

Udział wakuolarnego enzymu procesującego (VPE) i lipazy w degradacji ciał autofagowych w komórkach osi zarodkowych kiełkujących nasion łubinu (*Lupinus spp.*)

Głównym celem tego projektu jest opisanie roli wakuolarnego enzymu procesującego (VPE) i lipazy w degradacji ciał autofagowych w komórkach roślinnych. Ze względu na prawie całkowity brak informacji o wakuolarnych enzymach litycznych biorących udział w degradacji ciał autofagowych u roślin, postawiono hipotezę, że VPE i lipaza biorą udział w degradacji ciał autofagowych podczas autofagii w komórkach osi zarodkowych łubinu.

Autofagia, czyli "samozjadanie", odgrywa kluczową rolę w degradacji zbędnych lub uszkodzonych składników komórki. Jest to konserwatywny proces, który zachodzi podobnie w komórkach grzybów, zwierząt i roślin. W normalnych warunkach autofagia zachodzi z niewielką intensywnością, jednak w wyniku działania różnych czynników stresowych proces ten ulega gwałtownemu nasileniu. Pierwszym widocznym objawem makroautofagii (najczęstszy rodzaj autofagii) w komórkach roślinnych jest pojawienie się w cytoplazmie struktury w kształcie filizanki, zwanej fagoforą. Fagofora wydłuża się, otaczając i jednocześnie oddzielając fragment cytoplazmy wraz z organellami lub innymi składnikami komórki, które są przeznaczone do degradacji. Ostatnim etapem różnicowania się fagofory jest całkowite otoczenie ładunku i jego wydzielenie wewnątrz autofagosomu. Jest to pęcherzyk z podwójną, dwuwarstwową błoną lipidowo-białkową, zawierający ładunek przeznaczony do autofagicznej degradacji. U roślin autofagosom łączy się z wakuolą, tworząc ciała autofagowe. Degradacja ciał autofagowych zachodzi szybko i rozpoczyna się natychmiast po ich pojawieniu się w wakuoli. Tylko nieliczne publikacje opisują degradację ciał autofagowych, a ten etap autofagii często opisywany jest z użyciem ogólników, przewidywań i sugestii. W porównaniu z początkowymi etapami autofagii, mechanizm i regulacja degradacji ciał autofagowych są bardzo słabo zbadane i opisane. Są to jednak kluczowe etapy na drodze do pełnego recyklingu składników komórkowych w procesie autofagii.

Dotychczasowe badania przeprowadzone w Zakładzie Fizjologii Roślin UAM wykazały, że zawartość lipidów w głodzonych osiach zarodkowych łubinu jest wyższa niż w tych, które były odżywione sacharozą. Wyniki te były zaskakujące i trudne do zinterpretowania, gdyż stoją w całkowitej sprzeczności z danymi literaturowymi, które wskazywały na wyraźne nasilenie rozkładu substancji zapasowych w warunkach głodu węglowego. Równocześnie aktywność lipolityczna była wyraźnie wyższa w głodzonych osiach zarodkowych łubinu. Inne nasze dane wskazują, że w komórkach głodzonych osi zarodkowych łubinu intensywnie zachodzi autofagia. Objawami autofagii był wzrost wakuolizacji komórek oraz spadek poziomu fosfatydylocholiny, jednego z metabolicznych wskaźników autofagii. Stwierdzono również, że w głodzonych osiach zarodkowych, które jednocześnie odżywione były asparaginą (kluczowy aminokwas w metabolizmie nasion łubinu), degradacja ciał autofagowych była spowolniona, co powodowało ich akumulację w wakuoli. Obserwacja ta była zaskakująca, gdyż nie opisywano wcześniej akumulacji ciał autofagowych wewnątrz wakuoli bez użycia inhibitorów autofagii. Dodatkowo poza spowolnieniem degradacji ciał autofagowych asparagina znacząco obniżała również aktywność lipolityczną.

Dotychczas tylko jeden wakuolarny enzym lityczny (VPE) został opisany jako enzym prawdopodobnie zaangażowany w degradację ciał autofagowych u roślin. Roślinny VPE może działać podobnie do drożdżowego Pep4, aktywując kaskady innych hydrolaz, które są odpowiedzialne za hydrolizę różnych struktur wewnątrz wakuoli, w tym ciał autofagowych. Niemniej jednak, jak do tej pory, nie ma dowodów na udział VPE w degradacji ciał autofagowych u roślin. Najlepiej poznanym i opisanym białkiem zaangażowanym w degradację ciał autofagowych u drożdży jest Atg15, która jest prawdopodobnie lipazą. Autofagia jest konserwatywnym procesem, dlatego też lipaza która jest zaangażowana w degradację ciał autofagowych u drożdży, może też uczestniczyć w degradacji ciał autofagowych w komórkach roślinnych.

W oparciu o dotychczasowe wyniki badań oraz dane literaturowe proponujemy przeprowadzenie badań mających na celu opisanie roli VPE i lipazy w degradacji ciał autofagowych w osiach zarodkowych kiełkujących nasion łubinu białego (*Lupinus albus* L.) i łubinu andyjskiego (*Lupinus mutabilis* Sweet) kultywowanych *in vitro* w warunkach różnego odżywiania węglowego i azotowego (głód cukrowy oraz odżywianie sacharozą i asparaginą). W ramach tego projektu zostanie określony wpływ wybranych inhibitorów autofagii na degradację ciał autofagowych. Analizie poddane zostaną zmiany w poziomie ekspresji genów kodujących VPE oraz lipazę. Ponadto, określone zostaną zmiany w poziomie białka VPE i lipazy. Analizie poddana zostanie również aktywność VPE. Jednym z celów będzie też określenie wakuolarnego lokalizacji lipazy w komórkach roślinnych.

Znaczącym sukcesem będzie uzyskanie dowodów na udział VPE i lipazy w degradacji ciał autofagowych u roślin. Kontynuacja badań nad autofagią w komórkach kiełkujących nasion łubinu i publikacja nowych wyników przyczyni się do istotnego wkładu w wiedzę z tej dziedziny. Ponadto, wyniki projektu będą szczególnie ważne i wartościowe, ponieważ badania będą prowadzone na roślinnych komórkach zarodkowych. Do tej pory, z wyjątkiem badań prowadzonych w Zakładzie Fizjologii Roślin UAM w Poznaniu, taki materiał nie był w ogóle wykorzystywany w badaniach nad autofagią u roślin.