

Streszczenie

Kupiny stanowią dużą nadrodzinę wielofunkcyjnych białek występujących w organizmach wszystkich domen życia. Wśród kupin wyróżnić można m.in. białka ochronne, w tym antyoksydacyjne, białka zaangażowane w biosyntezę metabolitów wtórnych oraz fitohormonów, białka zapasowe, czynniki transkrypcyjne oraz białka związane ze strukturalnymi modyfikacjami ściany komórkowej. Nadrzędnym celem niniejszej pracy była charakterystyka wybranych przedstawicieli kupin roślinnych.

Jednym z białek badanych w prezentowanej pracy jest pochodzące z fakultatywnego halofitu - *Mesembryanthemum crystallinum* (kryształka lśniąca) białko germinopodobne (McGLP). McGLP ekspresjonowane było w dwóch układach heterologicznych: prokariotycznym w komórkach pałeczki okrężnicy (*Escherichia coli*) oraz eukariotycznym w tytoniu szlachetnym (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun). W pierwszym przypadku uzyskano frakcję białka dla określenia aktywności enzymatycznej, w drugim zaś nadrzędnym celem było zbadanie fizjologicznej funkcji McGLP w warunkach zasolenia lub deficytu wody.

Uzyskane w *E. coli* białko McGLP wykazało aktywność manganowej izoformy dysmutazy ponadtlenkowej (MnSOD). Badania nad aktywnością enzymatyczną prowadzone były dla dwóch uzyskanych form McGLP: zawierającej peptyd sygnałowy (sMcGLP) oraz pozbawionej peptydu sygnałowego (n_sMcGLP). Aktywność enzymatyczna została wykazana jedynie dla białka n_sMcGLP, co wskazuje na konieczność odcięcia peptydu sygnałowego w nabywaniu przez białko funkcji katalitycznych.

Badania nad funkcją McGLP w transgenicznym roślinach *N. tabacum* obejmowały pomiary wybranych cech morfologicznych oraz maksymalnej wydajności kwantowej fotosystemu II (Fv/Fm) w warunkach niestresowych oraz w odpowiedzi na zasolenie lub deficyt wody.

Rośliny wykazujące konstytutywną ekspresję McGLP hodowane w warunkach niestresowych nie różniły się od roślin typu dzikiego pod względem suchej i świeżej masy, długości pędu głównego, powierzchni i liczby liści, liczby węzłów, wymiarów i gęstości aparatów szparkowych oraz siły kiełkowania nasion. Nie wykazano również zmian w parametrze Fv/Fm. W przypadku roślin hodowanych w warunkach zasolenia lub deficytu wody stwierdzono, że nadekspresja McGLP albo nie wpływa lub ma wpływ negatywny na większość badanych cech fenotypu. Wyjątek stanowi wartość Fv/Fm, która u transformantów rosnących w warunkach deficytu wody była wyższa niż u roślin typu dzikiego.

Brak pozytywnego wpływu nadekspresji McGLP na większość z badanych cech fenotypowych wynika prawdopodobnie z wykazanej w obserwacjach mikroskopowych silnej agregacji białka fuzyjnego McGLP:GFP w cytoplazmie komórek liści. Przeciwnie, w komórkach korzenia obserwowany sygnał fluorescencji pochodził głównie z apoplastu i był zgodny z predykcją opartą na podobieństwie struktury do białek homologicznych oraz wynikach analizy sekwencji peptydu sygnałowego. Zatrzymanie McGLP:GFP w obrębie cytoplazmy komórek liści wynikające z jego agregacji prawdopodobnie wiąże się z ograniczeniem jego biologicznej dostępności i aktywności. Rzeczywiście, wizualizacja aktywności dysmutazy ponadtlenkowej McGLP na żelach poliakrylamidowych wykazała, że prążki aktywności enzymatycznej tego białka były znacznie intensywniejsze w komórkach korzenia niż w komórkach liści.

W niniejszej pracy zbadano również wpływ mutacji sekwencji aminokwasowej białka T6ODM z rodziny dioksygenaz zależnych od 2-oksoglutaranu oraz Fe^{2+} (ODD) na aktywność enzymatyczną. Białko T6ODM jest enzymem katalizującym przekształcenie tebainy do kodeinonu w ścieżce biosyntezy morfiny. Wprowadzone zmiany sekwencji aminokwasowej T6ODM zaprojektowano tak, by podnieść jej podobieństwo do sekwencji bliskiego filogenetycznie oraz zaangażowanego w ten sam szlak przemian metabolicznych białka CODM, dla którego substrat również stanowi tebaina, jednak produktem jego reakcji jest oripawina. W badaniach porównano wydajności ekspresji i oczyszczania uzyskanych białek T6ODM mut1, T6ODM mut2, T6ODM mut3 względem ich natywnej formy oraz białka CODM, określono stabilność termiczną białek T6ODM, CODM, T6ODM mut1, T6ODM mut2, T6ODM mut3 oraz przeprowadzono analizę aktywności enzymatycznej mutantów. Wprowadzenie zmian w sekwencji białka T6ODM wpływa na obniżenie ilości uzyskanego produktu białkowego w porównaniu z formą natywną. Białko CODM wykazuje naturalną tendencję do dimeryzacji/agregacji w warunkach ekspresji heterologicznej w *E. coli*, dlatego też uzysk produktu białkowego w jego przypadku był najniższy spośród wszystkich badanych ODD.

