

**A foszfatidil-glicerin meghatározó szerepe a fotoszintetikus
szervezetek sejtfunkcióiban**

Ph.D. értekezés

Laczkó-Dobos Hajnalka

Témavezető: Dr. Gombos Zoltán

Biológia Doktori Iskola

MTA Szegedi Biológiai Központ Növénybiológiai Intézet

SZTE TTIK

Szeged

2009

Rövidítések	4
1. Bevezetés	6
2. Irodalmi áttekintés	7
2.1. A cianobaktériumok mint modellszervezetek a fotoszintézis tanulmányozására ..	7
2.1.1. A cianobaktériumok membránszerveződése	7
2.1.2. Cianobaktériumok 2. fotokémiai rendszerének szerkezete	10
2.1.3.1. A PSII elektron donor oldala	13
2.1.3.2. A PSII elektronakceptor oldala	15
2.2. A PG biokémiája.....	16
2.2.1. A PG és a zsírsavak kémiai szerkezete	16
2.2.1.1. Zsírsavak bioszintézise	19
2.2.1.2. A PG bioszintézise	20
2.2.2. A PG előfordulása és mennyiségi eloszlása a cianobaktériumokban	23
2.3. A PG szerepe a fotoszintetizáló szervezetekben	25
2.4. A PG-molekula kémiai szerkezetének átépülése és annak szerepe a stresszreakciók kivédésében.....	27
3. Célkitűzések	29
4. Anyagok és módszerek	30
4.1. A PAL/ $\Delta cdsA$ és $\Delta pgsA$ nevelési körülményei	30
4.2. A PAL/ $\Delta cdsA$ mutáns létrehozása	30
4.3. A sejtek szaporodásának és pigmenttartalmának mérése.....	30
4.4. Morfológiai vizsgálatok	31
4.5. A tilakoidmembránok komponenseinek kétdimenziós gélelektroforézise	31
4.5.1. Tilakoidmembrán izolálása.....	31
4.5.2. A fehérjék analízise: kétdimenziós gélelektroforézis	32
4.6. Fluoreszcencia emissziós spektrumok felvétele 77 K hőmérsékleten	32
4.7. A fotoszintetikus oxigénfejlesztő aktivitás mérése.....	32
4.8. Termolumineszcencia mérések.....	33
4.9. Chl- <i>a</i> fluoreszcencia mérése	33
4.10. A lipidtartalom gázkromatográfiás analízise	33
4.11. Tömegspektrometriai analízis.....	34
5. Eredmények.....	36
5.1. A PAL/ $\Delta cdsA$ mutáns törzs előállítás	36
5.2. A PG kiürülésének hatása a sejtek szaporodására és pigmenttartalmára.....	37
5.3. A PG kiürülésének hatása a lipidösszetételre.....	38
5.4. A PG kiürülésének hatása a sejt méretére és szerkezetére	39
5.4. A PG kiürülésének hatása PSII szerkezetre	41
5.4.1. A PG-kiürülés hatása a PSII fehérje alegységek szintézisére és összeszerelésére	41
5.4.2. Alacsony hőmérsékletű (77K) fluoreszcencia mérések	42
5.5. A PG-kiürülés hatásának vizsgálata a PSII funkciókra	43
5.5.1. Fotoszintetikus oxigénfejlődés	43
5.5.2. Termolumineszcencia.....	44
5.5.3. Chl- <i>a</i> fluoreszcencia indukció kinetikai mérések.....	45
5.6. A PG átalakításának tanulmányozása	48
5.6.1. A PG-átalakítás tanulmányozása gázkromatográfia módszerével.....	48
5.6.2. A PG-átalakítás tanulmányozása tömegspektrometria módszerével	49
5.6.2.1. A PG(18:2/18:0) molekula azonosítása	51

5.6.2.2. A PG(18:2/18:1) és PG(18:3/18:0) izoformák azonosítása	52
5.6.2.3. A PG(18:1/16:0) és PG(16:1/18:0) izoformák azonosítása	53
5.6.2.4. A PG(18:2/16:0) és PG(16:1/18:1) izoformák azonosítása	55
5.6.2.5. A PG-molekulatípusok szemikvantitatív tömegspektrometriás analízise	56
6. Az eredmények megvitatása	58
6.1. A PG szerepe a fotoszintézis folyamataiban és más sejtfunkciókban	58
6.2. A PG-molekula átépülése.....	63
7. Összefoglalás.....	67
8. Idézett közlemények	70
Köszönetnyilvánítás	80
Összefoglaló.....	81
Summary.....	86
Publikációs lista.....	91

Rövidítések

16:0 zsírsav	palmitinsav
16:1 zsírsav	palmitoilsav
18:0 zsírsav	sztearinsav
18:1 zsírsav	olajsav
18:2 zsírsav	linolsav
18:3 zsírsav	linolénsav
ACP	„acyl carrier-protein” (acilcsoportot szállító fehérje)
CDP	citidil-difoszfát
Chl <i>a</i>	klorofill-a
CID	ütközésindukált disszociáció
CP43 és CP47	klorofill–protein komplexek
D1 és D2	a PSII reakciócentrum fehérjealegységei
DCMU	diklórfenil-dimetil-urea (herbicide)
ESI	electrospray ionizáció
F ₆₈₅	fluoreszcenciaemisszió 685 nm-nél (CP43)
FTICR	hibrid lineáris ioncsapdás Fourier-transzformációs ionciklotron-rezonancia tömegspektrométer
G3P	glicerín-3-foszfát
[M-H] [−]	molekulaion
MS	tömegspektrometria
MS/MS	tandem tömegspektrometria
OD	optikai denzitás
P680	a 2. fotokémiai rendszer elsődleges elektrondonorja
P700	az 1. fotokémiai rendszer elsődleges elektrondonorja
PA	foszfátidsav
PAL	<i>A Synechocystis</i> sp. PCC6803 fikobiliszómahiányos mutáns törzse
PG	foszfatidil-glicerín
PG(14:0/14:0)	1,2-dimirisztoil- <i>sn</i> -glicero-3-foszfó-(1'- <i>rac</i> -glicerín)

PG(16:0/18:1)	1-hexadekanoil-2-(9Z-oktadecenoil)- <i>sn</i> -glicero-3-foszfo-(1'- <i>rac</i> -glicerin)
PG(16:1/18:0)	1-(9Z-hexadecenoil)-2-oktadekanoil- <i>sn</i> -glicero-3-foszfo-(1'- <i>rac</i> -glicerin)
PG(16:1/18:1)	1-(9Z-hexadecenoil)-2-(9Z-oktadecenoil)- <i>sn</i> -glicero-3-foszfo-(1'- <i>rac</i> -glicerin)
PG(18:1/16:0)	1-(9Z-oktadecenoil)-2-hexadekanoil- <i>sn</i> -glicero-3-foszfo-(1'- <i>rac</i> -glicerin)
PG(18:1/18:1)	1,2-di-(9E-oktadekanoil)- <i>sn</i> -glicero-3-foszfo-(1'- <i>rac</i> -glicerin)
PG(18:2/16:0)	1-(9Z,12Z-oktadekadienoil)-2-hexadekanoil- <i>sn</i> -glicero-3-foszfo-(1'- <i>rac</i> -glicerin)
PG(18:2/18:0)	1-(9Z,12Z-oktadekadienoil)-2-oktadekanoil- <i>sn</i> -glicero-3-foszfo-(1'- <i>rac</i> -glicerin)
PG(18:2/18:1)	1-(9Z,12Z-oktadekadienoil)-2-(9E-oktadecenoil)- <i>sn</i> -glicero-3-foszfo-(1'- <i>rac</i> -glicerin)
PG(18:3/18:0)	1-(9Z,12Z,15Z-oktadekatrienoil)-2-oktadekanoil- <i>sn</i> -glicero-3-foszfo-(1'- <i>rac</i> -glicerin)
PLA1 és PLA2	foszfolipáz A ₁ és A ₂
PSI	1. fotokémiai rendszer
PSII	2. fotokémiai rendszer
Q _A	elsődleges kinon elektronakceptor
Q _B	másodlagos kinon elektronakceptor
R	acilcsoport
RC	reakciócentrum
RC47	CP43-hiányos PSII core-komplex
RCC	reakciócentrum core-komplex
RCCI(3) és RCCI(1)	trimer és monomer PSI core-komplexek
RCCII(2) és RCCII(1)	dimer és monomer PSII core-komplexek
TL	termolumineszcencia
2D-BN/SDS-PAGE	kétdimenziós blue natív SDS-gélelektroforézis

1. Bevezetés

A fotoszintetikus szervezeteknek tulajdonítható az, hogy a Földön felhalmozódik és hasznosul a Napból érkező fényenergia, mely a fotoszintézis során szerves anyagokba épülve éteti a földi élőlényeket, biztosítva élelmüket és közvetve az emberi társadalom energiaforrásának nagy részét.

A cianobaktériumok a legősibb prokariota szervezetek, amelyek oxigéntermelő fotoszintézisre képesek, a földtörténet során jelentős szerepet töltek be a légkör oxigénnel való dúsításában. A Föld eredeti redukzív légkörét ezek az élőlények alakították át oxidatív légkörré. A cianobaktériumok membránfelépítése hasonló a magasabbrendű növények és algák kloroplasztiszaihoz, hiszen rendelkeznek külső és belső membránnal, illetve tilakoid membránrendszerrel, mint a növények kloroplasztiszai. Az endoszimbiózis elmélet szerint a cianobaktériumokat a kloroplasztisz őseinek tekinthetjük. Egyszerű felépítésűek, gyorsan szaporodnak, egyes fajok teljes genomszekvenciája ismert, könnyen transzformálhatók, lehetővé téve mutánsok előállítását, melyek segítségével *in vivo* tanulmányozható a különböző lipid- és fehérjemolekuláknak a sejtfunkciókban játszott szerepe.

A tilakoidmembránok fő komponensei a nagy fehérjekomplexek, amelyek a lipid-kettősrétegbe vannak beágyazva. A fotoszintetikus apparátus fehérjéi szoros kölcsönhatásban vannak az őket körülvevő lipidmolekulákkal. Éppen ezért a fehérjemolekulák mellett a lipideknek igen fontos szerepük van a sejtfunkciók szabályozásában. A cianobaktériumok tilakoid- és citoplazmamembránjának lipidjei főként glikolipidek, mellettük kis mennyiségben található a foszfatidil-glicerol (PG), az egyetlen foszfolipid. A PG semleges pH-n negatív töltéssel rendelkezik, amely biztosítja a hidrofób fehérjék beépülését a membrán hidrofób régióiban. A PG-molekulának, amely nélkülözhetetlennek bizonyult a fotoszintetikus szervezetek számára, fontos szerepe van a fotoszintetikus fehérjekomplexek összeszerelésében, valamint ezek működésében, de még számos specifikus szerepét, részletes biokémiáját, hatóhelyét, a különböző lipid-fehérje kölcsönhatásokat nem ismerjük, így ezek felderítésre várnak. A PG-molekula élettani szerepének megértése érdekes kihívás.

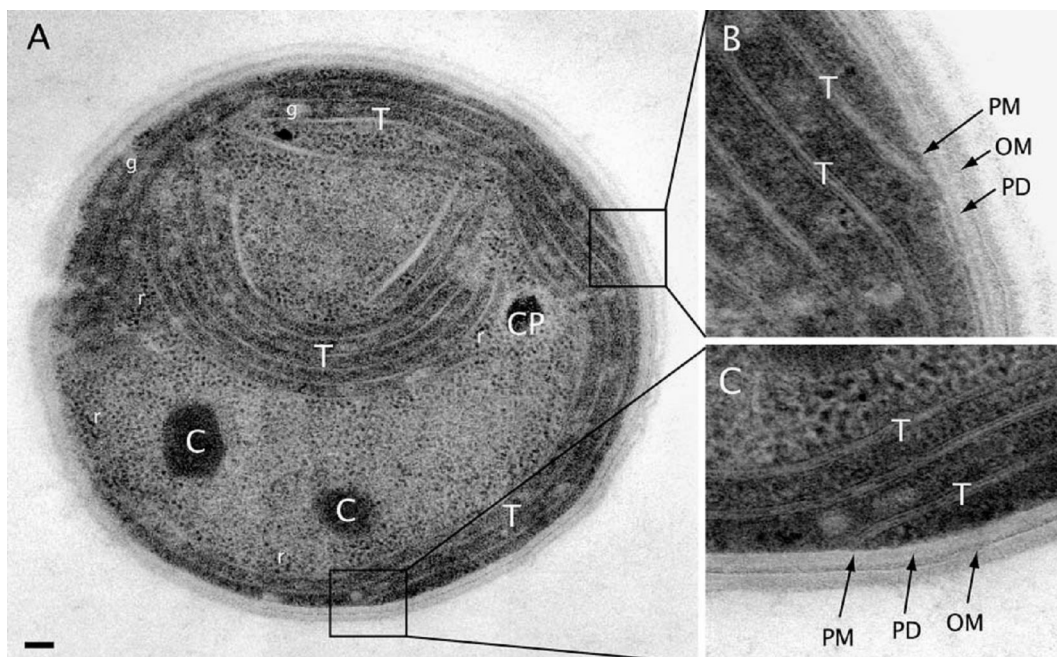
2. Irodalmi áttekintés

2.1. A cianobaktériumok mint modellszervezetek a fotoszintézis tanulmányozására

A cianobaktériumok Gram-negatív baktériumok, amelyek lehetnek egysejtések vagy fonalasak. A *Synechocystis* sp. PCC6803 egysejtű, hőmérsékleti igényét tekintve mezofil cianobaktérium. A továbbiakban *Synechocystis*-ként jelölöm. Fotoheterotróf életmódú: életfolyamatai fotoszintézisen alapulnak, de képes szaporodni glükóz szénforráson sötétben is, napi öt perc megvilágítás mellett. Ez utóbbi tulajdonsága lehetőséget ad arra, hogy a fotoszintetikus apparátus kulcsfontosságú enzimeit is inaktiváljuk. Tehát a *Synechocystis* felhasználhatjuk a fotoszintézis olyan részfolyamatainak tanulmányozására, amelyeket a növényi sejtekben igen bonyolult lenne vizsgálni. Nagyon jó modellszervezetek a fotoszintézis tanulmányozására, hiszen számos előnyös tulajdonsággal rendelkeznek, amelyeket már a bevezetőben említettem, éppen ezért választottuk kísérleteinkhez. A növényekkel ellentétben a cianobaktériumok képesek felvenni a PG-molekulákat a nevelési médiumból, így a PG-hiányos mutánsok életben tarthatók, hiszen az életbenmaradáshoz a PG elengedhetetlennek bizonyult.

2.1.1. A cianobaktériumok membránszerveződése

A cianobaktériumok membránfelépítése hasonló a magasabbrendű növények és algák kloroplasztisziáéhoz. Membránrendszerüket háromféle membrán alkotja: a külső membrán, a citoplazmamembrán, valamint a tilakoidmembrán. A *Synechocystis* cianobaktérium részletes szerkezetét az 1. ábra mutatja be.



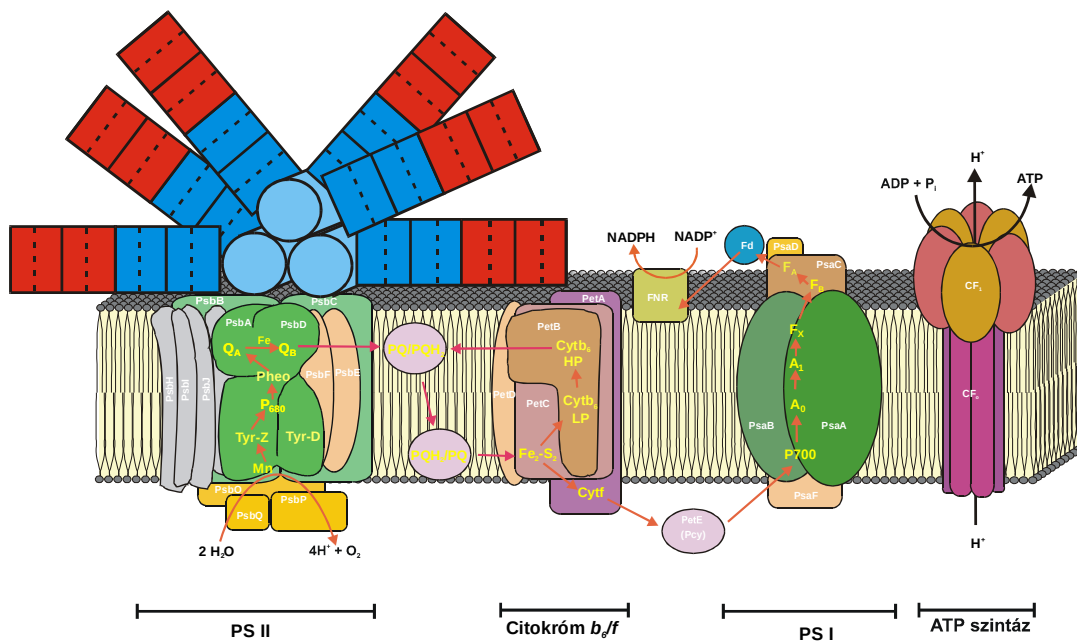
1. ábra. A *Synechocystis* sejt elektronmikroszkópos szerkezete

B és C panelek: az A panelen bekeretezett részek kinagyítása. Az ábrán használt jelölések a következők: T: tilakoidmembrán, C: karboxiszóma, CP: cianoficinszemce, g: glikogénszemce, r: riboszómák, PM: plazmamembrán, OM: külső membrán, PD: peptidoglikán réteg. Lépték: 100 nm. Az ábra Liberton és mtsai (2006) közleményéből származik.

A külső membrán, amely a sejtfa része, főként fehérjékből és lipopoliszacharidokból áll, lipideket és karotinoidokat kisebb arányban tartalmaz. A külső membránban sokféle transzporter fehérje található, amelyek passzív, illetve “facilitált” diffúziót lehetővé tevő csatornák, valamint aktívtranszport-komplexek, melyek összekötik a külső membránt a citoplazmamembránnal, átnyúlva a rigid peptidoglikán réteg pórusain (Gantt, 1994). A külső membránban található karotinoidkötő fehérjék is, amelyek valószínűleg óvják a sejtet a túl erős fénytől (Jurgens és Mantele, 1991).

A sejtfaon belül található citoplazmás és tilakoidmembrán lipidösszetétele hasonló, mely főként glikolipidekből és fehérjékből épül fel, de nem hasonlít a baktériumok főként foszfolipidekből álló membránjára. A citoplazmamembrán fehérjei között találunk transzport fehérjéket, pl. nitrát- és nitrátspecifikus aktívtranszport-rendszereket (Maeda és mtsai, 1998), valamint a légzési elektrontranszportlánc és az oxidatív foszforiláció fehérjeit (Peschek, 1987; Schmetterer, 1994).

Az intracelluláris elhelyezkedésű tilakoidmembrán keresztmetszeti elektronmikroszkópos felvételeken a sejtfallal párhuzamosan futó rétegek formájában jelenik meg, melyek nem tapadnak össze, egymástól 60-70 nm távolságra, párosával helyezkednek el, ellentétben a növények kloroplasztisaiban található gránum és sztróma membránszerveződéssel (Gantt, 1994). A *Synechocystis* esetében megfigyelhető, hogy a tilakoidmembránok többsége koncentrikusan helyezkedik el a sejtfal szomszédságában. Egyes helyeken azonban a tilakoidmembrán szintjén befűződéseket láthatunk. Más helyeken a tilakoidmembránok egymás közötti távolsága 50 nm, ami megegyezik a fikobiliszómák méretével is, amelyek a tilakoidmembrán felszínéhez tapadó fénybegyűjtő-komplexek (Anderson és Toole, 1998). A tilakoidmembránban találhatók a fotoszintetikus elektrontranszportlánc fehérjekomplexei (2. ábra): a 2. fotokémiai rendszer (PSII), a hozzá kapcsolódó vízbontó komplex, a fénybegyűjtő antenna, amely lehet külső (a fikobiliszóma), valamint belső (klorofil-protein komplexek: CP43, CP47), a citokróm b_6/f komplex, az 1. fotokémiai rendszer (PSI) és az ATP-szintáz komplex.



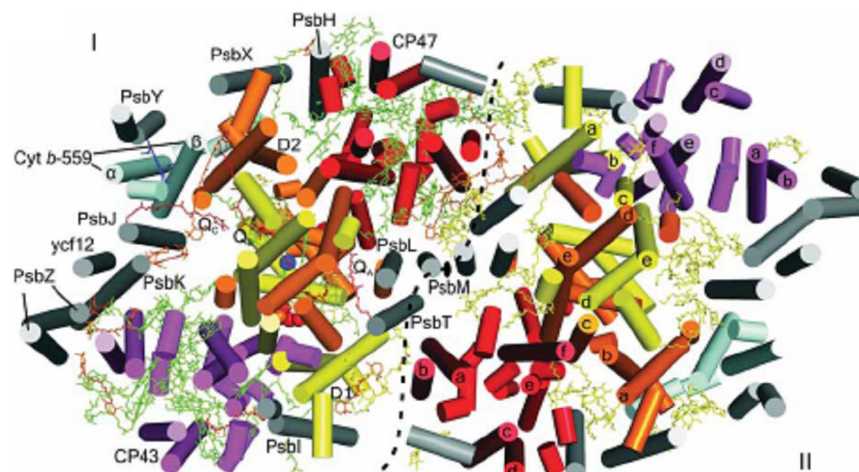
2. ábra. A fotoszintetikus készülék komponensei cianobaktérium sejtekben

A tilakoidmembrán főbb ábrázolt fehérjekomplexei: PSII, citokróm b_6/f , PSI és ATP szintáz. A membrán külső felszínéhez kapcsolódik a fikobiliszóma. Az ábrát Kovács László készítette Bryant (2009) alapján.

A tilakoidmembrán tartalmazza a légzési elektrontranszportlánc komponenseit is, mivel a cianobaktériumok sajátossága, hogy ugyanabban a sejtkompartimentumban képesek oxigéntermelő fotoszintézisre és légzésre is.

2.1.2. Cianobaktériumok 2. fotokémiai rendszerének szerkezete

A röntgenkristallográfiás módszerek felbontóképessége (2.9 Å) lehetővé tette a PSII reakciócentrum (RC)-nak (3. ábra) részletesebb tanulmányozását (Guskov és mtsai, 2009).



3. ábra. A PSII dimer szerkezeti modellje a citoszol felől nézve

A monomerek kapcsolódási felszínét szaggatott vonal jelzi. A transzmembrán α -helixek különböző színű hengerként vannak ábrázolva. D1: sárga, D2: narancs, CP43: lila, CP47: piros, cyt *b*-559: kék, kis alegységek: szürke. Az ábra Guskov és mtsai (2009) közleményéből származik.

A *Thermosynechococcus elongatus* és a *Thermosynechococcus vulcanus* PSII RC-nak röntgenkristallográfiás vizsgálata kimutatta, hogy monomerenként mintegy 20 fehérjealegység, 35 klorofill molekula, 12 β -karotin és 25 membránba ágyazott lipidmolekula, valamint az elektrontranszportlánc kofaktorai figyelhetők meg (Loll és mtsai, 2005; Guskov és mtsai, 2009). Ez a szerkezeti vizsgálat azt sugallja, hogy a lipidmolekuláknak igen fontos szerkezeti és működési szerep jut mind a PSII összeszerelésében, mind a flexibilitásában.

