

Streszczenie rozprawy doktorskiej

Ze względu na brak mobilności rośliny wykształciły unikalne mechanizmy obronne uruchamiane w odpowiedzi na niekorzystne warunki środowiskowe. Reakcje na czynniki biotyczne jak i abiotyczne odbywają się m.in. na poziomie molekularnym, w którym to kluczową rolę pełni odbiór, a następnie transdukcja sygnału. Aktywacja szlaku fenylopropanoidowego, a co za tym idzie indukcja syntezy produktów z niego pochodzących oraz zamykanie aparatów szparkowych stanowią elementy strategii obronnej u roślin wyższych. Do molekuł pełniących funkcje sygnałne w komórkach roślinnych zaliczane są niektóre nukleotydy. W ich obrębie wyróżnić można nukleotydy zwane nietypowymi, do których należą dinukleozydopolifosforany (Np_nN') oraz nukleozydo 5'-fosforamidy (NH_2-pN).

Nadrzędnym celem pracy było określenie roli Np_nN' i NH_2-pN w transdukcji sygnału i regulacji szlaku fenylopropanoidowego u winorośli właściwej (*Vitis vinifera* L.) i rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.). Potwierdzono, że egzogenne Np_nN' regulują szlak fenylopropanoidowy w zawiesinowej kulturze komórkowej *V. vinifera* cv. Monastrell zależnie od typu nukleozydu. Odnotowano istotne różnice akumulacji dwóch stilbenów: *trans*-resweratrolu oraz *trans*-piceidu w pożywce, zarówno pod wpływem Np_nN' purynowych (Ap_3A i Gp_3G), pirymidynowych (Up_3U i Up_4U) oraz puryno-pirymidynowej hybrydy (Ap_3U). Co więcej, wykazano wpływ badanych nukleotydów na poziom transkryptów genów kodujących enzymy zaangażowane w szlaku fenylopropanoidowym. Wzrost akumulacji stilbenów pod wpływem Ap_3A , Gp_3G , Up_3U i Up_4U był skorelowany z indukcją ekspresji genu *STS1* kodującego syntazę stilbenową oraz genu *C4H1* kodującego hydroksylazę kwasu cynamonowego. Te same nukleotydy indukowały ekspresję genu *ABCG44* kodującego białko *ABCG44* transportujące *trans*-resweratrol na zewnątrz komórki. Pirymidynowe Np_nN' takie jak Cp_3C , Cp_4C i purynowo-pirymidynowa hybrydy Ap_4C , silnie hamowały biosyntezę stilbenów co związane było z obniżeniem ekspresji genów *STS1* i *ABCG44* przy jednoczesnej indukcji ekspresji genu *CCR2* kodującego reduktazę cynamylo-CoA kontrolującą biosyntezę lignin. Podobnie do badań nad wpływem Np_nN' , wykazano że NH_2-pN również regulują szlak fenylopropanoidowy w komórkach zawiesinowej kultury *V. vinifera* cv. Monastrell zależnie od typu nukleozydu. Odnotowano istotne różnice akumulacji *trans*-resweratrolu oraz *trans*-piceidu w komórkach oraz pożywce zarówno pod wpływem NH_2-pN purynowych (NH_2-pA , NH_2-pG) jak i pirymidynowych (NH_2-pU , NH_2-pC).

Wykazano, że badane nukleotydy modyfikowały ekspresję genów kontrolujących biosyntezę stilbenów i lignin przy czym najistotniejsze różnice ekspresji genów odnotowano pod wpływem $\text{NH}_2\text{-pC}$. Ponadto nukleotyd ten indukował szybki wzrost poziomu N-benzoiloputrescyny.

Kluczowym elementem percepcji sygnału są oddziaływania pomiędzy molekułą sygnałową a receptorem. Poznanym i dobrze opisanym receptorem u roślin dla zewnątrzkomórkowego nukleotydu purynowego, eATP, jest błonowa receptorowa kinaza białkowa LecRK-1.9 (P2K1/DORN1). Pomimo wielu przesłanek wskazujących na działanie egzogennych $\text{Np}_n\text{N}'$ jako molekuł sygnałowych, mechanizmy percepcji i transdukcji sygnału wywołanych przez $\text{Np}_n\text{N}'$ u roślin pozostawały nieznane. W badaniach przeprowadzonych w ramach realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej wykazano, że P2K1/DORN1 jest kluczowym elementem w percepcji i transdukcji sygnału wywołanego przez Ap_4A . Co więcej, egzogenne Ap_4A i Cp_4C istotnie zmniejszały stopień rozwarcia aparatów szparkowych u *A. thaliana*, jednakże proces ten pod wpływem Cp_4C zachodził niezależnie od P2K1/DORN1. Udowodniono, że molekułami sygnałowymi pośredniczącymi w zamykaniu aparatów szparkowych przez Ap_4A i Cp_4C są reaktywne formy tlenu (RFT) w postaci anionorodnika nadadtlenkowego (O_2^-), i nadttlenku wodoru (H_2O_2). Ponadto u *A. thaliana* typu dzikiego traktowanych ATP i Ap_4A wykazano indukcję wybranych genów biorących udział w transdukcji sygnału i reakcję roślin na stres czego nie odnotowano u mutantu *dorn1-3* typu knock-out posiadającym insercję T-DNA w obrębie genu kodującego P2K1/DORN1. Indukcji ekspresji owych genów nie wykazano w liściach *A. thaliana* typu dzikiego pod wpływem CTP i Cp_4C .

Kluczowym osiągnięciem niniejszej pracy jest również wskazanie roślinnego purynoreceptora P2K1/DORN1 jako istotnego białka błonowego w percepcji sygnału wywołanego przez Ap_4A . Jest to pierwsze opisane roślinne białko receptorowe mogące oddziaływać z Ap_4A . Ponadto określono rolę elementów mogących uczestniczyć w transdukcji sygnału prowadzącego do modyfikacji szlaku fenylopropanoidowego u *V. vinifera* i regulacji ruchów aparatów szparkowych u *A. thaliana*. Co więcej, wykazano, że P2K1/DORN1 nie pełni takiej funkcji w przypadku dinukleotydu pirymidynowego Cp_4C , co świadczyć może o występowaniu u roślin innych białek oddziałujących z tymi nukleotydami.

Dobrogęśli