cysteine proteases and their inhibitors. *Chem Rev* 97: 133-171.
- Packer L, Siegenthaler PA (1965) Light-dependent volume changes and reactions in chloroplasts. II. Action of nions. *Plant Physiol* 40: 1080-1085.
- Paila YD, Richardson LG, Schnell DJ (2014) New insights into the mechanism of chloroplast protein import and its integration with protein quality control, organelle biogenesis and development. *J Mol Biol* pii: S0022-2836(14)00459-8.
- Pallen MJ, Wren BW (1997) The HtrA family of serine proteases. *Mol Microbiol* 26: 209-221.
- Parinov S, Sevugan M, Ye D, Yang W, Kumaran M, Sundaresan V (1999) Analysis of flanking sequences from *Dissociation* insertion lines: A database for reverse genetics in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 11: 2263-2270.

- Parinov S, Sundaresan V (2000) Functional genomics in *Arabidopsis*: Large-scale insertional mutagenesis complements the genome sequencing project. *Curr Opin Biotechnol* 11: 157-161.
- Park S, Rodermel SR (2004) Mutations in ClpC2/Hsp100 suppress the requirement for FtsH in thylakoid membrane biogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 12765-12770.
- Peacock AC, Dingman CW (1968) Molecular weight estimation and separation of ribonucleic acid by electrophoresis in agarose-acrylamide composite gels. *Biochemistry* 7: 668-674.
- Pelaz S, Ditta GS, Baumann E, Wisman E, Yanofsky MF (2000) B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes. *Nature* 405:200-203.
- Peltier JB, Ytterberg J, Liberles DA, Roepstorff P, van Wijk KJ (2001) Identification of a 350 kDa ClpP and protease complex with 10 different Clp isoforms in chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 276: 16318-16327.
- Pesquet E (2012) Plant proteases - from detection to function. *Physiol Plant* 145: 1-4.
- Piechota J, Kolodziejczak M, Janska H (2008) Prohibitins and *m*-AAA proteases form a 2 MDa supercomplex in plant mitochondria. *FEBS J* 275: 227-227 PP3-64.
- Piechota J, Kolodziejczak M, Juszczak I, Sakamoto W, Janska H (2010) Identification and characterization of high molecular weight complexes formed by matrix AAA proteases and prohibitins in mitochondria of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 285: 12512-12521.
- Pien S, Grossniklaus U (2007) Polycomb group and trithorax group proteins in *Arabidopsis*. *Biochim Biophys Acta* 1769: 375-382.
- Pitzschke A, Hirt H (2010) New insights into an old story: *Agrobacterium* induced tumour formation in plants by plant transformation. *EMBO J* 29:1021-1032.
- Polgár L (2005) The catalytic triad of serine peptidases. *Cell Mol Life Sci* 62: 2161-2172.
- Portereiko MF, Lloyd A, Steffen JG, Punwani JA, Otsuga D, Drews GN (2006) AGL80 is required for central cell and endosperm development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 1862-1872.
- Rajani S, Sundaresan V (2001) The *Arabidopsis* myc/bHLH gene *ALCATRAZ* enables cell separation in fruit dehiscence. *Curr Biol* 11: 1914-1922.
- Rapoport T A, Jungnickel B, Kutay U (1996) Protein transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes. *Annu Rev Biochem* 65: 271-303.

