

PhD értekezés tézisei

**A karotinoidok részvétele a cianobaktériumok fotoszintetikus komplexeinek
összeszerelődésében és működésében**

Özge Sözer

Témavezetők: Dr. Gombos Zoltán és Dr. Kis Mihály

MTA Szegedi Biológiai Központ Növénybiológiai Intézet
Szegedi Tudományegyetem

Szeged

2011

BEVEZETÉS

A fotoszintézis alapvető biofizikai és biokémiai folyamat, amelynek során a napfény energiája az élethez nélkülözhetetlen kémiai energiává alakul át. A cianobaktériumok a legősibb ismert oxigéntermelő, fotoszintetizáló szervezetek, melyek az endoszimbiózis elmélete szerint a növényi kloroplasztisz őseinek tekinthetők.

A cianobaktériumok igen ellenálló, a környezeti változásokhoz jól alkalmazkodó szervezetek, melyek hatékonyan védekeznek a reaktív oxigéngyökök (ROS) fotoszintetikus aktivitást csökkentő, fotoinhibíciót eredményező fotooxidatív károsító hatásai ellen is. A karotinoidok működése nélkülözhetetlen a védekezéshez. A fénykárosodástól azáltal védik a sejtet, hogy képesek kioltani a gerjesztett szinglet és triplet állapotú klorofillt, valamint befogni a szinglet oxigént, amely rendkívül káros hatású ROS. Nélkülözhetetlen védőszerepük mellett a karotinoidok járulékos fénybegyűjtő pigmentként is működnek és részt vesznek a membránok felépítésében is.

A *crtB* gén által kódolt fitoén-szintáz enzim katalizálja a karotinoidok bioszintézisének első lépését, a fitoén kialakítását. A fitoénből további enzimek közreműködésével különböző karotin- és xantofillmolekulák képződnek.

Az egyik legintenzívebben tanulmányozott cianobaktérium, a *Synechocystis* sp. PCC 6803 (*Synechocystis*) jellemző karotinoidjai a következők: β -karotin, hidroxiszármazéka a zeaxantin, ketoszármazékai az echinenon és a 3'-hidroxiechinenon, valamint a mixoxantofill, amely egy karotinoid glikozid. Az újabb röntgenkrisztallográfias analízisek feltárták, hogy a cianobakteriális fotoszintetikus komplexekben a β -karotin az egyetlen karotinoidfajta, de az összes többi karotinoid is megtalálható a cianobaktériumok tilakoidmembránjában, a citoplazmamembránban és a citoszolban. Különböző stressz körülmények hatására mennyiségük megnő a sejtben. A β -karotin-molekulán levő szubsztituensek kémiai természete meghatározza a molekula antioxidatív tulajdonságát, szerepét a fénykárosodás elleni védelemben. A hidroxikarotinoidok általában jók a peroxidgyökök inaktiválásában, míg a ketoszármazékok hatékonyabban a reaktív szinglet oxigén kioltásában, és legstabilabbnak bizonyultak a peroxidgyökök és a fotooxidáció károsításával szemben.

Röntgenkrisztallográfias analízissel 12 karotinoidot azonosítottak a *Thermosynechococcus elongatus* PSII komplexében monomerenként. A PSII a fotooxidatív stresszel szemben a leginkább érzékeny fotoszintetikus komplex, amelynek oka valószínűleg a központi antenna komplex hiánya. Korábbi tanulmányok arra engednek következtetni, hogy a β -karotin elengedhetetlenül szükséges a D1 fehérje felhalmozódásához *Chlamydomonas reinhardtii* zöld algában és *Synechocystis* cianobaktériumban is. Tehát a karotinoidok jelenléte fontos a működőképes PSII felépüléséhez.

