

## Streszczenie

Cyklofiliny to grupa białek posiadających aktywność izomerazy peptydylo-prolilowej, dzięki której mogą katalizować reakcję izomeryzacji wiązania peptydowego pomiędzy proliną a dowolnym aminokwasem poprzedzającym ją w pierwszorzędowej strukturze białka. Cyklofiliny powszechnie występują w komórkach organizmów żywych. Dotychczas białka należące do tej grupy zidentyfikowano zarówno u organizmów prokariotycznych jak i eukariotycznych. Ponadto stwierdzono udział cyklofilin w wielu procesach zachodzących w komórkach roślin jak na przykład fałdowanie białek, przekazywanie sygnałów komórkowych, oddziaływanie białek z DNA, dojrzewanie mRNA, składanie spliceosomów i nukleosomów, degradacja białek, apoptoza oraz odpowiedź na biotyczne i abiotyczne czynniki stresowe. Wzrost ekspresji genów kodujących cyklofiliny stwierdzono również w strefie merystematycznej brodawki korzeniowej *Lupinus luteus* co może świadczyć o udziale tych białek w tworzeniu symbiozy roślin bobowatych z rizobiami. Ponadto zarówno w procesie organogenezy jak i funkcjonowaniu brodawek korzeniowych uczestniczą białka należące do tak zwanych nodulin, które są bogate w prolinę i hydroksyprolinę. Biorąc pod uwagę aktywność izomerazową cyklofilin można przypuszczać, że uczestniczą one w fałdowaniu białek niezbędnych do wytworzenia i funkcjonowania organów symbiotycznych.

Celem niniejszej pracy było określenie funkcji jaką mogą pełnić cyklofiliny LjCYP18, LjCYP25-2, LjCYP56, LjCYP71 i LjCYP92 w komórkach rośliny modelowej *Lotus japonicus* z uwzględnieniem ich potencjalnego wpływu na formowanie układu symbiotycznego z bakteriami *Mesorhizobium loti*.

Realizacji tego celu posłużyły eksperymenty wykorzystujące rośliny *L. japonicus* ekotypu Gifu zawierające insercje *LORE1* w sekwencjach kodujących cyklofiliny LjCYP18, LjCYP56 i LjCYP71. Wykorzystano również rośliny kompozytowe (ang. *composite plants*) *L. japonicus* ekotypu MG-20 o transgenicznych korzeniach, posiadające mutacje typu indel wprowadzone za pomocą systemu CRISPR/Cas9 w obrębie sekwencji kodujących białka LjCYP18, LjCYP25-2, LjCYP56 i LjCYP92.

W niniejszej pracy wykazano, że w genomie *L. japonicus* znajdują się sekwencje kodujące co najmniej 14 różnych cyklofilin, spośród których 7 należy do białek jednodomenowych i 7 do wielodomenowych. Ponadto wykazano, że są one zlokalizowane w różnych przedziałach komórkowych. Zidentyfikowano 4 białka funkcjonujące w retikulum endoplazmatycznym, 3 w chloroplastach, 1 w mitochondrium, 4 w jądrze komórkowym i 2 w cytoplazmie. Obie cytoplazmatyczne cyklofiliny należą do białek jednodomenowych. Z kolei

wszystkie zidentyfikowane cyklofiliny jądrowe posiadają więcej niż jedną konserwatywną domenę funkcyjną. Ponadto stwierdzono wzrost ekspresji niektórych cyklofilin w odpowiedzi na wyciszenie ekspresji wybranych białek z domeną cyklofilinową występujących w tym samym przedziale komórkowym. Poza tym wyciszenie ekspresji genów kodujących LjCYP18, LjCYP56 i LjCYP41 za pomocą insercji *LORE1* spowodowało zahamowanie wzrostu i rozwoju *L. japonicus*. Z kolei wyciszenie ekspresji genu *LjCYP18* i *LjCYP56* przy pomocy insercji *LORE1* powoduje zmniejszenie liczby brodawek korzeniowych. Ponadto wyciszenie *LjCYP56* wywołuje zmianę mikrostruktury brodawek korzeniowych, w których intensywnie zachodzi wiązanie azotu atmosferycznego.

Przemysław Olszinski