

mgr Emilia Niemczyk
Katedra Farmacji i Chemii Ekologicznej
Instytut Chemii Uniwersytetu Opolskiego

Streszczenie rozprawy doktorskiej pt.:

Ukierunkowana biosynteza i wybrane aspekty aktywności biologicznej fikobiliprotein

Fikobiliproteiny – barwne białka wytwarzane przez cyjanobakterie są istotnym elementem aparatu fotosyntetycznego tych fototroficznych mikroorganizmów. W strukturze fikobiliprotein wyróżnia się apoproteinowy stelaż oraz związane z nim grupy prostetyczne - ugrupowania chromoforowe. Chromofory fikobiliprotein - fikobiliny, to tetrapiole o otwartym łańcuchu, które nie są związane z jonem metalu. Wyróżnia się cztery typy fikobilin – fikocyjanobilinę, fikoerytrobilinę, fikourobilinę oraz fikowiolobilinę. Rodzaj i liczba fikobilin związanych z apoproteinaą determinuje rozróżnienie tych białek na czerwoną fikoerytrynę, fioletowo-różową fikoerytrocyjaninę, niebieską fikocyjaninę oraz błękitną allofikocyjaninę. Fikobiliproteiny występujące w komórkach cyjanobakterii tworzą fikobilisomy - supercząsteczki składające się z powtarzających się monomerów fikobiliprotein, które mogą zawierać od 200 do 500 chromoforów. Obecność fikobilisomów usprawnia proces przenoszenia energii w fotosystemach, a chromofory fikobiliprotein umożliwiają cyjanobakteriom pozyskiwanie dodatkowych kwantów energii światła, zapewniając im przewagę nad organizmami wytwarzającymi tylko chlorofile. Wyraziste zabarwienie i brak toksyczności sprawiły, że fikobiliproteiny są atrakcyjnymi naturalnymi barwnikami, które poza przemysłem spożywczym i kosmetycznym znajdują zastosowanie w biologii molekularnej jako znaczniki fluorescencyjne. Z kolei właściwości neuroprotektyjne i przeciwutleniające fikocyjaniny, wskazują na możliwe wykorzystanie tego barwnego białka w leczeniu choroby Alzheimera czy Parkinsona. Inne badania potwierdzają przeciwnowotworowe oraz przeciwzapalne właściwości fikobiliprotein, a także zdolność do redukcji jonów metali. Fikobiliproteiny, pełnią również ważną rolę jako wewnątrzkomórkowe źródło azotu. W warunkach ograniczonego dostępu do tego pierwiastka, zostaje on uzupełniony poprzez degradację fikobiliprotein.

Metabolizm cyjanobakterii regulowany jest przez wiele czynników, a sam proces wytwarzania fikobiliprotein, również ma wpływ na właściwości tych białek. Czynniki wpływające na biosyntezę fikobiliprotein, podczas hodowli cyjanobakterii, to przede wszystkim jakość i intensywność oświetlenia, temperatura, odczyn i skład podłoża hodowlanego.

Celem przeprowadzonych badań stało się określenie wpływu wybranych modulatorów na wytwarzanie fikobiliprotein, a także ustalenie zakresu aktywności biologicznej i oddziaływania tak uzyskanych białek z jonami złota.

Prace badawcze realizowano jako zadania ogólne obejmujące:

- ocenę wrażliwości cyjanobakterii halofilnych i słodkowodnych na działanie wybranych stresorów; natężenia i barwy światła oraz modulatorów chemicznych,
- ustalenie zakresu zmian zawartości fikobiliprotein w komórkach cyjanobakterii pod wpływem wspomnianych czynników fizyko-chemicznych,
- określenie zakresu aktywności biologicznej fikobiliprotein produkowanych przez gatunek *Arthrospira platensis*, traktowany jako modelowy ze względu na jego specyficzną wrażliwość na działanie wybranych bodźców oraz rosnące wykorzystanie w procesie otrzymywania fikobiliprotein na skalę przemysłową,
- określenie zakresu interakcji fikobiliprotein produkowanych przez gatunek *Arthrospira platensis* z wybranymi jonami metali.

