

A Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**Kovamoszatok fotoszintetikus pigmentrendszerének
makroszerveződése és szerkezeti flexibilitása**

Szabó Milán

Témavezető:

Dr. Garab Győző

Tudományos tanácsadó

Biológia Doktori Iskola
Szegedi Tudományegyetem

MTA Szegedi Biológiai Központ
Növénybiológiai Intézet

**Szeged
2011**

BEVEZETÉS

A fotoszintézis során növények, algák és bizonyos baktériumok a napfény energiáját kémiai energiává alakítják, amely biztosítja létfontosságú szerves vegyületek előállítását, melyek nélkülözhetetlenek a metabolikus folyamatokban. A kovamoszatok (Bacillariophyta) egysejtű eukarióta fotoszintetizáló algák, melyek meghatározó szerepet játszanak az elsődleges globális fotoszintetikus produkcióban és a légköri széndioxid koncentráció szabályozásában.

A fotoszintetikus elektrontranszportlánc komponensei nagymértékben konzerváltak eukarióta szervezetekben, így igen hasonlóak magasabbrendű növényekben és kovamoszatokban. Azonban a tilakoid membránok szerveződésében és a fotoszintetikus pigment-protein komplexek elrendeződésében számos különbség figyelhető meg. Szemben a magasabbrendű növényekkel, a tilakoid membránok nem különülnek el gránum illetve sztróma tilakoidokká kovamoszatokban. A tilakoid membránok hármásával kapcsolt membránkötegekként rendeződnek el a kloroplasztiszbán.

Magasabbrendű növényekben a kettes típusú fotokémiai rendszer (PSII) és a járulékos antennája, a LHCII a kapcsolt gránum tilakoidokban, míg az egyes típusú fotokémiai rendszer (PSI) és a járulékos antennája, a LHCI a nem kapcsolt sztróma tilakoidokban található. A kovamoszatok fő fénybegyűjtő antenna rendszere a fukoxantin-klorofill antenna protein (FCP) komplex, melyek járulékos antennaként szolgál mind a PSI, mind pedig a PSII számára. Kovamoszatokban a PSII, PSI és FCP komplexek elrendeződése homogén, nem figyelhető meg laterális heterogenitás.

Növényekben a PSII-LHCII szuperkomplexek királisan rendezett makrodoménekbe szerveződnek, melyet cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia segítségével mutattak ki (Garab és Amerongen, 2009). A CD spektroszkópia egy igen hatékony, nem invazív vizsgálati módszer a pigmentkölsönhatások, komplex biológiai rendszerek szerkezeti sajátosságainak tanulmányozásában és a szerkezeti változások nyomonkövetésében. Hierarchikusan szervezett rendszerekben a CD jelek különböző molekuláris szerkezetekből származnak. Szabad klorofill molekulák esetén gyenge, ún. intrinzikus CD jelek figyelhetőek meg, melyek a molekulák belső aszimmetriájából és kiralitásából erednek. Két vagy több pigmentmolekula kölcsönhatása esetén (pl. izolált pigment-protein komplexekben) exciton CD jelek figyelhetőek meg, melyekre jellemző a

szabályos, konzervatív sávszerkezet. Nagyméretű, királisan rendezett makroaggregátumokban speciális CD jelek figyelhetők meg, melyek igen nagy intenzitással és nem-konzervatív sávszerkezettel jellemezhetők, és ezekkel differenciális fényszórással is társulhat. Ezeket polimer és só-indukált (psi) típusú CD jeleknek nevezzük.

A királisan rendezett makrodomének kiemelkedő szerkezeti flexibilitással rendelkeznek magasabbrendű növényekben. Kimutatták, hogy hő- és fénykezelés hatására nagymértékű szerkezeti átrendeződések történnek a makrodoménekben, melyet a psi-típusú CD sáv intenzitásának nagymértékű változása jelez, míg a rövid távú kölcsönhatásokra jellemző exciton CD jelek sokkal stabilabbnak bizonyultak. Ismert továbbá, hogy a közeg ozmotikus nyomása és a kétértékű kationok jelenléte meghatározó jelentőségű a makrodomén-szerveződés fenntartásában.