A PSII központi részét a D1-D2 polipeptid heterodimer képezi, amely 5 transzmembrán-helixet alkot (Zouni és mtsai, 2001; Kamiya és Shen, 2003). Mindkét polipeptid tartalmaz egy-egy tirozint, a Tyr Z-t a D1 és a Tyr D-t a D2, de csak az

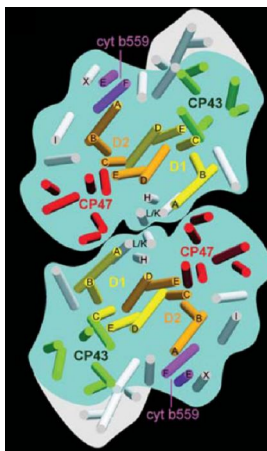
előbbi vesz részt a fotoszintetikus elektronszállításban a vízbontó komplex felől. Mindkét polipeptidhez kötődik a P680, a RC-ot alkotó sajátos klorofil-a (Chl *a*) dimer. Mind a D1, mind a D2 még megköt egy-egy feofitin-a (Pheo) molekulát, a sztróma felőli oldalon pedig mindkettő tartalmaz egy speciális kinonkötő helyet. A D2 polipeptid stabilan köti az elsődleges kinonakceptort, a Q_A -t. A D1 labilisan, lazán köti a másodlagos kinonakceptort, a Q_B -t, amely két elektron felvétele után, kétszeresen redukált állapotban kilép a tilakoidmembrán lipdrétegébe és helyébe egy oxidált plasztokinon, egy másik Q_B kötődik be. A Q_A és a Q_B között egy nem hem-típusú vas található, mely nem vesz részt az elektronszállításban. A Q_A viszonylag erősen kötődik a D2 polipeptidhez és csak egy-egy elektront képes fogadni a RC felől. A Q_B egymás után két elektront tud felvenni. Egyszeresen redukált Q_B^- állapotban nagyon stabil, megvárja egy újabb elektron érkezését a Q_A -felől, majd a Q_B^{2-} felvesz két protont a sztróma felől, és így levál a D1-ről. A levált Q_B^{2-} oldalirányba kidiffundál a tilakoid lipdrétegének szabad plasztokinon állományába. A legújabb röntgenkristallográfiás vizsgálatok (Loll és mtsai, 2005; Guskov és mtsai, 2009) három illetve 2,9 Å felbontással mutatják, hogy a Q_B kötőhelynél van egy ún. előkamra, amelynek az üregét kitölti a kinon fejcsoportja, míg izoprenoid lánc az üreg fala mentén csavarodik. Ez a fajta elrendeződés azt sugallja, hogy az üreg egy flexibilis, lipofil közeget tud biztosítani a PQ/PQH₂ diffúziójának. A D1 polipeptidet nagyon gyors „turnover” jellemzi, melynek sebessége függ a fényintenzitástól.

A RC további komponenseit képezi számos kis molekulasúlyú fehérje, amelyeknek nem ismert még pontos szerepük, valamint a heterodimer citokróm *b*-559 (PsbE és PsbF) és a belső antennafehérjék (CP43 és CP47).. A cianobaktérium PSII komplexében három membránon kívüli fehérje található, amelyek a lumenális oldalhoz kapcsolódnak: PsbO(33kDa), PsbU(12kDa) és PsbV(cyt c550). Ezek a fehérjék a PSII egy másik alkotórésze, a Mn-klaszter, közelében a PSII donor oldalán helyezkednek el, és résztvesznek a vízbontó komplex stabilizálásában.

A citokróm *b*-559 heterodimer mindegyike két-két fehérjealegységből áll, amelyek átérlik a tilakoidmembránt, és amelyekhez közös hemcsoport kapcsolódik. A citokróm *b*-559 a PSII teljesítményét segíti, túltelítő erős fényben fotoprotektív szerepet tölt be azáltal, hogy ciklizálja az elektronszállítást a PSII körül, így az elektronok nem jutnak tovább a PSI felé.

A belső antennát alkotó CP43 és CP47 klorofilltartalmú fehérjék, amelyek a reakciócentrum core-komplexnek (RCC) alkotórészei, hat α -helixet tartalmaznak, ide kötődik a PSII RCC klorofilok többsége és a β -karotinok egy része. A karotinoidoknak védő szerepük van a fotooxidáció károsító hatásaival szemben (Masamoto és Furukawa, 1997; Varkonyi és mtsai, 2002; Schafer és mtsai, 2005).

A CP47 mintegy 16, a CP43 13 Chl-*a* molekulát köt meg (Barber, 2003). A CP43 a D1 fehérje szomszédságában helyezkedik el, míg a CP47 a D2 fehérje közelében található (4. ábra).



4. ábra. A CP43 és CP47 klorofill-fehérje komplexek elhelyezkedése a PSII dimerben

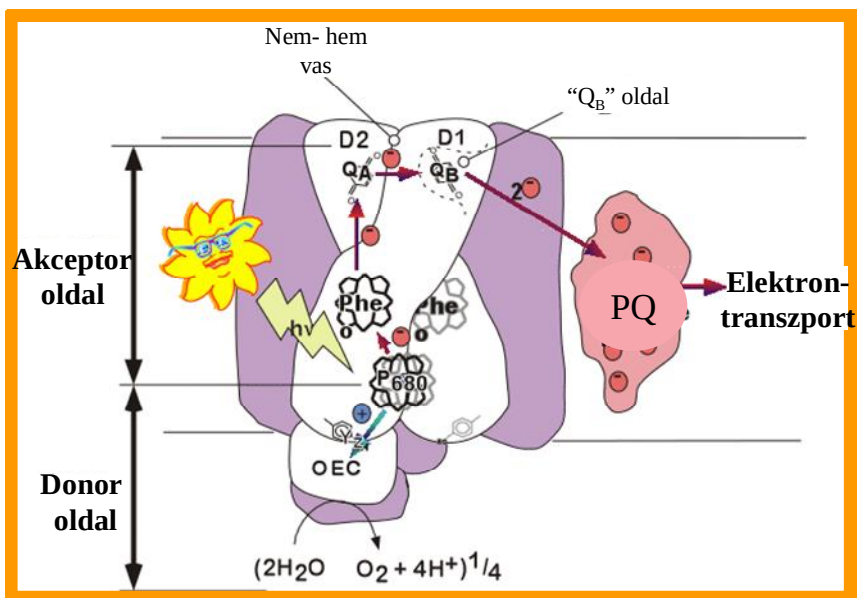
A transzmembrán-fehérjék helixei különböző színű hengerekként vannak ábrázolva. D1: sárga, D2: narancs, CP43: zöld, CP47: piros, cyt b559: lila, kis alegységek: szürke. Az ábra Barber (2003) közleményéből származik.

A klorofill-proteinek fő szerepe a gerjesztett energia továbbadása a RC-nak, amely beindítja a töltésszétválást (Vangrondelle és mtsai, 1994). A növényekben a PSII-höz mobilisan kapcsolódik az LHCII, e helyett cianobaktériumokban a membrán felszínén elhelyezkedő, külső antenna-komplex, a fikobiliszóma segíti a fénybegyűjtést (Sidler, 1994).

2.1.3. Elektrontraszport-folyamatok a PSII-ben

2.1.3.1. A PSII elektrondonor oldala

A PSII donor oldalát (5. ábra) a vízbontó komplex képviseli az itt zajló folyamatok révén, melynek során egy oxigénmolekula négy elektron egymás utáni leadása során keletkezik két vízmolekulából, miközben a lumenben négy proton (H^+) gyűlik fel, a képződött oxigén pedig a lumenből a sztrómába diffundál.



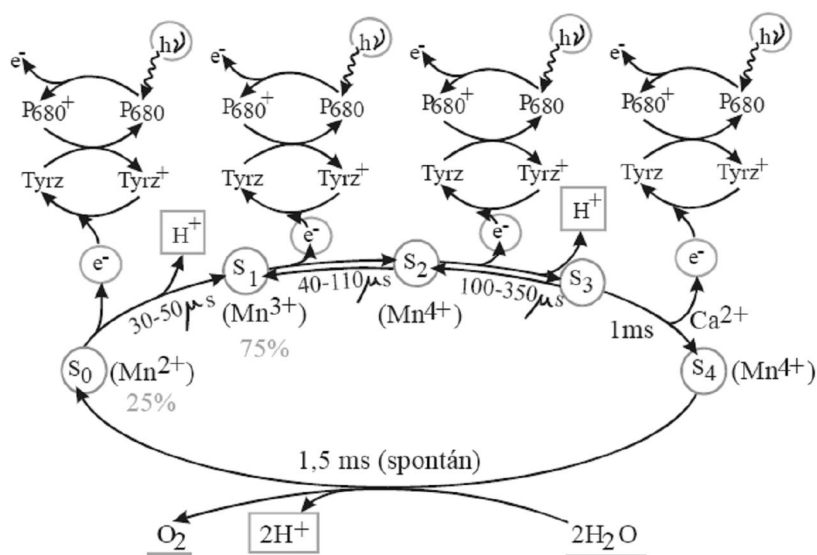
5. ábra. A PSII elektrondonor és -akceptor oldalának vázlatos ábrázolása

OEC, vízbontó komplex; P680, reakciócentrum-klorofill; Phe, feofitin; D1 és D2, polipeptidek; Q_A és Q_B , kinon elektronakceptorok; PQ, plasztokinon.

A röntgenkristallográfiás szerkezet részletes információt nyújt a vízbontó komplexről (Loll és mtsai, 2005; Guskov és mtsai, 2009). A vízbontó komplex tartalmaz legalább négy mangán iont, két klorid iont és egy kalcium iont. A legújabb röntgenkristallográfiás vizsgálat azt mutatja, hogy a négy mangán ion egy Y alakra emlékeztető "hurok" formájában rendeződik el (Loll és mtsai, 2005). A négy Mn atom közül kettő jelenléte nélkülözhetetlen a vízbontáshoz azért, hogy egy-egy elektront továbbít, a másik kettő pedig károsodás nélkül kicserélhető cink vagy réz ionokkal. A Ca^{2+} , amely a Mn és a TyrZ között helyezkedik el, stabilizáló szerepet tölt be, a Cl^-

valószínűleg segít a mangán redukciós folyamataiban. A röntgenkristallográfiás vizsgálat információt ad arról is, hogy milyen csoportokon keresztül kapcsolódik a Mn-klaszter a PSII fehérjéihez.

A vízmolekula egy nagyon gyenge elektrondonor. Ahhoz, hogy a víz oxidálódjon, szükség van egy jóval erősebb oxidálószerre, ami nem más, mint a PSII RC oxidált klorofillja, a $P680^+$. Az elektronok, amelyek redukálni tudják a $P680^+$ -at a vízből származnak. A vízbontó komplexnek öt redoxállapota van: S_0 , S_1 , S_2 , S_3 és S_4 (6. ábra), melyek ciklikusan követik egymást egy négylépéses folyamatsorban (Kok-ciklus) (Kok és mtsai, 1970). Az S_4 spontán visszaalakul S_0 állapotba és a ciklus újratekődik. Az $S_0 \rightarrow S_1$ és az $S_2 \rightarrow S_3$ átmenetekben egy-egy, az $S_4 \rightarrow S_0$ átmenetben pedig két H^+ képződik, és az $S_0 \rightarrow S_1 \rightarrow S_2 \rightarrow S_3 \rightarrow S_4$ átmenetek minden lépésénél átadódik egy-egy elektron a vízből a TyrZ-nek. A TyrZ (Y_Z) teremti meg a kapcsolatot a vízbontó komplex és a $P680$ között (6. ábra).



6. ábra. A vízbontó komplex működése

A Mn redoxállapotainak változása sematikusán ábrázolva. A TyrZ kapcsolja össze a vízbontó komplexet a $P680$ -nal. Az ábra Fodorpataki (2004) könyvéből származik.

2.1.3.2. A PSII elektronakceptor oldala

A PSII akceptor oldalát (5. ábra) pedig azok az alkotórészek képviselik, amelyek az elsődleges töltésszétválás során keletkezett elektronokat továbbadják a plasztokinonoknak, onnan továbbítva a citokróm *b6/f* komplexnek, amely kapcsolatot teremt a PSII és a PSI között.

A PSII antenna-pigmentjei által elnyelt fotonok energiája a PSII elsődleges elektrondonorjára, a P680 RC klorofillra jut, ahol megtörténik az elsődleges fotokémiai reakció, vagyis a gerjesztett P680 (P680*) néhány pikoszekundum alatt lead egy energizált elektront a D1-hez kapcsolt Pheo elsődleges akceptornak. Ezáltal a fényenergia felhasználódott arra, hogy a RC klorofilljából (P680*) egy nagyon erős oxidáló vegyület (P680⁺) jöjjön létre, és megtörténik az elsődleges töltésszétválás (P680⁺ Pheo⁻). A PSII elsődleges fotokémiai reakciója tehát: $P680^* + Pheo \rightarrow P680^+ + Pheo^-$. Ahhoz, hogy a töltésszétválás stabilizálódjék, a Pheo⁻-ről ne kerüljön vissza az elektron a P680⁺-ra, a Pheo gyorsan leadja (néhány száz pikoszekundum alatt) az éppen felvett elektront a Q_A-nak: $Pheo^- + Q_A \rightarrow Pheo + Q_A^-$. A Q_A⁻ pedig az elektront a D1 proteinhez kapcsolódó Q_B-nek juttatja tovább milliszekundumos idő alatt. Egy második fotokémiai átalakulás során a Q_B⁻ redukálódik Q_B²⁻-vé. A Q_B²⁻ protonálódik és plasztokinol formájában leválik a D1-ről és a lipid-kettősrétegbe diffundál. Innen tovább oxidálódik a PSI által, a citokróm *b6/f* komplex segítségével. Az elektronhiányos P680⁺ annyira erős oxidáló vegyület (redox potenciálja nagyobb, mint 1V), hogy képes a gyenge elektronleadó képességű, kis energiatartalmú vízmolekulából elektront elvonni. A vízbontó komplextől az elektront a D1 polipeptid 161-es tirozinja, a TyrZ veszi át és juttatja közvetlenül a P680⁺-ra ($TyrZ^- + P680^+ \rightarrow TyrZ + P680$) 200 nanoszekundum alatt. Eközben az oxidált, fény hatására felbomlott vízből visszamarad a lumenbe kerülő H⁺ és az O₂. Tehát az oxigén a vízből származik, a fényszakasz melléktermékeként.

Ezen reakciók mellett melléreakciók is végbemehetnek bizonyos körülmények között, mint a citokróm *b-559*, egy β-karotin és egy Chl-*a* molekula (amelyek a PSII magjának alkotórészei) oxidációja (Telfer és mtsai, 1991; Hanley és mtsai, 1999; Tracewell és mtsai, 2001). Ezek a melléreakciók milliszekundumos időskálán következnek be, ezért nem versenghetnek a fő elektrontranszport-folyamatokkal,

amelyek a víz oxidációjához vezetnek. Ezek a mellékreakciók védő mechanizmust biztosítanak a PSII-nek és akkor fordulnak elő, ha a víz oxidációja korlátolt és hosszú életű, erős redukáló potenciállal rendelkező P680 gyök kation keletkezhet (Barber és Rivas, 1993; Barber, 1994; Stewart és mtsai, 1998).

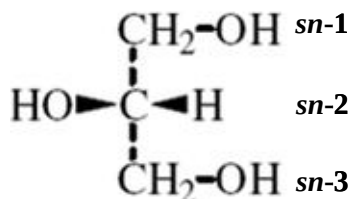
2.2. A PG biokémiája

A PG-molekula, amelyet Benson és Maruo (1958) azonosítottak 50 évvel ezelőtt, előfordul mind a prokariota, mind az eukariota szervezetekben. (Benson és Maruo, 1958; Benson és Maruo, 1989; Shibuya, 1992; Dowhan, 1997). A cianobaktériumokban és a magasabbrendű növényekben a PG-molekulák legnagyobb része a tilakoidmembránokban található, amely a fotoszintetikus fényreakciók és az elektrontranszport színhelye.

2.2.1. A PG és a zsírsavak kémiai szerkezete

A PG a foszfolipidek családjába tartozik, semleges pH-n a fejcsoport foszfát része egy negatív töltéssel rendelkezik, ezért az anionos foszfolipidekhez soroljuk. Alapvázát a glicerinnmolekula alkotja, amelynek középső szénatomja egy királis centrum, így optikailag aktív sztereoizomerek kialakulását teszi lehetővé (Kuksis és Itabashi, 2005).

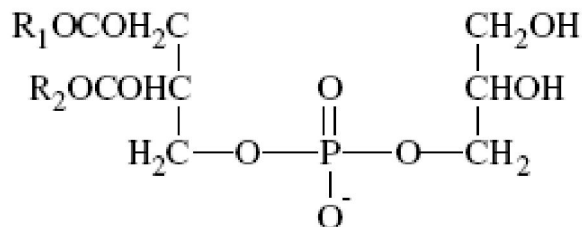
A sztereospecifikus számozás (*sn*) egy olyan módszer, amely a glicerinn alapú lipidek sztereokémiájának jelölésére szolgál. A glicerinnváz szénatomjainak számozása az IUPAC-IUB Biokémia Nomenklatura Bizottsága (1978) által jóváhagyott szabályok alapján történik. E szerint *sn*-1-el jelöljük azt a szénatomot, amely a Fisher levetítésben a középső szén fölött helyezkedik el, és amelyben a középső szén hidroxilcsoportja mindig baloldalt van (7. ábra).



7. ábra. A glicerinnmolekula térbeli szerkezete

Az *sn*-1, *sn*-2, *sn*-3 a szénatomok számozási sorrendjét jelöli.

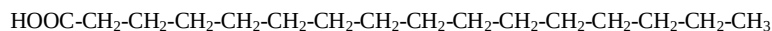
A glicerinvázat *sn*-1 és *sn*-2 helyzetben telített, illetve telítetlen zsírsavak észteresítik, *sn*-3 pozícióban található a fent említett foszfát fejcsoport, amelyen keresztül egy glicerinnmolekula kapcsolódik, szintén a fejcsoport részét képezve (8. ábra).



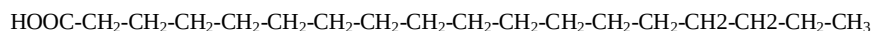
8. ábra. A PG-molekula szerkezete

R₁, R₂ az *sn*-1 illetve *sn*-2 helyzetekben észteresített zsírsavakat jelölik.

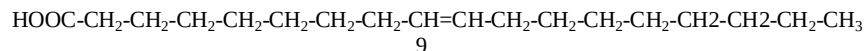
A zsírsavak olyan monokarbonsavak, amelyek egy karboxilcsoportot (-COOH) és egy hosszabb alifás (nem elágazó) szénhidrogénláncot tartalmaznak. A karboxilcsoport a zsírsavak szénláncának alfa (α)-végén található, a lánc másik végén lévő szénatomot omega (ω)-szénatomnak nevezzük. A telített zsírsavak nem tartalmaznak kettős kötések vagy más funkciós csoportot a karboxilcsoporton kívül. A telítetlen zsírsavak ezzel ellentétben tartalmaznak legalább egy kettős kötést (-CH=CH-) a láncban. A kettős kötések helyének meghatározására alkalmazzák a Δ jelölést is, amely a szénláncnak a karboxil végétől számított szénatomjára vonatkozik. A növényekben és cianobaktériumokban leggyakrabban előforduló telített zsírsavak a palmitinsav (16:0) és a sztearinsav (18:0), a telítetlen zsírsavak közül pedig a palmitoleinsav (16:1), olajsav, mely Δ9-es helyzetben tartalmaz egy kettős kötést [18:1(9)], linolsav [18:2(9,12)], α-linolénsav [18:3(9,12,15)] illetve γ-linolénsav [18:3(6,9,12)]. A 9. ábra összefoglalja a glicerinnel észteresített főbb zsírsavak szerkezetét, amelyek a magasabbrendű növényekben, algákban és cianobaktériumokban megtalálhatók.



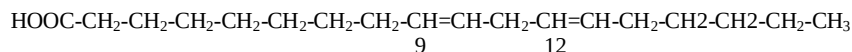
Palmitinsav [16:0]



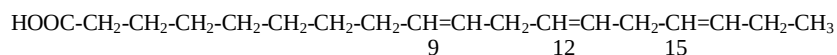
Sztearinsav [18:0]



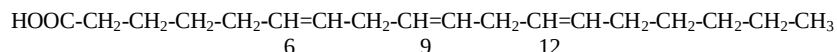
Olajsav [18:1(9)]



Linolsav [18:2 (9,12)]



α -Linolénsav [18:3 (9,12,15)]



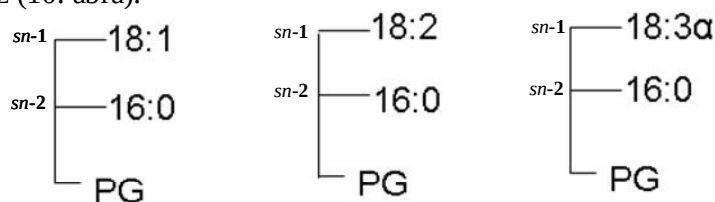
γ -Linolénsav [18:3 (6,9,12)]

9. ábra. A magasabbrendű növényekben és cianobaktériumokban leggyakrabban előforduló zsírsavak

A 16:0; 18:0; 18:1; 18:2 és 18:3 a zsírsavakat felépítő szénatomok és a kettős kötések számát jelölik. A (9); (9,12); (9,12,15) és (6,9,12) a kettős kötések helyét jelöli a zsírsavláncon belül a karboxi végtől számolva.

Murata és mtsai (1992b) tanulmányozták a kettős kötések helyét a cianobaktériumokban előforduló zsírsavakban, valamint a zsírsavak kapcsolódását a glicerinváz *sn*-1 illetve *sn*-2 szénatomjához. Több törzset is megvizsgáltak és csoportosították a cianobaktériumokat a telítetlen kötések száma és helye szerint. Ennek alapján a cianobaktériumokat négy nagy csoportba sorolhatjuk. Az első csoportba tartozó törzsek csak egy kettős kötést képesek bevinni a zsírsav $\Delta 9$ -es helyzetébe, mind az *sn*-1, mind az *sn*-2 pozícióban. A második csoportba tartozó törzsek kettős kötést tudnak bevinni az *sn*-1 pozícióban található C18-as zsírsavba a $\Delta 9$, $\Delta 12$ és $\Delta 15(\omega 3)$ helyekre, valamint az *sn*-2 pozícióban levő C16-os zsírsavba a $\Delta 9$, és $\Delta 12$ helyekre. A harmadik csoportba tartozó törzsek szintén képesek három kettős kötés bevitelére, de ezek az *sn*-1 helyzetében levő C18 zsírsav $\Delta 6$, $\Delta 9$, $\Delta 12$ helyére rakják a kettős kötést. A negyedik csoportba tartozó törzsek, mint az általam tanulmányozott *Synechocystis* törzs is, képesek négy kettős kötés bevitelére az *sn*-1 helyzetben levő C18 zsírsav $\Delta 6$, $\Delta 9$, $\Delta 12$ és $\Delta 15(\omega 3)$ helyére.

