15 -05- 2018

Streszczenie rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Kuczyńskiej zatytułowanej „Analiza wybranych aspektów funkcjonowania cyklu ksantofilowego w komórkach *Phaeodactylum tricornutum* w odpowiedzi na stres świetlny i temperaturowy"

Okrzemki jako organizmy fotosyntetyzujące zmagają się z problemem zarówno wydajnego wykorzystania energii słonecznej, jak i ochrony przed jej nadmiarem, mogącym doprowadzić do fotoinhibicji oraz uszkodzenia aparatu fotosyntetycznego. Funkcja fotoprotekcyjna jest przypisywana głównie karotenoidom, z których wybrane rodzaje biorą udział w procesie zwanym cyklem ksantofilowym. Spośród kilku dotąd opisanych cykli dwa występują w okrzemkach: cykl diadinoksantynowy będący pierwszym elementem ochrony oraz cykl wiolaksantynowy obserwowany w niektórych sytuacjach stresowych.

Celem niniejszej rozprawy było wyjaśnienie molekularnego mechanizmu funkcjonowania dwóch cykli ksantofilowych u okrzemek oraz charakterystyka wybranych aspektów procesów fizjologicznych wywołanych stresem temperaturowym lub zmianą intensywności światła. W szczególności podjęto próbę wyjaśnienia w jakich warunkach dochodzi do uruchomienia jednego bądź obu cykli. Do badań wykorzystano *Phaeodactylum tricornutum*, modelowy gatunek okrzemki o znanej sekwencji genomu, w tym także genów kodujących enzymy cyklu ksantofilowego. Przeprowadzono analizy składu barwnikowego, kinetyki de-epoksydacji diadinoksantyny i epoksydacji diatoksantyny, oznaczenia poziomu transkryptów genów cyklu ksantofilowego, a także oznaczenia stopnia peroksydacji lipidów. Zbadano wpływ produktów świetlnych reakcji cyklu ksantofilowego, zeaksantyny i diatoksantyny, na termodynamikę błon modelowych metodą skaningowej kalorymetrii różnicowej i przez pomiar anizotropii fluorescencji DPH. Dodatkowo przeprowadzono analizy mające na celu opracowanie układu umożliwiającego ekspresję wybranych rekombinowanych epoksydaz zeaksantynowych w *Escherichia coli*.

W wyniku badań nad stresem termicznym zaobserwowano, że okrzemki hodowane w niższej temperaturze cechuje zwiększona zdolność fotoprotekcyjna będąca prawdopodobnie mechanizmem adaptacyjnym uwrażliwionych termicznie komórek. Wyniki badań nad stresem świetlnym sugerują, że w silnym stresie świetlnym okrzemki preferują akumulację zeaksantyny, co może świadczyć o jej większych zdolnościach fotoprotekcyjnych w stosunku do diatoksantyny. Na podstawie badań *in vivo* kinetyki obu reakcji cyklu diadinoksantynowego wydaje się prawdopodobne, że zwiększona zawartość barwników cyklu wiolaksantynowego pozytywnie wpływa na szybkość reakcji cyklu diadinoksantynowego. Ponadto oznaczenia stopnia peroksydacji lipidów sugerują, że obecność zeaksantyny odgrywa istotną rolę, prawdopodobnie większą niż diatoksantyna, w zapobieganiu uszkodzeniom błon przez reaktywne formy tlenu. Badania ekspresji genów w komórkach poddanych stresowi świetlnemu sugerują, że VDE i ZEP2 katalizują reakcje cyklu diadinoksantynowego, VDL1 i ZEP3 – reakcje cyklu wiolaksantynowego, zaś VDL2 i ZEP1 są prawdopodobnie zaangażowane w reakcje niezwiązane z cyklem ksantofilowym. Badania fluorymetryczne błon modelowych wykazały większy wpływ zeaksantyny niż diatoksantyny na wzrost anizotropii DPH, szczególnie w fazie ciekłokrystalicznej, co sugeruje zwiększenie lepkości wnętrza błony, a tym samym obniżenie jej płynności. Natomiast wpływ diatoksantyny na zmiany strukturalne błony może być bardziej związany z jej powierzchnią niż wnętrzem, co wynika ze struktury cząsteczki barwnika. Oba barwniki charakteryzowały się dużym wpływem na termodynamikę błon, w szczególności w fazie żelu. Wykonane badania o charakterze metodycznym pozwoliły na opracowanie wydajnego procesu izolacji i oczyszczania diatoksantyny i diadinoksantyny z okrzemek, zeaksantyny z modyfikowanych genetycznie bakterii oraz tylakoidów z okrzemek. Preparaty charakteryzowały się wysokim stopniem czystości. Rezultatem badań nad białkami rekombinowanymi było uzyskanie nadekspresji AtZEP i PtZEP3 jednak występujących w komórkach bakteryjnych w postaci ciałek inkluzyjnych. Wyniki badań aktywności enzymatycznej wskazywały na obecność niewielkiej frakcji rozpuszczalnego i aktywnego białka.

Niniejsza rozprawa pozwoliła na zgłębienie wiedzy w zakresie mechanizmów fotoprotekcyjnych okrzemek, charakterystykę przemian określanych mianem cyklu diadinoksantynowego oraz podkreślenie ważnej roli fakultatywnie występującej w nich zeaksantyny. Ponadto opracowane procedury poszerzają dostępną metodykę wspierając tym samym rozwój badań, natomiast efekty pracy nad białkami rekombinowanymi otwierają drogę do dalszych etapów pozwalających na charakterystykę biochemiczną epoksydaz zeaksantynowych.