A kovamoszatok pigment-protein komplexekéinek szupramolekuláris szerveződéséről igen kevés információ áll rendelkezésre, a pigmentmolekulák makroszerveződését pedig még nem vizsgálták.

CÉLKITŰZÉSEK

A fotoszintetikus fénybegyűjtési folyamatok megértéséhez a fotoszintetikus elektrontranszportlánc komponenseinek biokémiai jellemzése mellett elengedhetetlenül fontos a pigmentek makroszerveződésének ismerete is. Ezért Ph.D. munkám során a következő célokat tűztem ki:

- I. A pigment-protein komplexek makroszerveződésének átfogó vizsgálata különböző szerveződési szinteken, szabad pigment molekulákon, izolált pigment-protein komplexekben és tilakoid membránokban, valamint intakt sejtekben *Phaeodactylum tricornutum* és *Cyclotella meneghiniana* kovamoszat fajokban.
- II. A makrodomének szerkezeti flexibilitásának vizsgálata különböző környezeti tényezők – hőmérséklet, beeső fényintenzitás, nevelési fényintenzitás, a közeg ozmotikus nyomása és ionerőssége - megváltoztatása során; a szerkezeti változások korreláltatása a fotoszintetikus paraméterek változásaival.

- III. A fukoxantin (Fx), mint fő fénybegyűjtő karotenoid mikrokozonyezetének és kölcsönhatásainak, valamint heterogenitásának vizsgálata.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A kovamoszat kultúrák nevelése

A *Phaeodactylum tricornutum* és *Cyclotella meneghiniana* sejteket ASP-2 médiumban növesztettem, 40 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fényintenzitácson, 16/8 órás fény/sötét ciklusban 19 °C-on. Egyes kísérletekhez a sejteket alacsony fényintenzitácson (LL, 10-15 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$) és magas fényintenzitácson (HL, 180-200 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$) neveltem.

Tilakoid membránok és pigment-protein komplexek izolálása

A sejteket French press készülékkel törtem fel. A tilakoid membránokat differenciális centrifugálással izoláltam. A tilakoid membránokat n-dodecyl β -D-maltoside-dal szolubilizáltam és a pigment-protein komplexeket cukorgrádiens ultracentrifugálással különítettem el.

Sejtek feltörése ultrahangos szonikálással

A sejteket Branson Sonifier 450 készülékkel különböző időtartamokig szonikáltam jégfürdön, ASP-2 médiumban.

Klorofilltartalom meghatározása

A klorofilltartalmat acetonos pigment-extraktumból határoztam meg spektrofotometriás úton Jeffrey és Humprey (1975) szerint.

Abszorpciós spektroszkópia

A sejtek abszorpciós spektrumát Shimadzu UV-3000 spektrofotométerrel fettem fel szobahőmérsékleten két fényutas üzemmódban 400–750 nm-es hullámhossz tartományban. A fényszórás okozta artefaktumok csökkentésének érdekében a spektumokat fényszórást-korrigáló mintatartóban vettem fel.

Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia

A CD spektrumokat Jobin-Yvon CD6 vagy Jasco J-815 dikrográffal mértem 400-750 nm-es hullámhossz tartományban. A hőmérséklet okozta spektrális változásokat termosztált mintatartóban mértem. A fényindukált változások méréséhez a készülékbe épített oldal-megvilágítást alkalmaztam. A CD spektrumokat abszorpció egységekben ábrázoltam.

