

Popularnonaukowe streszczenie projektu

W wyniku działania niekorzystnych czynników zewnętrznych i/lub starzenia **nasiona tracą wigor i zdolność kiełkowania**. Ma to negatywny wpływ na produkcję rolniczą, ogrodnictwo, niekorzystnie oddziałuje na zachowanie bioróżnorodności. Tlenek azotu (NO) to gazowa, regulatorowa cząsteczka o podwójnym działaniu, które można opisać modelem tzw. „drzwi nitrozacyjnych”. W fizjologicznych stężeniach NO działa niczym klucz do zamka inicjując komórkowe szlaki sygnałowe, w wyższych sprzyja patofizjologicznym zjawiskom związanym m.in. z modyfikacją (np. nitracją) białek i kwasów nukleinowych. Starzenie nasion jest spowodowane m.in. niekontrolowaną produkcją reaktywnych form tlenu (ROS - produktów niepełnej redukcji cząsteczki tlenu), które podobnie jak NO w niższych stężeniach pełnią funkcje regulatorowe. W przypadku, kiedy w komórkach wzrasta zawartość ROS może dochodzić do utleniania białek (białka karbonylowane), kwasów nukleinowych (utlenianie zasad azotowych, co prowadzi do powstania 8-hydroksyguanozyny) czy do peroksydacji lipidów. Wyniki badań ostatnich lat wskazują, że u chorych na cukrzycę, czy Alzheimerza dochodzi do akumulacji *meta*-tyrozyny - toksycznego izomeru jednego z aminokwasów - tyrozyny. Powstawaniu *meta*-tyrozyny sprzyja wysokie stężenia ROS. *meta*-Tyrozyna może być wbudowywana w białka w miejsce fenyloalaniny i w ten sposób zakłóca metabolizm. Nie ma dotychczas danych literaturowych, które wskazywałyby na obecność *meta*-tyrozyny w nasionach, zwłaszcza poddanych starzeniu, chociaż jest to bardzo prawdopodobne.

Celem proponowanych badań jest wykazanie krótkotrwałego (sygnalnego) działania NO na poprawę zdolności kiełkowania nasion postarzonych (w wyniku ciepłej stratyfikacji) poprzez określenie zmian w ilości modyfikowanych białek (karbonylowanych i nitrowanych). Badania będą prowadzone na zarodkach izolowanych z nasion jabłoni (*Malus domestica* Borkh.) poddanych zabiegowi ciepłej lub chłodnej stratyfikacji (zabieg prowadzący do ustąpienia głębokiego, spoczynku zarodkowego nasion jabłoni) i traktowanych NO po ciepłej stratyfikacji. Badania proteomiczne chcemy powiązać z analizą ekspresji genów kodujących białka systemu antyoksydacyjnego (modulującego stężenie ROS) jak i kodujących białka mające wpływ na długowieczność nasion (np. L-metylotransferaza izoaspartylowa, czy kinaza białkowa tzw. cel rapamycyny). Ponadto, naszym celem jest wykazanie obecności *meta*-tyrozyny w zarodkach i określenie przebiegu zmian stężenia tego niebiałkowego aminokwasu podczas starzenia nasion.

Projekt chcemy zrealizować stosując techniki z zakresu biologii molekularnej, biochemii i fizjologii roślin. Jakościowe analizy proteomiczne (analizy białek) będą wiązać się z dwukierunkowym rozdziałem białek po ich uprzedniej immunoprecypitacji (wyodrębnieniu białek z mieszaniny przy pomocy swoistych przeciwciał), a następnie identyfikacją techniką spektrometrii mas. Ilościowo białka zostaną oszacowane z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał techniką immunoenzymatyczną – ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Molekularna ocena zmian ekspresji genów zostanie przeprowadzona metodą ilościowej reakcja łańcuchowej polimerazy DNA w czasie rzeczywistym (qRT-PCR), a w przypadku określenia zawartości *meta*-Tyr podczas starzenia jak i w czasie ustępowania spoczynku nasion zastosujemy wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) - technikę pozwalającą na bardzo dokładny rozdział związków występujących w mieszaninie. Oszacowanie jakości zarodków jabłoni izolowanych z nasion poddanych chłodnej i ciepłej stratyfikacji będzie polegało na określeniu: stopnia fragmentacji DNA, nagromadzenia dialdehydu malonowego (MDA), świadczącego o postępującej peroksydacji lipidów oraz na oszacowaniu nagromadzenia 8-hydroksyguanozyny i 8-nitroguanozyny (znaczniki stresu oksydo-nitrozacyjnego).

Hipoteza badawcza zakłada, że krótkotrwałe działanie NO może przełamywać spoczynek zarodków jabłoni izolowanych z nasion poddanych stratyfikacji w cieple i poprawiać ich zdolność do kiełkowania poprzez zmianę składu modyfikowanych białek, ekspresji genów i zawartości *meta*-tyrozyny. Uzyskane wyniki pozwolą uzupełnić wiedzę dotyczącą molekularnych mechanizmów działania NO w biologii nasion, zwłaszcza w aspekcie przeciwdziałania ich starzeniu. Określenie zmian stężenia *meta*-tyrozyny w nasionach może być wykorzystane przy ocenie ich jakości nie tylko jako materiału siewnego, ale również w bankach nasion.