

## Regulacja aktywności i wiązanie substratów w zależnej od światła oksydoreduktazie protochlorofilidu

Zależna od światła oksydoreduktaza protochlorofilidu (E.C. 1.3.1.33, POR) jest roślinnym enzymem katalizującym jedną z ostatnich reakcji szlaku biosyntezy chlorofilu, mianowicie redukcję protochlorofilidu (Pchlidu) do chlorofilidu (Chlidu) z udziałem NADPH. W wyniku tej reakcji wiązanie podwójne między atomami węgla C17 i C18 zostaje zredukowane, a dinukleotyd utleniony. Unikalną cechą POR jest fakt, że wiązanie obu substratów przez enzym nie jest wystarczające to inicjacji reakcji. Reakcję inicjuje dopiero wzbudzenie cząsteczki Pchlidu związanej w kompleksie z POR i NADPH, które jest efektem np. absorpcji kwantu światła.

W etiolowanych roślinach okrytonasiennych POR akumulowany jest wraz z NADPH i Pchlidem w ciałach prolamellarnych (PLB) wewnątrz etioplastów. Takie kompleksy mają charakterystyczne pasmo emisji fluorescencji o maksimum 654 nm.

W ramach niniejszej pracy doktorskiej badano proces oligomeryzacji POR, mechanizm wiązania substratów oraz wpływ lipidów PLB na enzym z wykorzystaniem rekombinantowego białka PORA z *Arabidopsis thaliana*. Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że POR tworzy duże oligomery bez względu na obecność substratów. Tworzenie się oligomerów POR przed związaniem substratów obserwowano wykorzystując metodę FRET oraz elektroforezę natywną. Sieciowanie chemiczne oraz spektrometria mas pozwoliły zidentyfikować reszty aminokwasowe, które dzieli niewielka odległość w oligomerze POR. Uzyskane dane wykazały, że wiązanie substratów powoduje zbliżenie motywów katalitycznych sąsiednich podjednostek w oligomerze na odległość około 12 Å. Może się to odbywać poprzez reorganizację struktury oligomeru lub poprzez oddziaływanie między istniejącymi oligomerami. Zakładając, że kieszeń wiążąca barwnik sąsiaduje z motywem katalitycznym POR, uzyskane wyniki oznaczają, że podobnego rzędu jest odległość między cząsteczkami Pchlidu związanymi w sąsiednich podjednostkach oligomeru POR.

W oparciu o uzyskane dane otrzymano szereg mutein delecyjnych POR, a ich zdolność do oligomeryzacji badano za pomocą elektroforezy natywnej. Dzięki tej metodzie udało się zidentyfikować dwie grupy reszt aminokwasowych białka (reszty 85-88 oraz 240-270) ważne dla procesu oligomeryzacji.

Ponadto udowodniono eksperymentalnie, że do odtworzenia kompleksów charakteryzujących się pasmem emisji fluorescencji o maksimum 654 nm, a więc takich jakie występują w PLB, konieczna jest obecność POR, Pchlidu, NADPH, MGDG oraz przynajmniej jednego z ujemnie naładowanych roślinnych lipidów: PG lub SQDG. Co więcej, PG oraz SQDG znacząco zwiększają powinowactwo enzymu do NADPH. Efekt ten jest na tyle silny, że w obecności tych lipidów także NADH może być skutecznie wiązany przez POR i wykorzystywany w reakcji. Ponadto, uzyskane dane wskazują na intensywny transfer energii wzbudzenia z Pchlidu na Chlid oraz między cząsteczkami Pchlidu, co oznacza, że cząsteczki barwnika są blisko w oligomerze POR. Potwierdza to tym samym wnioski z poprzednich eksperymentów.

Dzięki ukierunkowanej mutagenzie udało się zidentyfikować kilka reszt aminokwasowych zaangażowanych we wiązanie Pchlidu, tj. H321, T316 oraz T317. Reszta R323 może brać udział w wiązaniu ujemnie naładowanych lipidów.

Zgromadzone dane na temat położenia maksimum emisji fluorescencji Pchlidu i Chlidu w obecności różnych stężeń lipidów i NADPH pozwolą lepiej interpretować widma fluorescencji zieleniejących roślin, co z kolei przełoży się na lepsze zrozumienie fizjologicznych procesów związanych z zielenieniem. Uzyskane wyniki pozwoliły poznać nowy mechanizm regulacji szlaku biosyntezy chlorofilu poprzez regulację powinowactwa POR do NADPH za pomocą ujemnie naładowanych lipidów. Poznanie fizjologicznego znaczenia tego procesu wymaga jeszcze dalszych badań