Lineáris dikroizmus spektroszkópia

A LD spektrumokat Jobin-Yvon CD6 dikrográffal mértem 400-730 nm-es hullámhossz tartományban, szobahőmérsékleten. A LD spektrumokat abszorpció egységekben mértem. A sejteket vagy izolált tilakoid membránokat gélösszenyomás módszerével vagy erős mágneses térrel orientáltam. Az orientációs szögek számítása az irodalomban leírt módszer alkalmazásával történt (Garab, 1996).

Fluoreszcencia spektroszkópia

A fluoreszcencia spektrumokat Horiba Jobin-Yvon Fluorolog 3 spektrofluoriméterrel mértem 77 K hőmérsékleten. A fluoreszcencia emissziós spektrumokat 600-800 nm-es hullámhossz tartományban mértem 510 és 550 nm-nél történő gerjesztést alkalmazva. A fluoreszcencia gerjesztési spektrumokat 400-600 nm-es hullámhossz tartományban mértem, a fluoreszcencia emissziót 689 és 713 nm-nél detektáltam.

Elektrokróm abszorpcióváltozások mérése

A villanófény-indukálta elektrokróm abszorpcióváltozásokat házilag épített egysugaras spektrofotométerrel mértem Barabás és mtsai. (1985) és Büchel és Garab (1995) szerint. Az elektrokróm abszorpcióváltozások tranziens spektrumának kiszámításához időkinetikai méréseket végeztem különböző hullámhosszakon 470 és 570 nm között. Az elektrokróm jeleket $-\Delta I/I$ egységekben adtam meg. Az elektrokróm változásokat mutató pigmentek abszorpciós spektrumának meghatározásához a tranziens spektrumokat Gauss sávok első deriváltjával illesztettem.

A tranziens klorofill fluoreszcencia mérése és a fotoszintetikus paraméterek meghatározása

Szobahőmérsékletű klorofill fluoreszcencia méréseket PAM 101 klorofill fluoriméterrel (Walz, Effeltrich) végeztem. A PSII maximális fotokémiai hatékonyságát F_v/F_m értékekben adtam meg, ahol F_v a változó, míg F_m a maximális fluoreszcencia. A nem-fotokémiai kioltás (NPQ) mértékét $NPQ = F_m/F_m' - 1$ szerint számoltam (Bilger és Björkmann, 1990).

Pigmentösszetétel meghatározása nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával (HPLC)

A mintákat HPLC pufferben (90% metanol/0.2 M ammónium acetát (90/10, v/v), 10% etilacetát) vettem fel. A pigmenteket Waters 600 MS kromatográfiás rendszerrel határoztam meg. Az elválasztásokhoz ET 250/4 Nucleosil 300-5 C18 oszlopot használtam. Az eluenseket és a gradiens beállításait Kraay és mtsai (1992) szerint alkalmaztam.

Transzmissziós elektronmikroszkópia

A sejteket Zeiss 902 elektronmikroszkóppal vizsgáltam. A sejteket centrifugálással ülepítettem, foszfát-pufferelt glutáraldehiddel fixáltam és foszfát-pufferelt ozmium-tetroxiddal utófixáltam. Ezután fokozatosan víztelenítettem etanollal. A mintákat propilén-oxiddal inkubáltam, majd Araldite gyantába ágyaztam. Ultramikrotómmal metszeteket készítettem, melyeket rézrostélyokra vettem fel. Kontrasztosításra uranil acetátot és ólom citrátot alkalmaztam.

AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

I. A *Phaeodactylum tricornutum* kovamoszat esetén acetonos pigment extraktumokban gyenge intrinzikus CD jeleket figyeltem meg. Izolált tilakoid membránokban egy CD sávpár található (+)445/(-)478 nm-nél, amely exciton sávnak tekinthető és főként a Fx molekulákból ered. 679 nm-nél egy negatív sáv található, mely nem tekinthető exciton sávnak, mivel nem rendelkezik konzervatív sávszerkezettel. Egész sejtek az exciton sávok mellett erős CD sávot mutatnak 698 nm-nél. Ez a sáv

differenciális fényszórással társul és eltűnik a sejtek feltörésének hatására, ezért psi-típusú CD sávnak tekinthető.