A PG-molekuláknak különböző típusait különböztetjük meg (Murata és mtsai, 1992b) annak függvényében, hogy milyen zsírsavak észtereződnek a glicerinváz szénatomjaihoz (10. ábra).



10. ábra. A *Synechocystis* főbb PG-molekula fajtái

A különböző PG-molekulák zsírsavösszetétele *sn*-1 és *sn*-2 pozíciókban. A „PG” jelöli a foszfatidil-glicerin fejcsoportját, a foszfoglicerint. Az ábra Murata és mtsai (1992b) közleménye alapján készült.

A PG zsírsavainak molszázalékos eloszlása fajonként eltér, és függ a nevelési körülményektől is (Wada és Murata, 1990). Az 1. táblázat a *Synechocystis* zsírsaveloszlását mutatja különböző nevelési körülmények között.

1. táblázat. A *Synechocystis* sejtekben, valamint a PG-molekulákban előforduló zsírsavak

Lipid	nevelési hőmérséklet (°C)	zsírsavak (mol%)										
		14:0	14:1	16:0	16:1	16:2	18:0	18:1	18:2	18:3α	18:3γ	18:4
Totál lipid	34	1	0	58	3	0	1	7	12	t	17	t
	30	1	0	54	3	0	1	3	9	3	24	2
	22	1	0	51	3	0	t	2	6	8	21	8
PG	30	3	0	51	2	0	1	5	17	20	1	ny

A táblázat Murata és mtsai (1992b) alapján készült, ny: nyomokban (<0,5%).

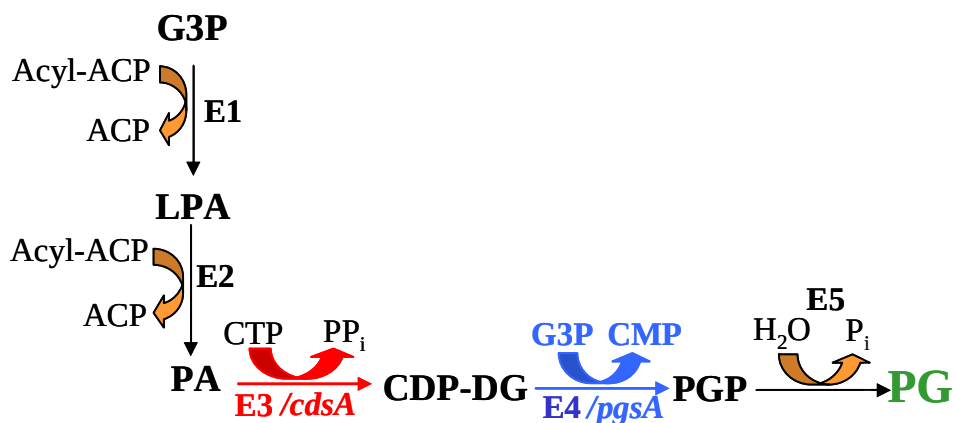
2.2.1.1. Zsírsavak bioszintézise

A zsírsavak bioszintézisének útja jól ismert a magasabbrendű növényekben. Első lépésben malonil-CoA képződik acetil-CoA karboxiláz segítségével. A zsírsavak elongációját négy enzim katalizálja: a β-ketoacil-ACP szintáz, β-ketoacil-ACP reduktáz, β-hidroxiacil-ACP dehidráz és enoil-ACP reduktáz. Korábban már azonosították a zsírsavak bioszintézisében résztvevő enzimek génjeit (Facciotti és Knauf, 1998). Cianobaktériumokból (*Anabena variabilis*, *Synechocystis*) is sikerült tisztítani az „acil carrier-proteineket” (acilcsoportot szállító fehérje, ACP), amelyek fontos szerepet játszanak a zsírsavak bioszintézisében mind a prokariota, mind az

eukariota szervezetekben. A cianobaktériumokban talált ACP-k erősen savas fehérjék, és nagymértékben hasonlítanak a magasabbrendű növényekben talált ACP-re (Ohlrorge, 1987; Froehlich és mtsai, 1990). A cianobaktériumok zsírsav bioszintézisében szerepet játszó enzimeket jellemezték az *Anabena variabilis* nyers extraktumaiból (Lem és Stumpf, 1984; Stapleton és Jaworski, 1984a; Stapleton és Jaworski, 1984b) és nagy hasonlóságot mutatnak a növényekkel. Cianobaktériumokban, a növényektől eltérően, a zsírsav bioszintézis végtermékei kizárólag telített zsírsavak, deszaturálásuk csak azután történik meg, miután a zsírsav észterkötéssel a glicerinvázhoz kapcsolódik (Al'Araji és Walton, 1980; Sato és mtsai, 1986).

2.2.1.2. A PG bioszintézise

A PG bioszintézisének lépései és az abban szerepet játszó enzimek jól ismertek mind a magasabbrendű növényekben (Murata és Siegenthaler, 1998), mind a prokariotákban (Ohta és mtsai, 1981). A cianobaktériumokban előforduló szintézis út (Murata és Nishida, 1987; Wada és Murata, 1998) az *E. coli*-ban találhatóhoz hasonlít. A PG bioszintézisének nem mindegyik enzime ismert cianobaktériumokban. Szintézisüket vázlatosan a 11. ábra foglalja össze.



11. ábra. A PG bioszintézisének útja cianobaktériumokban

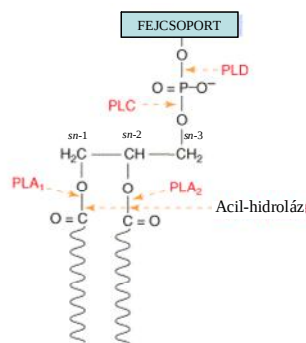
ACP: „acil carrier-protein”, CDP: citidil-difoszfát, CMP: citidil-monofoszfát, CTP: citidil-trifoszfát, DG: diacil-glicerid, G3P: glicerín-3-foszfát, LPA: lizofoszfátidsav, PA: foszfátidsav, PGP: foszfátidil-glicerín-foszfát, *cdsA*: foszfátidsav-citidiltranszferáz gén, *pgsA*: PGP-szintáz gén. Enzimek: E1: G3P-aciltranszferáz, E2: LPA-aciltranszferáz, E3: foszfátidsav-citidiltranszferáz, E4: PGP-szintáz, E5: PGP-foszfátáz. Az ábra Wada és Murata (1998) közleménye alapján készült.

Az ábrán látható, hogy első lépésben a glicerín-3-foszfátból (G3P) 1-acil-glicerín-foszfát, vagyis lizofoszfátidsav (LPA) keletkezik. Ezt a lépést a G3P-aciltranszferáz enzim katalizálja, amely egy acilcsoportot visz át az ACP-ről (18:0 ACP vagy 16:0 ACP) a G3P *sn*-1 helyzetébe, LPA-at eredményezve. Az így keletkezett LPA tovább acilálódik a LPA-aciltranszferáz segítségével, amelynek génjét *sll1848* nemrégiben sikerült azonosítani (Weier és mtsai, 2005). A LPA-aciltranszferáz egy acilcsoportot visz át a 16:0 ACP-ről a LPA *sn*-2 helyzetébe, foszfátidsavat (PA) eredményezve. Az így keletkezett PA átalakul citidil-difoszfát diacilglicerinné (CDP-DG), a foszfátidsav-citidiltranszferáz vagy más néven CDP-DG-szintáz enzim segítségével, amely átvisz egy citidil-monofoszfátot (CMP-t) a citidil-trifoszfátról (CTP-ről) a PA-ra. A CDP-DG szintáz kódoló gén a *cdsA* vagy *slr1369* (Sato és mtsai, 2000). A keletkezett CDP-DG reagál a G3P-tal foszfatidil-glicerín-foszfátot (PGP) és CMP-ot eredményezve. Ezt a reakciót a PGP-szintáz katalizálja, amelyet a *pgsA* vagy *sll1522* gén kódol (Hagio és mtsai, 2000). A biokémiai folyamat utolsó lépése a foszfát csoport felszabadítása a PGP-ről, amely a PG keletkezéséhez vezet. Ebben a lépésben a PGP-foszfátáz enzim játszik szerepet. Az aciltranszferázoknak tehát fontos szerepük van a glicerolipidek bioszintézisének első lépéseiben, amikor is a LPA és PA keletkezik. Annak következtében, hogy a különböző aciltranszferázoknak, vagyis a glicerinfoszfát- és lizofoszfátidsav-aciltranszferázoknak (GPAT és a LPAT) más a preferált szubsztrátumuk, az újonnan szintetizált PG *sn*-1 helyzetébe 18:0, 16:0 zsírsavak észtereződnek, míg az *sn*-2 helyzetbe 16:0 (Murata és mtsai, 1992b; Weier és mtsai, 2005; Okazaki és mtsai, 2006). Az aciltranszferáznak egy másik típusát is azonosították cianobaktériumokban, az ún. lizofoszfoglicerolipid-aciltranszferázt, amely katalizálja a zsírsav beépülést a lizofoszfátidil-glicerín molekula *sn*-2 helyzetébe, ezáltal igen fontos szerepe van a membrán lipidjeinek átépítésében (Weier és mtsai, 2005). Az így keletkezett PG-molekulafajták csak telítetlen zsírsavakat tartalmaznak mind az *sn*-1, mind az *sn*-2 helyzetben (Sato és Murata, 1982a; 1982b). A telített zsírsavak az acil-lipid deszaturázok révén deszaturálódnak.

Az élővilágban háromféle típusú deszaturáz ezimet ismerünk: acil-CoA deszaturáz, acil-ACP deszaturáz és acil-lipid deszaturáz (Murata és Wada, 1995). Az acil-CoA deszaturázok kettős kötést visznek be azokba a zsírsavakba, amelyek CoA-

hoz kötöttek. Ezen enzimeket megtaláljuk az állatokban, élesztőkben és gombákban. Az acil-ACP deszaturáz kettős kötést visz be ACP-hez kapcsolt zsírsavakba, ilyen enzim található a növények kloroplasztiszaiban is. Az acil-lipid deszaturázok pedig kettős kötést visznek be azon zsírsavakba, amelyek a glicerolipidekhez már észterkötéssel kapcsolódtak. Ezt a fajta deszaturáz enzimet megtaláljuk a növényekben és a cianobaktériumokban is. A cianobaktériumokban ezen enzimek a citoplazma- és tilakoidmembránban lokalizáltak (Mustardy és mtsai, 1996). Működésükhöz redukált ferredoxinra van szükség, amely elektrondonorként szolgál a zsírsavak deszaturációjához (Wada és mtsai, 1993). Mivel a ferredoxin a cianobaktériumok citoplazmájában található (Matsubara és Wada, 1988), a deszaturázok azon régiója, amely a ferredoxinnal kölcsönhatásba kerül feltételezhetően a citoplazma- és a tilakoidmembrán citoszol felőli részén található (Wada és Murata, 1998).

Magasabbrendű növényekben a lipidszintézis három sejtorganelumban történik: a kloroplasztiszbán, az endoplazmatikus retikulumban és a mitokondriumban (Moore, 1974; Mudd és Dezacks, 1981; Moore, 1982; Ohlrogge és Browse, 1995). A növényekben az aciltranszferáz és deszaturáz enzimeken kívül számos foszfolipázt és acil-hidrolázt azonosítottak. A leggyakoribbak a foszfolipáz D (PLD), C (PLC), A₂ (PLA₂), A₁ (PLA₁). A foszfolipázok és acil-hidrolázok a foszfolipideket hidrolizálják. Osztályozásuk a hasítási hely szerint történik, amelyet a 12. ábra mutat. Ezen enzimeknek fontos szerepük van a lipidanyagcserében, membránátrendezésben, illetve jelátvitelben (Wang, 2001; Wang, 2004).



12. ábra. A foszfolipidek hidrolízisét biztosító enzimek hasítási helyei növényekben

Enzimek: PLD: foszfolipáz D, PLC: foszfolipáz C, PLA₁: foszfolipáz A₁, PLA₂: foszfolipáz A₂, acil-hidroláz. Az acil-hidroláz lehasíthatja az acilcsoportot mind az sn-1 mind az sn-2 helyzetből. Az ábra Wang (2004) közleménye alapján készült.

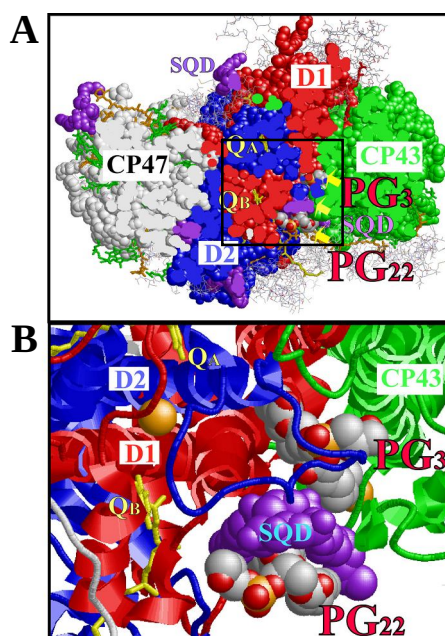
2.2.2. A PG előfordulása és mennyiségi eloszlása a cianobaktériumokban

A cianobaktériumokban négy fő lipidosztályt találunk (Wada és Murata, 1998). A *Synechocystis*, amely egy reprezentatív cianobaktérium törzs, tartalmaz monogalaktozil-diacilglicerint (MGDG-t), digalaktozil-diacilglicerint (DGDG-t), szulfokvinovozil-diacilglicerint (SQDG-t) és PG-t (Wada és Murata, 1990). Az egyes lipidosztályok mennyiségi arányai függenek a cianobaktérium törzstől is.

Az MGDG, amely a legnagyobb mennyiségben előforduló glikolipid, a membránszerkezet vázát képezi, mint mátrix lipid. A másik gyakran előforduló neutrális glikolipid a DGDG, amelynek mennyisége változó, fajtól és nevelési körülményektől függően. A fotoszintetikus tilakoidmembránokban előforduló töltéssel rendelkező lipidek az SQDG és a PG. A PG-tartalom a cianobaktériumokban változik 8 mol% (*Synechocystis*) és 20 mol% (*Synechococcus* PCC7942) között.

A 2,9 Å felbontású *Thermosynechococcus elongatus* PSII röntgenkristallográfiás vizsgálata lehetővé tette 25 belső elhelyezkedésű lipidmolekula helyének azonosítását is, amelyek a fehérjealegységek szomszédságában találhatók. A RC alegységeit, a D1 illetve D2 fehérjét lipidekből álló öv veszi körül, amely flexibilis környezetet biztosít a D1 fehérje kicserélődéséhez, valamint a fehérjemolekulák szállításához. Három lipidmolekula a dimerizációs találkozási pontnál helyezkedik el, ezáltal kapcsolatot teremt két PSII monomer között. Néhány lipid a Q_B kinonkötőhelyéhez közel helyezkedik el.

A PSI RC-ban mintegy három PG-molekulát azonosítottak a 2,5 Å felbontású kristályszerkezet alapján (Jordan és mtsai, 2001). A PSII RC-ban pedig két PG-molekulát találtak (13. ábra) a D1 fehérje és a CP43 között (Loll és mtsai, 2005; Guskov és mtsai, 2009).



13. ábra. A PG-molekulák elhelyezkedése a PSII RC-ban

A PG-molekulák jelölése a röntgenkristallográfiás szerkezetben Guskov és mtsai (2009) által azonosított lipidek számozása alapján történt: PG₃ és PG₂₂. A PSII ábrázolt fehérjéi és kofaktora: D1, D2, CP43, CP47, Q_A és Q_B. Az SQD a szulfokinovozil lipidmolekulát jelöli. A "B" panel az A panelben bekeretezett részek kinagyítása.

Az újonnan azonosított PG-molekula (Guskov és mtsai, 2009) a PQ/PQH₂ kicserélődési üreg közelében található, amelyet átér a D2 fehérje egyik hurokja. Ellentétben a röntgenkristallográfiás szerkezetvizsgálatokkal, a biokémiai vizsgálatok több PG jelenlétére utalnak a PSII RC-ban. Mostanában közzéttek különböző cianobaktériumok izolált PSII RC-ainak lipidösszetételét (Sakurai és mtsai, 2006). A biokémiai vizsgálatok azt mutatják, hogy a PSII dimerekben három-öttször több PG található, mint a tilakoidmembránokban. Hasonló jelenség fordul elő a magasabbrendű növények esetében is. A spenót és rizs PSII komplexeiben mintegy kétszer-többször több PG található, mint a neki megfelelő tilakoidmembránokban. Lehetséges, hogy néhány PG-molekula elhelyezkedése a kis felbontóképesség miatt a kristályszerkezetben még nem azonosított, vagy az is lehetséges, hogy a PSII RC-ok izolálása és kristályosítása folyamán leválnak (Sakurai és mtsai, 2006).

2.3. A PG szerepe a fotoszintetizáló szervezetekben

Kezdetben a PG szerepének tanulmányozása *in vitro* kísérletekkel történt. Droppa és mtsai (1995) foszfolipáz C enzimmel kezeltek borsóból izolált tilakoidmembránt. Az enzim eltávolította a membránban levő PG-molekulák fejcsoportját, minek hatására jelentősen csökkent a PSII aktivitása. Foszfolipáz A₂ (PLA₂)-kezelésnek kitett borsó tilakoidmembránban az enzim hidrolizálta a membránban levő PG *sn*-2 helyzetében észteressített zsírsavat (Jordan és mtsai, 1983). Az emésztés eredményeként a PSII aktivitása csökkent. Fontos megjegyezni, hogy az *in vitro* rendszerekben a foszfolipáz kezelés hatására felszabaduló szabad zsírsavak aspecifikus hatásokat válthatnak ki, melyek esetenként téves következtetések levonásához vezethetnek.

Szintén *in vitro* PLA₂ kezelésnek tették ki Kruse és mtsai (2000) spenótból izolált PSII dimereket. Két óra PLA₂-kezelés után a dimerek monomerekre estek szét, valamint izoláltak kisebb komplexeket is, melyek tartalmazták a D1, D2 és CP47 fehérjét, de CP43 fehérjét nem. Eredményeiket rekonstrukciós kísérletekkel is megerősítették. Megállapították, hogy a PG fontos szerepet játszik a PSII komplex szerkezeti integritásának fenntartásában, és valószínűsítették, hogy a PG a CP47-D1-D2 szubkomplex és a CP43 alegység kapcsolódási felszínéhez kötődik. *In vitro* kísérletekkel mutatták ki a PG szerepét a PSII komplexhez kapcsolódó fénybegyűjtő-komplex (LHCII) trimerizációjában (Nussberger és mtsai, 1993; Kuhlbrandt és mtsai, 1994).

Később lehetőség volt a PG szerepének *in vivo* tanulmányozására *Arabidopsis* mutánsokban. *Arabidopsis thaliana*-ban azonosították a PGP szintézisében szerepet játszó géneket, a *PGP1*-et és *PGP2*-t, az előbbi a kloroplasztisz PG szintézisében szerepet játszó PGP-enzimet kódolja, az utóbbi gén pedig az endoplazmatikus retikulumban (ER) zajló PG szintézisének enzimét.

Xu és mtsai (2002) a *PGP1* gén pontmutációjával létrehoztak egy PG-mutánt, amelyben kb 30%-al csökkent a PG szintje a vad típushoz képest. A teljes PG-hiány a növények pusztulását okozná, melynek oka az, hogy a növények nem képesek a kívülről adagolt PG felvételére, mint a cianobaktériumok. Alacsony PG-tartalom mellett csökkent a klorofill pigmentek bioszintézise, a fénybegyűjtő-komplexek, a PSI

és PSII RC-k száma és a fotoszintézis hatékonysága. A növények lassú növekedésűek és halványzöld színűek voltak (Xu és mtsai, 2002).

Hagio és mtsai (2002) létrehoztak egy PGP1 teljes funkcióvesztéses mutáns T-DNS-inszercióval, ahol a mutáns PG tartalma csak 12%-a volt a vad típusénak, hiszen így a kloroplasztiszból nem képződött PG, csak az ER-ban. A PG hiánya megváltoztatta a növény fejlődését és a sejtek morfológiáját. A levelek sárgászöldek, szinte átlátszóak voltak, a növény nem volt képes autotróf növekedésre a lecsökkent fotoszintetikus aktivitás miatt, ezért csak szacharózzal kiegészített táptalajon tudott fennmaradni. A PG hiánya nagy hatással volt a kloroplasztisz differenciálódására és a tilakoidmembránok biogenezisére is. Ez a PG-hiányos mutáns egyértelműen bizonyította, hogy a PG nélkülözhetetlen a kloroplasztisz fejlődéséhez, főként a tilakoid kialakulásához.

Cianobaktériumok segítségével szintén *in vivo* tanulmányozták a PG szerepét. *Synechocystis* sejtekben inaktiválták a *cdsA* és *pgsA* géneket, amelyek a CDP-DG-szintáz és a PGP-szintáz enzimek szintéziséért felelősek. Ezek az inszerciós mutánsok, vagyis a *Synechocystis* sp. PCC6803/ $\Delta cdsA$ (Sato és mtsai, 2000), valamint a *Synechocystis* sp. PCC6803/ $\Delta pgsA$ (Hagio és mtsai, 2000) nem képesek PG-t előállítani, de a növekedésükhöz nélkülözhetetlen PG-t képesek a tápoldatból felvenni. A PG-t más foszfolipid, mint pl. foszfatidilkolin vagy foszfatidiletanolamin nem képes hatékonyan helyettesíteni (Hagio és mtsai, 2000).

Sakurai és mtsai (2003) eredményei rámutattak arra, hogy a $\Delta pgsA$ mutánsban a PG-hiány a PSII dimerek destabilizációjához vezethet. A PG szerkezeti jelentőségére a PSI komplexek kialakításában mostanában derült fény, *in vivo* kísérletek segítségével (Domonkos és mtsai, 2004). A $\Delta pgsA$ mutánsban, amely nem képes PG-t szintetizálni, PG hiányában zavart szenvedett a PSI trimerek képződése és ez a monomerek felhalmozódását indukálta. 21 napos PG-megvonás után már nincs kimutatható mennyiségű PG a sejtekben, ebben az állapotban a sejtekben nem volt kimutatható PSI trimer komplex. Monomerizáció során a PSI trimerek elvesztették a PsaL fehérjealegységüket, amelyeknek fontos szerepük van a PSI trimer képződésében (Fromme, 1996). A PG-molekula kapcsolja a PsaL fehérjealegységet a PSI komplexhez, és ezáltal befolyásolja a trimerek képződését.

A PG-nek a PSI működésében játszott szerepét is tanulmányozták *in vivo* a *ΔpgsA* mutánsban (Hagio és mtsai, 2000; Domonkos és mtsai, 2004). Rövid ideig (hat-tíz nap) tartó PG-megvonás esetén nem észleltek jelentős változást a PSI működésében, míg a PSII-ben ez idő alatt súlyos elváltozások figyelhetők meg. Hosszabb ideig tartó PG-éhezés esetén csökkent a PSI aktivitása, ahogyan a PG kiürül a sejtekből. Valószínűleg a PG-molekulák hatóhelye a fillokinonok közelében van, hiszen röntgenkristallográfiás szerkezetmeghatározással kimutatták egy PG-molekula jelenlétét az elektrontranszportlánc egyik fillokinon komponense közelében, egy másik PG pedig a monomerek kapcsolódási felszínén köt egy Chl-*a* molekulát. Ezek a PG-molekulák zárt, jól védett helyen kötődnek a PSI RC alegységeihez, ahonnan nehezebb eltávolítani, mint a PSII komplex felszínéről. Eddig még nem sikerült meghatározni a PG hatóhelyét az energiaátadásban a PSI RC-on belül (Jordan és mtsai, 2001).