Formy białka z wprowadzonymi zmianami sekwencji w obrębie centrum aktywnego i jego najbliższego otoczenia (T6ODM mut1, T6ODM mut2) oraz centrum aktywnego, jego najbliższego otoczenia oraz C-końca (T6ODM mut3) nie wykazały aktywności enzymatycznej CODM. Tym samym substrat – tebaina, był przez nie nadal przekształcany w kodeinon, a nie w oripawinę jak w przypadku CODM, w kierunku którego zwiększono podobieństwo ich sekwencji. Jednocześnie natywna zdolność zmienionych form T6ODM do katalizowania reakcji przemiany tebainy w kodeinon malała wraz liczbą wprowadzonych mutacji.

Uzyskane wyniki wskazują, że zmiana specyfiki reakcji prowadzonej przez badane ODD nie zawsze może zostać osiągnięta wskutek manipulacji sekwencją aminokwasową białka. Dla dokładnego poznania mechanizmu działania ODD zaangażowanych w szlaki przemian alkaloidów morfinianowych wymagane są dalsze badania z zastosowaniem zaawansowanych metod obliczeniowych.

Robert Czerw

Summary

Cupins constitute a large superfamily of multifunctional proteins present in organisms across all domains of life. Among cupins, various proteins can be distinguished, including protective proteins such as antioxidant proteins, proteins involved in the biosynthesis of secondary metabolites and phytohormones, reserve proteins, transcription factors, and proteins associated with structural modifications of the cell wall. The primary goal of this study was to characterize selected representatives of plant cupins.

One of the proteins investigated in the present study is the germin-like protein (McGLP) derived from the facultative halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* (common ice plant). McGLP was expressed in two heterologous systems: prokaryotic cells of *Escherichia coli* and eukaryotic organisms of *Nicotiana tabacum* cv. Samsun (common tobacco). In the first case, a protein fraction was obtained to determine enzymatic activity, while in the second case, the primary aim was to examine the physiological function of McGLP under salt stress or water deficit conditions.

The McGLP protein obtained in *E. coli* showed the activity of manganese superoxide dismutase (MnSOD). Enzymatic activity studies were conducted for two forms of McGLP: one containing the signal peptide (sMcGLP) and the other lacking the signal peptide (n_sMcGLP). Enzymatic activity was demonstrated only for the n_sMcGLP protein, indicating the necessity of removing the signal peptide for the acquisition of catalytic functions by the protein.

Investigations on the function of McGLP in transgenic *N. tabacum* plants included measurements of selected morphological traits and the maximum quantum yield of photosystem II (Fv/Fm) under non-stress conditions and in response to salinity or water deficit. Plants exhibiting constitutive expression of McGLP under non-stress conditions did not differ from wild-type plants in terms of dry and fresh mass, length of the main shoot, leaf area and number, number of nodes, dimensions and density of stomata, and percentage of germinated seeds. No changes were observed in the Fv/Fm parameter either. In the case of plants grown under salt stress or water deficit conditions, the overexpression of McGLP either had no effect or had a negative impact on most of the investigated phenotypic traits. The exception was the Fv/Fm value, which was higher in water-deficit-transformants compared to wild-type plants.

The lack of a positive impact of McGLP overexpression on the majority of the investigated phenotypic traits is likely due to the observed strong aggregation of the recombinant McGLP:GFP protein in leaf cell cytoplasm during microscopic observations. In

contrast, the observed fluorescence signal in root cells mainly originated from the apoplast and was consistent with predictions based on the structural similarity to homologous proteins and the analysis of the signal peptide sequence. The retention of McGLP:GFP within the cytoplasm of leaf cells resulting from its aggregation is likely associated with limitations in its biological availability and activity. Indeed, visualization of the dismutase activity of McGLP on polyacrylamide gels demonstrated that the bands of enzymatic activity were significantly more intense in root cells than in leaf cells.

This study also examined the impact of amino acid sequence mutations in the T6ODM protein from the 2-oxoglutarate/Fe²⁺-dependent dioxygenase family (ODD) on enzymatic activity. The T6ODM protein is an enzyme involved in the conversion of thebaine to codeinone in the biosynthesis pathway of morphine. Sequence changes in the T6ODM protein were designed to increase its similarity to the sequence of the closely related protein CODM, which is also involved in the same metabolic pathway, but with the substrate thebaine and the product oripavine. The study compared the expression efficiency and purification yield of the obtained T6ODM mut1, T6ODM mut2, T6ODM mut3 proteins with their native form and the CODM protein, determined the thermal stability of T6ODM, CODM, T6ODM mut1, T6ODM mut2, T6ODM mut3 proteins, and conducted enzymatic activity analysis. The introduction of changes in the amino acid sequence of the T6ODM protein led to a decrease in the amount of the obtained protein product compared to the native form. The CODM protein naturally tends to dimerize/aggregate under heterologous expression conditions in *E. coli*, resulting in the lowest protein yield among all investigated ODD proteins.

The protein variants with sequence changes within the active site and its immediate environment (T6ODM mut1, T6ODM mut2) and within the active site, its immediate environment, and the C-terminus (T6ODM mut3) showed no enzymatic activity of CODM. Thus, the substrate thebaine continued to be transformed into codeinone by these variants rather than oripavine, as observed in the case of CODM, for which the sequence similarity was increased. At the same time, the native ability of the modified T6ODM forms to catalyze the thebaine-to-codeinone transformation reaction decreased with the number of introduced mutations.

The obtained results indicate that changing the specificity of the reaction conducted by the investigated ODD does not always occur as a result of amino acid sequence manipulation. Further studies employing advanced computational methods are required for a thorough understanding of the mechanism of action of ODD enzymes involved in the morphinan biosynthesis pathway.

Bobt Uomy