

Streszczenie

Programowana śmierć komórki (PCD) pełni kluczową rolę zarówno w trakcie rozwoju tkanek roślinnych jak i w reakcji roślin na niektóre czynniki środowiskowe. Przyjmuje się, że u roślin znaczenie PCD wynika także z roli jaką proces ten pełni w redystrybucji cennych składników budulcowych odzyskiwanych z komórek podlegających eliminacji. Jednym z podstawowych zjawisk towarzyszących programowanej śmierci komórek u zwierząt jak i u roślin jest degradacja zawartych w nich kwasów nukleinowych. U roślin degradacji tej towarzyszy pojawienie się aktywności co najmniej kilku nukleaz charakteryzujących się różnymi właściwościami katalitycznymi, które dotychczas nie były jednak obiektem badań.

Przyjmuje się, że w trakcie procesu PCD w hydrolizie DNA współuczestniczą ze sobą różne nukleazy należące do rodziny S1/P1 wraz z nukleazami należącymi do innych rodzin, np. S_{Nc}. Ponieważ enzymy te posiadają zróżnicowane wymagania katalityczne teoretycznie mogą one pełnić swoje funkcje na różnych etapach PCD, charakteryzujących się różnymi warunkami fizjologicznymi. Zakłada się, że DNA genomowy podczas PCD u roślin początkowo jest celem aktywności nukleaz zależnych od Ca²⁺, aktywnych w neutralnym pH, natomiast na kolejnym etapie, po pęknięciu tonoplastu, kwasy nukleinowe podlegają degradacji z udziałem nukleaz zależnych od Zn²⁺ i aktywnych w niskim pH.

Głównym celem pracy było potwierdzenie powyższych założeń dotyczących współdziałania różnych nukleaz w mechanizmie degradacji DNA. Przeprowadzone badania wykazały w jaki sposób proces ewolucji w wyniku mutacji pozycji aminokwasowych centrum katalitycznego może prowadzić do wytworzenia różnorodności wymagań katalitycznych wśród nukleaz S1/P1. Potwierdzono także, że różnorodność tego typu nie jest cechą specyficzną jedynie dla roślinnych przedstawicieli tej rodziny. Opisano również zmiany lokalizacji komórkowej poszczególnych nukleaz typu S1/P1 w trakcie postępującego procesu PCD oraz w wyniku oddziaływania stresu kwasu salicylowego, potwierdzając założenie, że ma ona związek z ich wymaganiami katalitycznymi. Korzystając z systemu genu reporterowego przedstawiono profile ekspresji promotorów poszczególnych nukleaz z rodzin S1/P1 oraz S_{Nc} *A. thaliana* na różnych etapach rozwoju roślin. Wyniki te potwierdziły zakładany do tej pory tylko teoretycznie udział niezbadanych dotychczas nukleaz z rodzin S1/P1 oraz S_{Nc} w procesach zachodzących na terenie tkanek podlegających PCD. Pozwoliło to na wykazanie, że mechanizmy degradacji DNA angażują różne nukleazy współdziałające ze sobą w trakcie PCD. Przenalizowano również fenotypy roślin z mutacjami insercyjnymi w genach nukleaz z obu wyżej wspomnianych rodzin białkowych, co pozwoliło na potwierdzenie, że kluczowe dla przebiegu procesu PCD u roślin są nukleazy wymagające neutralnego pH oraz obecności jonów Ca²⁺. Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki, udało się w znacznym stopniu poszerzyć wiedzę na temat zaangażowania i mechanizmu działania różnych nukleaz degradujących w procesie programowanej śmierci komórki.