- Ratcliffe OJ, Amaya I, Vincent CA, Rothstein S, Carpenter R, Coen ES, Bradley DJ (1998) A common mechanism controls the life cycle and architecture of plants. *Development* 125: 1609-1615.
- Ratcliffe OJ, Bradley DJ, Coen ES (1999) Separation of shoot and floral identity in *Arabidopsis*. *Development* 126: 1109-1120.
- Rawlings ND, Barrett AJ (1993) Evolutionary families of peptidases. *Biochem J* 290: 205-218.
- Rigas S, Daras G, Laxa M, Marathias N, Fasseas C, Sweetlove LJ, Hatzopoulos P (2009a) Role of Lon1 protease in post-germinative growth and maintenance of mitochondrial function in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 181: 588-600.
- Rigas S, Daras G, Sweetlove LJ, Hatzopoulos P (2009b) Mitochondria biogenesis via Lon1 selective proteolysis: who dares to live for ever? *Plant Signal Behav* 4:221-224.
- Robertus JD, Kraut J, Alden RA, Birktoft JJ (1972) Subtilisin; a stereochemical mechanism involving transition-state stabilization. *Biochemistry* 11: 4293-4303.
- Rock CD, Bowlby NR, Hoffmann-Benning S, Zeevaart JA (1992) The *aba* mutant of *Arabidopsis thaliana* (l.) Heynh. has reduced chlorophyll fluorescence yields and reduced thylakoid stacking. *Plant Physiol* 100: 1796-1801.
- Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D, Goldberg AL (1994) Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class 1 molecules. *Cell* 78: 761-771.
- Rotanova TV, Melnikov EE, Tsurulnikov KB (2003) A catalytic Ser-Lys dyad in the active site of the ATP-dependent Lon protease from *Escherichia coli*. *Bioorg Khim* 20: 114-125.
- Rudella A, Friso G, Alonso JM, Ecker JR, van Wijk KJ (2006) Downregulation of ClpR2 leads to reduced accumulation of the ClpPs protease complex and defects in chloroplast biogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 1704-1721.
- Sakamoto W (2003) Leaf-variegated mutations and their responsible genes in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Genet Syst* 78: 1-9.
- Sakamoto W, Tamura T, Hanba-Tomita Y, Sodmergen, Murata M (2002) The *VAR1* locus of *Arabidopsis* encodes a chloroplastic FtsH and is responsible for leaf variegation in the mutant alleles. *Genes to Cells* 7: 769-780.
- Sakamoto W, Zaltsman A, Adam Z, Takahashi Y (2003) Coordinated regulation of 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* 15: 2843-2855.

- Sarria R, Janska H, Arrieta-Montiel M, Lyznik A, Mackenzie SA (1999) Two nuclear directed means of suppressing a dominant mitochondrial mutation in common bean. *J Hered* 90: 357-361.
- Sarria R, Lyznik A, Vallejos CE, Mackenzie SA (1998) A cytoplasmic male sterility-associated mitochondrial peptide in common bean is post-translationally regulated. *Plant Cell* 10: 1217-1228.
- Sato H, Shibata F, Murata M (2005) Characterization of a Mis12 homologue in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosome Res* 13: 827-834.
- Schagger H (2006) Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc* 1: 16-22.
- Schaller A (2004) A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta* 220: 183-97.
- Schmid M, Davison TS, Henz SR, Pepe UJ, Demar M, Vingron M, Scholkopf B, Weigel D, Lomann JU (2005) A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat Genet* 37: 501-506.
- Schmid M, Uhlenhaut NH, Godard F, Demar M, Bressan R, Weigel D, Lohmann JU (2003) Dissection of floral induction pathways using global expression analysis. *Development* 130: 6001-6012.
- Schröder G, Waffenschmidt S, Weiler EW, Schröder J (1984) The T-region of Ti plasmids codes for an enzyme synthesizing indole-3-acetic acid. *Eur J Biochem* 138: 387-391.
- Schuhmann H, Adamska I (2012) Deg proteases and their role in protein quality control and processing in different subcellular compartments of the plant cell. *Physiol Plant* 145: 224-234.
- Schuhmann H, Huesgen PF, Adamska I (2012) The family of Deg/HtrA proteases in plants. *BMC Plant Biol* 12: 52.
- Schuhmann H, Huesgen PF, Gietl C, Adamska I (2008) The DEG15 serine protease cleaves peroxisomal targeting signal 2-containing proteins in Arabidopsis. *Plant Physiol* 148: 1847-1856.
- Schuhmann H, Mogg U, Adamska I (2011) A new principle of oligomerization of plant DEG7 protease based on interactions of degenerated protease domains. *Biochem J* 435: 167-174.
- Sharkey TD, Bernacchi CJ, Farquhar GD, Singsaas EL (2007) Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C3 leaves. *Plant Cell Environ* 30: 1035-1040.

Shimada T, Yamada K, Kataoka M, Nakaune S, Koumoto Y, Kuroyanagi M, Tabata S, Kato T, Shinozaki K, Seki M, Kobayashi M, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I (2003) Vacuolar processing enzymes are essential for proper processing of seed storage proteins in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 278: 32292-32299.