Cukorgrádiens centrifugálás segítségével elkülönítettük a FCP komplexek trimer illetve oligomer szerveződési formáját (FCP és FCPo). A FCP és FCPo komplexek CD spektruma igen hasonló volt egymáshoz, azonban egyik frakcióban sem figyeltünk meg psi-típusú CD sávokat, így megállapítható, hogy a FCP komplexek önmagukban nem képeznek királis makrodoméneket.

A (+)698 nm-es CD sáv psi-típusú természetét igazoltam oly módon, hogy a sejteket ultrahangos szonikálásnak vetettem alá. Szonikálás során a (+)698 nm-es sáv intenzitása lecsökkent, végül teljesen eltűnt, míg a (-)679 nm-es sáv intenzitása csak kismértékben változott. A kontroll és szonikált sejtek elektronmikroszkópos felvételei arról tanúskodnak, hogy a psi-típusú CD sávokat csak akkor figyelhetjük meg, ha a tilakoid membránok szabályos, multilamelláris rendszerbe szerveződnek.

II. *P. tricornutum* sejtekben a királis makrodomének erős szerkezeti flexibilitást mutattak. Hőkezelés hatására a psi-típusú CD sáv sokkal érzékenyebbnek bizonyult, mint az exciton sávok; 45 °C-ig a psi-típusú CD sáv intenzitása fokozatosan csökkent, míg az exciton sávok nagyjából változatlanok maradtak. 45 °C felett az exciton sávok is eltűntek, amely a pigment-protein komplexek szétesésére utal.

Fényindukált CD változásokat is megfigyeltem a sejtekben; a psi-típusú CD sáv intenzitása – és kismértékben a (-)679 nm-es sáv intenzitása - megnőtt erős fényrel történő megvilágítás hatására, míg a többi spektrális tartomány nem változott. Kinetikai mérésekkel kimutattam, hogy a fényindukált változások gyorsan, mintegy 100 s alatt telítődtek és reverzibilisek voltak. A fényindukált CD változások mértéke függött a fényintenzitástól is kb. 450 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ -ig, ahol a változások mértéke telítődött. Kimutattam, hogy xantofill ciklus-gátló dithiothreitol megakadályozta a fényindukált CD változás kialakulását, amely a xantofill ciklus és a szerkezeti változások összefüggésére utal. Azonban a protongrádiens szétkapcsoló ammónium-klorid nem gátolta a változásokat, ezért jelen eredményekből nem ítéltető meg egyértelműen a szerkezeti változások és a NPQ közötti összefüggés; ennek felderítésére további vizsgálatok szükségesek.

Különböző nevelési fényintenzitás alkalmazásával nevelt sejtek CD spektrumaiban jelentős különbségeket figyeltem meg. Alacsony fényintenzitáson (LL) nevelt sejtekben jóval nagyobb psi-típusú CD sávok és gyengébb (-)679 nm-es sáv volt megfigyelhető, mint magas fényintenzitáson (HL) nőtt sejtek esetén. Ezzel szemben a fényindukált változások kinetikája és mértéke jóval kisebb volt LL sejtekben mint HL sejtekben. Ez arra utal, hogy a nagyobb fokú makrodomén szerveződés társulva kisebb szerkezeti flexibilitással előnyös lehet a hatékonyabb fénybegyűjtés kialakulásában alacsony fényintenzitásokon.

