

Streszczenie

Cykliczny 3',5' – guanozynomonofosforan (cGMP) to cząsteczka sygnałowa, która pełni istotną rolę zarówno w komórkach prokariotycznych, jak i eukariotycznych. Enzymami odpowiedzialnymi za syntezę cGMP są cyklazy guanylanowe (GC). Roślinne GC charakteryzują się znacząco różną budową od lepiej poznanych i scharakteryzowanych cyklaz zwierzęcych. Do tej pory opisano enzymy te u kilku gatunków roślin oraz zbadano rolę GC i cGMP w procesach wzrostu, rozwoju i w odpowiedzi na zewnętrzne czynniki stresowe.

Celem niniejszej pracy była charakterystyka dwóch cyklaz guanylanowych u *Brachypodium distachyon*, transmembranowej BdPepR2 i cytozolowej (rozpuszczalnej) BdGUCD1, oraz odpowiedź na pytanie o rolę cyklaz guanylanowych w reakcjach uruchamianych w komórkach roślin jednoliściennych w następstwie biotycznych czynników stresowych wywołanych infekcją *Fusarium pseudograminearum*, określenie funkcji cyklicznych nukleotydów w procesach zachodzących w komórkach roślinnych pod wpływem infekcji i ustalenie zależności przyczynowo - skutkowych pomiędzy cyklazami, cyklicznymi nukleotydami i wybranymi hormonami stresowymi.

W toku prac dowiodłam, iż rekombinowane białka BdPepR2 i BdGUCD1 charakteryzują się aktywnością enzymatyczną cyklazy guanylanowej *in vitro*. Ponadto, potwierdziłam aktywność kinazy serynowo/treoninowej u BdPepR2, która jest regulowana przez cGMP. Powyższe doświadczenia biochemiczne uzupełniłam analizami *in silico*, które wykazały, że BdPepR2 zawiera 14-aminokwasowe centrum katalityczne charakterystyczne dla roślinnych GC. Jednak w przypadku BdPepR2 w jednej z funkcjonalnie istotnych pozycji występuje metionina, nigdy wcześniej nie analizowana jako potencjalny aminokwas wchodzący w skład centrum aktywnego. Modelowanie struktury połączone z dokowaniem substratu sugeruje, że w przypadku BdPepR2 metionina może wykazywać dodatnie powinowactwo względem GTP w centrum GC, dane te wymagały jednak weryfikacji poprzez wykonanie serii doświadczeń. Wykorzystując mutagenezę kierunkową zaprojektowałam białka z różnymi mutacjami w centrum GC, a następnie potwierdziłam, że metionina jest aminokwasem najbardziej preferowanym spośród analizowanych. Jej obecność wiązała się z najwyższą aktywnością GC *in vitro*, co może być unikalną cechą cyklaz guanylanowych roślin jednoliściennych. Kolejno, testowałam czy cyklazy guanylanowe, BdGUCD1 i BdPepR2, oraz cGMP uczestniczą w odpowiedzi *Brachypodium distachyon* na infekcję *Fusarium pseudograminearum* oraz analizowałam czy istnieją zależności przyczynowo - skutkowe pomiędzy cGMP, a jasmonianami, kwasem salicylowym i kwasem abscysynowym, w następstwie infekcji. W wyniku przeprowadzonych analiz wykazałam, że wzrost poziomu cGMP inicjowany jest infekcją *F. pseudograminearum*, a analizy poziomu transkryptu ukazały dynamiczne zmiany ekspresji genów *BdGUCD1* i *BdPepR2*, wykazując, że podlegają one regulacji przez infekcję grzybową. Ponadto, odnotowałam, że w pierwszej dobie po inokulacji *F. pseudograminearum* w komórkach *B. distachyon* dochodzi do znaczącego wzrostu poziomu kwasu jasmonowego, natomiast stężenie kwasu abscysynowego wzrasta tylko trzeciego dnia. Ponadto, dzięki zastosowaniu inhibitora cyklaz guanylanowych przed inokulacją *F. pseudograminearum*, wykazałam, że istnieje zależność pomiędzy cGMP, a szlakiem jasmonowym gdyż zahamowanie syntezy cGMP modulowało poziom tylko jednego

z analizowanych hormonów, kwasu jasmonowego. Opisane wyniki pozwoliły na wkomponowanie dokonanych odkryć do istniejącego stanu wiedzy o metabolizmie cyklicznych nukleotydów u roślin oraz uzupełniły dotychczasową wiedzę na temat odpowiedzi *B. distachyon* na biotyczny czynnik stresowy.

Maria Duszyńska

13.05.2022