Shimoda N, Toyoda-Yamamoto A, Nagamine J, Usami S, Katayama M, Sakagami Y, Machida Y (1990) Control of expression of *Agrobacterium vir* genes by synergistic actions of phenolic signal molecules and monosaccharides. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 6684-6688.

Siegenthaler PA, Packer L (1965) Light-dependent volume changes and reactions in chloroplasts. I. Action of alkenylsuccinic acids and phenylmercuric acetate and possible relation to mechanisms of stomatal control. *Plant Physiol* 40: 785-791.

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

Sinvany-Villalobo G, Davydov O, Ben-Ari G, Zaltsman A, Raskind A, Adam Z (2004) Expression in multigene families. Analysis of chloroplast and mitochondria proteases. *Plant Physiol* 135: 1336-1345.

Sjögren LL, Tanabe N, Lymperopoulos P, Khan NZ, Rodermel 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.* 289 (2014) 11318–11330

Sjögren LLE, MacDonald TM, Sutinen S, Clarke AK (2004). 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* 136: 4114-4126.

Sjögren LLE, StanneTM, Zheng B, Sutinen S, Clarke AK (2006) Structural and Functional Insights into the Chloroplast ATP-Dependent Clp Protease in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 2635-2649.

Sjögren LLE, Clarke AK (2011) Assembly of the chloroplast ATP-dependent Clp protease in *Arabidopsis* is regulated by the ClpT accessory proteins. *Plant Cell* 23: 322-332.

Smith CK, Baker TA, Sauer RT (1999) Lon and Clp family proteases and chaperones share homologous substrate-recognition domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 6678-6682.

Smith DM, Chang SC, Park S, Finley D, ChengY, Goldberg AL (2007) Docking of the proteasomal ATPases' carboxyl termini in the 20S proteasome's alpha ring opens the gate for substrate entry. *Moll Cell* 27: 731-744.

Smith DM, Kafri G, Cheng Y, Ng D, Walz T, Goldberg AL (2005) ATP binding to PAN or the 26S ATPases causes association with the 20S proteasome, gate opening, and translocation of unfolded proteins. *Mol Cell* 20: 687-698.

Sokolenko A, Pojidaeva E, Zinchenko V, Panichkin V, Glaser VM, Herrmann RG, Shestakov SV (2002) The gene complement for proteolysis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Curr Genet* 41: 291-310.

Spetea C, Hundal T, Lohmann F, Andersson B (1999) GTP bound to chloroplast thylakoid membranes is required for light-induced, multienzyme degradation of the photosystem II D1 protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 339-347.

Speulman E, Metz PLJ, van Arkel G, te Lintel Hekkert B, Stiekema WJ, Pereira A (1999). A two component *Enhancer-Inhibitor* transposon mutagenesis system for functional analysis of the *Arabidopsis* genome. *Plant Cell* 11: 1853-1866.

Spiess C, Biel A, Ehrmann M (1999) A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell* 97: 339-347.

Spurr AR (1969) A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J Ultrastruc Res* 155: 400-408.

Ståhl A, Moberg P, Ytterberg J, Panfilov O, Brockenhuus Von Lowenhielm H, Nilsson F, Glaser E (2002) Isolation and identification of a novel mitochondrial metalloprotease (PreP) that degrades targeting presequences in plants. *J Biol Chem* 277: 41931-41939.

Ståhl A, Pavlov PF, Szigyarto C, Glaser E (2000) Rapid degradation of the presequence of the F1 β precursor of ATP synthase inside mitochondria. *Biochem J* 349: 703-707.

Stanne TM, Sjögren LLE, Koussevitzky S, Clarke AK (2009) Identification of new protein substrates for the chloroplast ATP-dependent Clp protease supports its constitutive role in *Arabidopsis*. *Biochem J* 417: 257-268.

Steffen JG, Kang I-H, Portereiko MF, Lloyd A, Drews GN (2008) AGL61 interacts with AGL80 and is required for central cell development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 148: 259-268.