A *ΔpgsA*, illetve *ΔcdsA* mutánsokban PG-kivonás hatására csökkent a klorofilltartalom és az oxigénfejlődés (Hagio és mtsai, 2000; Sato és mtsai, 2000). A PSII inaktivációja a *ΔpgsA* mutánsban a Q_B szuppressziójának tulajdonítható (Gombos és mtsai, 2002). Ez a hatás hasonló egy tipikus herbicid, a diklórfenil-dimetil-urea (DCMU) hatásához, amely képes kötődni a Q_B plasztokinon kötőhelyre, megakadályozva ezáltal a Q_A reoxidációját. Annak ellenére, hogy ezek az eredmények alátámasztják, hogy PG hiányában inhibíció lép fel a PSII akceptor oldalán, az elektrontranszport-folyamatokban, Sakurai és mtsai (2006) ugyanezt a *ΔpgsA* mutánst használva a PG-nek a PSII donor oldalán játszott szerepét tartották valószínűnek. Éppen ezért szükség van más mutánsok bevonására is, hogy tisztázni tudjuk, milyen funkcionális szerepe van a PG-nek a PSII RC-ban.

2.4. A PG-molekula kémiai szerkezetének átépülése és annak szerepe a stresszreakciók kivédésében

A lipidmolekulák átépülése az a biokémiai folyamat, melynek során a lipidek zsírsavtartalma kicserélődik. A PG-molekulák átépülése fontos szerepet játszik a környezeti stresszfaktorokkal szembeni védekezésben (Wada és Murata, 1990; Harwood és mtsai, 1994). A lipidmolekulák átépülése jól ismert állati sejtekben, de az átépülés mechanizmusa növényekben és cianobaktériumokban részleteiben nem ismert.

Korábban a PG átépülését az aciltranszferázok és deszaturázok genetikai manipulálásával tanulmányozták cianobaktériumokban (Wada és Murata, 1990; Wada és mtsai, 1992; Sakamoto és mtsai, 1994) és növényekben (Murata és mtsai, 1992a) annak érdekében, hogy feltárják a különböző PG-típusok védő szerepét alacsony és magas hőmérsékleti stresszel szemben.

Dohány növényben (*Nicotiana tabacum*) túltermeltették a tök (*Cucurbita moschata*) és *Arabidopsis* G3P-aciltranszferázokat, amellyel a dohány PG-molekuláinak zsírsav telítettségi szintjét megváltoztatták (Wolter és mtsai, 1992; Murata és mtsai, 1992a). Az *Arabidopsis* gén heterológ kifejezése megnövelte a dohány alacsony hőmérséklettel szembeni ellenállóképességét, hiszen megnövelte a PG-molekulák sn-1 helyzetében a telítetlen zsírsavak arányát. A tök G3P-aciltranszferáz, amely erős preferenciát mutat a palmitoil-ACP iránt, megnövelte a transzgenikus dohány hidegérzékenységet (Murata és mtsai, 1992a). A membrán glicerolipidjeinek telítetlenségét a zsírsav-deszaturázok manipulációjával is elérték cianobaktériumokban és növényekben (Wada és Murata, 1990; Wada és mtsai, 1992; Tasaka és mtsai, 1996). A kétszeresen telítetlen glicerolipidek jelenléte a membránban megnövelte a hidegérzékenységgel szembeni ellenállást, és segített a fotoszintetikus folyamatok helyreállításában alacsony hőmérsékleti fotoinhibíciót követően (Lynch és Thompson, 1984c; Gombos és mtsai, 1997). Hőmérsékleti stressz által indukált PG-átépülést figyeltek meg a sótűrő *Dunaliella salina* zöld alga esetében is (Lynch és Thompson, 1984a; 1984b; 1984c), azonban az átépülés mechanizmusa, amelynek eredményeképpen különböző zsírsavösszetételű glicerolipidek keletkeztek, nem tisztázott (Roughan és Slack, 1982; Nishida és Murata, 1996).

3. Célkitűzések

A PG-nek a fotoszintetikus szervezetek szerkezetében és működésében játszott szerepe *in vivo* tanulmányozható cianobakteriális PG-mutánsok segítségével. Korábban a $\Delta pgsA$ (Hagio és mtsai, 2000) és $\Delta cdsA$ (Sato és mtsai, 2000) mutáns törzsek felhasználásával rámutattak a PG nélkülözhetetlen szerepére. Felderítették a PSI trimerek (Domonkos és mtsai, 2004) és PSII dimerek (Sakurai és mtsai, 2003) kialakításában, valamint az elektrontranszport működésében játszott szerepét (Gombos és mtsai, 2002). A PG-nek számos hatása nem ismert, ezért tűztem ki célul a PG sejtfunkciókban játszott szerepének részletesebb tanulmányozását. A PG-hiányos mutánsok vizsgálata során megfigyeltük a PG-molekulák kémiai szerkezetének átépülését, amelynek révén a sejtek alkalmazkodni tudnak a változó környezeti feltételekhez. Az átépülés lényege a PG-ben lévő zsírsavak megváltozása.

Munkám során a következő célokat tűztem ki:

- I. Olyan, a PG-szintézisben gátolt *Synechocystis* sp. PCC6803 törzs létrehozása, amely alkalmasabb a PSII vizsgálatára, mint a korábban tanulmányozott mutánsok.
- II. A PG szerepének tanulmányozása a PSII RC szerkezeti felépítésében, valamint a PG-kiürülés hatásának vizsgálata a PSII funkciókra.
- III. A cianobaktériumhoz kívülről adott, szintetikus PG-molekulák átépülésének vizsgálata.

4. Anyagok és módszerek

4.1. A PAL/ $\Delta cdsA$ és $\Delta pgsA$ nevelési körülményei

A PAL/ $\Delta cdsA$ és $\Delta pgsA$ (Hagio és mtsai, 2000) sejteket BG11 médiumban (Allen, 1968) neveltük, amely tartalmazott még 5 mM HEPES-NaOH (pH 7,5) puffert, 20 $\mu\text{g/ml}$ kanamicint és 20 μM PG(18:1/18:1)-t (Sigma, St. Louis). A sejteket 30 °C-on, folyamatos 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ intenzitású fehér fényen neveltük. A kultúrákat egy körkörös rázóval állandóan rázattuk (100 rpm), így biztosítva a kultúrák levegőztetését. A PG kiürülésének vizsgálatához a sejt kultúrát lecentrifugáltuk, a PG-tartalmú médiumot kimostuk, majd a sejteket PG-mentes BG11 médiumban neveltük tovább.

4.2. A PAL/ $\Delta cdsA$ mutáns létrehozása

A *Synechocystis* 1,4 kb genomi szakaszt amplifikáltuk PGF (5'-AGGTCCGCAACGTGGAGGTG-3') és PGR (5'-CTGGAACGACTTGGGAAGTG-3') primerek segítségével. A primerek megválasztása a *Synechocystis* ismert teljes genomi szekvenciája (<http://www.kazusa.or.jp/>) alapján történt. A *cdsA* gén *MscI* és *NsiI* közti 543 bp hosszú fragmensét kanamicin rezisztencia kazettával (*aphI* gént tartalmazó kazetta) helyettesítettük.

A transzformánsok szelektálása BG11-tartalmú agar lemezekén történt, amelyek 20 μM PG-t és 50 $\mu\text{g/ml}$ kanamicint is tartalmaztak. A mutánsok teljes szegregálását PCR reakcióval is ellenőriztük, valamint igazoltuk a PG szintézisére képtelen mutáns előállítását azzal, hogy PG hozzáadása nélkül a sejtek nem szaporodtak, illetve a kultúra nem volt fenntartható.

4.3. A sejtek szaporodásának és pigmenttartalmának mérése

A folyadékkultúrában a sejtszám növekedését az optikai denzitás 750 nm-nél történő (OD_{750}) mérésével követtük. A PAL/ $\Delta cdsA$ sejtek pigmenttartalmának változását abszorpciós spektrumok felvételével követtük. A spektrumokat Shimadzu UV-1601 spektrofotométeren vettük fel 400-800 nm hullámhossz tartományban. Hogy a sejtszuszpenzió nagy fényszórásából adódó hibákat csökkentsük, a sejteket 80% szacharóz oldatban szuszpendáltuk fel. A minták közel azonos denzitásúak voltak 750

nm-en. A klorofillkoncentráció méréséhez 90%-os metanollal extraháltuk a pigmenteket, majd megmértük az extraktumok abszorpcióját 665 nm-en. A számításhoz használt extinkciós koefficiens: 78,95 l/g/cm (Lichtenthaler, 1987).

4.4. Morfológiai vizsgálatok

Az összecentrifugált cianobaktérium sejteket 0,1 M foszfát pufferben (PB, pH:7,4) oldott 1%-os formaldehid és 1%-os glutáraldehid oldatban 4 °C-on négy órán keresztül fixáltuk. Rövid foszfátpufferes mosás után az utórögztítés 0,1 M PB-ben oldott 1%-os ozmium-tetroxiddal történt. A mintákat növekvő alkohol koncentrációval víztelenítettük, majd műgyantába ágyasztuk. A polimerizáció után a blokkokból Reichert Ultracut E típusú ultramikrotómmal 85-90 nm-es ultravékony metszeteket készítettünk, amelyeket uranil-acetáttal és ólom-citráttal kontrasztosítottunk, majd Zeiss EM 902 elektronmikroszkóppal tanulmányoztunk. A sejtek méretének összehasonlításához lemértük az azonos nagyítású fotókon látható nem osztódó sejtek átmérőjét μm -ben.

4.5. A tilakoidmembránok komponenseinek kétdimenziós gélelektroforézise

4.5.1. Tilakoidmembrán izolálása

A sejt kultúrákat 75 μg klorofilltartalomra állítottuk be és [^{35}S] metioninnal ($>1000 \text{ Ci mmol}^{-1}$, Izótop Intézet, Magyarország) jelöltük 60 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fényerősségen és 29 °C-on, Komenda és mtsai (2004) szerint.

A tilakoidmembránokat Komenda és Barber (1995) módszere szerint izoláltuk. A tilakoidok kinyeréséhez az ép sejteket 150-200 μm átmérőjű üvegyöngy segítségével 4 °C-on feltártuk, és differenciál centrifugálással a membránfrakciót összegyűjtöttük. A sejtek feltárása és a tilakoidok felszuszpendálása a következő összetételű pufferben történt: 25 mM MES-NaOH, pH 6,5, 10 mM CaCl_2 , 10 mM MgCl_2 , és 25% (v/v) glicerol.

4.5.2. A fehérjék analízise: kétdimenziós gélelektroforézis

Az izolált tilakoidmembránokat dodecil- β -D-maltoziddal (dodecil-maltozid: klorofill arány 20:1, w/w) szolubilizáltuk és 5-14%-os blue-natív gélen megfuttattuk (Schagger és von Jagow, 1991). A blue-natív gélből a protein-komplexeknek megfelelő csíkot kivágtuk, inkubáltuk 30 percig 25 mM Tris-HCl (pH 7,5) pufferben, amely tartalmazott 1% SDS-t, utána a denaturáló gélre felvittük. A komplexek fehérjeösszetételét egy második dimenziós gélelektroforézis révén állapítottuk meg egy denaturáló 12-20%-os lineáris gradiens SDS-poliakrilamid gél segítségével, amely 7 M ureát is tartalmazott (Komenda és mtsai, 2004). A gélben a fehérjéket Coomassie Brilliant Blue-val festettük meg. A radioaktívan jelölt fehérjékből jövő jeleket röntgenfilmen detektáltuk. Az exponálási idő 2-3 nap volt, szobahőmérsékleten.

4.6. Fluoreszcenciaemissziós spektrumok felvétele 77 K hőmérsékleten

Alacsony hőmérsékletű steady-state fluoreszcencia spektrumokat vettünk fel 600-780 nm hullámhossz tartományban, 437 nm-es gerjesztés után. A spektrofluoriméter (Fluorolog-3/Jobin Yvon-Spex Instrument S.A., Inc.) egy adapterrel volt ellátva, amely lehetővé tette a folyékony nitrogénben történő mérést. Az emissziós spektrumokat a fotomultiplier érzékenységihez korrigáltuk, és a 700 nm hullámhossznak megfelelő fluoreszcenciaintenzitásra normáltuk.

4.7. A fotoszintetikus oxigénfejlesztő aktivitás mérése

A sejtek fotoszintetikus oxigénfejlesztését Clark-típusú oxigénelektród segítségével mértük, Gombos és mtsai (2002) alapján. A PSII-ből származó oxigénfejlődést mértük a H_2O -tól a külsőleg adott mesterséges elektronakceptorig (500 μM p-benzokinon). Az oxigénfejlődés méréséhez a sejteket BG11 médiumban mostuk, majd friss BG11 tápoldatban felfuszpendáltuk. A sejteket vörös, PSII-t gerjesztő fénnel világítottuk meg, melynek erőssége 500 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ volt.

4.8. Termolumineszcencia mérések

A termolumineszcencia méréseket Vass és mtsai (1981) alapján végeztük, néhány módosítással. A sejteket lecentrifugáltuk és friss BG11 médiumban felfuszpendáltuk, majd a sejtsuszpenziót 10 µg/ml klorofilltartalomra hígítottuk ki. A termoluminszcencia görbék felvételét -10 °C-tól +80 °C-ig terjedő hőmérséklet-tartományban végeztük. A minták által kibocsátott fényt egy vörös érzékenységű fotomultiplier (Hamamatsu R/2228) segítségével mértük, az így kapott felerősített jelet számítógépes program segítségével értékeltük ki. A mintatartó hőmérsékletét egy platina alapú hőmérővel követtük, amely a minták alatt helyezkedett el. A hűtést folyékony nitrogén biztosította. A mintákat a fagyasztást megelőzően két 5 µs-os flash-el világítottuk meg 5 °C-on.

4.9. Chl-*a* fluoreszcencia mérése

A sejt kultúrákból vett minták klorofilltartalmát 20 µg/ml koncentrációra állítottuk be. A sejtek a mérés előtt két óráig sötétadaptálva voltak. A fluoreszcencia méréseket egy Handy-PEA készülék (Hansatech Instruments Ltd, UK) segítségével végeztük. A 20 µg klorofilltartalmú mintát Whatman szűrőpapír (GF/C) korongra szűrtük. A sejteket tartalmazó korongot folyamatos 650 nm-es vörös fénnel világítottuk meg, amely 3500 µmol foton m⁻²s⁻¹ intenzitású volt. A fényforrást három LED biztosította, amelyek fénye egy 5 mm átmérőjű körbe fókuszálódott. Az első megbízható mérési pont, ahol a fluoreszcencia tranziens (jel) jelentkezett, 20 µs volt. Ezt az intenzitásértéket vettük F₀-nak a sötétadaptált sejteknél. A mérések időtartama 3 s volt.

4.10. A lipidtartalom gázkromatográfiás analízise

A gázkromatográfiás vizsgálatokhoz először izoláltuk a cianobaktérium sejtekből (kb. OD₇₅₀=50) a különböző lipidosztályokat, majd az elválasztott PG-molekulákat észterestítettük.

A lipideket Bligh és Dyer (1959) által leírt módon nyertük ki intakt sejtekből kloroform és metanol 1:2 arányú elegyével. A lipidosztályok elválasztását és a zsírsavak analízisét a Sato és Murata (1988) által közölt eljárás alapján végeztük. A

lipidek elválasztása szilikagél vékonyréteg lapokon (TLC) (Merck 5721) történt kloroform, metanol és 28% ammónium-hidroxid 65:35:5 térfogatarányú futtatóelegyben, szobahőmérsékleten. Az elválasztott lipidfrakciókat ANSA (8-anilino-1-naftalén-szulfonsav) kezelés után UV-fény alatt megjelöltük, és 50 µg 15:0 zsírsav, mint belső kontroll felvitele után a lemezről lekapartuk. A lemezről lekapart lipideket 5%-os HCl-t tartalmazó metanolban 85 °C-on 2 óra hosszat észteresítettük. Az így nyert zsírsav-metilésztereket hexánba átrázva Supelco SP-2330 kapillárisoszlopon Hewlett Packard HP6890 gázkromatográffal választottuk el.

4.11. Tömegspektrometriai analízis

Tömegspektrometriai analízishez összlipidet izoláltunk kb. OD₇₅₀=50 mennyiségű sejtből Bligh és Dyer (1959) alapján. A lipidkomponensek szemi-kvantitatív analíziséhez lipidizolás előtt a mintákhoz belső standardként 20 µg PG(14:0/14:0)-t (Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA) adtunk. Tömegspektrometriai mérés előtt az izolált lipidmintákat százszorosára hígítottuk acetonitril/víz elegyével (1:1). A mintákat (50 µl) direkt infúzióval juttattuk a tömegspektrométer készülékébe, 5 µl/ml áramlási sebességgel. A készülék egy FTICR (hibrid lineáris ioncsapdás Fourier-transzformációs ionciklotron-rezonancia) tömegspektrométer, 7T szupervezető mágnessel (LTQ-FT; ThermoFisher, San Jose, CA), amely egy elektropray típusú ionforrással volt ellátva, negatívion-módban működve. Az elektronsugár (spray) feszültsége 5 kV-ra volt állítva, a porlasztógáz aránya 10 egység, a kapilláris hőmérséklete 270 °C volt, az ionoptikai elemek feszültségét egy beépített automata tuningoló eljárás alapján állítottuk be, amelyhez PG(18:1/18:1) standard oldatát használtuk.

Az egyszeres negatív töltésű molekulaionokat $[M-H]^-$ az FTICR teljes MS spektruma alapján azonosítottuk, amelyek pontos tömeget szolgáltatnak (szerkezeti információ), az ionintenzitások pedig mennyiségi elemzést tettek lehetővé. A spektrumokat 150-2000 Th tartományban vettük fel, a készüléket pedig úgy állítottuk be, hogy 400 Th tömeg/töltésnél (m/z) a tömegfelbontás ($m/\Delta m$) érje el az 50 000-et. Körülbelül 80 spektrumot átlagoltunk mintánként. További részletes szerkezeti jellemzés céljából tandem MS (MS/MS) analízist végeztünk. A molekulaionokat $[M-H]^-$ elkülönítettük, ütközésindukált disszociációnak (CID) vetettük alá, a keletkezett

fragmensek a lineáris ioncsapda m/z alapján azonosítottuk (MS/MS spektrum). Az elkülönítési szélesség 1,0 Th, az ütközési energia 15%-ra volt beállítva. A koncentrációk becsléséhez a következő egyszerű kalibrációs egyenletet használtuk:

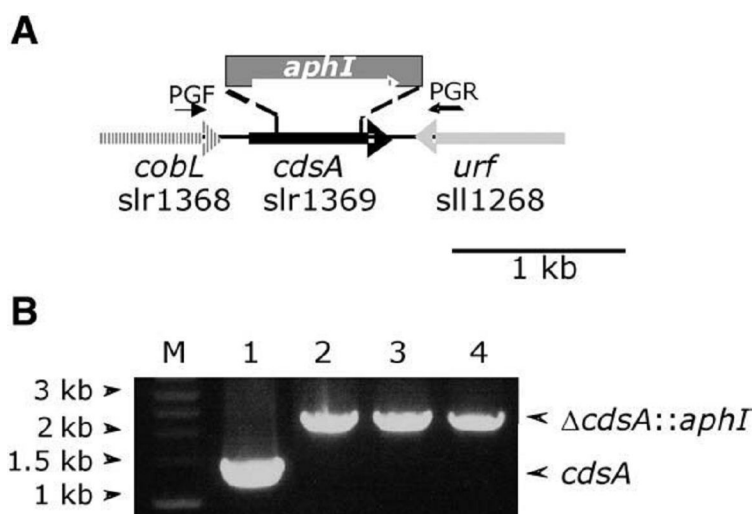
$$c_A / c_{IS} = k_A \cdot (I_A / I_{IS})$$

ahol c_A az analitikum (analizálandó molekula) koncentrációja, c_{IS} a belső standard [PG(14:0/14:0)] koncentrációja, I_A és I_{IS} az analitikum és a belső standard ionintenzitásai. A kalibrációt változó koncentrációjú oldatokkal végeztük, amelyek tartalmaztak 1, 2, 5, 10, 20 és 50 µg/ml PG(18:1/18:1)-t vagy PG(16:0/18:1)-t (Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA) és 20 µg/ml belső standardot. A c_A / c_{IS} arányokat ábrázoltuk az I_A / I_{IS} arányok függvényében. A $k_{PG(18:1/18:1)}$ és $k_{PG(16:0/18:1)}$ konstansokat úgy számítottuk ki, hogy egyenest illesztettünk a pontokra és a zéró lineáris regressziójú görbék metszését vettük figyelembe. Az így kapott konstansokat felhasználtuk a biológiai mintákban található PG(18:1/18:1) (m/z 773) és PG(18:1/16:0) (m/z 747) koncentrációk meghatározására. A többi PG-típus, a PG(18:2/18:1) (m/z 771) és PG(18:2/16:0) (m/z 745) mennyiségének becslésére a $k_{PG(18:1/18:1)}$ és $k_{PG(16:0/18:1)}$ konstansok átlagát használtuk.

5. Eredmények

5.1. A PAL/ $\Delta cdsA$ mutáns törzs előállítása

A *cdsA* gént inaktiváltuk a *Synechocystis* cianobaktérium PAL nevezetű mutánsában. Cianobaktériumokban a fikobiliproteinek fluoreszcenciaemissziója átfedhet más pigmentekből jövő jelekkel, ezért a fluoreszcencia mérések eredményei nehezebben kiértékelhetők. A PG-nek a sejtfunkciókban játszott szerepének tanulmányozásához előnyösebb a PAL mutáns, hiszen nem rendelkezik fikobiliszómával. Ahhoz, hogy tudja kompenzálni a PSII fénybegyűjtő antennájának hiányát, megnöveli a PSII/PSI arányát (Ajlan és Vernotte, 1998). A magas PSII/PSI arány egy újabb előnyös tulajdonság a PSII vizsgálatokhoz. Ahhoz, hogy létrehozzuk a PAL/ $\Delta cdsA$ mutánt a *cdsA* gént kódoló régiót egy kanamicin-rezisztencia (Km^r) kazettára cseréltük (14. ábra).