A *T. elongatus* PSI komplexek szerkezetében 22 karotinoidmolekulát azonosítottak monomerenként. A PSI általában kevésbé érzékeny a fénystresszre, és a karotinoidok részvétele a fénykárosodás elleni védelemben a PSI esetén kevésbé ismert. A fitoén-szintáz gátló norflurazonnal történt kezelés hatására karotinoidmentessé vált *Scenedesmus obliquus* sejtek még tartalmaztak PSI komplexeket, melyekben töltésszeparációt is megfigyeltek. Ha a tilakoid membránokból szerves oldószerrel kivonták a karotinoidokat és a kinonokat, még ezután is megtörtént az elektronszállítás a P700 és az A0 között.

A fotoszintézis folyamatai a PSI- és PSII-reakciócentrumokban játszódnak le, melyek a tilakoidmembránba ágyazott pigment-fehérje komplexek. A lipid-fehérje és lipid-pigment kölcsönhatások fontos szerepet játszanak a fotoszintézis szabályozásában. A cianobaktériumok tilakoidmembránja jellegzetes lipidösszetételű, mely glikolipideket és egy foszfolipidet tartalmaz. A cianobaktériumokban és a magasabbrendű növények tilakoidmembránjában egyetlen foszfolipid fordul elő, a foszfatidil-glicerín (PG). A *T. elongatus* fotoszintetikus komplexeinek röntgenkristallográfiás szerkezetvizsgálata PG-molekulákat mutatott ki a PSII komplex CP43 és D1 fehérjéi között, valamint a PSI szerkezetében is. A PG eltávolítása a sejtekből a klorofilltartalom csökkenését és a fotoszintetikus folyamatok lassulását okozta. A Q_A és Q_B közti elektrontranszport gátlása volt megfigyelhető, ami a Q_A túlredukálódásához és Q_A^{-2} képződéséhez vezet. A PG esszenciális az alacsony hőmérsékleti stressz) és a fénystressz elleni védekezésben.

CÉLKITŰZÉSEK

A globális környezet változása egyre gyakrabban idéz elő olyan stressz körülményeket, melyek a fotoszintetizáló szervezetekre hatva csökkentik a fotoszintézis hatékonyságát. A stressz körülmények között a fotoszintézisben működő védekező mechanizmusok megismerésének igénye a különböző körülmények között eltérő fejlődési sajátosságokkal rendelkező növények, algák és cianobaktériumok kutatásához vezetett. A cianobaktériumok a növényi kloroplasztisz őseinek tekinthetők, így kiváló modellszervezetek a magasabbrendű növények fotoszintézisének tanulmányozásához. Az antioxidáns tulajdonságokkal bíró karotinoidok fontos szerepet játszanak a stressz körülmények elleni harcban, de a védekezésben elengedhetetlen szerkezeti és funkcionális sajátosságaik csak részben felderítettek. A *Synechocystis* cianobaktérium törzs jól transzformálható, genomszekvenciája ismert, s így kiváló alany különböző mutánsok létrehozására, amelyek segítségével tanulmányozhatjuk a karotinoidok szerepét a fotoszintetikus folyamatokban. Munkám során a következő célokat tűztem ki:

I Létrehozni az első, oxigéntermelő fotoszintézist végző prokarióta organizmus mutáns amely nem tartalmaz karotinoidokat. Ezen mutáns felhasználásával *in vivo* tanulmányozzuk a teljes karotinoid hiány (i) strukturális és (ii) funkcionális hatását a fotoszintetikus folyamatokra.

II Ezenkívül a karotinoidok védő szerepét tanulmányozni olyan stressz körülmények között, melyet a PG hiánya váltott ki a *Synechocystis pgsA* mutánsban.