Wyniki przeprowadzonych badań dowodzą możliwości kontrolowania biosyntezy fikobiliprotein przez cyjanobakterie, poprzez zastosowanie modulatorów chemicznych i fizycznych. Ustalono, że zmiany zawartości i składu fikobiliprotein pod wpływem wybranych modulatorów wynikają ze zróżnicowanej wrażliwości sinic halofilnych i słodkowodnych na działanie tych czynników. W toku doświadczeń, w których zastosowano związki aminofosfonowe jako stresory fizjologiczne sinic wykazano, że (i) sinice słodkowodne są wielokrotnie bardziej wrażliwe, niż sinice halofilne oraz, że (ii) jeden z testowanych gatunków halofilnych - *Arthrospira platensis*, jest wyjątkowo podatny na działanie stosowanych modulatorów jako regulatorów biosyntezy fikobiliprotein. Wytwarzanie barwników białkowych przez ten gatunek było stymulowane w przypadku trzech badanych fosfonianów: glifozatu, glifozyny oraz ATMP, podanych w niższych stężeniach. Natomiast obecność DTPMP – pochodnej fosfonowej kompleksującej jony metali, hamowała wytwarzanie barwnych białek przez przedstawicieli wszystkich testowanych gatunków halofilnych. Gatunki słodkowodne, charakteryzowały się wielokrotnie wyższą wrażliwością na obecność badanych związków fosfonowych, niż gatunki halofilne. Najbardziej znaczące ograniczenie produkcji fikobiliprotein, w odpowiedzi na obecność związków aminofosfonowych zaobserwowano w przypadku *Anabaena torulosa*, natomiast najmniejszą podatność na działanie tego typu pochodnych wykazywał gatunek *Chroococcidiopsis thermalis*.

Ciekawe rezultaty w zakresie zmian zawartości fikobiliprotein uzyskano również analizując wpływ organicznych połączeń boru na ten aspekt metabolizmu cyjanobakterii. Podobnie jak w przypadku związków fosfonowych, gatunki słodkowodne charakteryzowały się dużą większą wrażliwością wobec boronianów. Kolejnym podobieństwem było stwierdzenie, że szczególnym beneficjentem obecności pochodnych boronowych okazały się cyjanobakterie halofilne gatunku *Arthrospira platensis*, które zintensyfikowały biosyntezę barwników białkowych pod wpływem kwasu fenyloboronowego oraz benzoksaborolu.

Dążąc do bardziej precyzyjnego ustalenia zakresu oddziaływania modulatorów na kluczowe procesy warunkujące rozwój bakterii fototroficznych wprowadzono autorskie określenie specyficznego

wydajności wytwarzania fikobiliprotein (Y_{PBP}). Wartość Y_{PBP} pozwala ustalić czy działanie stresora skutkujące zwiększoną produkcją fikobiliprotein, jest związane z nadprodukcją tych barwników białkowych – co jest efektem specyficznym, czy z intensywnym wzrostem komórek, którego wyrazem jest rosnące stężenie chlorofilu. Wykorzystanie parametru Y_{PBP} okazało się niezwykle pomocne w analizie wyników konkretnych eksperymentów pod kątem określenia możliwości ukierunkowania biosyntezy fikobiliprotein przez słodkowodne i halofilne gatunki cyjanobakterii poprzez wprowadzenie określonych modulatorów do środowiska życia mikroorganizmów. Potwierdzono jednoznacznie, że glifozyna, glifozat, benzoksaborol i 5-fluoro benzoksaborol silnie stymulowały wytwarzanie fikobiliprotein przez *Arthrospira platensis*. Dlatego, do kolejnego etapu - badań pogłębionych, wybrano właśnie ten gatunek halofilnych sinic.

Uznając zasadniczą rolę procesów przetwarzania materii i energii dla rozwoju organizmów, określono zmiany statusu energetycznego komórek *A. platensis* rozwijających się w skali laboratoryjnej, w obecności glifozatu, glifozyny, benzoksaborolu oraz 5-fluoro benzoksaborolu. Status energetyczny komórek *A. platensis* w warunkach kontrolnych charakteryzował się przewagą procesów katabolicznych, natomiast w obecności związków fosfonowych promowane były wybrane procesy anaboliczne, wśród nich biosynteza barwników białkowych fotosyntezy. Może to także potwierdzać, zdolność *A. platensis* do wykorzystywania glifozyny jako źródła pierwiastków wykorzystywanych do tworzenia nowych połączeń chemicznych. Benzoksaborol (0,30 mM) promował wytwarzanie fikobiliprotein oraz chlorofili, a także intensyfikował procesy anaboliczne. Wartość AEC komórek rozwijających się w obecności 5-fluoro benzoksaborolu (0,30 mM) była najwyższa, chociaż rozwój tego gatunku, był porównywalny do kontroli. Co ciekawe, zawartość chlorofili była niższa, gdy *A. platensis* rozwijała się w obecności B2 i B3 (3,00 mM), równocześnie w tych hodowlach zanotowano wyższe stężenia fikobiliprotein. Wyniki te wskazują na znaczący udział fikobiliprotein w przyswajaniu energii światła i potwierdzają możliwość funkcjonalnego kompensowania niedoboru chlorofilu przez barwniki białkowe. Zauważono także, że komórki testowanej sinicy charakteryzowały się istotnie niższymi wartościami AEC, gdy w podłożu znajdował się DMSO, a obecność boronianów niwelowała negatywne działanie tego rozpuszczalnika.

