

## STRESZCZENIE

Szczytowy wzrost łagiewki pyłkowej jest jednym z podstawowych procesów, które decydują o powodzeniu podwójnego zapłodnienia u roślin okrytonasiennych. Łagiewka pyłkowa transportuje pozbawione zdolności ruchu komórki plemnikowe do woreczka zalążkowego, co umożliwia rozmnażanie generatywne roślin wyższych od środowiska wodnego. Łagiewki pyłkowe rosnące w warunkach *in vitro* zachowują polarny typ wzrostu charakteryzujący się strefową organizacją cytoplazmy i stanowią doskonały model w badaniach nad wierzchołkową elongacją wyspecjalizowanych komórek roślinnych. Liczne doniesienia niezależnych autorów dowodzą, że wzrost łagiewki pyłkowej wymaga precyzyjnej regulacji poziomu jonów wapnia ( $\text{Ca}^{2+}$ ) w jej cytoplazmie. W rosnącej łagiewce utrzymuje się charakterystyczny gradient tych jonów od apikalnego wierzchołka do jej podstawy, który warunkuje współdziałanie wszystkich podstawowych procesów komórkowych umożliwiających jej apikalny wzrost. Jednak molekularny mechanizm powstawania i stabilizacji gradientu  $\text{Ca}^{2+}$  w rosnącej łagiewce pyłkowej nie został do dziś wyjaśniony.

W prezentowanej pracy doktorskiej postawiono hipotezę, że jednym z kluczowych elementów mechanizmu wewnątrzkomórkowego, kontrolującego homeostazę  $\text{Ca}^{2+}$  łagiewki pyłkowej roślin okrytozalążkowych jest kalretikulina (CRT, ang. *calreticulin*), która w komórkach eukariotycznych uczestniczy w precyzyjnej regulacji poziomu  $\text{Ca}^{2+}$  w cytoplazmie oraz w kontroli jakości nowo syntetyzowanych peptydów w siateczce śródplazmatycznej (ER, ang. *endoplasmic reticulum*). W celu weryfikacji tej hipotezy, podjęto badania zmierzające do określenia roli CRT w procesie wzrostu łagiewki pyłkowej *Petunia*, które były prowadzone w warunkach *in vitro*, a w miarę możliwości weryfikowane *in planta*. W badaniach wykorzystano szereg metod stosowanych w biologii komórki, w tym hodowlę łagiewek pyłkowych w pożywce płynnej, technikę fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH, ang. *fluorescence in situ hybridization*), immunocytochemiczne metody lokalizacji antygenów, analizę ultrastrukturalną, fluorescencyjną wizualizację cytoszkieletu aktynowego, lokalizację luźno związanych  $\text{Ca}^{2+}$  na poziomie subkomórkowym, analizę Western blot oraz szereg podstawowych barwień cytologicznych. Wykorzystano także technikę wyciszania ekspresji genu na poziomie jego transkryptu za pomocą interferencji RNA (ang. *RNA interference*). Uzyskane wyniki analizowano z wykorzystaniem mikroskopii świetlnej, konfokalnej i transmisyjnej mikroskopii elektronowej.

Wyniki badań ujawniły, że łagiewki pyłkowe *Petunia* hodowane *in vitro* w warunkach umożliwiających ekspresję genu *PhCRT* na wymaganym poziomie, wykazują strefową

organizację cytoplazmy, która jest typowa dla łagiewek pyłkowych innych gatunków roślin okrytonasiennych, w tym łagiewek rosnących w szlupku. Można w nich wyróżnić trzy zdefiniowane strefy: apikalną, podwierzchołkową i trzonową, w których zróżnicowana organizacja cytoszkieletu aktynowego umożliwia dwukierunkowy przepływ cytoplazmy zgodnie z modelem „odwrotnej fontanny” oraz właściwą lokalizację organelli komórkowych i pęcherzyków. Zatem zastosowane warunki hodowli *in vitro* gwarantują otrzymywanie łagiewek pyłkowych o właściwych parametrach fizjologicznych, które mogą być wykorzystywane do bardziej zaawansowanych analiz cytologicznych i molekularnych.

W aktywnej aperturze kiełkujących ziaren pyłkowych i strefie podwierzchołkowej wydłużonych łagiewek *Petunia* ujawniono współwystępowanie CRT, *PhCRT* mRNA, transkryptów *Ph18S* rRNA oraz cystern śródplazmatycznej siateczki ziarnistej (RER, ang. *rough endoplasmic reticulum*). Wyniki te wskazują, że podczas kiełkowania i wzrostu łagiewki, translacja CRT odbywa się na rybosomach związanych z błonami ER w ściśle określonych regionach cytoplazmy. Ponadto, badania z wykorzystaniem techniki FISH oraz specyficznych sekwencji siRNA (ang. *small interfering RNA*) degradujących wybiórczo *PhCRT* mRNA dowodzą, że podczas kiełkowania pyłku *Petunia* następuje wznowienie transkrypcji, a następnie translacji CRT. W strefach aktywnej syntezy CRT, białko to jest gromadzone w cysternach ER i strukturach Golgiego, w których ujawniono także akumulację luźno związanych  $Ca^{2+}$  (tzw. wymienny wapń, ang. *exchangeable calcium*). Fakt współwystępowania CRT i wymiennego  $Ca^{2+}$  w tych przedziałach komórkowych wskazuje, że stanowią one mobilny magazyn  $Ca^{2+}$  w rosnącej łagiewce pyłkowej, którego kluczowym elementem jest CRT.

Kolejne badania wykazały, że efektem wyciszenia ekspresji *PhCRT* jest brak akumulacji CRT w strefie subapikalnej wydłużonej łagiewki oraz redukcja i zaburzona lokalizacja cystern ER i innych organelli komórkowych, związana z dezintegracją cytoszkieletu aktynowego w jej zdefiniowanych strefach. Zatem niedobór CRT skutkuje dysfunkcją wewnątrzkomórkowego mechanizmu sterującego przepływem cytoplazmy, który w warunkach fizjologicznych utrzymuje prawidłową strukturę łagiewki pyłkowej. Zaburzenia strukturalno-funkcjonalne powodują zahamowanie wzrostu łagiewki pyłkowej, która w efekcie pęka i obumiera. Badania z użyciem specyficznych sekwencji siRNA są unikalne z uwagi na fakt, że po raz pierwszy na świecie otrzymano wyniki dokumentujące efekt wyciszenia ekspresji CRT w rosnących łagiewkach pyłkowych.

Podsumowując, wyniki uzyskane podczas realizacji pracy doktorskiej dowodzą, że CRT jest niezwykle istotnym elementem wewnątrzkomórkowego mechanizmu, który pełniąc

rolę mobilnego magazynu  $\text{Ca}^{2+}$ , stabilizuje specyficzny gradient  $\text{Ca}^{2+}$  w rosnącej łagiewce *Petunia*, przez co wpływa na współdziałanie wszystkich podstawowych procesów i struktur warunkujących prawidłowy, polarny wzrost tej wysoce wyspecjalizowanej komórki roślinnej.