KÍSÉRLETI ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A felhasznált törzsek és nevelési körülményeik

A *Synechocystis ΔcrtH* és *ΔcrtH/B* törzseket 30 °C-on neveltük 5 mM HEPES-NaOH pufferrel (pH 7.5), 10 mM glukózzal, 20 μg ml⁻¹ kanamicinnel (*ΔcrtH*, *ΔcrtH/B*) és 40 μg ml⁻¹ szpektinomocinnel (*ΔcrtH/B*) kiegészített BG11 tápoldatban, fény aktiválta heterotróf növesztési körülmények között (a sejteket sötétben tartottuk, naponta tíz percig 35 μmol foton m⁻²s⁻¹ intenzitású fényvel megvilágítva)

A *Synechocystis pgsA* mutáns sejteket fotoautotróf körülmények között BG11-5 mM HEPES-NaOH (pH 7.5) tápoldatban 20 μg ml⁻¹ kanamycin és 20 μM dioleoyl-PG (18:1/18:1 PG) (P-9664, Sigma, St Louis, MO, USA) hozzáadásával 30°C-on 30 μmol foton m⁻² s⁻¹ intenzitású fényvel megvilágítva neveltük. A PG kiürülés hatásának vizsgálatához a sejteket centrifugálással összegyűjtöttük, a PG-tartalmú tápoldatot kétszeri mosással eltávolítottuk, majd PG-mentes tápoldatban neveltük tovább a fenti körülmények között. A kultúrákat körkörös rázón folyamatosan kevertettük (100 rpm).

A *Synechocystis ΔcrtH/B* mutáns létrehozása

A *Bgl*III és *Not*I restrikciós enzimekkel hasítva a cs0798 kozmid klónt, (<http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase/Synechocystis/map/Chr/orf16>), amelyet Dr. S. Tabata bocsátott rendelkezésünkre, egy 7.7 kb nagyságú *Bgl*III fragment tartalmazta a fitoén szintáz kódoló *crtB* gént. Ezt a pMPMA2 plazmid BamHI helyére ligáltuk. A *crtB* gén egy darabját *Ap*I-*Hind*III emésztéssel eltávolítottuk és helyére egy omega kazettát klónoztunk. Ezzel a konstrukcióval transzformáltuk a *ΔcrtH* *Synechocystis* mutáns sejteket. A transzformánsokat fény aktiválta heterotróf növesztési körülmények között 10 mM glukózt tartalmazó BG11-agar lemezekon szegregáltattuk egyedi kolóniák egymást követő szétszélesztésével. A BG11-agar lemezek szélesztésenként növekvő koncentrációjú szpektinomocint tartalmaztak. A mutáns sejtek szegregációját polimeráz láncreakciós technikával követtük a *crtB*up (5'-CGGTGCCCAACTTTTACCTA-3'), és *crtB*down (5'-TCACCTAAGGGGAAACATCG-3') primerek felhasználásával.

Pigment analízis

A *Synechocystis* sejtekből és sejtfrakciókból aceton:metanol 7:2 (v/v) arányú keverékével vontuk ki a pigmenteket majd centrifugálás (3 perc 4°C-on, Sigma K-18 centrifuga, 20,000×g) után a felülúszót nitrogén gáz alatt bepároltuk és a pigmenteket HPLC-minőségű etanolban feloldottuk. A pigmentek elválasztására Nucleosil 100 C18 fordított fázisú oszlopot (5 µm szemecseméret, Technokroma, Barcelona, Spain) használtunk egy fotodiódasoros detektorral (Tidas I, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) felszerelt Prostar HPLC rendszerbe (Varian, Miami, FL, USA) kötve. 100 µl térfogatú mintát rozsdamentes acél szűrőn ($\varphi = 0.22 \mu\text{m}$) átszűrve felvittünk az A oldattal (acetonitril:víz:triethylamine, 9:1:0.01) ekvilibrált oszlopra. Az oszlopról a pigmenteket 100%-os etil acétáttal (B oldat) eluáltuk egy három lépcsős gradienssel (0-40% B 10 percig, 40-60% B 10 percig, 60-100% B 3 percig) amelyet egy izokratikus lépcső (100% B 2 percig) követett. Az elválasztás alatt 1.5 ml perc^{-1} konstans áramlási sebességet tartottunk fenn, és az eluátum abszorpciós spektrumát (380–800 nm) 0,2 másodpercenként rögzítettük.

