

Intensywne badania mechanizmów pozwalających organizmom żywym minimalizować skutki promieniowania ultrafioletowego (UV) rozpoczęły się w latach 70-tych ubiegłego wieku, gdy zaobserwowano zmniejszanie się warstwy ozonowej. Zjawisko to, związane z działalnością człowieka, prowadzi do zwiększenia ilości UVB docierającego do powierzchni Ziemi. Stanowi to zagrożenie zarówno dla ludzi, u których podniesiony poziom UVB może powodować zwiększone ryzyko zachorowania na nowotwory skóry, jak i dla roślin, czego najbardziej odczuwalnym efektem jest obniżenie plonów. Żywe organizmy wytworzyły dwa główne sposoby radzenia sobie z promieniowaniem UVB. Pierwszy z nich to produkcja pochłaniających je związków, które działają jak naturalne kremy z filtrem minimalizując ilość promieniowania docierającego do wnętrza komórki. Drugi, to jak najszybsza naprawa tych uszkodzeń, których nie udało się uniknąć. Szkodliwe działanie UVB związane jest m.in. z powstawaniem dimerów pirymidynowych w wyniku wytworzenia trwałego wiązania pomiędzy dwiema sąsiadującymi zasadami budującymi DNA. Obecność takich dimerów uniemożliwia „odczytywanie” i „przepisywanie” informacji genetycznej. Jeżeli takich uszkodzeń jest wiele i nie zostaną naprawione, może dojść do śmierci komórki. Naprawa dimerów pirymidynowych u człowieka jest skomplikowanym i wieloetapowym procesem. Natomiast wiele innych organizmów, w tym rośliny, posiada wyspecjalizowane enzymy, nazywane fotoliazami. Wykorzystują one energię świetlną (w zakresie światła niebieskiego i UVA) do szybkiego, wydajnego i prostego odwrócenia reakcji, w wyniku której powstał dimer. Przeprowadzana przez fotoliazę naprawa DNA, czyli tzw. fotoreaktywacja jest dobrze poznana na poziomie molekularnym. Jednak dane na temat działania roślinnych fotoliaz w żywych organizmach (*in vivo*) są wciąż skąpe. Co ciekawe, w toku ewolucji fotoliaz dały początek kryptochromom, obecnym u roślin i zwierząt fotoreceptorom światła niebieskiego, kontrolującym rytm okołodobowy, a u ptaków magnetorecepcję. Zamiana pojedynczego aminokwasu może nadawać kryptochromom aktywność fotoliaz, co wskazuje na bliskie powiązanie obu funkcji: fotoreceptorowej i naprawczej, w tego typu białkach.

Ostatnimi laty prosty model: jeden gen - jedno białko - jedna funkcja staje się nieaktualny. W świetle najnowszych badań wiadomo, że istnieje wiele mechanizmów regulacji aktywności i roli biologicznej białek. Przykładem jest alternatywne składanie genów, dzięki któremu z jednego genu może powstać kilka różniących się od siebie i pełniących różne funkcje białek. Inne modyfikacje to fosforylacja, czyli przyłączanie reszt fosforanowych do białek i sumoilacja, która polega na wiązaniu do nich małego białka SUMO. W konsekwencji może ulec zmianie stabilność, lokalizacja wewnątrzkomórkowa czy oddziaływania białek. Wszystkie te modyfikacje są istotne dla naprawy DNA w komórkach zwierzęcych, a ich zaburzenia skutkują powstaniem kilku typów nowotworów.

Celem projektu jest charakterystyka trzech genów rośliny modelowej, rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*), bliskiego krewnego wielu roślin uprawnych, m.in. niezbędnej w polskiej kuchni kapusty. Badania obejmą znaną fotoliazę AtUVR3 oraz dwa białka o potencjalnej aktywności fotoliazowej: AtPHR2 i At4g25290, które dotychczas nie zostały opisane. Prowadzone przez nas badania pokazały, że wszystkie trzy białka występują w chloroplastach, a AtUVR3 obecny jest także w jądrze i mitochondriach. Fotoliaz AtUVR3 może więc odpowiadać za naprawę dimerów pirymidynowych we wszystkich przedziałach komórki zawierających DNA. Zaobserwowaliśmy także zaskakujący fenotyp mutantu rzodkiewnika pozbawionego białka AtPHR2. Jego siewki mają albinotyczne liścienie z chloroplastami o zaburzonej budowie wewnętrznej. Właściwe liście są jasnozielone, o mocno powcinanych brzegach, a rośliny charakteryzuje wolniejszy wzrost i tworzenie dodatkowych rozetek liściowych na pędach kwiatowych. Analiza sekwencji aminokwasowej At4g25290 wykazała, że poza domeną fotoliazową białko to ma również domenę hydrolazową, która odpowiada za rozkład wiązań chemicznych z udziałem cząsteczki wody. Hydrolaza ta wykazuje homologię do feofitynazy, enzymu przeprowadzającego degradację zielonego barwnika obecnego w chloroplastach, chlorofilu. Wynikiem działania feofitynaz jest żółknięcie liści jesienią lub w czasie starzenia się roślin. Podobny efekt wywołuje UVB.

Czy AtPHR2 jest nieznanym dotąd białkiem, kontrolującym rozwój chloroplastów, zielenienie kielkujących siewek i wzrost roślin? Światło niebieskie wpływa na wzrost i rozwój roślin działając przez fotoreceptory. Czy AtPHR2 jest więc takim niezidentyfikowanym dotąd fotoreceptorem światła obecnym w chloroplastach? Jakie reakcje może kontrolować? Czy At4g25290 bierze udział jednocześnie w naprawie DNA i degradacji chlorofilu? Co mają te procesy ze sobą wspólnego? W jaki sposób regulowane jest rozmieszczenie AtUVR3 w różnych przedziałach komórkowych? Jak badane przez nas fotoliazę wpływają na odpowiedź roślin na warunki stresowe takie jak zasolenie, susza czy wysoka temperatura? Między innymi na te pytania odpowiemy w ramach projektu. Połączymy w nim metody molekularne, biochemiczne i mikroskopowe, aby zbudować pełny obraz działania fotoliaz w komórce roślinnej.