A közeg ozmotikus nyomásának emelése főként a psi-típusú CD jel intenzitásának reverzibilis változását vonta maga után, azonban az exciton kölcsönhatások is változtak, bár csak kisebb mértékben. Izolált tilakoid membránokban nem volt megfigyelhető a psi-típusú CD sáv. Azonban ha az izolálás $MgCl_2$ jelenlétében történt, a psi-típusú CD sáv jelentős része megmaradt. A psi-típusú CD jel részben visszaállítható volt, amikor az eredetileg $MgCl_2$ hiányában izolált tilakoid membránokat $MgCl_2$ -tartalmú pufferben szuszpendáltam. A psi-típusú CD sávval párhuzamosan a F_v/F_m , NPQ és a deepoxidációs arány is jelentősen magasabb volt Mg^{2+} ionok jelenlétében.

A pigmentek királis makrodoménekbe történő szerveződése megfigyelhető volt egy másik kovamoszat, a *Cyclotella meneghiniana* sejtjeiben is. Psi-típusú CD sávot azonosítottam (+)694 nm-nél, amely szintén érzékeny volt erős fényvel történő megvilágítás és hőkezelés hatására, míg az exciton sávok jóval nagyobb stabilitást mutattak. Mg^{2+} ionok jelenlétében szintén nagymértékben megtartható volt a psi-típusú CD sáv izolált tilakoid membránokban.

III. Annak érdekében, hogy információt kapjunk a Fx molekulák mikrokozonyezetéről, villanófény indukálta elektrokróm abszorpcióváltozásokat mértem *P. tricornutum* sejteken 470 és 570 nm között. Két fő elektrokróm jelet azonosítottam 515/485 és 565/535 nm-nél. Ezek a jelek a Fx molekulák különböző spektrális formáiból erednek és hullámhossz pozíciójuknak megfelelően Fx_{green} , illetve Fx_{red} in vivo formaként azonosítottam őket, ugyanis korábban kimutatták e két forma létezését izolált FCP komplexeken (Premvardhan et al. 2008). Megállapítottam, hogy különböző megvilágítási körülmények alkalmazása a nevelés során befolyásolja a két Fx forma mennyiségét; LL sejtekben a Fx_{red} felhalmozódik a HL sejtekhez képest, míg a Fx_{green} mennyisége nem

változik jelentősen a fényintenzitással. Mélyhőmérsékletű fluoreszcencia spektroszkópia segítségével kimutattam, hogy $F_{x_{red}}$ hatékonyabb klorofill *a*-ra történő gerjesztési energiaátadást mutat, mint $F_{x_{green}}$. Továbbá, $F_{x_{red}}$ hatékonyabb energiaátadást mutat a 689 nm-nél emittáló, valószínűsíthetően PSII-ben található klorofill molekulákra, mind LL, mind pedig HL sejtek esetén. Ez egyúttal arra is utal, hogy a F_x molekulák és a FCP antenna komplexek funkcionálisan is heterogén csoportokat alkotnak. Azt is megállapítottam, hogy a $F_{x_{red}}$ kisebb orientációs szöget zár be a tilakoid membránok hosszirányú síkjával, mint a $F_{x_{green}}$.

Igen hasonló elektrokróm jeleket azonosítottam egy másik kovamoszat faj, a *C. meneghiniana* sejtjeiben. A F_x molekulák spektrálisan és funkcionálisan heterogén csoportokat alkotnak ebben a fajban is, és a $F_{x_{red}}$ és $F_{x_{green}}$ formákat is sikerült azonosítani. Ezek az eredmények arra utalhatnak, hogy a F_x és FCP molekulák heterogenitása általános jelenség lehet kovamoszatokban.