14. ábra. A *cdsA* gén inaktiválása

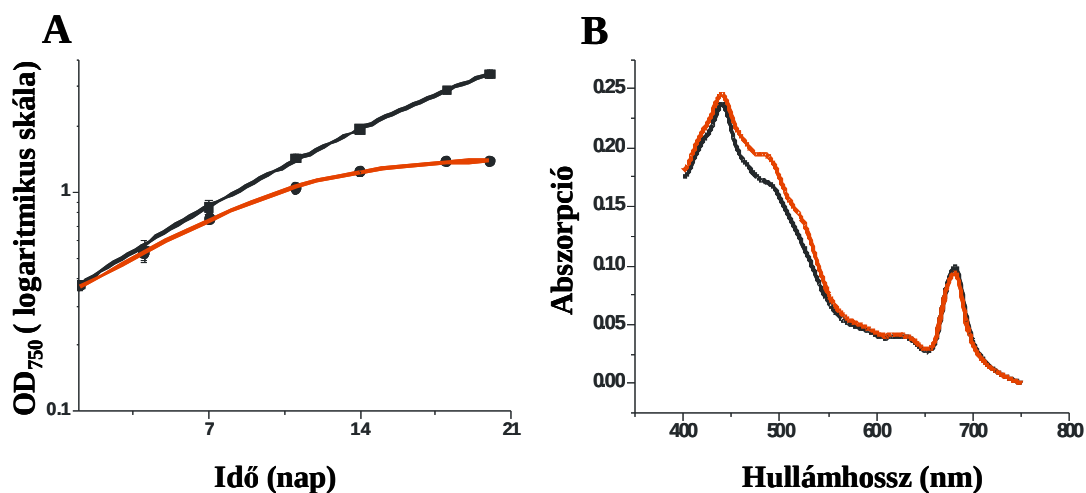
(A) A *Synechocystis* genom *cdsA* körüli régiója. Az inaktivált törzsben az *aphI* gént tartalmazó antibiotikumrezisztencia kazetta egy 543 bp hosszúságú génfragmenst helyettesít. A fekete kis nyílak a primerek helyét jelölik, amelyeket a PCR reakció során használtunk, hogy megsokszorozzuk a génrégiót, valamint hogy a mutánsizolálásnál leellenőrizzük a génkicserélődést. (B) PCR analízise a vad-típusú sejteknek (1-es sáv) és PAL/ $\Delta cdsA$ transzformánsoknak (2-4 sávok), három független minta. A vad típusú és a mutáns PCR termékeket jobboldalon ábrázoltuk, baloldalon találhatóak a DNS markerek méretei (M sáv).

A PAL mutáns törzs, A PAL/ $\Delta cdsA$ mutáns fiziológiai tulajdonságai hasonlóak voltak a $\Delta pgsA$ -hoz, habár a PAL/ $\Delta cdsA$ esetében a PG-hiányos állapot eléréséhez hosszabb ideig tartó nevelésre volt szükség.

5.2. A PG kiürülésének hatása a sejtek szaporodására és pigmenttartalmára

A mutáns törzs sejtszámának növekedését a folyadékkultúra 750 nm-es hullámhosszon mért abszorpciójának követésével vizsgáltam. A 15/A ábra mutatja a PG jelenlétében és PG hiányában nevelt sejt kultúrák denzitásának növekedését. Megfigyelhető, hogy a PG-vel kiegészített tápoldatban az osztódás exponenciális volt, a megkettőződési idő hat-hét nap, az adott nevelési körülmények között, vagyis viszonylag alacsony fényintenzitáson. PG-mentes médiumban nevelt sejtek esetén az osztódás üteme négy napos PG-éhezés után fokozatosan lecsökkent, 14 nap elteltével jelentősen lelassult. Érdekes megemlíteni, hogy a sejtek még 18 napos PG-éhezés után is életben voltak, hiszen mérhető oxigénfejlődést mutattak. Ha 18 napos éhezés után a PG-t visszaadtam a nevelési médiumhoz, a sejtek ismét osztódni kezdtek.

A PG-hiányos PAL/ $\Delta cdsA$ sejtek klorofilltartalma kissé lecsökkent a PG-éhezés folyamán (15/B. ábra). Ez a csökkenés kisebb a $\Delta pgsA$ esetében megfigyeltnél. Ez utóbbi mintegy 3 hétig tartó PG-megvonás hatására eredeti klorofilltartalmának kb 50%-át elveszítette, főként mivel a PSI tartalma jelentősen lecsökkent (Domonkos és mtsai, 2004). A PG-éheztetett PAL/ $\Delta cdsA$ sejtek abszorpció spektruma a karotinoidtartalom jelentős növekedését mutatta a PG jelenlétében nevelt sejtekhez képest (15/B ábra).



15. ábra. Osztódási görbék és abszorpciós spektrumok

(A) A PAL/ $\Delta cdsA$ mutáns sejtek osztódási görbéje PG-vel kiegészített (■) és PG-mentes (●) tápoldatban. (B) A PAL/ $\Delta cdsA$ mutáns sejtek abszorpciós spektruma 20 napig PG jelenlétében (—), illetve PG hiányában (—) nevelve. A spektrumokat OD₇₅₀-re normáltuk.

5.3. A PG kiürülésének hatása a lipidösszetételre

A PAL/ $\Delta cdsA$ sejteket kívülről adott, szintetikus PG-molekulákkal tartottuk életben. Ez kizárólag 18:1 zsírsavat tartalmazott, amely nem természetes PG komponens a cianobaktériumokban. GC-vel megvizsgáltuk a TLC-n elválasztott PG zsírsavösszetételét. Megfigyeltük, hogy négy napig PG jelenlétében nevelt sejtek esetében a 18:1 zsírsav 40 mol% fölött volt, majd mennyisége nyolc napig tartó PG-éhezés után 10 mol%-ra változott. Ez a koncentráció közel volt a PAL sejtekben mért 18:1 zsírsav arányához (2. táblázat).

2. táblázat. A PG zsírsavösszetétele

Minták	PG-molekulák zsírsavláncai, mol%					
	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3
PAL	54,6	4,1	6,6	11,5	22,0	1,2
PAL <i>cdsA</i> +PG	31,4	2,2	14,9	42,4	6,7	2,5
PAL <i>cdsA</i> -PG 8n	55,1	1,3	25,6	10,1	5,5	2,4

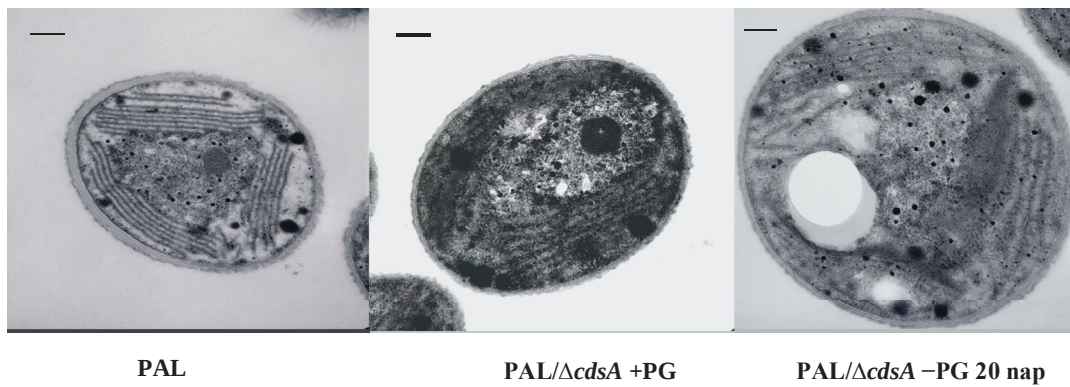
A PAL a *Synechocystis* törzs fikobiliszómahiányos mutánsa. A PAL/ Δ *cdsA*+PG és –PG sejtek PG jelenlétében illetve 8 napig PG hiányában voltak nevelve.

Ez időtartam alatt a PG mennyisége 4,4 nM-ról 2,1 nM PG/mg fehérje szintre lecsökkent, ami az eredeti mennyiségnek mintegy felére csökkenését jelenti. Nyolc nap egy sejtosztódásnak felel meg, ami a PG mennyiségének a megfelezését jelentette.

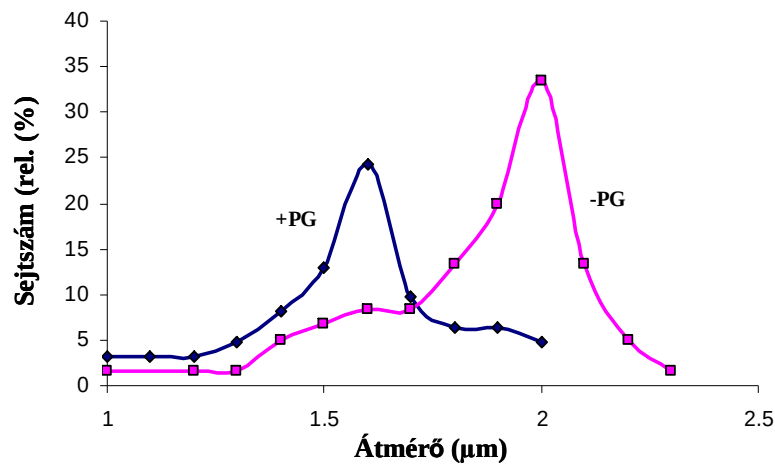
5.4. A PG kiürülésének hatása a sejt méretére és szerkezetére

A 16/A ábrán a PAL mutáns sejtek elektronmikroszkópos képe látható. A fikobiliszóma hiánya következtében a sejtek szorosan, egymáshoz közel elhelyezkedő tilakoidmembránnal rendelkeztek, gránumokhoz hasonló szerveződést hozva létre (Olive és mtsai, 1997). A PG jelenlétében nevelt PAL/ Δ *cdsA* sejtek esetében a tilakoidmembránok szoros elhelyezkedést mutattak, és méretük is a PAL sejtekhez hasonló volt. A PG hiányában 20 napig nevelt PAL/ Δ *cdsA* sejtek esetében azonban a sejtek mérete jóval nagyobb volt, mint a PG-vel kiegészített tápoldatban nevelt mutáns sejteké (16/B ábra). A nagyobb sejtméret mellett megfigyelhetjük, hogy a tilakoidmembránok között nagyobb hézagok vannak, sok foszfát granulum halmozódik fel a citoplazmában. Láthatjuk, hogy a PG hiányában nevelt sejtek tilakoidmembránjai kevésbé rendezettek, mint a PG jelenlétében nevelt sejtekéi. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy PG hiányában a tilakoidmembránok kialakulnak, de a membrán szerveződése eltér. A megnövekedett sejtek pedig arra utalnak, hogy osztódásuk gátolt.

A



B



16. ábra. A PG kiürülésének hatása a sejtek felépítésére és méretére

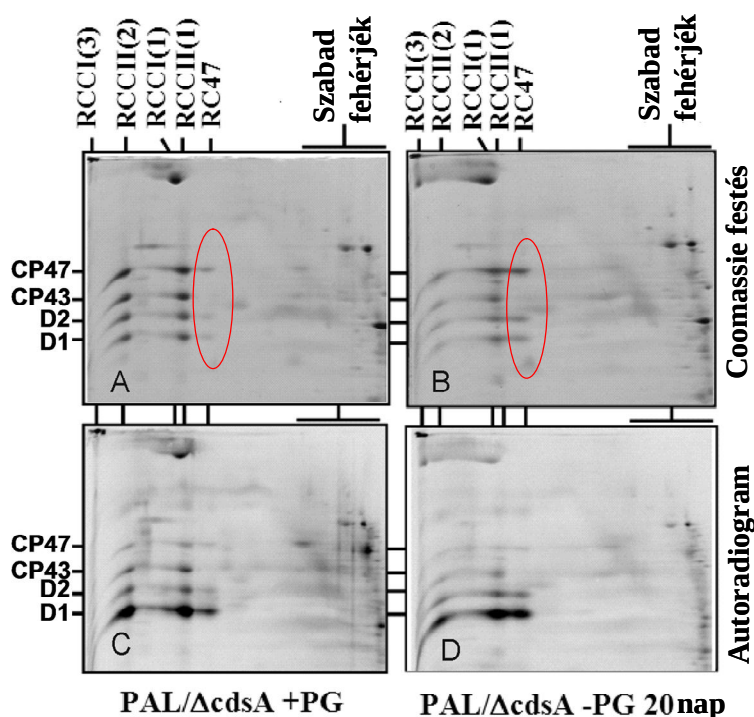
(A) A PAL, PAL/ $\Delta cdsA$ +PG és PAL/ $\Delta cdsA$ -PG sejtek reprezentatív elektronmikroszkópos felvétele. Lépték: 0.25 μm . (B) A PAL/ $\Delta cdsA$ mutáns sejtek mérethelyi különbségei PG jelenlétében (+PG) és 20 napig PG hiányában (-PG) nevelt sejtek esetében. A sejtek méretét elektronmikroszkópos felvételek alapján határoztuk meg (n=80).

5.4. A PG kiürülésének hatása PSII szerkezetre

5.4.1. A PG-kiürülés hatása a PSII fehérjealegységek szintézisére és összeszerelésére

Kétdimenziós gélelektroforézist (2D-BN/SDS-PAGE) alkalmaztunk a PAL/ Δ *cdsA* mutáns sejtek tilakoidmembránjait használva ahhoz, hogy felderítsük a PG kiürülésének lehetséges következményeit a PSII szerkezeti felépítésében. Blue-natív elektroforézissel szétválasztottuk a tilakoidmembrán fehérjekomplexeit, denaturáló SDS-elektroforézissel pedig az egyes komplexeket felépítő fehérjéket. A PG jelenlétében nevelt PAL/ Δ *cdsA* sejtek esetében (17/A ábra) a tilakoidmembránokban a leggyakrabban előforduló fehérjekomplexek hasonlóak voltak a vad típusú *Synechocystis* sejtek fehérjekomplexeinek összetételéhez (Dobakova és mtsai, 2007). A PSI RCC-ének monomer és trimer formája [RCCI(1) és RCCI(3)], valamint monomer és dimer PSII RCC [RCCII(1) és RCCII(2)] voltak jelen. A PSII komplex mindkét esetben tartalmazta mind a négy nagy PSII fehérjealegységet: a D1, D2, CP47 és CP43 proteineket (17/A ábra). Kis mennyiségben jelen volt az ún. RC47 komplex, amely tulajdonképpen a PSII monomer RCC, amelyből hiányzik a CP43. A szabad fehérje frakciókban pedig kis mennyiségű CP47-et és CP43-at találtunk. A 20 napig PG hiányában nevelt PAL/ Δ *cdsA* mutáns sejtek jelentős RCCII(2) mennyiségi csökkenést mutattak (17/B ábra). A RCCI(3)-ek destabilizálódtak, monomerekre estek szét. Ugyanakkor megfigyelhetjük az RC47 komplex mennyiségének növekedését. Ebből a komplexből hiányzik a CP43 fehérje. Arányának növekedése azt sugallta, hogy PG hiányában a CP43 nem tud stabilan kötődni a PSII RC-hoz.

Radioaktív metionin felhasználásával nyomon követhettük a fehérjék szintézisét. Húsz napig tartó PG-megvonás után (17/D ábra) sem lehet látni számottevő különbséget a fehérjemintázatban a PG jelenlétében (17/C ábra), illetve hiányában nevelt sejtek esetében. Ez azt jelentheti, hogy PG hiányában is megtörténik a komplexet felépítő fehérjék szintézise, azonban a nagy komplexek, mint RCCII(2) és RCCI(3) összeszerelése zavart szenved.



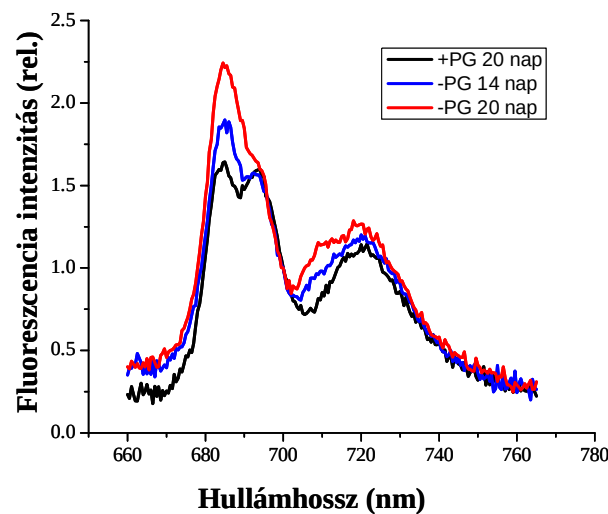
17. ábra. A PAL/ $\Delta cdsA$ sejtek tilakoidmembránjainak 2D-BN/SDS-PAGE fehérjemintázata

A sejteket PG jelenlétében (+PG) és hiányában 20 napig neveltük (-PG 20 nap). A sejteket [^{35}S]Met-nal voltak jelölve $500 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fényerősségen és 29°C -on 20 percig. A felső (A és B) panelek a Coomassie festett géleket mutatják, míg az alsó (C és D) panelek az ezeknek megfelelő autoradiogramokat. Használt jelölések: RCCI(3) és RCCI(1): trimer, illetve monomer PSI core-komplexek; RCCII(2) és RCCII(1): dimer, illetve monomer PSII core komplexek; RC47: PSII core-komplex, melyből hiányzik a CP43. A PSII fehérjéi: D1, D2, CP43, CP47. A pirossal bekeretezett részek az RC47 mennyiségét hangsúlyozzák. Mindegyik minta klorofilltartalma $60 \mu\text{g}$ volt.

5.4.2. Alacsony hőmérsékletű (77K) fluoreszcencia mérések

A PAL/ $\Delta cdsA$ sejtek alacsony hőmérsékletű fluoreszcenciaemissziós spektruma két jól elkülönült csúcst mutat 685 és 695 nm-nél (18. ábra). Ezek kizárólagosan a PSII emissziójából származnak, hiszen a sejtekben nincs fikobiliszóma, amely hozzájárulhatna a 685 nm-es csúcsmisszióhoz (Ajlan és Vernotte, 1998). A perifériás antennák által begyűjtött fényt a CP43 és CP47 Chl-*a* molekulái továbbítják a PSII RC-ban lévő P680-hoz, ahol megtörténik a töltésszétválás. Ez a fajta energiatovábbítás azonosnak tűnik a cianobaktériumokban és a magasabbrendű növényekben (Shen és Vermaas, 1994; Bricker és Frankel, 2002). Az energiának az a része, amely nem használódik fel töltésszétválásra, vagyis a felesleges energia fluoreszcencia formájában sugárzódik ki 685, illetve 695 nm-en. Míg a 685 nm-es csúcsmissziójához számos

antennaklorofill hozzájárul, addig a 695 nm-es csúcs a CP47-ben lévő klorofilloktól származik. A 725 nm-es csúcs a PSI RC emissziójának felel meg, amelynek magassága a PAL sejtek esetében a PSII emissziójának a fele. Ez annak tulajdonítható, hogy a vad típusú sejtekhez képest a PSII/PSI aránya megnőtt (Ajlan és Vernotte, 1998). A PG jelenlétében nevelt PAL/ Δ cdsA sejtek hasonló fluoreszcenciaemissziós spektrumot mutattak, mint a kontrollként számító PAL sejtek (Ajlan és Vernotte, 1998). A PAL/ Δ cdsA sejtek 14 és 21 napig tartó PG-megvonás hatására nagyobb fluoreszcenciaemissziót mutattak 685 nm-nél, a PG jelenlétében nevelt kontrollénál (18. ábra).



18. ábra. Alacsony hőmérsékletű fluoreszcenciaemissziós spektrumok

A PG jelenlétében (fekete) és hiányában 14 (kék) illetve 20 napig (vörös) nevelt PAL/ Δ cdsA mutáns sejtek fluoreszcencia spektrumai.

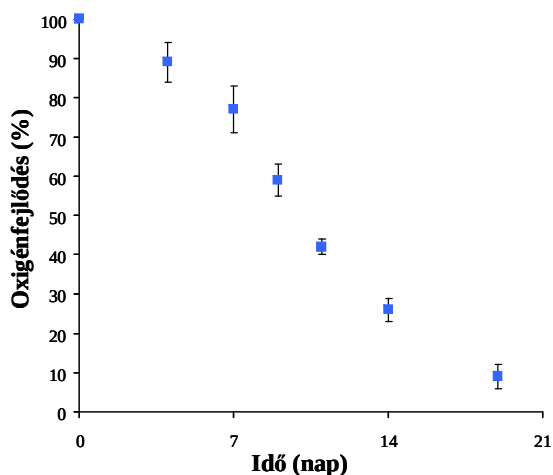
A 685 nm-es fluoreszcenciaemisszió növekedése valószínűleg a PSII RCC többi részétől levált, szabad CP43-ból származhat. Ez a megfigyelés összhangban van a PSII szerkezeti vizsgálatokkal, ahol megfigyeltük a CP43 hiányos RC47 komplex mennyiségének növekedését a PG-hiányos sejtekben.

5.5. A PG-kiürülés hatásának vizsgálata a PSII funkciókra

5.5.1. Fotoszintetikus oxigénfejlődés

Megmértük a PG jelenlétében és hiányában nevelt PAL/ Δ cdsA sejtek oxigénfejlesztő aktivitását. Húsz napig tartó PG-éhezés hatására a teljes elektrontranszportot jelentő fotoszintézis (H_2O-CO_2) értéke fokozatosan csökkent (19.

ábra). Még 18 napig tartó PG-éhezés után is kimutatható mennyiségű oxigén termelődött. Megmértük a PSII-ből származó oxigénfejlődést is a víztől egy mesterséges kinonakceptorig, az 1,4-p-benzokinonig ($\text{H}_2\text{O-pBQ}$). Itt az oxigénfejlődés gyorsan csökkent, majd teljesen leállt a PG-éhezés során. Ez megegyezik a korábbiakban a $\Delta pgsA$ sejteken tapasztaltakkal (Hagio és mtsai, 2000).



19. ábra. A PG kiürülésének hatása a PAL/ $\Delta cdsA$ mutáns sejtek oxigénfejlesztésére ($\text{H}_2\text{O-CO}_2$)

A 100 % aktivitás megfelel $430 \mu\text{mol O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ Chl h}^{-1}$ mennyiségnek. A sejtek klorofilltartalma $5 \mu\text{g/ml}$ volt. Az aktivitás-értékek három különböző mérés átlagából származnak.

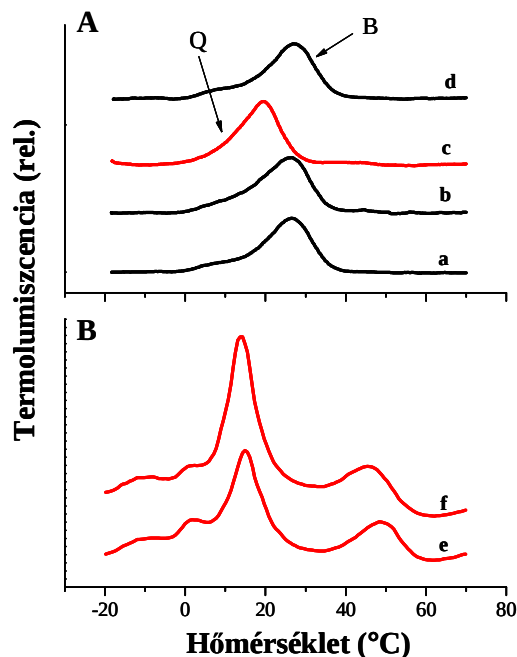
5.5.2. Termolumineszcencia

Ahhoz, hogy részletesebben tanulmányozzuk a PSII akceptoroldali elektrontranszport-folyamatokat, megmértük a sejtek PSII-ből származó termolumineszcenciáját. A PG jelenlétében nevelt sejtek esetében a TL-görbe 27°C -nál mutatott egy csúcsot (20. ábra). Ez a TL csúcs megfelel az ún. B típusú TL sávnak, amely a Q_B^- és az S_2 állapotok közötti töltésrekombinációból származik. A 7 napig tartó PG-éhezés hatására a B sáv ($\text{Q}_\text{B}^- \text{S}_2$) hasonló volt a PG jelenlétében nevelt sejtekéhez. Ez arra utal, hogy nem volt számottevő változás sem az S_2 , sem a Q_B^- redox állapotaiban.

