„Badania funkcji antyoksydacyjnych oraz szlaków biosyntezy chinonów prenylowych u roślin"

Beatrycze Nowicka

Lipidy prenylowe stanowią zróżnicowaną grupę związków o istotnym znaczeniu dla organizmów. Należące do nich chinony prenylowe występują w niemal wszystkich żywych komórkach, gdzie pełnią funkcje przenośników elektronów i protonów w łańcuchach transportu elektronów. Ponadto, są one kofaktorami enzymów, mogą uczestniczyć w regulacji ekspresji genów, a także, zwłaszcza w chinolowej formie zredukowanej, są wydajnymi antyutleniaczami. Inną ważną podgrupę stanowią chromanole, uważane przede wszystkim za antyutleniacze, choć mogą również pełnić funkcje regulacyjne. Celem niniejszej pracy było poszerzenie wiedzy na temat antyutleniającego działania wyżej wymienionych związków w układach *in vitro* oraz *in vivo*, a także zbadanie pewnych, do tej pory nierozstrzygniętych aspektów biosyntezy chinonów prenylowych.

W doświadczeniach z wykorzystaniem liposomów sporządzonych z mieszaniny lipidów chloroplastowych, zawierających fotouczulacz - porfirynę oraz lipidy prenylowe badano hamowanie peroksydacji lipidów wywoływanej przez tlen singletowy. Przebadano pod tym względem jedenaście związków należących do chromanoli, chinonów oraz chinoli prenylowych. Wszystkie analizowane związki wykazywały znaczną zdolność hamowania peroksydacji. Obserwowano również powstawanie charakterystycznych produktów utleniania plastochromanolu-8 i plastochinonu-9 przez tlen singletowy, mianowicie odpowiednio hydroksy-plastochromanol i plastochinon-C. Przeprowadzono także doświadczenia, mające na celu wyjaśnienie zjawiska prooksydacjynego działania α-tokoferolu w liposomach, w których peroksydacja lipidów była inicjowana za pomocą hydrofobowego termolabilnego azoinicjatora. Wyniki pozwoliły na wytłumaczenie tego zjawiska, potwierdzono też, że plastochinol jest zdolny do redukcji rodnika α-tokoferoksylowego, powstającego podczas reakcji α-tokoferolu z wolnymi rodnikami.

Kolejne eksperymenty miały na celu wyjaśnienie, czy produkty utleniania α-tokoferolu mogą być bez udziału enzymów ponownie przekształcane w α-tokoferol. Tego rodzaju reakcję obserwowano wcześniej dla α-tokoferylochinonu w metanolu, w obecności kwasu i askorbinianu. Okazało się jednak, że nie zachodzi ona w układach liposomowych. Podobnie cyklizacji nie ulegał α-tokoferylochinol. Natomiast dla 8*a*-hydroperoksy-α-tokoferonu, nietrwałego produktu utleniania α-tokoferolu przez tlen singletowy, obserwowano jego przekształcanie do α-tokoferolu w liposomach w buforze o niskim pH, zawierającym askorbinian.

Eksperyment, w którym mierzono szybkość konsumpcji tlenu w układach liposomowych, zawierających wbudowany PSI, badany lipid prenylowy oraz donory elektronów - hydrochinon i plastocyjaninę, miał na celu zbadanie zdolności lipidów prenylowych do zmiatania anionorodnika ponadtlenkowego. Wykazano, że wszystkie badane lipidy prenylowe obniżały szybkość konsumpcji tlenu przez PSI. Z reguły prenylochinony z krótkim łańcuchem bocznym okazywały się bardziej aktywne od posiadających długi łańcuch boczny.

W doświadczeniu, w którym badano zawartość lipidów prenylowych w liściach *Arabidopsis thaliana*, poddanego uprzednio działaniu stresu świetlnego lub termicznego, zaobserwowano, że w warunkach stresu świetlnego dochodziło do gromadzenia się głównie α-tokoferolu, podczas gdy w niskiej temperaturze znaczny udział miał również γ-tokoferol. Badania zawartości chromanoli w liściach *A. thaliana* hodowanych w świetle o niskim, średnim i wysokim natężeniu pozwoliły oszacować rolę, jaką pełnią chromanole, a przede wszystkim mniej do tej pory przebadane plastochromanol-8 i hydroksy-plastochromanol, w czasie stresu świetlnego i starzenia się roślin. Stwierdzono, że hydroksy-plastochromanol może być indykatorem wskazującym na wzmożoną produkcję tlenu singletowego w tkankach. Pomiar udziału chromanoli i plastochinonu-9 we frakcji uzyskanej z plastoglobul, potwierdził, że znaczna część wszystkich wyżej wymienionych związków w starzejących się roślinach występuje w plastoglobulach, a plastochromanol-9 i jego utleniona pochodna zachowują się podobnie, jak α-tokoferol.

Eksperymenty na zielenicy *Chlamydomonas reinhardtii*, poddawanej stresowi świetlnemu w obecności różnego rodzaju inhibitorów, wykazały, że u tego glonu decydującą rolę w ochronie przed stresem oksydacyjnym, a zwłaszcza przed tlenem singletowym, pełni plastochinol-9. Doświadczenia prowadzone w obecności DCMU pozwoliły stwierdzić, że nie tylko plastochinol-9, ale też jego forma utleniona może pełnić funkcję antyutleniającą. Pomiary zawartości produktów utlenienia α-tokoferolu i plastochinonu-9 okazały się istotne dla określenia udziału tych związków w zmiataniu reaktywnych form tlenu. Pozwoliły także uznać plastochinon-C za indykator stresu oksydacyjnego wywołanego przez tlen singletowy *in vivo*.

W niniejszej pracy zweryfikowano dane literaturowe odnośnie biosyntezy α-tokoferylochinonu u wybranych mikroorganizmów. W przebadanych organizmach nie wykryto jednak obecności α-tokoferylochinonu; wyjątkiem okazała się obligatoryjnie beztlenowa bakteria *Butyrivibrio fibrisolvens*, u której związek ten występował w ilościach śladowych. Innym, do tej pory nierozstrzygniętym zagadnieniem jest biosynteza plastochinonu u sinic. Dane literaturowe wskazują na inny niż u roślin szlak biosyntezy tego prenylolipidu u sinic. Przeprowadzone analizy sekwencji genów, analizy składu wybranych gatunków i szczepów, doświadczenia z wykorzystaniem inhibitorów oraz prekursorów znakowanych izotopowo pozwoliły stwierdzić, że biosynteza plastochinonu przebiega odrębnym szlakiem, który jest zbliżony do szlaku biosyntezy ubichinonu u *E. coli*.