Strauch KL, Johnson K, Beckwith J (1989) Characterization of degP, a gene required for proteolysis in the cell envelope and essential for growth of *Escherichia coli* at high temperature. *J Bacteriol* 171: 2689-2696.

Striebel F, Kress W, Weber-Ban E (2009) Controlled destruction: AAA+ ATPases in protein degradation from bacteria to eukaryotes. *Curr Opin Struct Biol* 19: 209-217.

- Stroher E, Dietz KJ (2008) The dynamic thiol-disulphide redox proteome of the *Arabidopsis thaliana* chloroplasts revealed by differential electrophoretic mobility. *Physiol Plant* 133: 566-583.
- Suguna K, Padlan EA, Smith CW, Carlson WD, Davies DR (1987) Binding of a reduced peptide inhibitor to the aspartic proteinase from *Rhizopus chinensis*: implications for a mechanism of action. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 7009-7013.
- Sun R, Fan H, Gao F, Lin Y, Zhang L, Gong W, Liu L (2012) Crystal structure of *Arabidopsis* Deg2 protein reveals an internal PDZ ligand locking the hexameric resting state. *J Biol Chem* 287: 37564-37569.
- Sun W, Gao F, Fan H, Shan X, Sun R, Liu L, Gong W (2013) The structures of *Arabidopsis* Deg5 and Deg8 reveal new insights into HtrA proteases. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 69: 830-837.
- Sun X, Fu T, Chen N, Guo J, Ma J, Zou M, Lu C, Zhang L (2010a) The stromal chloroplast Deg7 protease participates in the repair of photosystem II after photoinhibition in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 152: 1263-1273.
- Sun X, Ouyang M, Guo J, Ma J, Lu C, Adam Z, Zhang L (2010b) The thylakoid protease Deg1 is involved in photosystem-II assembly in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 62: 240-249.
- Sun X, Peng L, Guo J, Chi W, Ma J, Lu C, Zhang L (2007a) Formation of DEG5 and DEG8 complexes and their involvement in the degradation of photodamaged photosystem II reaction center D1 protein in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 1347-1361.
- Sun X, Wang L, Zhang L (2007b) Involvement of Deg5 and Deg8 proteases in the turnover of the photosystem II reaction center D1 protein under heat stress in *Arabidopsis thaliana*. *Chin Sci Bull* 52: 1742-1745.
- Sussman MR, Amasino RM, Young JC, Krysan PJ, Austin-Phillips S (2000) The *Arabidopsis* knockout facility at the University of Wisconsin-Madison. *Plant Physiol* 124: 1465-1467.
- Swinkels BW, Gould SJ, Bodnar AG, Rachubinski RA, Subramani S (1991) A novel, cleavable peroxisomal targeting signal at the amino-terminus of the rat 3-ketoacyl-CoA thiolase. *EMBO J* 10: 3255-3262.
- Takechi K, Sodmergen, Murata M, Motoyoshi F, Sakamoto W (2000) The *YELLOW VARIEGATED* (*VAR2*) locus encodes a homologue of FtsH, an ATP-dependent protease in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 41: 1334-1346.
- Tanaka Y, Sugano SS, Shimada T, Nishimura I (2013) Enhancement of leaf photosynthetic capacity through increased stomatal density in *Arabidopsis*. *New Phytol* 198: 757-764.