14 napig tartó PG-éhezés hatására a B sáv csúcsa 19°C -nál jelent meg, ami az ún. Q-sáv irányába történő eltolódást jelenti (20/A ábra). A 14 napig PG-éheztetett sejtek esetében észlelt alacsony hőmérsékletű TL csúcs helyzete hasonló volt a diklórfenil-dimetil-urea (DCMU)-kezelt vad típusú (Gombos és mtsai, 2002) valamint a

DCMU-kezelt, PG jelenlétében, illetve hiányában nevelt PAL/ $\Delta cdsA$ sejtéhez (20/B. ábra). A Q sáv a Q_A^- és az S_2 állapot közötti töltésrekombinációból származik.

Ha a 14 napig éheztetett sejtekhez visszaadjuk a PG-t, visszaáll a 27 °C-os TL sáv, és a 19 °C-nál lévő sáv eltűnik. A DCMU egy akceptoroldali kinongátlószer. A kapott eredmények azt sugallják, hogy hosszabb ideig tartó PG-éhezés hatására a Q_A^- és Q_B közötti elektrontranszport lelassul. Ez alátámasztja, hogy PG hiányában az akceptoroldal sérül.



20. ábra. A PG kiürülésének hatása a PAL/ $\Delta cdsA$ sejtek termolumineszcenciájára

(A) A PG jelenlétében nevelt sejtek (a) PG-mentes médiumba voltak áttéve 7 (b) illetve 14 (c) napig. A recovery eléréséhez (d) a 14 napig PG-mentes médiumban nevelt sejtekhez visszaadtuk a PG-t. A Q és a B sáv töltésrekombinációt jelölnek, Q_A^- és S_2 illetve Q_B^- és S_2 között. (B) A 10 μM DCMU-val kezelt sejtek termolumineszcenciája, PG jelenlétében (e) és 14 napig PG hiányában nevelt sejtek (f) esetében. Pirossal jelöltem a Q sáv irányába eltolódott görbét.

5.5.3. Chl-a fluoreszcenciaindukció kinetikai mérések

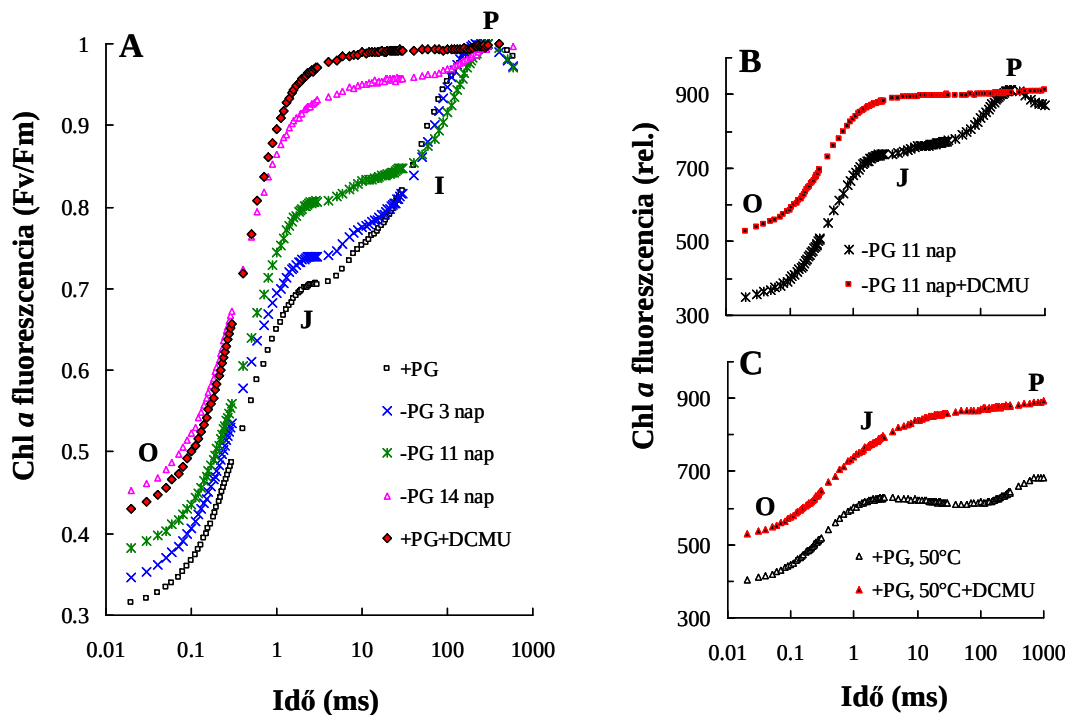
Megmértük a sejtek OJIP fluoreszcenciáját, amely információt ad az elektrontranszportlánc redukciójáról (Schansker és mtsai, 2005). A 0-2 ms időtartamú fázist fotokémiai résznek nevezzük, mivel erősen fényintenzitás-függő (Neubauer és Schreiber, 1987). A 2-30 ms-os II fázis a PQ pool redukcióját tükrözi (Schreiber és mtsai, 1989). A 30-300 ms-os IP fázis a PSI aktivitásától függ, és a ferredoxin (Fd)

redukcióját tükrözi az inaktív ferredoxin-NADP⁺-reduktáz jelenlétében (FNR) (Munday, Jr. és Govindjee, 1969; Schansker és mtsai, 2005; Schansker és mtsai, 2006). Cianobaktériumokban a klorofill fluoreszcencia-kinetikai görbe különböző fázisai jelen vannak, de nehezen megkülönböztethetők (Stamatakis és mtsai, 2007), alacsony Fv/Fm (~0.2-0.4) értéket mutatnak, ezért nehezen kiértékelhetők. A PG jelenlétében nevelt PAL/ Δ cdsA sejtek esetében az OJIP fluoreszcenciagörbe lefutása hasonló a magasabbrendű növényekéhez, azzal a különbséggel, hogy a cianobaktériumokban az I fázis (30 ms) nem különül el élesen (21/A ábra). Az Fv/Fm értéke is viszonylag magas volt (0.73), amely a fikobiliszóma hiányának valamint a magas PSII/PSI aránynak tulajdonítható. DCMU jelenlétében az Fm értéket 2 ms körül érte el (J fázis).

Különböző ideig tartó PG-megvonás hatására a PAL/ Δ cdsA sejtek J fázisának fluoreszcencia intenzitása fokozatosan megnőtt. 14 napig tartó PG-éhezést követően a fluoreszcenciagörbe hasonló volt a DCMU-kezelt sejtek görbéjéhez (21/A ábra). Ez azt jelenti, hogy a PG-megvonás gátolta vagy lelassította az elektrontraszport-folyamatokat a PSII akceptor oldalán. Körülbelül 10%-os Fm csökkenést észleltünk a PG hiányában nevelt sejtek esetében. Az OJIP görbék összehasonlíthatósága érdekében a 21/A ábra görbéit Fm értékre normalizáltuk. A 21/B ábra görbéi nincsenek Fm értékre normalizálva. Itt láthatjuk, hogy a 11 napig PG hiányában nevelt sejtek esetében az Fm érték megegyezett a DCMU-kezelt sejtek Fm értékével, ami azt mutatja, hogy az Fm értéknél a RC-ok mind zárva voltak. Tehát ez a 10%-os Fm csökkenés a fotokémiai aktív RC-ok csökkenését jelenti. Az F₀ értéke fokozatosan nőtt a PG-megvonás hatására, 14 napos PG-éhezés után mintegy 20% körüli növekedést észleltünk a PG jelenlétében nevelt sejtekhez viszonyítva. Ez származhat a CP43-nak a RC-tól való részleges leszakadása miatt. A CP43-nak leválását a alacsony hőmérsékletű fluoreszcencia eredmények is alátámasztják (18. ábra).

Megnéztük, hogy PG hiányában a PSII donor oldala sérül-e, mint azt Sakurai és mtsai (2007) feltételezték a Δ pgsA sejtek esetében. A donoroldali és az akceptoroldali gátlás megkülönböztetése céljából hőkezeléssel részlegesen inaktiváltuk az oxigénfejlődést (10 percig, 50 °C fokon). Ennek eredményeképpen a fluoreszcencia intenzitása a J szakaszban lecsökkent, a fluoreszcencia növekedése a J-től a P fázisig lassabban következett be, és egy jóval kisebb Fm értéket ért el (21/C ábra). Az Fm értéke nagymértékben visszaállítható volt DCMU hozzáadásával, de ilyenkor a

fluoreszcencia növekedése lassúbb volt, akárcsak a hőkezelt árpa leveleknél (Toth és mtsai, 2007), amit a 21/B és C ábrák összehasonlítása mutat. Ebben az esetben az Fm csökkenése a PSII donor oldaláról jövő elektronok hiányának volt tulajdonítható. A hőkezelés kb. 15%-os F_0 növekedést idézett elő, ami azt mutatja, hogy a PSII RC-ban nem történt masszív antennakomplex-leválás, valamint a RC-ok sem degradálódtak. A fent említett hőkezelt sejtek fluoreszcencia tulajdonságai jól láthatóan eltértek a PG-éheztetett sejtekétől. Éppen ezért úgy tűnt, hogy a PSII elektrontranszport-folyamatainak a gátlása annak tulajdonítható, hogy a Q_A^- újra oxidálása lelassul vagy gátlódik, és valószínű, hogy a PSII donoroldali gátlása elhanyagolható, vagy csupán másodlagos.



21. ábra. Fluoreszcencia (OJIP) átmenetek

(A) A PG-megvonás hatása a PAL/ $\Delta cdsA$ mutáns sejtek fluoreszcencia átmeneteire, valamint a DCMU hatása a PG jelenlétében nevelt sejtekre. A fluoreszcencia görbék Fm (F_v/F_m) értékre vannak normalizálva. (B) A DCMU hatása a PG hiányában 11 napig nevelt sejtek fluoreszcencia átmeneteire. A görbéket normalizálás nélkül ábrázoltam (C) A hőkezelt (50 °C, 10 perc) PG jelenlétében nevelt sejtek OJIP fluoreszcenciája, DCMU jelenlétében ($\blacktriangle$), illetve hiányában ($\triangle$). Mindegyik fluoreszcencia átmenet logaritmikus skálán van ábrázolva.

5.6. A PG átalakításának tanulmányozása

A PG átalakításának részletes felderítéséhez a *ΔpgsA* cianobakteriális törzset használtuk. Előnyös tulajdonsága, hogy csak a PG bioszintézisében gátolt mutáns, melynek a fiziológiáját korábban már részletesen tanulmányozták (Hagio és mtsai, 2000; Sakurai és mtsai, 2003; Domonkos és mtsai, 2004). 21 napig PG-mentes tápoldatban neveltem a *ΔpgsA* sejteket, melyekben ez idő alatt a PG-tartalom jelentősen lecsökkent. A PG nem ürül ki teljesen a sejtekből, hiszen PG teljes hiányában azok nem maradnának életben. A PG-hiányos sejteknek dioleoil-PG-t [PG(18:1/18:1)] adtam nagy feleslegben. A beépült PG-típusokat 1 nap inkubálás után kezdtem mérni.

5.6.1. A PG-átalakítás tanulmányozása gázkromatográfia módszerével

A PG jelenlétében nevelt *ΔpgsA* sejtek gázkromatográfiai eredményei a PAL/*ΔcdsA* sejtekhez hasonló PG zsírsavösszetétel-változást mutattak. Ez arra utalt, hogy a szintetikus PG új PG-típusokká alakult, megjelent a vad típusban előforduló természetes PG-re jellemző zsírsavösszetétel (Murata és mtsai, 1992b; Okazaki és mtsai, 2006)(Murata 1992, Okazaki 2006). Egy napig PG jelenlétében nevelt *ΔpgsA* sejtek (*ΔpgsA*+PG 1n) esetében az olajsav volt a legnagyobb gyakorisággal előforduló zsírsav. A 21 napig PG jelenlétében nevelt *ΔpgsA* sejtek (*ΔpgsA*+PG 21n) esetében az olajsav tartalom lecsökkent 60%-ról 11%-ra. A palmitinsav tartalom az olajsav rovására pedig megnőtt 19%-ról 57%-ra (3. táblázat).

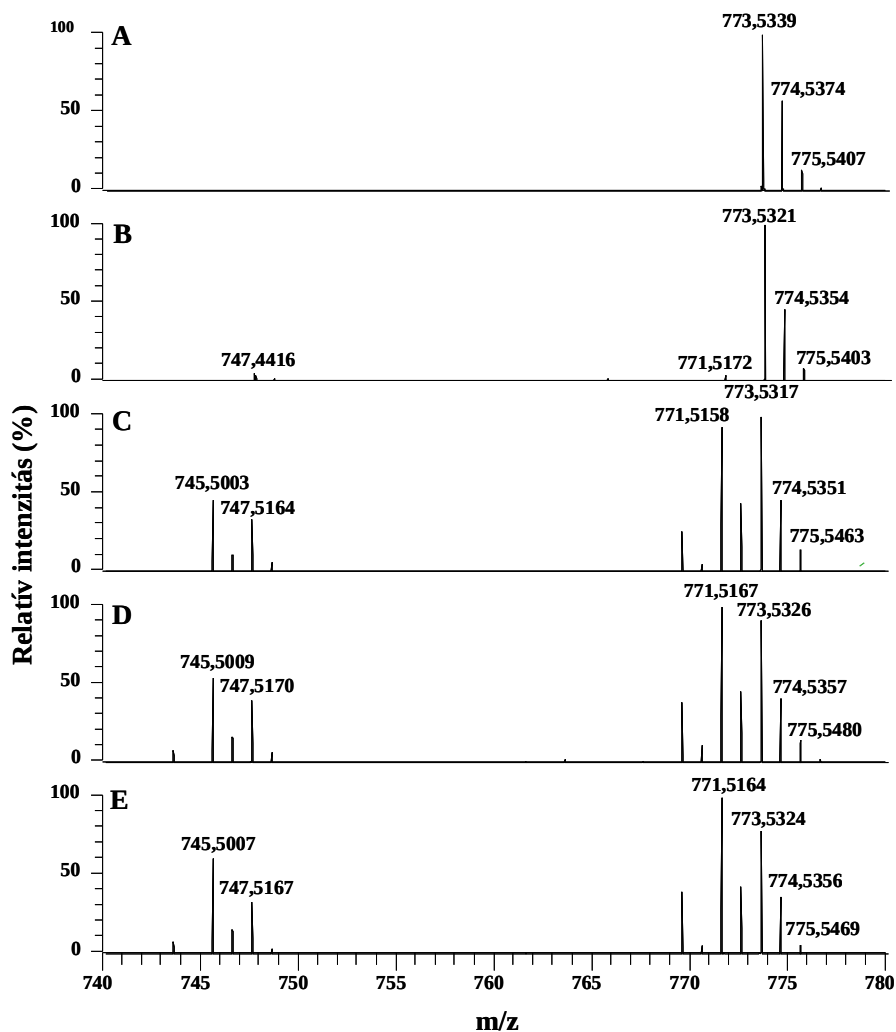
3. táblázat. A *ΔpgsA* mutáns sejtek zsírsavösszetétele

Minták	PG-molekulák zsírsavláncai (mol%)					
	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3
<i>ΔpgsA</i> +PG 1n	19	2	10	60	7	2
<i>ΔpgsA</i> +PG 21n	57	4	20	11	8	n.d.

A mutáns sejteket PG jelenlétében neveltük 1 és 21 napig (*ΔpgsA*+PG 1n illetve *ΔpgsA* +PG 21n); n.d : nem kimutatható. Az értékek három független mérés átlagának felelnek meg.

5.6.2. A PG-átalakítás tanulmányozása tömegspektrometria módszerével

A PG biokémiai átépülését tömegspektrometria (MS) segítségével követtük nyomon. A 22/A ábra mutatja a negatívion-módban készült PG(18:1/18:1) standard tömegspektrumát, a 22/B-E ábrák a PG(18:1/18:1) visszaadása után 1, 12, 18, illetve 21 napig nevelt sejtek lipid extraktumának tömegspektrumát.



22. ábra. A negatívion-módban kapott FTICR tömegspektrum "PG tartománya"

A jelzett csúcsok mutatják a PG-ből származó $[M-H]^-$ ionokat: (A), szintetikus PG(18:1/18:1) (B), $\Delta pgsA$ +PG 1n (C), $\Delta pgsA$ +PG 12n (D), $\Delta pgsA$ +PG 18n és (E), $\Delta pgsA$ +PG 21n lipid extraktumai.

A dioleoil-PG monoizotopikus ionja m/z 773,5339-nél jelent meg (22/A ábra). Megfigyelhetjük, hogy a dioleoil-PG visszaadása után 12 napig nevelt sejtek esetében új PG-molekulatípusok (m/z 771,5159; 747,5164 és 745,5004 értékeknél) jelennek meg (22/C ábra). A molekulaionok pontos m/z arányaiból (22/E ábra), amelyek az ESI-FTICR tömegspektrumból származnak, feltételezhetjük az új PG-típusokat, mivel tömegük utal a PG-molekulák szénatomszáma és a zsírsavláncokban levő kettőskötések számára (4. táblázat). A mért m/z (22/E ábra) pontossága minden esetben 5 ppm hibahatáron belül volt.

4. táblázat. A feltételezett PG-típusok molekulaionjai (m/z)

Elméleti (m/z)	Mért (m/z)	Hiba (ppm)	Szénatomszám	Kettőskötések száma	Feltételezhető PG-típusok ($sn-1/sn-2$)
773,5338	773,5325	-1,7	C42	2	18:1/18:1 18:2/18:0
771,5201	771,5164	-4,8	C42	3	18:2/18:1 18:3/18:0
747,5182	747,5167	-1,93	C40	1	18:1/16:0 16:0/18:1 16:1/18:0
745,5025	745,5007	-2,37	C40	2	18:2/16:0 16:1/18:1

12 napnál tovább tartó PG-éhezés után nem jelentek meg újabb PG-származékok, ennek ellenére a 21 napig tartó PG-éhezés alatt az új PG-származékok mennyisége folyamatosan nőtt, míg ezzel egyidőben a dioleoil-PG mennyisége fokozatosan csökkent (22/E ábra).

A mesterséges és az újonnan képződött PG-molekulák pontos kémiai szerkezetét a 21 napig PG jelenlétében nevelt ún. $\Delta pgsA+PG$ 21n sejtek teljes spektrumában megfigyelt $[M-H]^-$ molekulaionok segítségével határoztam meg. Az itt megfigyelt molekulaionokat elkülönítettük és tandem MS-sel tovább vizsgáltuk. Az MS/MS spektrumok részletes analízisével sikerült megkülönböztetni olyan acilcsoportokat, amelyek az $sn-1$, illetve $sn-2$ helyzetben találhatók. A PG-típusok azonosításához felhasználtam Hsu és Turk (2001) különböző mesterséges PG-molekulatípusokkal kapott korábbi eredményeit. Az a módszer, amelyet alkalmaztak,

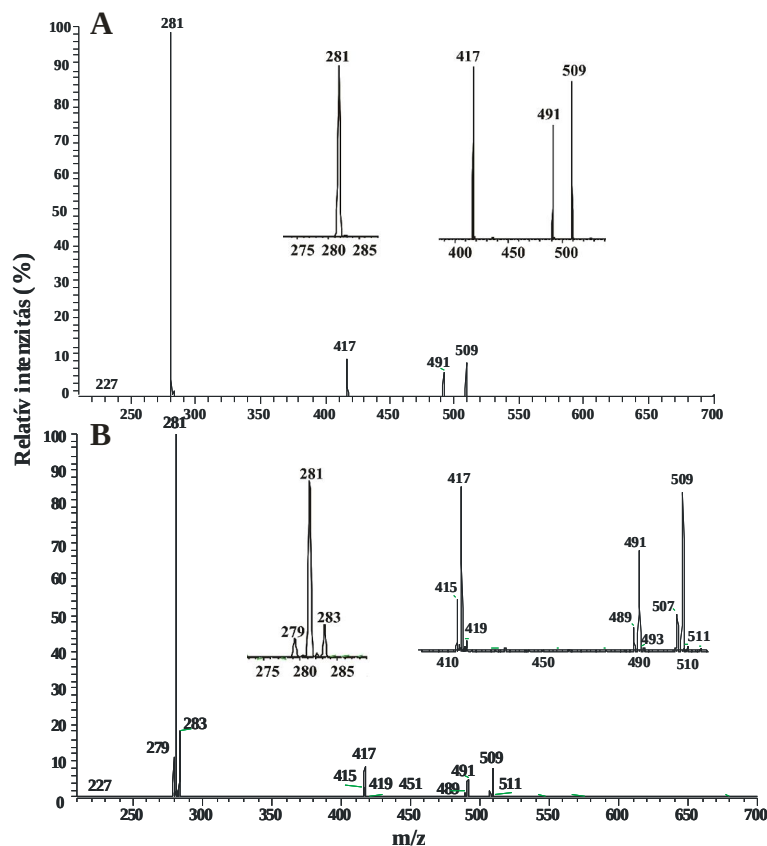
megbízható volt a zsírsav komponensek és azok glicerinvázon belüli helyzetének meghatározására. Szerkezeti információkat nyertem főként a főbb fragmensionokból, amelyek karakterisztikusak voltak az egyes PG-típusokra, és amelyek különböző fragmentáció útján keletkeztek: szabad zsírsavként ($[M-H-R_xCO_2H]^-$), vagy keténként ($[M-H-R'_xCH=C=O]^-$) történő neutrális vesztes útján, egyidejű zsírsav és glicerín fejcsoport ($[M-HR_xCOOH-C_3H_6O_2]^-$) vesztesége útján, valamint zsírsav-karboxilanionok ($[R_xCO_2]^-$) képződése útján, ahol $x=1,2$ és $R_x = R'_xCH_2$. Ugyanakkor felhasználtuk azt a tulajdonságot, hogy az *sn*-2 helyzetből neutrális veszteséssel leszakadt szabad zsírsav $[M-H-R_2CO_2H]^-$ vagy ketén $[M-H-R'_2CH=C=O]^-$ típusú fragmensionok mennyisége általában nagyobb, mint az *sn*-1 helyzetből ugyanolyan neutrális vesztes útján leszakadt fragmensionoké. Ez annak tulajdonítható, hogy nukleofil támadás történik az anionos foszfátcsoport, valamint a glicerinváz C1, vagy C2 szénatomja között, amelyekhez a különböző zsírsavak észtereződnek. Általában nagyobb gyakorisággal történik az *sn*-2 helyzetből a szabad zsírsav-karboxilanion ($R_2CO_2^-$) leszakadása, mint az *sn*-1($R_1CO_2^-$) helyzetből (Hsu és Turk, 2001). Nem zárhatjuk ki annak a lehetőségét sem, hogy a kisebb mennyiségben jelen levő helyzeti izomereket elfedik a nagyobb mennyiségben jelen levő izomerek. Azonban a PG izomerek azonosítása a fragmensionok intenzitása alapján történt, figyelembe véve Hsu és Turk (2001) módszerét.