A karotenoid származékok azonosítása abszorpciós spektrumuk és retenciós idejük alapján történt. Az egyes pigmentek relatív mennyiségét a 440 nm-en rögzített kromatogramok csúcsai alatti területek összehasonlításából számoltuk. Az egyes karotenoid és klorofill fajták koncentrációját a Beer–Lambert törvényt felhasználva számoltuk ki a 440 és 665 nm-en mért specifikus extinkciós koefficienseket felhasználva. (Az echinenone tartalmat 460 nm számoltuk). Az ábrázolt értékek legalább három független kísérlet átlagai \pm SD.

A sejtfrakciók izolálása

A tilakoid és a citoplazmás membránokat Murata és Omata (1988, *Methods Enzymol.* 167: 245-251) módszere szerint izoláltuk, módosításokkal. A 0.2% lizozimmal kezelt (37°C, 2 h) és lecentrifugált sejteket 0.1 mm-es üvegyöngyökkel Bead Beater homogenizálóban (Biospec Products, Bartlesville, OK, USA) 1 mM phenylmethylsulfonil fluoride (PMSF) proteázgátló jelenlétében homogenizáltuk, jégen. A feltört sejteket DNáz oldattal kezeltük 15 percig, majd a feltáratlan sejteket és a törmeléket centrifugálással szeparáltuk (10 min, 7,000×g). A membrán vezikulumokat tartalmazó szuszpenziót lépcsős cukorgradienssel ultracentrifugálással szeparáltuk (130,000×g, 16 h, 4°C). Centrifugálás után a citoplazma membrán sárga frakcióként gyűlt össze a 30%-os cukorrétegben, míg a 39-50%-os cukorrétegben különültek el a zöld színű tilakoid membrán vezikulumok.

Citoszólikus frakciót izoláltunk kívülről hozzáadott PG-t tartalmazó és PG-hiányos kultúrákból származó sejtekből. A sejteket 50 mM MES puffert (pH 6.5), 2 mM ϵ -amino-

kapronsavat, 5 mM EDTA-t, 1 mM PMSF-et and 1 mM benzamidint tartalmazó oldatban szuszpendáltuk fel, majd feltártuk a fent leírt módon. Az intakt sejteket, sejtörmelékét, membránokat centrifugálással (45 perc, 145,000× g, 4°C) eltávolítottuk. A felülúszót liofilizáltuk és a pigmenteket a fentebb leírt módon extraháltuk.

Fehérje analízis

A sejtek radioaktív jelölése- 75 µg klorofillt tartalmazó sejtmenyiséget szuszpendáltunk fel 250 µl BG11-ben egy Eppendorf csőben. Ezt 50 µmol foton m⁻² s⁻¹ megvilágítás alatt 15 percig rázattuk majd [³⁵S]Met és [³⁵S]Cys (Trans-label, MP Biochemicals, Irvine, USA) keverékét adtuk hozzá (végső specifikus aktivitás: 400 µCi ml⁻¹). A szuszpenziót megvilágítottuk 15 percig 50 µmol foton m⁻² s⁻¹ fehér fényvel (pulse), ezután kloramfenikolt (1 mg ml⁻¹ végső koncentráció) és jelöletlen Met and Cys (5 mM végső koncentráció) keverékét adtuk hozzá és tovább folytattuk az inkubációt 15 percig (pulse-chase). Ezután a sejteket folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és tilakoid membránt izoláltunk belőlük.

Tilakoid membrán izolálása-A tilakoid membránt Komenda and Barber (1995, Biochemistry 34: 9625-9631) szerint izoláltuk a következő módosításokkal: a sejteket 25 mM MES/NaOH (pH 6.5), 10 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, 25% glicerol összetételű oldatban mostuk és tarttuk fel. Az üveggöngyöket szűrőssel eltávolítottuk és a tilakoid membránt differenciál centrifugálással tisztítottuk.

