



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Wanda Biała Katedra Biochemii i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Stypendystka projektu pt. „Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski”, Poddziałanie 8.2.2 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

Funkcja oraz mechanizmy regulacji transporterów ABC u *Medicago truncatula*

Jednym z najważniejszych obszarów biotechnologii roślin jest produkcja metabolitów wtórnych. Pod tą nazwą kryje się ogromna liczba związków chemicznych, wykazujących swoistą aktywność biologiczną, które nie odgrywają większej roli w metabolizmie podstawowym, natomiast mają zasadnicze znaczenie w procesach przystosowania się roślin do przeżycia w środowisku.

Obecnie znanych jest ponad 20 000 związków chemicznych wyizolowanych z roślin. Mimo, iż dzięki zdobywanemu przez lata doświadczeniu udało się zoptymalizować produkcję roślinną, wyzwania stojące przed naukowcami, aby uczynić roślinne systemy produkcyjne wydajniejszymi są nadal aktualne. Obejmują między innymi: (i) zwiększenie ilości otrzymywanego produktu, (ii) obniżenie kosztów produkcji, (iii) bezpieczeństwo dla środowiska. Ponieważ są to zazwyczaj substancje o bardzo złożonej budowie, synteza chemiczna wielu z nich jest niezwykle trudna i kosztowna. Główną metodą ich otrzymywania pozostaje ekstrakcja tych związków z materiału roślinnego. Takie rozwiązanie niesie ze sobą szereg trudności, takich jak niska wydajność biosyntezy czy niewielkie stężenia pożądanego związku w tkance roślinnej. W związku z tymi ograniczeniami tradycyjnego pozyskiwania materiału roślinnego, atrakcyjną alternatywę stanowi produkcja z zastosowaniem roślinnych kultur komórkowych lub tkankowych.

Roślinne kultury zawieszinowe są stosowane często w produkcji metabolitów roślinnych na skalę przemysłową z powodu swej jednorodności oraz istnienia opracowanych metod hodowli w bioreaktorach o dużej pojemności. Jednakże w przypadku tego typu kultur często, jako wadę wskazuje się niestabilność genetyczną i niską wydajność produkcji. Dlatego też ciekawą możliwością wydają się być hodowle korzeni włosowatych (*ang. hairy roots*). W wyniku procesu transformacji, za pośrednictwem *A. rhizogenes* w miejscu infekcji następuje

intensywny wzrost licznych, drobnych korzeni zwanych korzeniami włosowatymi. Korzenie takie charakteryzuje niezwykle szybki i nieograniczony wzrost na pożywkach bez dodatku regulatorów wzrostu. Ponadto kultury korzeni włosowatych charakteryzuje znaczne zróżnicowanie komórek w porównaniu z hodowlą zawieszinową, co sprzyja zwiększonej produkcji niektórych metabolitów roślinnych. Jednak, aby w pełni móc wykorzystać potencjał kultur *in vitro* w produkcji roślinnej należy położyć nacisk na problem uwalniania produkowanych substancji z komórek do pożywki. Stąd duża koncentracja naukowców na poszukiwaniu białek, które mogą być transporterami pożądaných produktów naturalnych. W Katedrze Biochemii i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu intensywnie rozwijane są badania związane z regeneracją i transformacją korzeniowych kultur *in vitro*, a także możliwością ich modyfikacji i aplikacji w przemyśle biotechnologicznym.

Flawonoidy są metabolitami wtórnymi o szerokim spektrum aktywności biologicznej. Oprócz tego, ze odgrywają istotną rolę w rozwoju roślin i ich oddziaływaniu ze środowiskiem, znalazły rozległe zastosowanie, jako terapeutyki i nutraceutyki. Szczególną grupę metabolitów wtórnych stanowią izoflawonoidy. Są to związki niskocząsteczkowe pochodzące z roślin motylkowatych. Izoflawonoidy wykazują właściwości antyoksydacyjne i przeciwzapalne, chronią przed promieniowaniem ultrafioletowym i mają właściwości antybiotyczne i przeciwgrzybicze, a także działanie antyproliferacyjne. Izoflawonoidy często określane są, jako fitoestrogeny, posiadają cechy strukturalne naturalnego estradiolu. Najpopularniejszym i najlepiej poznanym jest genisteina, pochodząca z soi (*Glycine max*). Jednakże oprócz zalet związanych z łagodzeniem objawów menopauzy u kobiet, genisteina wykazuje właściwości indukcyjne wobec komórek nowotworowych. Dlatego też intensywnie poszukuje się innych fitoestrogenów. Odpowiednimi kandydatami wydają się być m. in. formononetyna, daidzeina (występujące u *Medicago*) i kumesterol, które mogłyby znieść niekorzystne działanie genisteiny. Sekrecja i transport metabolitów wtórnych są jednym z przedmiotów badań Katedry Biochemii i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

Jak dotąd nie zidentyfikowano molekularnych podstaw transportu izoflawonoidów u motylkowatych. Otrzymane przeze mnie do tej pory wyniki pozwalają sądzić, iż MtABCG10 pełni taką funkcję, a tym samym mogą być wykorzystane do zwiększenia wydajności produkcji izoflawonoidów na dużą skalę. Skutkiem tego będzie obniżenie kosztów, a tym samym, cen preparatów zawierających izoflawonoidy. Podobne podejścia są już stosowane, np. w produkcji alkaloidów w komórkach tytoniu.