A 23/A ábra mutatja a nevelési médiumhoz adott szintetikus PG(18:1/18:1) molekula MS/MS spektrumát, amely referenciaként szolgál. Azonosítottam az *m/z* 491, 509 és 417 fragmensionokat, amelyek tükrözik a 18:1 zsírsav neutrális leszakadását mint sav, ketén, valamint sav és glicerín fejcsoport egyidejű neutrális vesztesét. Csak egy típusú zsírsav-karboxianion jelent meg, (*m/z* 281), hiszen a PG(18:1/18:1) molekula ugyanazt a 18:1 zsírsavat tartalmazta az *sn*-1 és *sn*-2 helyzetekben.

5.6.2.1. A PG(18:2/18:0) molekula azonosítása

A 23/B ábrán látható az *m/z* 773 $[M-H]^-$ ion MS/MS tömegspektruma, amely a 21 napig PG(18:1/18:1) jelenlétében nevelt sejtek lipid extraktumából származik. A PG(18:1/18:1) esetében megfigyelt fragmensionokon kívül azonosítottuk, az *m/z* 493 és 489 ionokat is, amelyek a 18:2 és 18:0 zsírsavak neutrális vesztesére utalnak. Az *m/z* 419 és 415 ionok a zsírsav és a glicerín fejcsoport egyidejű leszakadásából származnak, az *m/z* 511 és 507 ionok pedig a ketének neutrális vesztesének feleltek meg. A leszakadt zsírsav-karboxilanionok az *m/z* 279 és 283 értékeknek feleltek meg. A

spektrum mutatta, hogy az m/z 489, 415, 507 és 283 ionok intenzitása nagyobb volt, mint az m/z 493, 419, 511 és 279 ionoké. Az ionintenzitások arra utaltak, hogy a 18:2 zsírsav féként az *sn*-1 helyzetben észtereződött, míg a 18:0 zsírsav főként a glicerinváz *sn*-2 helyzetében. Tehát, az MS/MS spektrum a hozzáadott mesterséges PG(18:1/18:1) mellett a PG(18:2/18:0) jelenlétét is mutatta.



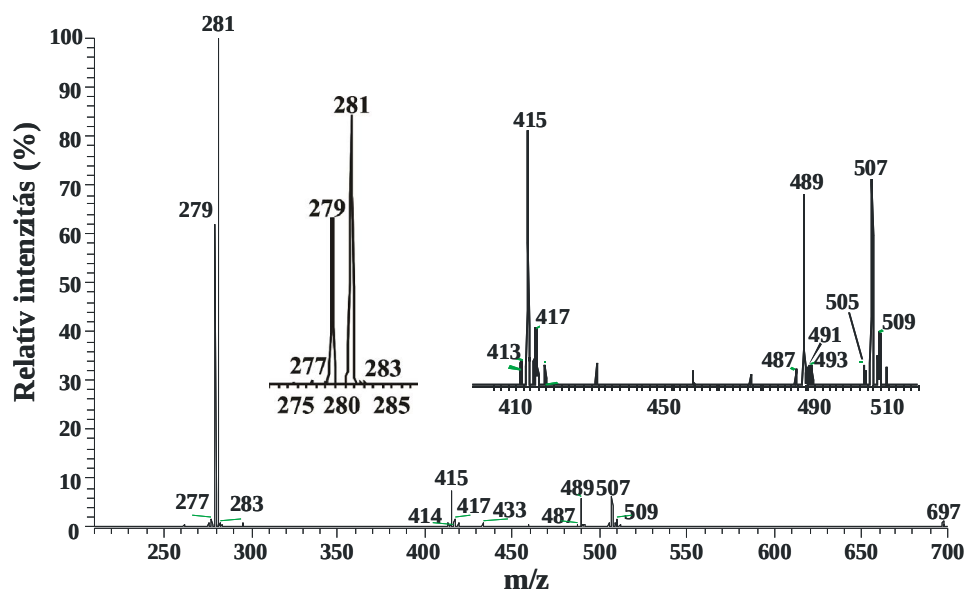
23. ábra. Az m/z 773 prekursorok CID termékion spektrumai

A kinagított régiók fragmentonjai: (A), a szintetikus PG(18:1/18:1) standardnak (B), a Δ pgsA+PG 21n mintákból kivont PG(18:1/18:1) és PG(18:2/18:0) izoformáknak felelnek meg.

5.6.2.2. A PG(18:2/18:1) és PG(18:3/18:0) izoformák azonosítása

Az m/z 771 $[M-H]^-$ termékion spektrumában (24. ábra) megfigyeltük az m/z 491 és 489 ionokat, amelyek a 18:2 illetve 18:1 zsírsavak neutrális vesztese révén keletkeztek. A zsírsavak és a glicerín fejcsoport egyidejű leszakadása az m/z 417 és 415 ionokat eredményezte. A spektrum tartalmazott m/z 509 és 507 ionokat is, amelyek az acil-komponensek ketéknént való neutrális vesztesére utaltak. Az m/z 489 ion mennyisége nagyobb volt mint az m/z 491 ion mennyisége, ugyanakkor az m/z 415 mennyisége

nagyobb volt, mint az m/z 417 ion mennyisége. Az m/z 507 ion intenzitása szintén nagyobb volt mint az m/z 509 ionné. A zsírsav-karboxilanionok közül az m/z 281 ion intenzitása nagyobb volt, mint az ugyanolyan leszakadás útján keletkezett m/z 279 zsírsav-karboxilanion intenzitása. A fragmensionok intenzitásából arra következtettünk, hogy a 18:2, illetve a 18:1 zsírsavak a glicerinváz *sn*-1, illetve *sn*-2 helyzetében észetereződtek. Ebben az MS/MS spektrumban, ami az m/z 771 prekursorionból származik, azonosítottunk más, jóval kisebb intenzitású fragmensionokat is. Azonban jól elkülöníthető, hogy az m/z 487, 413, 505 és 283 ionok intenzitása nagyobb volt mint az m/z 493, 419, 511 és 277 fragmensionok intenzitása. Éppen ezért az előbbi felsorolt fragmensionokat a 18:0 az utóbbiakat a 18:3 acilcsoportok leszakadásának tulajdonítottuk. A 18:3 zsírsav az, *sn*-1, míg a 18:0 az *sn*-2 helyzetekben észetereződtek. Megállapíthatjuk, hogy az m/z 771 ion MS/MS spektruma (24. ábra) két PG-származéknak, a PG(18:2/18:1) és PG(18:3/18:0) az együttes jelenlétét jelezte.



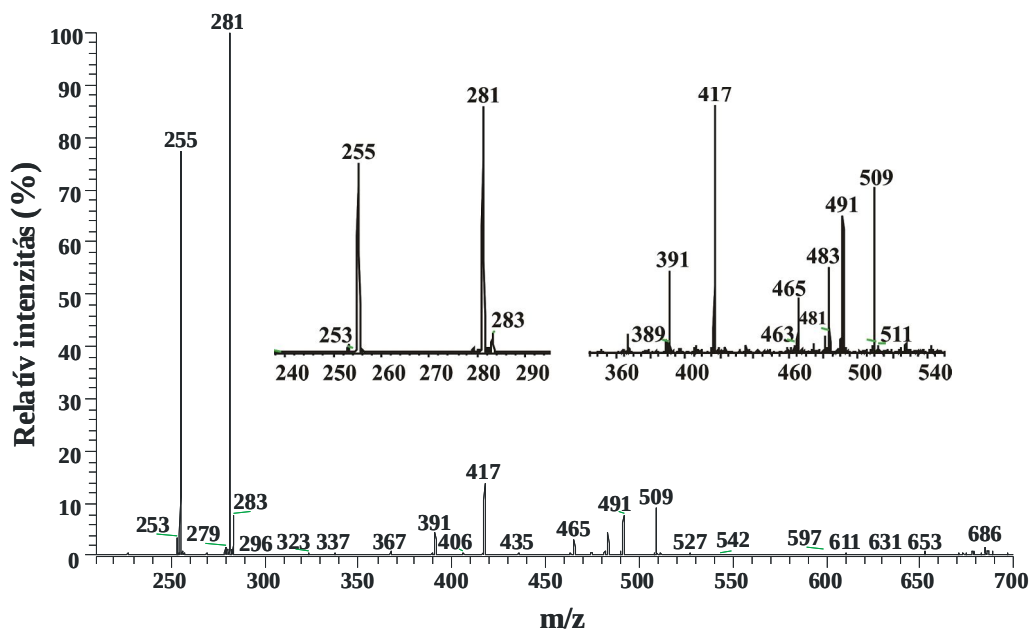
24. ábra. A $\Delta pgsA$ +PG 21n mintákból kivont m/z 771 prekursor CID termékion spektruma

A kinagyított régiók fragmensionjai a PG(18:2/18:1) és PG(18:3/18:0) izoformáknak felelnek meg.

5.6.2.3. A PG(18:1/16:0) és PG(16:1/18:0) izoformák azonosítása

A 25. ábra mutatja az m/z 747 tömegű $[M-H]^-$ ion MS/MS spektrumát. A 18:1 és 16:1 zsírsavak leszakadását jelezték a képződött m/z 465 és 491 fragmensionok. Az

m/z 391 és 417 ionok a zsírsav és a glicerín fejcsoport egyidejű leszakadásából keletkeztek. Más, nagyobb mennyiségben jelenlévő ionok, az m/z 483 és 509 is leszakadtak, amelyek a zsírsav szubsztituensek ketéenként való vesztéséből jöttek létre. Megfigyeltük, hogy az m/z 491 ion mennyisége nagyobb volt mint az m/z 465. Az m/z 417 ion esetében szintén nagyobb mennyiséget figyeltem meg mint az m/z 391 ion esetében. Az m/z 509 ion gyakorisága szintén nagyobb volt mint az m/z 483-é. Az m/z 255 tömegű zsírsav-karboxilanion intenzitása alacsonyabb volt mint a hasonló módon leszakadt m/z 281 ioné. A fent említett fragmensionoknak relatív mennyisége azt valószínűsítette, hogy a 18:1 és 16:0 zsírsavak az *sn*-1, illetve *sn*-2 helyzetből származtak. Ebben az m/z 747 ionspektrumban megfigyeltem más, jóval kisebb intenzitású fragmensionok jelenlétét is. Az acil-komponensek leszakadásából származó m/z 463, 389, 481 és 283 ionok mennyisége nagyobb volt mint az m/z 493, 419, 511 és 253 ionoké, ami arra utalt, hogy a 16:1 és 18:0 zsírsav komponensek a glicerínmolekula *sn*-1, illetve *sn*-2 helyzetéből szakadtak le. Ezért az m/z 747 ion spektruma (25. ábra) két PG-típus, a PG(18:1/16:0) és a PG(16:1/18:0) jelenlétére utalt.

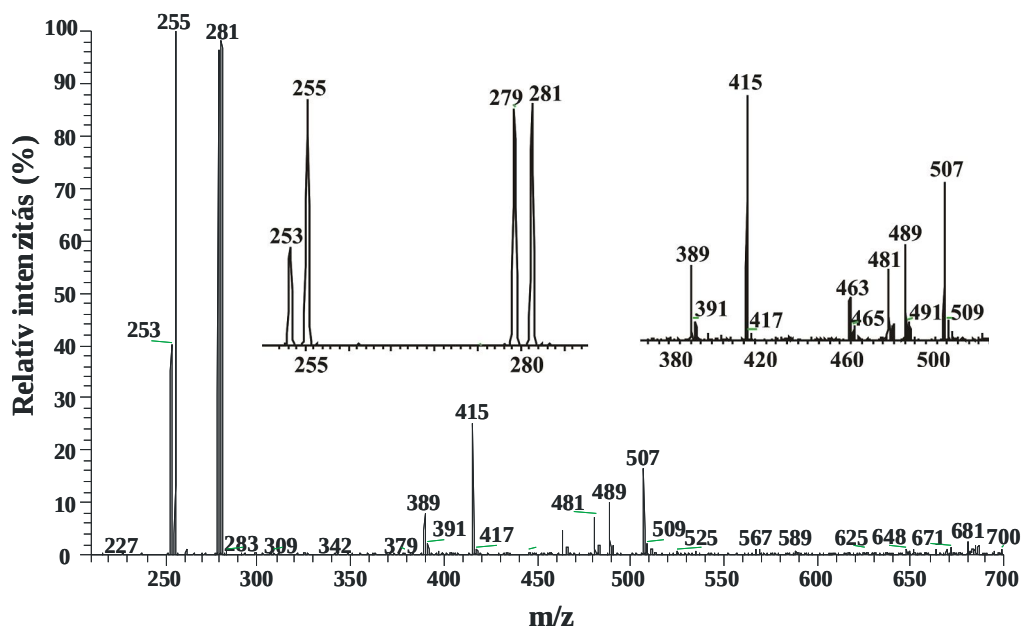


25. ábra. A $\Delta pgsA$ +PG 21n mintákból kivont m/z 747 prekursor CID termékion spektruma

A kinagyított régiók fragmensionjai PG(18:1/16:0) és PG(16:1/18:0) izoformáknak felelnek meg.

5.6.2.4. A PG(18:2/16:0) és PG(16:1/18:1) izoformák azonosítása

Amikor az m/z 745 tömegű szülőionokat $[M-H]^-$ fragmentáltuk (25. ábra) a keletkezett fragmensionok lehetővé tették az acilcsoportok azonosítását és helyzetük meghatározását a glicerinvázon belül. Az MS/MS fragmentációból keletkezett ionok m/z 465 és 489, a 18:2 illetve, a 16:0 zsírsavak neutrális vesztesét tükrözték. Az m/z 391 és 415 ionok pedig a zsírsav és a glicerín fejcsoport egyidejű leszakadását jelezték. Más ionok, mint az m/z 483 és 507 a zsírsavak keténként való leszakadásából származtak. Az m/z 489 ion mennyisége nagyobb volt mint az m/z 465 ion mennyisége, és az m/z 415 ion mennyisége szintén nagyobb volt mint az m/z 391 ioné. Az m/z 507 tömegű ion esetében is nagyobb mennyiséget észleltünk, összehasonlítva az m/z 483 ionnal. Az m/z 255 tömegű zsírsav-karboxilánion intenzitása nagyobb volt, mint a hasonló fragmentációs folyamat során keletkezett m/z 279 ion intenzitása. A fragmensionok intenzitásbeli különbsége arra utalt, hogy a 18:2 zsírsav *sn*-1 helyzetben, míg a 16:0 zsírsav az *sn*-2 helyzetben észtereződött [PG(18:2/16:0)]. Az m/z 745 tömegű prekursor ion MS/MS spektrumában (26. ábra) észrevettünk más fragmensionokat is, amelyek a 16:1 és 18:1 zsírsav szubsztituenseknek felelnek meg. Az m/z 463, 389, 481 és 281 ionok relatív intenzitása nagyobb volt, mint az m/z 491, 509, 417 és 253 ionoké. Ezért az azonosított fragmensionok két PG-típus, a PG(18:2/16:0) és PG(16:1/18:1) izomerjének egyidejű jelenlétét jelezték.

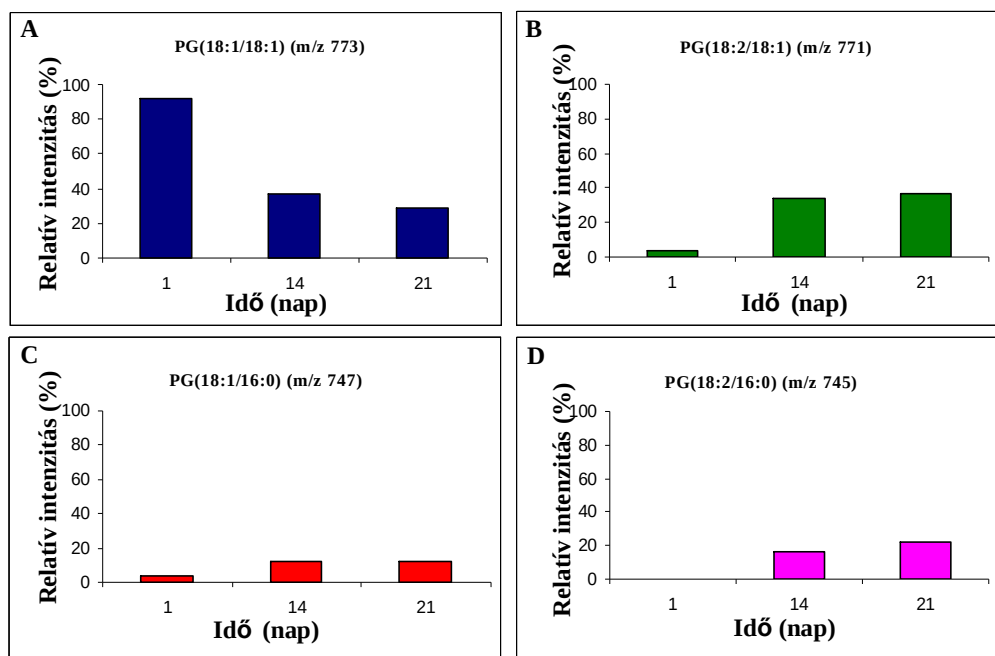


26. ábra. A Δ pgsA+PG 21n mintákból kivont m/z 745 prekursor CID termékion spektruma

A kinagyított régiók fragmensionjai a PG(18:2/16:0) és PG(16:1/18:1) izoformáknak felelnek meg.

5.6.2.5. A PG-molekulatípusok szemikvantitatív tömegspektrometriás analízise

A PG-átépülés dinamikájának nyomon követése érdekében elvégeztem a PG-típusok szemikvantitatív analízisét. A vizsgálatokhoz PG(14:0/14:0) belső standardot használtam, mivel ez nem természetes foszfolipid. Másik előnyös tulajdonsága, hogy a az ESI spektrumban a molekulaionja (m/z 665) nem fed át a többi természetesen előforduló molekulatípusával. A mennyiségi analízishez az FT-ICR teljes spektrumában megfigyelt relatív ionintenzitásokat használtam fel, ezért nem tudtam a PG-izomerek pontos arányát meghatározni. Az m/z 773, 771, 747 és 745 ionok relatív intenzitásának összehasonlítása alapján megfigyeltem, hogy a tápoldathoz adott mesterséges (18:1/18:1)PG molekula (m/z 773) mennyisége folyamatosan csökkent a nevelési idő (1, 14 és 21 nap) függvényében (27/A. ábra). Ezzel egyidőben a többi PG-típus, m/z 771 (27/B ábra), 747 (27/C ábra) és 745 (27/D ábra) koncentrációja fokozatosan nőtt az m/z 773 rovására. Ez a PG-molekulatípusok átépítését jelezte.



27. ábra . A PG-típusok ionintenzitásainak változásai

(A), PG(18:1/18:1) (*m/z* 773); (B), PG(18:2/18:1) (*m/z* 771); (C), PG(18:1/16:0) (*m/z* 747) és (D), PG(18:2/16:0) (*m/z* 745), ez utóbbi PG-típus nem volt kimutatható a PG visszaadása utáni első napon. Az intenzitás értékeket az 1, 14 és 21 napig PG jelenlétében nevelt sejtek lipid extraktumainak teljes MS spektrumából olvastuk le. Viszonyításként a PG(14:0/14:0) (*m/z* 665) belső standard intenzitása szolgált.

A PG-típusok koncentrációját kalibrációs koeficiensek segítségével is megbecsültük. A PG(18:1/18:1) koncentrációja mintegy három hét alatt 1,77-ről 0,77 μM -ra csökkent. Ezzel párhuzamosan a többi nagyobb gyakorisággal előforduló PG-molekulatípus koncentrációja fokozatosan nőtt (5. táblázat). A koncentrációbeli változások hasonló tendenciát mutattak, mint a 27-es ábrán.

5. táblázat. A PG-típusok koncentrációjának időbeni változásai

Minták	Molekulatípusok			
	18:1/18:1	18:2/18:1	18:1/16:0	18:2/16:0
	18:2/18:0	18:3/18:0	16:0/18:1	16:1/18:1
	Molekulaion (<i>m/z</i>)			
	773	771	747	745
Molkoncentráció (μM)				
$\Delta pgsA$ +PG 1n	1,77	0,12	0,17	n.d.
$\Delta pgsA$ +PG 21n	0,77	1,47	0,67	0,88

A mintákat a 3-as táblázatnál leírtak szerint jelöltem (48. oldal), dőlt karakterekkel emeltem ki a leggyakrabban előforduló PG-típusokat; n.d.:nem kimutatható.

6. Az eredmények megvitatása

6.1. A PG szerepe a fotoszintézis folyamataiban és más sejtfunciókban

A növények kloroplasztizának és a cianobaktériumok tilakoidmembránjainak egy jellegzetes, jól konzervált lipidmátrixa van. A PG nélkülözhetetlen alkotórésze ezeknek a membránoknak. A $\Delta pgsA$ PG-hiányos mutáns segítségével korábban is tanulmányozták a PG-nek a fotoszintézisben játszott szerepét (Hagio és mtsai, 2000; Gombos és mtsai, 2002; Sakurai és mtsai, 2003; Domonkos és mtsai, 2004). Hogy jobban megérthessük ennek a foszfolipid molekulának a PSII szerkezetében és működésében játszott szerepét, a *Synechocystis* fikobiliszómahiányos (PAL) mutánsában inaktiváltuk a PG bioszintézisének kulcsenzimét kódoló *cdsA* gént. A PAL sejtek kompenzálni igyekeznek a fénybegyűjtő fehérjekomplexek, a fikobiliszómák hiányát, ezért a mutánsban nagyobb a PSII/PSI aránya. A PAL mutáns másik előnye, hogy lehetővé teszi a PSII fluoreszcencia jeleinek könnyebb értelmezését, hiszen itt a klorofill-fehérje komplexből származó jelek nem fednek át a fikobiliszómából származókkal. A sejtekből kapott magas Fv/Fm érték a magasabbrendű növényekéhez hasonló, ami biztosítja az OJIP fluoreszcencia görbék könnyebb értelmezését.

A PAL/ $\Delta cdsA$ sejtek életben tartásához PG-hozzáadás volt szükséges, amelyet a sejtek felvettek a külső tápoldatból, lehetővé téve növekedésüket. Hosszú ideig tartó PG-éhezés (20 nap) hatására sem változott jelentősen a PAL/ $\Delta cdsA$ sejtek klorofilltartalma, amit az abszorpciós spektrumaik is mutatnak. Ezek az eredmények ellentétesek a $\Delta pgsA$ sejtek esetében észleltekkkel, ahol hosszabb ideig tartó PG-éhezés hatására a sejtek klorofilltartalma mintegy 30%-kal lecsökkent (Hagio és mtsai, 2000). A PAL/ $\Delta cdsA$ mutáns esetében észlelt jelentéktelen változás annak is tulajdonítható, hogy ebben a mutánsban nagyobb a PSII/PSI arány mint a $\Delta pgsA$ -ban. Ez utóbbiban kimutatták, hogy 20 napig tartó PG-éhezés hatására a PSI-tartalom jelentősen lecsökkent (Domonkos és mtsai, 2004). Mivel a PAL/ $\Delta cdsA$ sejtek PSI-tartalma már eleve kisebb, így a PSI-tartalom további csökkenése nem valószínűsíthető. A CP43 és CP47 Chl-*a* molekulákat tartalmazzák, melyek a PAL/ $\Delta cdsA$ sejtekben a kizárólagos fénybegyűjtő pigmentek. Ez indokolhatja, hogy a mutáns sejtek PG-éhezés körülményei között is megőrzik klorofilltartalmukat. Egy másik magyarázat a két

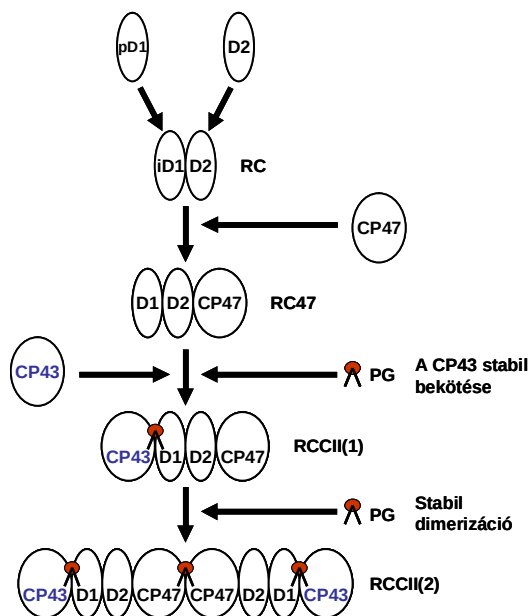
mutáns hosszantartó PG-hiány okozta különbségeire, hogy a PAL/ $\Delta cdsA$ sejtek lassabban osztódnak, mint a $\Delta pgsA$ sejtek.