2D gél elektroforézis-Az izolált membránokat dodecyl-β-D-maltoziddal (dodecyl maltozid: klorofill arány 40:1 w/w) szolubilizáltuk és a membrán-fehérje komplexeket 5-14%-os poliakrilamid blue-natív gélen 4 °C-on futtattuk. Minden minta 6 µg klorofillt tartalmazott. A komplexek fehérje-összetételét egy második elektroforézis során 7M ureát tartalmazó 12-20%-os lineáris grádiens poliakrilamid gélen analizáltuk. A natív gélből a megfelelő csíkot kivágtuk majd 30 percig inkubáltuk 25 mM Tris/HCl, (pH 7.5), 1% SDS (w/v) összetételű oldatban és a denaturáló gél tetejére helyeztük. A gélben a fehérjéket Coomassie Blue-val festettük meg. A radioaktívan jelölt proteinekből származó jelet szobahőmérsékleten detektáltuk, röntgenfilmen 2-3 napos expozíciós idővel vagy foszforimidzser lemezen (GE Healthcar, Vienna, Austria) egy éjszaka át. A szignálok mennyiségi kiértékelését ImageQuant 5.2 szoftverrel (GE Healthcarotenoide, Vienna, Austria) végeztük.

Western blot analízis-1 µg klorofillt tartalmazó mintákat futtattunk denaturáló poliakrilamid gélen (lásd fent) majd a szeparált fehérjéket PVDF membránra rögzítettük. A membránokat specifikus elsődleges antitesttel majd tormaperoxidázal konjugált másodlagos antitestekkel inkubáltuk (Sigma, St. Louis, USA).

A fotoszintetikus oxigénfejlesztő aktivitás mérése

A sejtek oxigénfejlesztését Clark-típusú oxigénelektóddal (Hansatech Instruments, Kings Lynn, U.K.) mértük. A PSII-ből származó oxigénfejlődést a H₂O-tól a kívülről hozzáadott mesterséges elektronakceptorig (500 µM parabenzokinon) mértük. A méréshez a sejteket BG11 tápfolyadékkal mostuk majd friss BG11-ben felfuszpendáltuk. A sejteket vörös PSII-t gerjesztő 500 µmol foton m⁻² s⁻¹ erősségű telítő fényvel világítottuk meg. Mindegyik minta mennyiségét 5 µg ml⁻¹ klorofill koncentrációra egészítettük ki.

A klorofill *a* molekulák fluoreszcenciájának és a P700 redox állapot változásainak mérése

A P700 fényindukált abszorpcióváltozását és a klorofill *a* molekulák fluoreszcenciáját DUAL-E mérőfejjel (830 és 875 nm-en mért intenzitások különbsége), P700 Near Infra Red Emitter-rel (720 nm) és DUAL-DR (vörös) mérőfejjel (620 nm) felszerelt Dual-PAM-100 Measuring System (Heinz Walz GmbH, Germany) készülékkel mértük. 20 µg klorofillnak megfelelő mennyiségű sejtet szűrtünk rá Whatman GF\C szűrőkorongra és minden méréshez 3 független mintát használtunk.

A maximális PSII hatásfokot (Fv/Fm) 20 perces sötét adaptáció után határoztuk meg, hogy a fotoszintetikus apparátus kioltott állapotba kerüljön és a nyitott PSII reakciócentrumok fluoreszcenciája (Fo) mérhető legyen. A maximális fluoreszcencia értéket (Fm) 2000 µmol foton m⁻² s⁻¹ intenzitású telítő fényimpulzussal értük el. Ezen paramétereket felhasználva, sötét adaptált állapotban, a PSII maximális kvantum hatásfoka: Fv/Fm=(Fm-Fo)/Fm, ahol Fv a változó fluoreszcencia, a sötétadaptált sejtek maximális fluoreszcenciája.