IRODALOM

- Barabás K, Zimányi L, Garab G** (1985) Kinetics of the Flash-Induced Electrochromic Absorbency Change in the Presence of Background Illumination - Turnover Rate of the Electron-Transport .1. Isolated Intact Chloroplasts. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **17**, 349-364.
- Bilger W, Björkmann O** (1990) Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynthesis Research* **25**, 173-185.
- Büchel C, Garab G** (1995) Electrochromic Absorbency Changes in the Chlorophyll-C-Containing Alga *Pleurochloris-Meiringerensis* (Xanthophyceae). *Photosynthesis Research* **43**, 49-56.
- Garab G** (1996) Linear and Circular Dichroism. In: Amesz J and Hoff AJ (eds) Biophysical Techniques in Photosynthesis, *Advances in Photosynthesis*, Vol. 3, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, pp 11-40.
- Garab G, van Amerongen H** (2009) Linear dichroism and circular dichroism in photosynthesis research. *Photosynthesis Research* **101**, 135-146.
- Jeffrey SW, Humphrey GF** (1975) New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* **167**, 191-194.
- Kraay GW, Zapata M, Veldhuis MJW** (1992) Separation of chlorophylls c1, c2, and c3 of marine phytoplankton by reversed-phase-C18-high-performance liquid chromatography. *Journal of Phycology* **28**, 708-712.
- Premvardhan L, Sandberg DJ, Fey H, Birge RR, Büchel C, van Grondelle R** (2008) The charge-transfer properties of the S-2 state of fucoxanthin in solution and in fucoxanthin chlorophyll-a/c(2) protein (FCP) based on stark spectroscopy and molecular-orbital theory. *Journal of Physical Chemistry B* **112**, 11838-11853.

PUBLIKÁCIÓS LISTA

***Szabó M**, Premvardhan L, Lepetit B, Goss R, Wilhelm C and Garab G (2010) Functional heterogeneity of the fucoxanthins and fucoxanthin-chlorophyll proteins in diatom cells revealed by their electrochromic response and fluorescence and linear dichroism spectra. *Chemical Physics* 373: 110-114
IF: 2.277

***Szabó M**, Lepetit B, Goss R, Wilhelm C, Mustárdy L and Garab G (2008) Structurally flexible macro-organization of the pigment–protein complexes of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Photosynthesis Research* 95: 237-245
IF: 2.681

Lepetit B, Volke D, **Szabó M**, Hoffmann R, Garab G, Wilhelm C and Goss R (2008) The Oligomeric Antenna of the Diatom *P. tricornutum* – Localisation of Diadinoxanthin Cycle Pigments. In: Allen JF, Gantt E, Golbeck JH and Osmond B (eds), *Photosynthesis. Energy from the Sun*, pp 283-286, Springer

Lepetit B, Volke D, **Szabó M**, Hoffmann R, Garab G, Wilhelm C and Goss R (2007) Spectroscopic and Molecular Characterization of the Oligomeric Antenna of the Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Biochemistry* 46: 9813-9822
IF: 3.368

* A dolgozat alapjául szolgáló közlemények

TÁRSSZERZŐI NYILATKOZAT

Alulírott nyilatkozom, hogy a jelölt téziseit ismerem, a tézisekben foglalt tudományos eredményeket PhD fokozat megszerzéséhez nem használtam fel és azokat ilyen célból a jövőben sem fogom használni. Elismerem, hogy Szabó Milánnak az alábbi közlemények eredményeinek elérésében meghatározó fontosságú szerepe volt, így a közlemények anyagát Ph.D értekezésében felhasználhatja.

Szabó Milán PhD munkájának témavezetőjeként igazolom, hogy a tézise az általa végzett munka eredményeit tükrözi és PhD értekezéséhez felhasznált közlemények létrehozásához jelentős mértékben hozzájárult:

Szabó M, Premvardhan L, Lepetit B, Goss R, Wilhelm C and Garab G (2010) Functional heterogeneity of the fucoxanthins and fucoxanthin-chlorophyll proteins in diatom cells revealed by their electrochromic response and fluorescence and linear dichroism spectra. *Chemical Physics* 373: 110-114

Szabó M, Lepetit B, Goss R, Wilhelm C, Mustárdy L and Garab G (2008) Structurally flexible macro-organization of the pigment–protein complexes of the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Photosynthesis Research* 95: 237-245

.....
Dr. Garab Győző-témavezető