- Telfer A, Bollman KM, Poethig RS (1997) Phase change and the regulation of trichome distribution in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124: 645-654.
- Thompson AR, Doelling JH, Suttangkakul A, Vierstra RD (2005) Autophagic nutrient recycling in *Arabidopsis* directed by the ATG8 and ATG12 conjugation pathways. *Plant Physiol* 138: 2097-2110.
- Thompson AR, Vierstra RD (2005) Autophagic recycling: lessons from yeast help define the process in plants. *Curr Opin Plant Biol* 8: 165-173.
- Tisné S, Reymond M, Vile D, Fabre J, Dauzat M, Koornneef M, Granier C (2008) Combined genetic and modeling approaches reveal that epidermal cell area and number in leaves are controlled by leaf and plant developmental processes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 148: 1117-1127.
- Tisné S, Serrand Y, Bach L, Gilbault E, Ben Ameer R, Balasse H, Voisin R, Bouchez D, Durand-Tardif M, Guerche P, Chareyron G, Da Rugna J, Camilleri C, Loudet O (2013) Phenoscope: an automated large-scale phenotyping platform offering high spatial homogeneity. *Plant J* 74: 534-544.
- Tissier AF, Marillonnet S, Klimyuk V, Patel K, Torres MA, Murphy G, Jones JD (1999) Multiple independent defective *Suppressor-mutator* transposon insertions in *Arabidopsis*: A tool for functional genomics. *Plant Cell* 11: 1841-1852.
- Tobias JW, Shrader TE, Rocap G, Varshavsky Q (1991) The N-end rule in bacteria. *Science* 254: 1374-1377.
- Unverdorben P, Beck F, Śledź P, Schweitzer A, Pfeifer G, Plitzko JM, Baumeister W, Förster F (2014) Deep classification of a large cryo-EM dataset defines the conformational landscape of the 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 5544-5549.
- Urantowka A, Knorpp C, Olczak T, Kolodziejczak M, Janska H (2005) Plant mitochondria contain two *i*-AAA-like complexes. *Plant Mol Biol* 59: 239-252.
- van Oort B, van Hoek A, Ruban AV, van Amerongen H (2007) Aggregation of Light-Harvesting Complex II leads to formation of efficient excitation energy traps in monomeric and trimeric complexes. *FEBS Lett* 581: 3528-3532.
- Verelst W, Saedler H, Munster T (2007) MIKC* MADS-protein complexes bind motifs enriched in the proximal region of late pollen-specific *Arabidopsis* promoters. *Plant Physiol* 143: 447-460.
- Vierstra RD (2009) The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology. *Nature Rev* 10: 385-339.

- Voges D, Zwickl P, Baumeister W (1999) The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* 68: 1015-1068.
- Vögtle FN, Wortelkamp S, Zahedi RP, Becker D, Leidhold C, Gavaert K, Kellermann J, Voss W, Sickmann A, Pfanner N, Meisinger C (2009) Global analysis of the mitochondrial N-proteome identifies a processing peptidase critical for protein stability. *Cell* 139: 428-439.
- Wagner R, Aigner H, Pružinská A, Jänkänpää HJ, Jansson S, Funk C (2011) Fitness analyses of *Arabidopsis thaliana* mutants depleted of FtsH metalloproteases and characterization of three FtsH6 deletion mutants exposed to high light stress, senescence and chilling. *New Phytol* 191: 449-458.
- Walsh NP, Alba BM, Bose B, Gross CA, Saurer RT (2003) OMP peptide signals initiate the envelope-stress response by activating DegS protease via relief of inhibition mediated by its PDZ domain. *Cell* 113: 61-71.
- Wang A, Garcia D, Zhang H, Feng K, Chaudhury A, Berger F, Peacock WJ, Dennis ES, Luo M (2010) The VQ motif protein IKU1 regulates endosperm growth and seed size in *Arabidopsis*. *Plant J* 2010: 63:670-679.
- Wang H, Caruso LV, Downie AB, Perry SE (2004) The embryo MADS domain protein AGAMOUS-Like 15 directly regulates expression of a gene encoding an enzyme involved in gibberellin metabolism. *Plant Cell* 16: 1206-1219.
- Wang J W, Czech B, Weigel D (2009) miR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 138: 738-749.
- Wang J, Hartling JA, Flanagan JM (1997) The structure of ClpP at 2.3 Å resolution suggests a model for ATP-dependent proteolysis. *Cell* 91: 447-456.
- Wang KH, Sauer RT, Baker TA (2007) ClpS modulates but is not essential for bacterial N-end rule degradation. *Genes Dev* 21: 403-408.
- Wang YH (2008) How effective is T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*? *J Biochem Tech* 1: 11-20.
- Wientjes E, van Amerongen H, Croce R (2013) LHClI is an antenna of both photosystems after long-term acclimation. *Biochim Biophys Acta* 1827: 420-426.
- Wilken C, Kitzing K, Kurzbauer R, Ehrmann M, Clausen T (2004). Crystal structure of the DegS stress sensor: How a PDZ domain recognizes misfolded protein and activates a protease domain. *Cell* 117: 483-494.
- Winans SC, Kerstetter RA, Nester EW (1988) Transcriptional regulation of the *virA* and *virG* genes of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 170: 4047-4054.

- Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ (2007) An “Electronic Fluorescent Pictograph” Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. *PLoS One* 2: 718.
- Won KA, Reed SI (1996) Activation of cyclin E/CDK2 is coupled to site-specific autophosphorylation and ubiquitin-dependent degradation of cyclin. *E EMBO J* 15: 4182-4193.
- Wu G, Park MY, Conway SR, Wang JW, Weigel D, Poethig R S (2009) The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*. *Cell* 138: 750-759.
- Xiao W, Brown RC, Lemmon BE, Harada JJ, Goldberg RB, Fischer RL (2006) Regulation of seed size by hypomethylation of maternal and paternal genomes. *Plant Physiol* 142: 1160-1168.
- Xu S, Li J, Zhang X, Wei H, Cui L (2006) Effects of heat acclimation pretreatment on changes of membrane lipid peroxidation, antioxidant metabolites, and ultrastructure of chloroplasts in two cool-season turfgrass species under heat stress. *Environ Exp Bot* 56: 274-285.
- Yamamoto Y (2001) Quality control of photosystem II. *Plant Cell Physiol* 42: 121-128.
- Yant L, Mathieu J, Dinh TT, Ott F, Lanz C, Wollmann H, Chen X, Schmid M (2010) Orchestration of the floral transition and floral development in *Arabidopsis* by the bifunctional transcription factor APETALA2. *Plant Cell* 22: 2156-2170.
- Yoshida K, Watanabe C, Kato Y, Sakamoto W, Noguchi K (2008) Influence of chloroplastic photo-oxidative stress on mitochondrial alternative oxidase capacity and respiratory properties: a case study with *Arabidopsis yellow-variegated 2*. *Plant Cell Physiol* 49: 592-603.
- Yu F, Park S, Rodermel SR (2004) The *Arabidopsis* FtsH metalloprotease gene family: interchangeability of subunits in chloroplast oligomeric complexes. *Plant J* 37: 864-876.
- Yu F, Park S, Rodermel SR (2005) Functional redundancy of AtFtsH metalloproteases in thylakoid membrane complexes. *Plant Physiol* 138: 1957-1966.
- Zaltsman A, Feder A, Adam Z (2005a) Developmental and light effects on the accumulation of FtsH protease in *Arabidopsis* chloroplasts-implications for thylakoid formation and photosystem II maintenance. *Plant J* 42: 609-617.
- Zaltsman A, Ori N, Adam Z (2005b) Two types of FtsH protease subunits are required for chloroplast biogenesis and Photosystem II repair in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17: 2782-2790.

Zeeman SC, Northrop F, Smith AM, Rees T (1998) A starch-accumulating mutant of *Arabidopsis thaliana* deficient in a chloroplastic starch-hydrolysing enzyme. *Plant J* 15: 357-365.

Zhang R, Wise RR, Struck KR, Sharke TD (2010) Moderate heat stress of *Arabidopsis thaliana* leaves causes chloroplast swelling and plastoglobule formation. *PhotosynthRes* 105: 123-134.

Zheng B, Halperin T, Hruskova-Heidingsfeldova O, Adam Z, Clarke AK (2002) Characterization of chloroplast Clp proteins in *Arabidopsis*: localization, tissue specificity and stress responses. *Physiol Plant* 114: 92-101.

Zhou Y, Zhang X, Kang X, Zhao X, Zhang X, Ni M (2009) SHORT HYPOCOTYL UNDER BLUE1 associates with *MINISEED3* and *HAIKU2* promoters in vivo to regulate *Arabidopsis* seed development. *Plant Cell* 21: 106-117.

Zienkiewicz M, Ferenc A, Wasilewska W, Romanowska E (2012) High light stimulates Deg1-dependent cleavage of the minor LHCII antenna proteins CP26 and CP29 and the PsbS protein in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 235: 279-288.

Želisko A, Garcia-Lorenzo M, Jackowski G, Jansson S, Funk C (2005) AtFtsH6 is involved in the degradation of the light-harvesting complex II during high-light acclimation and senescence. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 13699-13704.