A P700 maximális abszorpció-változásának (Pm-Po) meghatározásához a sejt kultúrát 20 percig sötétben tartottuk, ezalatt a P700 teljesen redukált állapotba került (Po). Ezután a P700-at távoli vörös fényvel 10 másodpercig megvilágítva oxidáltuk, majd a maximális jelintenzitást (Pm), a vörös fény jelenlétében, aktinikus távoli vörös fényvel megvilágítva értük el. A jelintenzitásokat milliszekundumos időskálán rögzítettük.

A P700 oxidációs-redukációs kinetikáját 20 perces sötét adaptáció után, 53 µmol foton m⁻² s⁻¹ erősségű folyamatos aktinikus vörös fényvel megvilágítva, szobahőmérsékleten mértük. A P700 abszorpció-változását folyamatos aktinikus fényvel megvilágítva milliszekundumos időskálán rögzítettük. A lineáris elektrontranszportot 100 µM 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU) hozzáadásával elimináltuk.

EREDMÉNYEK

A fitoén-szintáz enzimet kódoló *crtB* gént inaktiváltuk a részlegesen karotinoidhiányos $\Delta crtH/B$ mutánsban. Így létrejött egy teljes mértékben karotinoidmentes kettős mutáns, a $\Delta crtH/B$, amely csak sötétben, glükóztartalmú tápoldatban volt fenntartható. HPLC analízissel igazoltuk, hogy a $\Delta crtH/B$ sejtek semmilyen karotinoid származékot nem tartalmaznak. A $\Delta crtH/B$ sejt-kultúra kékes színe arra utalt, hogy a sejtekben a fikobilinok a domináns pigmentek. A karotinoidok hiánya nem érintette szignifikánsan a fikobiliproteinek szintézisét és felhalmozódását, a klorofill szintézisét és akkumulációját viszont gátolta. Fénykezelés hatására a mutáns sejtek fokozatosan kiféhéredtek, elvesztették pigmentációjukat és elpusztultak, igazolva, hogy a karotinoidok nélkülözhetetlen elemei a fotoprotekciónak.

Western blot analízissel kimutattuk, hogy LAHG körülmények között a karotinoidmentes $\Delta crtH/B$ mutánsban a PSII nagy fehérjelegységeinek szintje igen alacsony, míg a PSI és a citokróm- b_6/f fehérjéinek mennyisége nem csökkent a vad típushoz viszonyítva. Miután a sejteket megvilágítottuk, a D1 és D2 fehérjék mennyisége tovább csökkent, jelezve a karotinoidok hiányában bekövetkező fotooxidációt. A CPP47 és különösen a CP43 klorofillkötő antennaegységek szintje volt a leginkább érintett. Ez a megfigyelés összhangban van a PSII legutóbbi röntgenkristallográfiás szerkezeti modelljével, mely szerint a β -karotin molekulák többsége a CP47 és CP43 alegységek transzmembrán α -hélixjeinek közelében helyezkedik el. A $\Delta crtH/B$ sejtek fehérje alegységeinek 2D-gélanalízise radioaktív „pulse-chase” jelöléssel kombinálva megadta a kulcsot annak magyarázatához, hogy miért nem épülnek fel aktív PSII komplexek a mutánsban. Az eredmények megmutatták, hogy PSII-dimerek nem képesek kialakulni β -karotin hiányában, sőt még a nagyon instabil PSII-monomerek is csak radioaktív jelöléssel voltak detektálhatóak. A CP43 alegységek nem kötődtek stabilan a PSII komplexben, ezért csak egy intermedier PSII komplex, az RC47 (melyből a CP43 hiányzik) volt képes felhalmozódni Coomassie Blue-val detektálható mennyiségben. A $\Delta crtH/B$ sejtek tilakoidjában a D1 fehérje volt a radioaktívan leginkább jelölődött fehérje, ami jelzi, hogy a D1 fehérje „steady state turnover” karotinoidok hiányában is fennmaradt. A radioaktívan jelölődött D1 fehérje leginkább az RC47 komplexben volt detektálható, valamint a monomer PSII-ben és az RCa-ban, amely egy olyan intermedier PSII komplex, ahonnan a CP43 és a CP47 is hiányzik. β -karotin hiányában azoknak a kis fehérje alegységeknek a kapcsolódása sem stabil, amelyek a nagy PSII-alegységekhez kötődnek a komplexek összeszerelődése során, s így ezek a szubkomplexek destabilizálódnak. A PSII komplexszel ellentétben, a PSI és a citokróm- b_6/f komplexek felépülnek, bár a trimer/monomer PSI aránya szignifikánsan csökkent karotinoidok hiányában.

