

Popularnonaukowe streszczenie projektu

Sąsiadujące ze sobą rośliny oddziałują wzajemnie nie tylko poprzez konkurencję o światło, wodę lub składniki odżywcze, ale także wykorzystują wyrafinowaną broń chemiczną. Zdolne są do wydzielania do środowiska różnych związków chemicznych (allelotoksyn), wywołujących korzystny lub negatywny wpływ na sąsiadów. Z uwagi na ostateczny efekt działania takich substancji, objawiający się ograniczeniem wzrostu, a nawet śmiercią roślin sąsiadujących, oddziaływania negatywne są najczęściej obserwowane i badane. Allelozwiązki należą do różnych grup chemicznych, znajdują się wśród nich także niebiałkowe aminokwasy. Wyróżnia się 20 typowych aminokwasów, z których jak z cegiełek zbudowane są białka organizmów roślinnych i zwierzęcych. Obok tzw. wielkiej 20 funkcjonuje ponad 200 innych aminokwasów, syntetyzowanych przez rośliny, których rola jest inna niż tworzenie funkcjonalnych białek. Niektóre z nich są trujące dla owadów, są produktami pośrednimi kluczowych przemian biologicznych, przekazywającymi informacje. **Do grupy niebiałkowych aminokwasów należy meta-tyrozyna (*m*-Tyr), strukturalny odpowiednik białkowego aminokwasu - fenyloalaniny. *m*-Tyr jest produkowana w korzeniach roślin z rodzaju **kostrzew** - traw stosowanych na boiskach i polach golfowych. Wcześniejsze badania prowadzone w USA wykazały, że jest to związek, który jest wydzielany do gleby przez korzenie i charakteryzuje się silnie toksycznym działaniem w stosunku do wielu roślin, szczególnie dwuliściennych. *m*-Tyr w komórkach zwierzęcych, jest uznawana za znacznik stresu oksydacyjnego, związanego ze zwiększoną produkcją i akumulacją reaktywnych form tlenu (ROS). ROS to "bracia" i "siostry" cząsteczki tlenu, które powstają w komórkach wszystkich organizmów w procesach np. oddychania i/lub fotosyntezy gdy elektrony przenoszone są na cząsteczkę tlenu (gdy na tlen przeniesione są 4 elektrony powstaje cząsteczka wody, ale nie zawsze tak jest, wówczas tworzą się reaktywne formy tlenu). Wysokie stężenie *m*-Tyr jest charakterystyczne dla osób z chorobą Alzheimera, cukrzycą lub miażdżycą, dlatego ważne jest poznanie mechanizmu działania tego niebiałkowego aminokwasu. **Celem badań jest powiązanie negatywnego oddziaływania *m*-Tyr na wzrost korzeni pomidora ze zmianami metabolizmu ROS. Interesować nas będzie, szczególnie zawartość glutationu.** Jest on, obok witaminy C (askorbinianu) związkiem odpowiadającym za usuwanie z komórek ROS. Występuje w formie zredukowanej i utlenionej. Jego forma zredukowana warunkuje utrzymanie niskiej ilości ROS. **Planujemy także zbadanie jak *m*-Tyr wpływa na aktywność trzech enzymów (dysmutazy ponadtlenkowej, reduktazy glutationowej i peroksydazy glutationowej),** wchodzących w skład tzw. komórkowego systemu antyoksydacyjnego (regulującego stężenie ROS). Dysmutaza ponadtlenkowa przekształca jedną z ROS - anionorodnik ponadtlenkowy do mniej toksycznej wody utlenionej, która następnie jest przekształcana przy udziale peroksydazy glutationowej do wody. Dotychczasowe dane wskazują na zwiększoną zawartość anionorodnika ponadtlenkowego w korzeniach roślin rosnących w obecności *m*-Tyr. Natomiast reduktaza glutationowa odpowiada za utrzymania wysokiego stężenia zredukowanej formy glutationu w komórkach, a zatem zabezpiecza potencjalną zdolność komórki do zmiatania ROS. Zawartość glutationu podlega także regulacji przez reaktywne formy azotu, w tym szczególnie tlenek azotu. Stężenie tlenu azotu jest regulowane między innymi przez tworzenie związku z glutationem - nitrozoglutationu. Z kolei ilość nitrozoglutationu zależy od aktywności reduktazy nitrozoglutationu, enzymu odpowiadającego za przekształcanie tej cząsteczki do utlenionej formy i amoniaku. Jak wykazaliśmy w dotychczasowych badaniach, aktywność i ilość tego enzymu wzrasta w roślinach pod wpływem *m*-Tyr. **Dla uzupełnienia danych biochemicznych planujemy także oznaczenie transkrypcji genów kodujących dysmutazę ponadtlenkową, peroksydazę glutationową i reduktazę glutationową.** Jako materiał badawczy stosowane będą korzenie siewek pomidora (*Solanum lycopersicum* L., odmiany Malinowy Ożarówski), których wzrost zostanie w 50 lub 100 % zahamowany przez podanie *m*-Tyr w stężeniu 50 lub 250 μ M przez 24 lub 72 godz. **Postawiona hipoteza badawcza zakłada, że pod wpływem *m*-Tyr dochodzi do aktywacji komórkowego systemu modulującego stężenie ROS.** Przypuszczamy, że obserwowane będą zmiany aktywności oraz transkrypcji genów dysmutazy ponadtlenkowej, peroksydazy glutationowej i reduktazy glutationowej, jak również zmiana zawartości zredukowanej i utlenionej formy glutationu. Modyfikacja aktywności reduktazy glutationowej wywoła z kolei zmiany stosunku utlenionej do zredukowanej formy glutationu. Zawartość obu form glutationu oznaczymy stosując wysokosprawną chromatografię cieczową - metodę pozwalającą na bardzo dokładny rozdział związków występujących w mieszaninie. Oznaczenie transkrypcji genów kodujących dysmutazę ponadtlenkową, peroksydazę glutationową i reduktazę glutationową przeprowadzimy stosując reakcję qRT-PCR (ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy DNA w czasie rzeczywistym), zadanie to ułatwia poznany w 2012 roku genom pomidora. Aktywność enzymatyczną dysmutazy oznaczymy po rozdziale białek na żelu, co pozwoli na wyróżnienie aktywności poszczególnych izoform enzymu (odmiennych fizycznie postaci enzymu), natomiast aktywność peroksydazy glutationowej i reduktazy glutationowej zostanie oznaczona spektrofotometrycznie. Mamy nadzieję, że dzięki tym badaniom uzupełniającym aktualnie prowadzone analizy **zdołamy zaproponować model opisujący mechanizm działania *m*-Tyr w roślinach uwzględniający metabolizm reaktywnych form tlenu i azotu z podkreśleniem szczególnej roli glutationu.****