Co więcej prowadzone przeze mnie badania przyczynią się z racji pełnionej funkcji-modulacji oddziaływań roślina-środowisko, a w szczególności symbiozy. Ze względu na zawartość metabolitów wtórnych oraz znaczących ilości białka, uprawa roślin motylkowatych stała się ważnym elementem gospodarki światowej. Dodatkowo motylkowate wykazują

zdolność do wiązania azotu atmosferycznego dzięki nawiązywaniu symbiozy z bakteriami brodawkowymi. Tym samym ich uprawa korzystnie wpływa na strukturę gleby oraz jej żyzność. Dzięki czemu podczas uprawy motylkowatych nie są wymagane nawozy sztuczne (zmniejszenie chemizacji), a w przypadku wykorzystania ulepszonych odmian, odpornych na choroby także środki ochrony roślin. Ten aspekt jest niezwykle ważny dla gospodarstw ekologicznych w Województwie Wielkopolskim. Wielkopolska jest ważnym regionem strategicznym dla sprzedaży ekologicznych produktów, ze względu sprzyjające ku temu warunki m.in. najmniej skażoną glebę, dużą powierzchnię użytków rolnych, niskie koszty produkcji. Rozwojowi eko-rolnictwa w Wielkopolsce sprzyja też bliskość rynku zachodnioeuropejskiego, szczególnie niemieckiego. Dodatkowym atutem motylkowatych jest możliwość ich uprawy na terenach suchych, a takim właśnie regionem jest Wielkopolska.

Białka ABCG będące obiektem badań mojej pracy doktorskiej należą do rodziny transporterów błonowych określanej białka ABC (*ang. ATP-Binding Cassette proteins*). Tworzą one jedną z najliczniejszych i najszerzej rozpowszechnionych rodzin białkowych. Białka te wykorzystują energię hydrolizy ATP do aktywnego transportu przez błony biologiczne niepowiązanych ze sobą strukturalnie i funkcjonalnie związków.

Wykazano, że rośliny są szczególnie bogate w białka ABC, których aktywność jest niezbędna zarówno dla ich prawidłowego rozwoju, jak i nawiązywania interakcji z otaczającym środowiskiem. Wiadomo, że roślinne transportery ABC uczestniczą w wielu kluczowych procesach, decydujących o istotnych cechach użytkowych roślin m.in. w detoksyfikacji, odpowiedzi obronnej, transporcie hormonów roślinnych, formowaniu funkcjonalnej kutikuli, a także modulacji poziomu oraz sekrecji metabolitów wtórnych.

Dostępne dane literaturowe pozwalają postawić hipotezę, że pełne transportery ABCG biorą udział w sekrecji niskocząsteczkowych związków endogennych modulujących oddziaływań rośliny ze środowiskiem oraz odpowiedzi na stres biotyczny i abiotyczny.

Celem mojej pracy doktorskiej jest poznanie mechanizmów regulacji oraz funkcji, jaką pełnią transportery ABCG w sekrecji izoflawonoidów u modelowej rośliny motylkowatej *Medicago truncatula*.

Swoje badania rozpoczęłam od uzyskania materiału roślinnego w postaci korzeni włosowatych *Medicago* z wyciszoną ekspresją *MtABCG10*. Wyciszenie ekspresji interesującego genu może wywołać zmiany fenotypowe, wskazujące na udział produktów jego ekspresji w danym procesie fizjologicznym. Otrzymany homogeny materiał wykorzystano do przeprowadzenia szeregu analiz metabolomicznych.

Analizy te wykazały, że wyciszenie ekspresji *MtABCG10* powoduje zaburzenia ilości związków niezbędnych w biosyntezie medikarpiny (fitoaleksyny *Medicago*). Dotyczy to w szczególności prekursorów szlaku m. in. izolikwiritigeniny, co skutkuje ostatecznie znaczącym obniżeniem ilości medikarpiny. Ponadto udało mi się doprowadzić do

rekonstrukcji szlaku biosyntezy medikarpiny w liniach transgenicznym z wyciszoną ekspresją MtABCG10 w efekcie egzogennej aplikacji jej prekursorów. Uzyskany efekt potwierdził rolę dystrybucji kluczowych związków ze szlaku w prawidłowym jego funkcjonowaniu oraz wskazywał na MtABCG10, jako potencjalny transporter takich molekuł.

Z racji, iż transportery ABCG jawią się, jako białka biorące udział w translokacji izoflawonoidów u *Medicago*, a jednocześnie ich prawidłowe funkcjonowanie jest zależne od endogennego poziomu ATP w komórce, przeprowadzono dodatkowo eksperyment z wykorzystaniem substancji znanych, jako inhibitory syntezy ATP. Wykazano, że obniżenie ilości ATP w materiale roślinnym znacząco obniża ilość izoflawonoidów transportowanych do pożywki.

Celem ostatecznego potwierdzenia transportu izolikwiritigeniny i likwiritigeniny przez MtABCG10 zamierzam przeprowadzić eksperyment transportu z wykorzystaniem heterologicznej ekspresji genu kodującego to białko i hodowli tytoniu *Nicotiana tabacum cv. BY2* (ang. *Bright Yellow-2*). Tytoń nie wykazuje obecności związków fenolowych, izoflawonoidów, charakterystycznych dla motylkowatych, a szczególnie *Medicago*.

Prowadzone przeze mnie badania oprócz cennych walorów poznawczych mają aspekt aplikacyjny. Wyniki moich badań wpłyną na udoskonalenie już stosowanych rozwiązań jak uprawa ulepszonych odmian roślin uprawnych, a także pozwolą na rozwój dość młodej branży przemysłu, jakim jest biotechnologiczna produkcja roślinna. Ze względu na możliwość optymalizacji produkcji izoflawonoidów w systemach bioreaktorowych poprzez nadekspresję białek transportowych możliwe również będzie zaspokojenie potrzeb rynku farmaceutycznego.