

## **Streszczenie rozprawy doktorskiej pt.: „Fosfodiesterazy u roślin wyższych – brakujące ogniwo w transdukcji sygnału cyklicznych nukleotydów”**

Transdukcja sygnału jest procesem, w którym bodźce chemiczne bądź fizyczne docierające do komórki są rejestrowane przez wyspecjalizowane sensory i przenoszone przez błonę komórkową na cytoplazmatyczne elementy układu efektorowego. Wiązanie zewnątrzkomórkowego liganda z receptorem wywołuje kaskadę zdarzeń o naturze biochemicznej i genetycznej, prowadzące do swoistej odpowiedzi fizjologicznej. Proces przekazywania informacji zawartej w bodźcu uruchamia szereg cząstek sygnałnych. Cykliczne nukleotydy (cNMP) zaliczane do wtórnych przekaźników informacji, są jednymi z nich. Pojawiając się w odpowiedzi na aktywację receptora, pełnią kluczowe role w wielu procesach fizjologicznych i rozwojowych zarówno u prokariotów i eukariotów. Przez wiele lat transdukcja sygnału z udziałem cNMP u roślin budziła kontrowersje, głównie przez techniczny brak możliwości ich oznaczenia w komórkach roślinnych. Wraz z odkryciem technik takich jak LC-MS/MS, pozwalających oznaczać stężenia substancji na poziomie śladowym, pozycja cNMP, jako wtórnego przekaźnika u roślin została ustabilizowana, a enzymy odpowiedzialne za ich syntezę zaczęły być odkrywane. Jednakże wciąż niewiele było wiadomo o enzymach odpowiedzialnych za degradację cNMP u roślin wyższych - fosfodiesterazach (PDE). Biorąc pod uwagę fakt, że zakończenie sygnalizacji z udziałem cNMP możliwe jest tylko przez działanie PDE, postawiłem hipotezę, że u roślin są obecne PDE, a trudność w ich odkryciu związana jest z odmienną budową niż ta poznana dla PDE zwierzęcych.

W oparciu o analizę sekwencji i właściwości strukturalnych centrów katalitycznych fosfodiesteraz pochodzących z różnych organizmów, opracowałem unikalną, uniwersalną, sekwencje aminokwasową, pozwalającą identyfikować roślinne PDE, opartą o kluczowe aminokwasy zaangażowane w wiązanie oraz hydrolizę ligandu, co pozwoliło na odkrycie ponad 30 PDE w proteomie rośliny modelowej *Arabidopsis thaliana*. Zastosowanie technik wizualizacji struktury białek i symulacji dokowania ligandu pozwoliło na stwierdzenie, że roślinne PDE nie są pojedynczymi enzymami, a domenami wchodzącymi w skład większych, wielofunkcyjnych białek. Poprzez analizę struktury ortologów PDE różnych gatunków roślin, w których nie występował pierwotny motyw PDE oraz zastosowanie narzędzia mutagenyzy dokonałem modyfikacji motywu, dodając nowe, unikalne, aminokwasy zaangażowane w aktywność katalityczną PDE. Powstałe w ten sposób narzędzie znacząco zwiększyło ilość odkrytych PDE w roślinach wyższych. Przeprowadzone badania biochemiczne *in vitro* z

wykorzystaniem systemu detekcji LC-MS/MS potwierdziły prawdziwość motywów PDE, ponieważ obydwie białka, które zostały poddane testom wykazywały aktywność hydrolityczną względem cyklicznych nukleotydów cAMP oraz cGMP.

Podsumowując, otrzymane wyniki, w których zastosowano tandemowe podejście motyw-dokowanie molekularne doprowadziły do znacznego poszerzenia naszej wiedzy o roślinnych PDE. Analiza poszczególnych kandydatów pokazuje, że roślinne PDE w odróżnieniu do zwierzęcych ortologów nie są pojedynczymi białkami, lecz są małymi domenami osadzonymi w strukturze większych białek. Takie rozmieszczenie enzymów odpowiedzialnych za metabolizm cNMP rzuca nowe światło na odmienną ewolucję metabolizmu cNMP u roślin, co w przyszłości bezpośrednio przyczyni się do lepszego poznania procesów, w których zaangażowane są te wtórne przekaźniki.