Analizując wpływ czynników fizycznych stwierdzono, że zastosowanie niebieskiej barwy światła w hodowli *A. platensis* w fotobioreaktorze skutkowało stymulacją wytwarzania fikobiliprotein. Wykorzystanie sekwencji światła czerwonego i niebieskiego następujących po sobie tydzień po tygodniu w czternastodniowej hodowli, pozwoliło na uzyskanie najwyższego stężenia fikobiliprotein. Potwierdziły to również zwiększone wartości wydajności Y_{PBP} ustalone w warunkach tego doświadczenia. Co istotne, zastosowanie także w skali półpilotażowej testowanych modulatorów chemicznych potwierdziło pozytywny wpływ glifozatu oraz benzoksaborolu na wytwarzanie fikobiliprotein. Warto podkreślić, że prowadzenie hodowli w skali półpilotażowej w obecności związku B2 wpłynęło korzystnie na zawartość fikobiliprotein, w porównaniu do doświadczeń w kolbach stożkowych, co dowodzi, że z sukcesem przeprowadzono zmianę skali hodowli. Wydajność procesu

otrzymywania fikobiliprotein w obecności benzoksaborolu była znacząco wyższa, niż w przypadku hodowli kontrolnej.

Należy zwrócić uwagę, że oddziaływanie modulatorów, jako czynników stresowych w hodowli *A. platensis*, wpłynęło na strukturę drugorzędową biosyntezy fikobiliprotein. Chociaż w każdym przypadku dominowały struktury α -helikalne, co dla białek rozpuszczalnych w wodzie wydaje się naturalne, zanotowano zróżnicowany udział struktur β . Największe zmiany zaobserwowano w przypadku fikobiliprotein syntezowanych w obecności światła niebieskiego oraz glifozyny w obu stężeniach, gdzie struktury β stanowiły około 30% całkowitej ilości struktur drugorzędowych, co jest najwyższą wartością w badanych próbkach.

Fikobiliproteiny, szczególnie niebieska fikocyjanina, posiadają właściwości antyoksydacyjne. W przeprowadzonych badaniach określono wpływ warunków hodowli na zdolność wytworzonych fikobiliprotein do redukcji wolnych rodników, uwzględniając rodzaj i zawartość pozyskanych barwników. Stwierdzono, że fikobiliproteiny uzyskane z komórek *Arthrospira platensis* rozwijających się w świetle niebieskim, w sekwencji światła czerwonego i niebieskiego następujących po sobie tydzień po tygodniu w czternastodniowej hodowli oraz w obecności pochodnej boronowej: 5-fluoro benzoksaborolu (B3 3,00 mM), charakteryzowały się wyższą aktywnością przeciwutleniającą.

Zakładając, że zmienione właściwości fizykochemiczne badanych barwnych białek mogą wpływać na ich aktywność biologiczną, określono również wrażliwość wybranych grzybów mikroskopowych i fotoautotrofów – sinic słodkowodnych i mikroalg eukariotycznych, wobec fikobiliprotein pozyskanych z komórek *Arthrospira platensis* hodowanych w różnych warunkach. Odpowiedź mikroorganizmów na obecność fikobiliprotein wyraźnie się różniła. W przypadku mikroalg eukariotycznych odnotowano wyraźne zahamowanie rozwoju, natomiast słodkowodne sinice wykazywały mniejszą wrażliwość na obecność barwnych białek. Wypada zauważyć, że większość testowanych gatunków grzybów strzępkowych nie wykazała wrażliwości na obecność badanych białek, co nie było zaskakujące, biorąc pod uwagę znane zdolności tych heterotrofów do wydzielania enzymów litycznych do podłoża. Interesujące natomiast było to, że obecność fikobiliprotein w podłożu stymulowała gatunek *Trichoderma koningii* do wytwarzania zwiększonej ilości zarodników.

Pamiętając o interesujących efektach oddziaływań białek z jonami metali przejściowych, przeprowadzono doświadczenia z udziałem fikobiliprotein i jonów złota Au^{3+} . Zauważono, że badane białka zmieniły swoje właściwości fizykochemiczne w obecności jonów złota (III) w roztworze. Pomiar spektrofotometryczny UV-Vis potwierdził zanik pasm odpowiadających maksimum absorpcji fikobiliprotein, w obecności jonów złota, czemu towarzyszyła precypitacja tych białek z roztworu w postaci osadu o fioletowo-czerwonej barwie. Może to świadczyć o powstawaniu drobin metalicznego złota związanych z powierzchnią fikobiliprotein. Zjawisko to potwierdzono na podstawie obserwacji mikroskopowych SEM.