

## Streszczenie

### **Indukcja alternatywnej drogi metabolizmu tyrozyny w ziemniaku przez wprowadzenie genu hydroksylazy tyrozyny ze szczura laboratoryjnego (*Rattus norvegicus*)**

Katecholaminy to klasa biogennych monoamin aromatycznych występujących powszechnie zarówno w świecie zwierząt, jak i roślin. Ta grupa związków została bardzo dokładnie poznana u zwierząt z uwagi na funkcję, jaką pełnią w tych organizmach – są neuroprzekaźnikami w układzie nerwowym, a także hormonami regulującymi wiele procesów fizjologicznych, w tym gospodarkę cukrową. Ich funkcja w roślinach jest natomiast słabo poznana. Mogą być w nich prekursorami dla innych związków biochemicznych, w tym alkaloidów (morfina, papaweryna), pigmentów (betalain i melanin) oraz składników ściany komórkowej (amidy z kwasami hydroksycynamonowymi). Katecholaminy charakteryzują się dużym potencjałem antyoksydacyjnym, a ich pochodne mogą uczestniczyć w odpowiedzi na infekcję patogenną. Z uwagi na niewielkie stężenia katecholamin w roślinach oraz ich pewną analogię do funkcji pełnionych w zwierzętach, np. wpływ na gospodarkę cukrową czy modulację działania innych hormonów, zaproponowano fitohormonalne działanie tej grupy związków. Dodatkowo stwierdzono zmiany w ich zawartości w odpowiedzi na stres. Nie potwierdzono jednak istnienia receptora specyficznego względem katecholamin.

Wszystkie katecholaminy produkowane są z tyrozyny, która powstaje na drodze hydroksylacji fenyloalaniny. Oba te aminokwasy są w roślinach punktem wyjścia do biosyntezy obszernej grupy metabolitów drugorzędowych, jakimi są pochodne fenolowe, w tym kwasy fenolowe, pochodne benzoesowe, ligniny czy flawonoidy. Przyjmuje się, że podstawowa droga biosyntezy katecholamin roślinnych opiera się o katalizowaną przez dekarboksylazę tyrozyny przemianę tyrozyny do tyraminy i dalej jej hydroksylację do dopaminy. Alternatywna droga biosyntezy tych związków zakłada najpierw hydroksylację tyrozyny do L-DOPY, a następnie jej dekarboksylację do dopaminy i jest główną drogą produkcji katecholamin u zwierząt. Dotychczas nie udało się zidentyfikować genu kodującego hydroksylazę tyrozyny w roślinach. Celem tej pracy było wygenerowanie owej alternatywnej ścieżki produkcji katecholamin w ziemniaku poprzez wprowadzenie sekwencji kodującej hydroksylazę tyrozyny pochodzącej ze szczura laboratoryjnego (*Rattus norvegicus*) i zbadanie jej funkcjonalności oraz wpływu na fizjologię rośliny. Wybór ziemniaka jako rośliny badawczej podyktowany był prowadzonymi wcześniej w Laboratorium Biochemii Genetycznej Uniwersytetu Wrocławskiego badaniami dotyczącymi oszacowania roli katecholamin w tym organizmie opierającymi się o wytworzone rośliny transgeniczne z nadekspresją dekarboksylazy tyrozyny. W roślinach tych stwierdzono podniesioną zawartość tyraminy i katecholamin i ich wpływ na gospodarkę cukrową rośliny. W bulwach stwierdzono spadek zawartości skrobi przy jednoczesnym wzroście poziomu cukrów rozpuszczalnych. W dodatku, prawdopodobnie z uwagi na zmiany w zawartości związków fenolowych, były one również odporniejsze na infekcje patogenne. W roślinach transgenicznych

wytworzonych w ramach tej pracy zaobserwowano odmienną odpowiedź. Wprowadzenie genu szczurzej hydroksylazy tyrozyny doprowadziło do zwiększonej ilości produktu reakcji katalizowanej przez ten enzym - L-DOPY, jednak poziom katecholamin (i produktów ich katabolizmu) był niższy niż w roślinach kontrolnych, co sugeruje, że główną drogą biosyntezy katecholamin jest ta przez dekarboksylację tyrozyny do tyraminy. L-DOPA w roślinach może być wydzielana jako związek allelopatyczny, a jej toksyczne działanie polega na utlenianiu do związków chinonowych, podczas którego produkowane są wolne rodniki. Badania ziemniaków z ekspresją szczurzego genu hydroksylazy tyrozyny sugerują, że produkowana w ziemniakach L-DOPA nie jest substratem do produkcji katecholamin, ale stanowi czynnik stresowy dla rośliny. Zmierzona wyższa zawartość  $H_2O_2$  potwierdza tę hipotezę. Odpowiedzią rośliny na ten stan jest reakcja typowa dla roślin poddanych stresowi oksydacyjnemu - nadprodukcja antyoksydantów - głównie flawonoidów, wzmocnienie ściany komórkowej (produkcja amidów tyraminy i kwasów hydroksycynamonowych) i aktywacja genów odpowiedzialnych za neutralizację wolnych rodników. Taki utrzymujący się stan stresu oksydacyjnego powoduje większą odporność roślin na infekcję patogenną. Być może z uwagi na brak wzrostu poziomu katecholamin nie zaobserwowano efektu, który cechował ziemniaki z nadekspresją dekarboksylazy tyrozyny, to jest spadku poziomu skrobi. Plon ziemniaków utrzymywał się na poziomie kontrolnym, aczkolwiek zaobserwowano, że rośliny te produkowały bulwy o mniejszej masie, ale w większej liczbie, niż rośliny nietransgeniczne. Z drugiej jednak strony pozytywny z punktu widzenia konsumenta okazał się być nieco obniżony poziom charakterystycznych dla ziemniaka glikoalkaloidów -  $\alpha$ -solaniny i  $\alpha$ -chakoniny oraz nieco większa zawartość białka w bulwach, a przede wszystkim podwyższona ilość antyoksydantów fenolowych.

Badania nad efektem indukcji alternatywnej drogi metabolizmu tyrozyny w kierunku katecholamin doprowadziły do pozyskania nowej wiedzy na temat możliwości manipulowania metabolicznymi szlakami roślinnymi poprzez wprowadzenie układów typowych dla zwierząt. Postawiły również nowe pytania, jak choćby to na czym polega udział katecholamin w odporności roślin, czy wynika ona z indukcji stresu oksydacyjnego czy też bardziej „wyrafinowanego” działania na przykład poprzez wpływ na czynniki transkrypcyjne. Odpowiedź przyniosą dalsze badania katecholamin w roślinach.