Kétségtelenül a PSII volt a karotinoidok hiányában leginkább érintett fotoszintetikus membránkomplex a $\Delta crtH/B$ mutánsban. A karotinoidhiányos mutáns sejtek valóban nem tartalmaztak működőképes PSII komplexeket, amit a PSII-függő oxigénfejlesztő aktivitás mérésével igazoltunk. Továbbá a PSII klorofill-*a* fluoreszcencia mérései és a P700 tranzienis redukciókinetikájának mérései megerősítették, hogy a $\Delta crtH/B$ sejtekben nem alakultak ki aktív PSII-reakciócentrumok. Ezzel szemben a PSI-hez köthető töltésszeparáció és ciklikus elektrontranszport működik a LAHG-körülmények között nevelt $\Delta crtH/B$ sejtekben is. Azonban, miután a sejteket megvilágítottuk, az aktív PSI-reakciócentrumok mennyisége szignifikánsan csökkent. Azért, hogy megértsük a PSI fotoinhibíciójának okát a karotinoidmentes és aktív PSII-mentes $\Delta crtH/B$ sejtekben, méréseket végeztünk egy másik PSII-hiányos mutáns törzsből, melyben a D2 és a CP43 alegységek szintézise gátolt. A karotinoidokat is tartalmazó PSII-hiányos mutáns konstans PSI-aktivitást mutatott, még akkor is, ha a sejteket folyamatos fényen neveltük. Az eredmények arra utalnak, hogy nem a kevésbé hatékony lineáris elektrontranszport, hanem a karotinoidok hiánya vezetett a PSI fotoinhibíciójához.

A *Synechocystis* sp. PCC 6803 *pgsA* sejtekben a foszfatidil-glicerinnel kiürítése csökkentette a PSII aktivitását, valószínűleg a ROS fokozott termelődése következtében. Ezért megmértük a sejtek karotinoidtartalmának és -összetételének változását a PG kiürítésének ideje alatt. A karotinoidok analízise és a felhalmozódás helyének meghatározása céljából tilakoid- és citoplazmamembrán-frakciókat izoláltunk mind a PG-vel kiegészített tápoldatban nevelt, mind a PG-hiányos sejtekből. A citoplazma- és tilakoidmembránokat lépcsős cukorgradiens ultracentrifugálással elválasztva szemmel látható volt, hogy a PG-hiányos sejtek több karotinoidot tartalmaztak, mint a PG-vel kiegészített tápoldatban nevelt sejtek, különösen a gradiens felső rétegében, ahol a sejtek vízdékony, membránt nem tartalmazó frakciója gyűlt össze. HPLC-vel határoztuk meg a *pgsA* sejtekből és az izolált membránfrakciókból extrahált karotinoidokat. Abszorpciósspektrumuk és retenciósidejük alapján mixoxantofil, zeaxantin, echinenon és β -karotin karotinoidokat azonosítottunk. A PG-vel kiegészített tápoldatban nevelt mintákhoz képest a PG-hiányos mintákban csökkent a β -karotin és a zeaxantin mennyisége. A mixoxantofil mennyisége kb. háromszorosára nőtt a PG-hiányos mintákban, míg az echinenon mennyisége kétszer nagyobb volt a PG-hiányos tilakoidmembránban és kisebb mértékben nőtt az egész sejten, mint a PG-vel kiegészített mintákban. Az egyes karotinoidfajták arányát is kiszámítottuk a HPLC-kromatogramokból a csúcsok területe alapján. A mixoxantofil és echinenon karotinoidok aránya magasabb volt a PG-hiányos sejtekben, izolált membránokban és a citoszolban is mint a PG-vel kiegészített mintákban. Ezen eredmények alapján arra következtethetünk, hogy a PG-kiürülés következtében fellépő fotooxidatív károsodás egyes specifikus karotinoidok szintjének növekedé-

