

POPULARNONAUKOWE STRESZCZENIE PROJEKTU

Autofagia, czyli samo-zjadanie, jest procesem znanym od lat 60-ych ubiegłego wieku. Jest to konserwatywny proces występujący w komórkach drożdży, zwierząt i roślin i umożliwia degradację całych organelli, makromolekuł czy kompleksów białkowych. Takie elementy w obrębie cytoplazmy otoczone zostają podwójną błoną fosfolipidową. Powstaje autofagosom, który u roślin ulega fuzji z tonoplastem i dostarcza swoją zawartość do wakuoli, tworząc ciało autofagowe. Za formowanie się autofagosomu i jego fuzję z tonoplastem odpowiadają białka ATG. Wewnątrz wakuoli ciało autofagowe ulega błyskawicznej degradacji w wyniku działania licznych wakuolarnych enzymów litycznych. Autofagia w warunkach normalnych zachodzi z małą intensywnością, ale ulega ona wyraźnemu nasileniu w wyniku działania różnych czynników stresowych (zarówno abiotycznych jak i biotycznych). Modelowym przykładem stresu nasilającego autofagię jest głód węglowy lub azotowy. W takich okolicznościach nasilona autodestrukcja umożliwia pozyskiwanie substratów oddechowych i przeżycie komórki. U ssaków autofagia jest istotna w utrzymaniu dobrego stanu zdrowia, gdyż zapobiega powstawaniu wielu chorób (w tym nowotworów i chorób neurodegeneracyjnych, np. choroba Huntingtona). U roślin autofagia uczestniczy w obrocie składników komórek i działa jako mechanizm kontroli jakości, ale funkcjonuje też w niektórych procesach rozwojowych, takich jak dojrzewanie pyłku czy starzenie i śmierć komórki (w tym także w PCD). Przez dziesięciolecia autofagia uważana była za proces w którym elementy komórki degradowane są w sposób nieselektywny. Jednakże wyniki badań z ostatnich 20 lat dowodzą jednoznacznie, że autofagia jest też procesem, w którym elementy komórki są degradowane w sposób wybiórczy tzn. utylizowane są tylko te elementy komórki, które są uszkodzone, zużyte lub nie są już w komórce potrzebne. Przykładem selektywnej autofagii jest peksofagia, czyli autofagiczna degradacja peroksysomów. Niemniej jednak dane dotyczące selektywnych odmian autofagii w komórkach roślinnych są bardzo nieliczne i publikowane są od zaledwie kilku lat.

Nasze dotychczasowe badania prowadzone na kultywowanych *in vitro* osiach zarodkowych różnych gatunków łubinu pokazały, że w komórkach osi głodzonych pod względem cukru dochodzi do zaawansowanej autofagii. Ponadto w takich osiach zawartość tłuszczu jest wyraźnie wyższa niż w osiach odżywionych sacharozą, co jest wynikiem całkowicie przeciwnym do licznych danych literaturowych. Stwierdziliśmy też, że w osiach głodzonych pod względem cukru i jednocześnie odżywionych asparaginą (centralny aminokwas w metabolizmie nasion łubinu) następuje wyraźne spowolnienie degradacji ciał autofagowych (końcowy etap przebiegu autofagii). Jest to efekt, który nie jest opisywany w literaturze. Zatem zasadniczym celem projektu jest poznanie mechanizmu poprzez który asparagina spowalnia degradację ciał autofagowych w wakuolach komórek osi zarodkowych kiełkujących nasion łubinu. Spowolnienie degradacji ciał autofagowych przez asparaginę umożliwia przeanalizowanie ich zawartości pod transmisyjnym mikroskopem elektronowym. Okazuje się, że wewnątrz zachowanych ciał autofagowych znajdują się organelle, które rozpoznane mogą być jako peroksysomy. Dlatego drugim ważnym celem badań jest uzyskanie jednoznacznych dowodów na występowanie peksofagii w roślinnych komórkach zarodkowych. Na obecnym etapie badań nieznany jest mechanizm działania asparaginy. Ale realizacja niniejszego projektu i publikowanie nowych wyników przyczyni się do znacznego wzbogacenia wiedzy w tym zakresie. Badania pozwolą wyjaśnić nie tylko mechanizm działania asparaginy w regulacji rozkładu ciał autofagowych w komórkach roślinnych, ale umożliwią też udowodnienie występowania peksofagii w roślinnych komórkach zarodkowych. Uzyskanie przez nas jednoznacznych dowodów na występowanie peksofagii i ich opublikowanie będzie znaczącym sukcesem, gdyż jak do tej pory nie ma w literaturze żadnych danych na temat peksofagii w roślinnych komórkach zarodkowych.

Badania wykonane będą na izolowanych ze spęczniałych nasion osiach zarodkowych łubinu białego (*Lupinus albus*) i andyjskiego (*Lupinus mutabilis*), które kultywowane będą *in vitro* na mineralnej pożywce z 60 mM sacharozą, bez cukru i na pożywkach wzbogaconych w 35 mM asparaginę. Wybrane do badań gatunki łubinu różnią się zasadniczo pod względem zawartości zapasowego tłuszczu w nasionach (7-14% w nasionach łubinu białego i ok. 20% w nasionach łubinu andyjskiego). W projekcie przewidziane są badania proteomiczne, które wykonane będą z zastosowaniem elektroforezy 2D i spektrometrii mas. Badania transkryptomiczne wykonane będą z zastosowaniem techniki masowego sekwencjonowania utworzonych bibliotek transkryptomów przygotowanych na matrycach mRNA wyizolowanych kultywowanych *in vitro* osi zarodkowych łubinu. Wykonane będą liczne badania z zastosowaniem mikroskopii elektronowej i konfokalnej. Metody spektrofotometryczne i izotopowe zastosowane będą w celu zbadania aktywności proteolitycznej. Przewidziane są również badania z zastosowaniem przeciwciał (Western blot, Immuno-Gold). Stosując metody chromatograficzne badana będzie zawartość związków tłuszczowych.