sét indukálta. Ezt a specifikus növekedést valószínűleg a karotinoidok bioszintézisének a stressz hatására megváltozott regulációja okozta.

Vizsgálataink alapján levonhatjuk azt a következtetést, hogy a karotinoidok nélkülözhetetlen résztvevői a működőképes fotoszintetikus komplexek felépülésének, különös tekintettel a PSII-re. Karotinoidok hiányában a $\Delta crtH/B$ sejtek rendkívül fényérzékenyek, még alacsony intenzitású fénykezelés is erős fotoinhibíciót okoz. Másrészt kimutattuk, hogy a karotinoidok védő szerepe nem csak fénystressz esetén, de másfajta stresszkörülmények között is nélkülözhetetlen. A PG-kiürülés okozta fotooxidatív károsodás specifikus karotinoidok mennyiségének a megnövekedését eredményezte nemcsak a fotoszintetikus membránokban, de a citoplazmamembránban és a citoszolban is.

PUBLIKÁCIÓS LISTA

A dolgozatban felhasznált közlemények

Domonkos I, Malec P, Laczko-Dobos H, **Sozer O**, Klodawska K, Wada H, Strzalka K, Gombos Z. Phosphatidylglycerol depletion induces an increase in myxoxanthophyll biosynthetic activity in *Synechocystis* PCC6803 cells **Plant Cell Physiol.** 2009 Feb; **50**(2):374-82

Sozer O, Komenda J, Ughy B, Domonkos I, Laczkó-Dobos H, Malec P, Gombos Z, Kis M. Involvement of carotenoids in the synthesis and assembly of protein subunits of photosynthetic reaction centers of *Synechocystis* sp. PCC 6803 **Plant Cell Physiol.** 2010 May; **51**(5):823-35

Sozer O, Kovacs L, Kis M, Gombos Z

Involvement of carotenoids in the activity of photosynthetic reaction centers of *Synechocystis* sp. PCC 6803 (**kézirat**)

A dolgozat témájához kapcsolódó közlemények

Sozer O, Kis M, Gombos Z, Ughy B

Proteins, glycerolipids and carotenoids in the functional photosystem II architecture **Frontiers in Bioscience** 2011 Jan; **16**: 619-643

Laczkó-Dobos H, Todinova S.J., **Sozer O.**, Komenda J., Kis M, Sallai A., Dobrikova A.G., Ughy B., Debreczeny M., Gombos Z., Apostolova E.L., Domonkos I. Identification of thylakoid membrane thermal transitions in *Synechocystis* sp. PCC6803 photosynthetic mutants (**benyújtva**)

A szerzőtársak nevében, mint „corresponding author” kijelentem, hogy Ózge Sözer a dolgozatában felhasznált következő cikkben:

„Domonkos I, Malec P, Laczko-Dobos H, **Sozer O**, Klodawska K, Wada H, Strzalka K, Gombos Z.

Phosphatidylglycerol depletion induces an increase in myxoxanthophyll biosynthetic activity in *Synechocystis* PCC 6803 cells.

Plant Cell Physiol. (2009) 50: 374-82.”

Meghatározó jelentőségű önálló munkát végzett valamint azt, hogy ezt a munkát a szerzőtársak közül senki sem használja fel egy másik doktori dolgozat elkészítéséhez.

Szeged, 2011 január 3.

Gombos Zoltán
MTA doktora
Növénybiológiai Intézet
Szegedi Biológiai Kutatóközpont