PG hiányában a sejtek osztódása gátolt, hasonlóan a $\Delta pgsA$ (Hagio és mtsai, 2000) és a $\Delta cdsA$ (Sato és mtsai, 2000) esetében észleltekhöz. Az elektronmikroszkópos felvételek (16. ábra) PG hiányában két-háromszoros sejtméretbeli növekedést mutatnak és számos morfológiai rendellenesség is megfigyelhető volt. Nagyon sok az osztódó sejt annak ellenére, hogy a sejtszám nem növekedik. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a PG-nek szerepe lehet a cianobaktérium sejtek osztódásában, hasonlóan, mint a kardiolipinnek egyes baktériumok esetében (Mileykovskaya és Dowhan, 2005). Negatív töltése révén a PG segítheti az osztódási gyűrű kialakításában szerepet játszó speciális membránfehérjék elrendezését a sejt központi részén, illetve pólusán. Ennek révén a PG részt vehet az osztódási gyűrű helyének meghatározásában. Ezen lipid-fehérje kölcsönhatások feltárása igen hasznos lenne, hiszen akkor jobban megérthetnénk, hogyan történik a kloroplasztiszok osztódása.

A 2D-BN/SDS-PAGE fehérjeanalízis eredményei megerősítették azokat a megfigyeléseket, amelyeket korábban a $\Delta pgsA$ sejtekben kimutattak. A PG-megvonás mind a PSII dimerek, mind a PSI trimerek destabilizációjához vezetett (Sakurai és mtsai, 2003; Domonkos és mtsai, 2004). Mindamellet sikerült a PG-megvonást egy új szempontból vizsgálni, amely eddig még ismeretlen volt. Nevezetesen, a CP43 leválását/destabilizálódását a PSII RCC-ről. A monomer PSII RCC szerkezetében megfigyelhetjük, hogy a CP43 a D1 oldalán, a CP47 pedig a D2 oldalán szimmetrikusan helyezkednek el (Zouni és mtsai, 2001). Ismert, hogy a CP43 könnyebben leválik a PSII RCC-ről mint a CP47 (Akabori és mtsai, 1988; Yamaguchi és mtsai, 1988). A *Synechocystis* sejtekben mindig találunk olyan PSII RCC frakciót, amely nem tartalmaz CP43-at (RC47). Feltételezzük, hogy a CP43 leválását eddig azért nem detektálták, mert a 2D-BN/SDS-PAGE-nek sokkal nagyobb a felbontóképessége, mint a cukorgradiens centrifugálós izolálása, amit korábban használtak. Nagy a valószínűsége annak, hogy a monomer PSII RCC frakciója, amelyet centrifugálással kaptak, nem csak eredeti RCCII(1)-ket, hanem CP43-hiányos komplexeket (RC47) is tartalmazott. Ezt az elképzelésünket támasztja alá az, hogy Sakurai és mtsai (2003) ebben a frakcióban kimutatták a Psb28 fehérjét, amely inkább a RC47 komponense,

mint az RCCII(1)-é. Úgy tűnik, hogy a PG-nek szerepe van a CP43-nak a PSII RCC-ba való bekötődésében. A PG-megvonás hatására bekövetkező CP43 disszociációja hozzájárulhat a PSII RCC dimerek destabilizációjához is. A CP43 részt vesz a vízbontó komplex perifériás fehérjének a RC-hoz történő kötődésében (Isogai és mtsai, 1985; Zouni és mtsai, 2001). A dimer PSII RCC szerkezetének stabilizálásában a 33 kDa fehérjének különösen nagy jelentősége van. Figyelembe véve azt, hogy a CP43 az oxigénfejlesztő komplex Mn_4Ca klaszterének a rögzítésében vesz részt, a CP43 leválása lehet a felelős a PG-hiány PSII donor oldalán észlelt hatásaiért (Sakurai és mtsai, 2007).

A PSII fehérjék szintézisét és azok beépülését a RCC-ba [^{35}S]-el jelölt metionint használva követtük nyomon. Az eredmények megerősítik Sakurai és mtsai (2003) megfigyeléseit, hogy a PG-kiürülésnek nincs hatása a PSII fehérjealagságok szintézisére és a D1 fehérje szelektív kicserélődésére. Eredményeink arra utalnak, hogy a PG fontos szerepet játszik a CP43-nak a PSII RCC-ba való beépülésében. A legújabb PSII röntgenkristallográfiás szerkezet (Guskov és mtsai, 2009) két PG-molekula jelenlétét igazolta a D1 és CP43 fehérjék között.



28. ábra. A PG-molekulák szerepe a PSII RC-ok felépülésében

A lipidmolekula színes rajza mutatja a PG feltételezett helyét a CP43 szomszédságában az [RCCII(1)]-ben, valamint a CP47-en keresztül kapcsolódó dimerek kialakításában, az [RCCII(2)]-ben; pD1, pre-D1 polipeptid; iD1, inaktív D1 intermedier.

A 2D-BN/SDS-PAGE alapján nem lehet egyértelműen eldönteni, hogy a CP43 *in vivo* válik le, vagy nagyon lazán kötött, és a natív gélelektroforézishez szükséges detergenskezelés okozza a leválását. Ahhoz, hogy meggyőződjünk a CP43 *in vivo* leválásáról megmértük a sejtek alacsony hőmérsékletű fluoreszcenciáját. A PG-éheztetett PAL/ $\Delta cdsA$ sejtek alacsony hőmérsékletű fluoreszcenciaemissziós spektruma jelentős növekedést mutatott a 685 nm-es csúcsnál (F_{685}), összehasonlítva a kontrollként szolgáló, PG jelenlétében nevelt sejtekéhez. A fikobiliszóma még a 440 nm-es gerjesztésnél is jelentősen hozzájárul az F_{685} emissziójához (Sakurai és mtsai, 2007), azonban ennek hiányában az F_{685} növekedés kimondottan a Chl-*a* molekulát kötő proteineknek, főként a CP43-nak tulajdonítható (Andrizhiyevskaya és mtsai, 2005). Az F_{685} csúcs növekedése származhat a CP43 megnövekedett mennyiségéből, vagy a fluoreszcenciaemisszió növekedéséből, amely a CP43-nak a RC többi részétől való leválásának tulajdonítható. A kétdimenziós gélelektroforézises adatok nem utalnak a CP43 abszolút mennyiségének megnövekedésére (17. ábra), így az előbbi feltételezés nem valószínű. Azonban a fehérjeanalízis eredménye rámutatott arra, hogy jelentős mennyisége a CP43-nak a RCCII-ről levált. Úgy gondoljuk, hogy a CP43 *in vivo* leválása lehet a legvalószínűbb oka az F_{685} növekedésének.

Korábban kimutatták, hogy PG-éhezés hatására a $\Delta pgsA$ sejtekben a PSII elektrontranszport-folyamatai jelentősen lelassultak (Hagio és mtsai, 2000). Az elektrontranszport-folyamat lelassulását észlelték a $\Delta cdsA$ esetében is (Sato és mtsai, 2000), a PAL/ $\Delta cdsA$ sejtek pedig ugyanezt megerősítették. Gombos és mtsai (2002) a flash indukált fluoreszcencia görbék változásai, valamint a TL eredményei alapján kimutatták, hogy a PG-kiürülés az elektrontranszport-folyamatok gátlásával járt. Ennek okaként a Q_A és Q_B közötti elektrontranszport lelassulását valószínűsítették. A PG kinonmolekulák bekötődésében játszott szerepét támasztják alá Guskov és mtsai (2009) röntgenkristallográfiás vizsgálatai, amelyek egy PG-molekulát mutattak ki a Q_B kötőhelyen. Sakurai és mtsai (2007) nemrégiben feltételezték, hogy PG hiányában a PSII donor oldala is sérül. Feltételezésüket, a fluoreszcenciaindukció valamint oxigénfejlődés mérésekkel támasztották alá. Azonban az oxigénfejlődést mesterséges elektrondonor és -akceptor segítségével mérték, izolált tilakoidmembránokon, ezért nem összehasonlíthatóak az általunk alkalmazott oxigénfejlődési mérésekkel, amelyeket egész sejteken mértünk.

A B és a Q TL sávok pozíciója tükrözik az $S_2Q_B^-$ és $S_2Q_A^-$ akceptor-donor párok közötti töltésrekombinációk aktiválási energiáit (Vass és mtsai, 1981), A PG jelenlétében nevelt PAL/ $\Delta cdsA$ sejtek esetében a TL csúcs 27 °C-nál jelent meg. Ez a hőmérsékleti csúcs hasonló volt a vad típusú sejteknél azonos körülmények között mért B sávhoz (Gombos és mtsai, 2002). Ez az eredmény azt jelenti, hogy a PG jelenlétében nevelt sejtekben az elektrontranszport a Q_B környezetében zavartalan. A PG-hiányos sejtekben a TL csúcs 19 °C-nál jelentkezik, hasonlóan a DCMU-val kezelt sejtekben megjelenő Q sáv helyzetéhez (Vass és mtsai, 1981).

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a Q_A^- , Q_B^- és S_2 energiaszintekre a PG rövid ideig tartó megvonása nem volt hatással. Hét napig tartó PG-megvonás hatására a TL sáv pozíciója (B csúcs) nem változott meg, ugyanazon a hőmérsékleten jelenik meg, mint a PG-kezelt sejtek esetében. 14 napos PG-éhezés hatására a B sávhoz tartozó hőmérsékleti érték a Q sáv irányába tolódott el. Ez azt jelenti, hogy az elektronátadás a Q_A^- -ről a Q_B^- -re zavart szenvedett. Ha a PG-t visszaadtuk a nevelési médiumhoz, a B sáv teljesen helyreállt. A kapott eredmények a TL-görbe alapján (20. ábra) mások voltak, mint amit olyan izolált tilakoidmembránokból kaptak, ahol a PG-t foszfolipáz kezeléssel távolították el (Droppa és mtsai, 1995). Ez utóbbi kezelés a Q_B^- gyors oxidációját okozta, valamint a B és Q sáv intenzitásának a csökkenéséhez vezetett, ezzel egyidőben pedig a C sáv intenzitása nőtt. Ez a PSII donor oldalának súlyos sérülésére utal. A PAL/ $\Delta cdsA$ sejtek esetében észlelt termolumineszcencia mintázatban a B sáv eltolódott a Q sáv irányába, de a B sáv amplitudója összehasonlítható volt a Q sávéval. Ez azt mutatja, hogy PG hiányában a PSII donor oldala nem károsodott.

A PAL/ $\Delta cdsA$ mutáns sejteknek magas a PSII/PSI aránya, ennek következtében magas az Fv/Fm értékük. Ez lehetővé teszi a Chl-*a* fluoreszcencia („Kautsky effektus”; (Kautsky és mtsai, 1960) és főként a gyors OJIP fázis átmenetek jobb értelmezését. A Q_A redukciója, valamint az elektrontranszportlánc redukciója alatt megnő a fluoreszcencia intenzitása (Duysens és Sweers, 1963; Murata és mtsai, 1966; Malkin és Kok, 1966; Schansker és mtsai, 2005; Lazar, 2006). A PAL/ $\Delta cdsA$ sejtek PG-éhezése alatt megfigyelhettük a fluoreszcencia J fázisának fokozatos növekedését, hasonlóan a növekvő koncentrációjú DCMU vagy dibromothymoquinone jelenlétében észlelteknél (Schansker és mtsai, 2005). Éppen ezért a J-fázisban megfigyelt növekedés két okra is visszavezethető. Vagy teljesen aktív RC-ok és olyan RC-ok keverékéből ered, ahol a

Q_A^- és Q_B közötti átmenet teljesen gátolt, vagy csak olyan RC-ból, amelyekben a Q_A^- és Q_B közötti elektrontranszport-folyamat lelassult. A TL méréseknél a B sáv eltolódása a Q sáv irányában azt jelzi, hogy nem teljes gátlásról van szó, hanem az elektrontranszport-folyamatok lelassulásáról a PSII RC-ok akceptor oldalán.

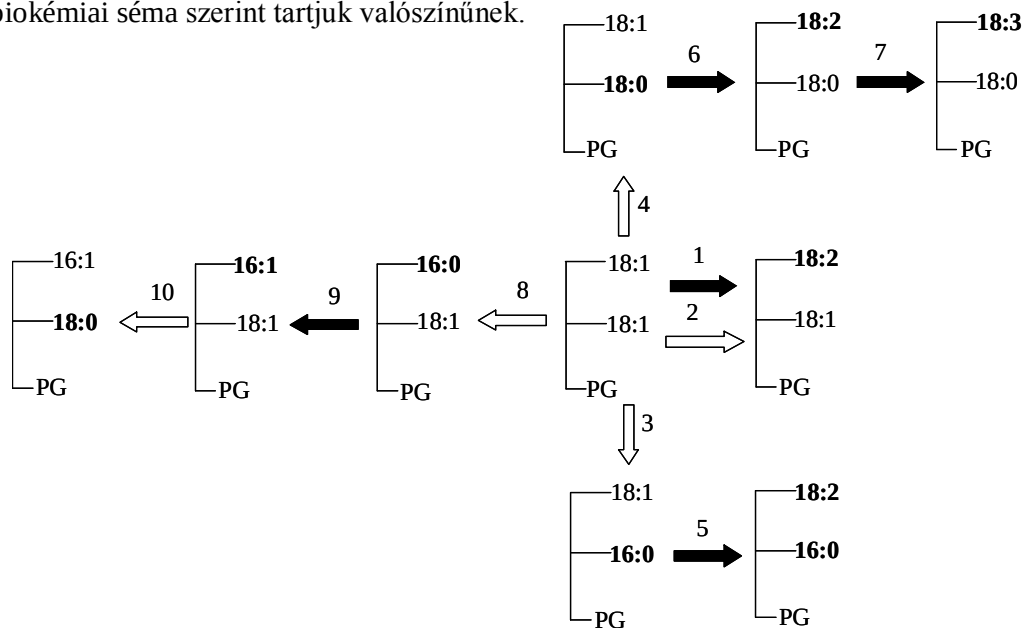
Hogy megvizsgáljuk annak lehetőségét, hogy PG-megvonás hatására a PSII gátlása elsősorban a PSII donor oldalán jelentkezik, ahogy azt Sakurai és mtsai (2007) javasolták, összehasonlítottuk a PG-éheztetett PAL/ $\Delta cdsA$ sejtek OJIP fluoreszcenciáját a PG jelenlétében nevelt, hőkezelt sejtekével, melyekben részben inaktiváltuk az oxigénfejlődést (Enami és mtsai, 1994; Yamane és mtsai, 1998). Ezek a sejtek alacsony J és Fm értékeket mutattak, az értékek DCMU hozzáadásával nagymértékben visszaállíthatók voltak (21/C ábra). Mivel ez a jelenség jól láthatóan különbözött a PG-éheztetett sejtekben megfigyelttől, megállapíthattuk, hogy a vízbontó komplex gátlása elhanyagolható. Ezt megerősíti az a tény is, hogy a B és Q TL sávok intenzitása még 14 napig tartó PG-éhezés hatására sem csökkent (20. ábra). A PG-éheztetett PAL/ $\Delta cdsA$ sejtek esetében észlelt magasabb F_0 érték (21/A ábra) összefüggésbe hozható az alacsony hőmérsékletű fluoreszcenciánál is észlelt F_{685} növekedéssel, amely a CP43 részleges leválásából adódik.

6.2. A PG-molekula átépülése

A GC vizsgálatok jelezték a PG(18:1/18:1) átépülését a $\Delta pgsA$ sejtekben, hasonlóan a PAL/ $\Delta cdsA$ sejtek esetében megfigyeltekhez. Ezt a tápoldathoz adott szintetikus PG-t a cianobaktériumok szükségleteiknek megfelelően átalakították. Az átépülés során természetes PG-molekulák képződtek a sejtekben, amelyek esszenciálisak egyes sejtfunciók fenntartásához. Korábbi tanulmányok rámutattak a PG(18:2/16:0) jelentőségére, amely szükséges az alacsony hőmérsékleti fotoinhibíció kivédéséhez (Gombos és mtsai, 1994; Tasaka és mtsai, 1996). Ez adhat magyarázatot arra, hogy a PG átépülése főként a PG(18:2/16:0) molekulatípus képződését eredményezi, további deszaturáció nagyon ritkán fordul elő. Annak ellenére, hogy a GC vizsgálatok jelezték a PG-molekulák átépülését, a PG-típusok pontos szerkezeti azonosítását, és ezáltal az átalakítási folyamatok felderítését a nagyérzékenységű MS módszerek tették lehetővé. Az eredmények megbízhatósága érdekében fontos volt

ellenőrizni a 21 napig tartó PG-éhezés után a $\Delta pgsA$ sejtek életképességét. Korábban kimutatták, hogy PG-éhezés hatására a fotoszintetikus aktivitás lecsökkent, de a PG visszaadása az eredeti aktivitást helyreállította (Hagio és mtsai, 2000; Gombos és mtsai, 2002). A sejtek életképességét minden mintavételi pontnál ellenőriztük az életképes kolóniák számlálásával.

Az MS analízis eredményei alapján a PG-átépülést a 29. ábrán összefoglalt biokémiai séma szerint tartjuk valószínűnek.



29. ábra. A $\Delta pgsA$ sejtek PG átépülését szolgáló feltételezett bioszintetikus utak

A számok enzimatis reakciókat, a vastagbetűs részek az átépült zsírsavakat jelölik. A kicserélődési és deszaturációs reakciókat világos, illetve sötét nyílak mutatják. A „PG” jelöli a foszfatidil-glicerinn fejcsoportját, a foszfoglicerint.

Az első lehetséges enzimatis reakció (sötét nyíl) a sejtekhez adott PG(18:1/18:1) molekulából kiindulva az 1-es, amely egy acil-lipid deszaturáció. Ennek eredményeképpen olajsavból egy linolsav képződik. Az acil-lipid deszaturáz, amely ezt a reakciót katalizálja (30. ábra) jól ismert és jellemzett a cianobaktériumokban (Wada és Murata, 1989; Murata és mtsai, 1992b). Cianobaktériumokban a lipidek deszaturációját csakis acil-lipid deszaturázok végzik (Higashi és Murata, 1993).

A 2-, 3-,4 és 8-as útvonalak (29. ábra, világos nyílak) olyan szintetikus utakat jelölnek, amelyhez legalább két különböző enzim által katalizált lépésre van szükség. Ezen reakciók során olyan PG-típusok keletkeznek, amelyek a kiindulási 18:1-től

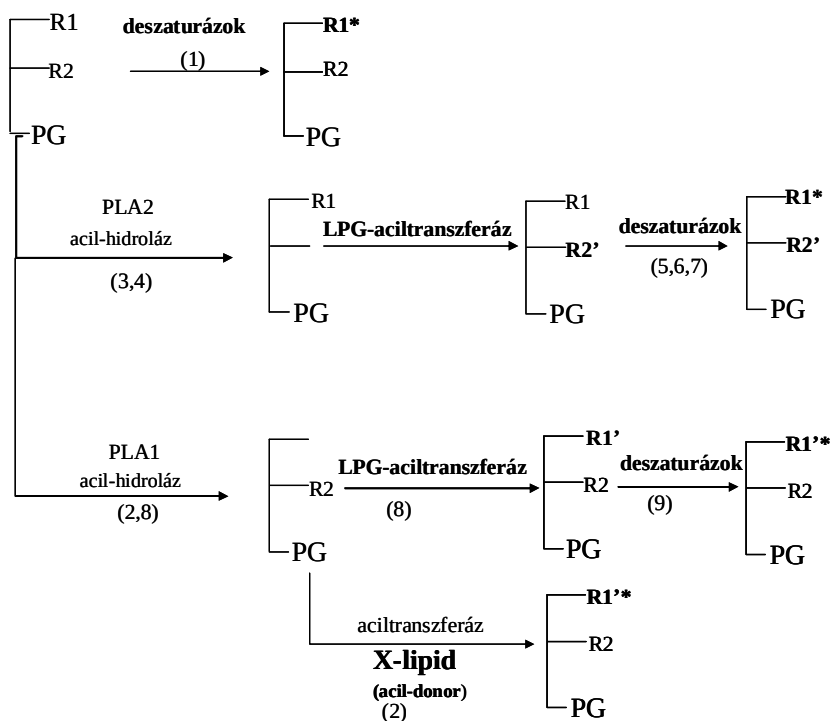
eltérő, 16:0 és 18:0 zsírsavakat tartalmaznak. Az első lépésben a zsírsavak lehasítódnak az *sn*-1, vagy az *sn*-2 helyzetből, amihez PLA1-re és PLA2-re van szükség. Egy alternatív bioszintetikus út lehet az acil-hidrolázok által katalizált reakció is (Mignery és mtsai, 1984; Matos és Pham-Thi, 2009). A 3-as és 4-es enzimatis lépésekhez a sejteknek PLA2-re van szüksége (30. ábra), amely egy acilcsoportot tud lehasítani az *sn*-2 helyzetből. A 2-vel és 8-sal jelölt reakció PLA1-et igényel (30. ábra), amely az észter kötést *sn*-1 helyzetben tudja hasítani. Az acil-hidrolázok nem specifikusak: mind az *sn*-1, mind az *sn*-2-ben lévő zsírsavat képesek hidrolizálni (Wang, 2004). A *Synechocystis* cianobaktériumokban a foszfolipázokat, acil-hidrolázokat, és azok génjeit még nem sikerült azonosítani. A homológ szekvenciák keresése nem hozott pozitív eredményeket. Ez azt mutatja, ha a *Synechocystis* cianobaktériumban vannak foszfolipázok és acil-hidrolázok, akkor azok lényegesen eltérőek a magasabbrendű növényekben ismert megfelelőiktől.

A második lépés az acilcsoportok beépítése, amihez aciltranszferáz enzimekre van szükség (30. ábra). Ezek specifikus “acil carrier” tulajdonsággal rendelkeznek, és képesek az új zsírsavakat a glicerinvázba beépíteni, vagyis az észterezési reakciót katalizálni. A cianobaktériumokban nemrégiben azonosították a 16:0 specifikus LGP-aciltranszferázt (Weier és mtsai, 2005), amely fontos szerepet játszhat az általam észlelt fő termék a PG(18:1/16:0) létrehozásában. A kicserélt zsírsavak tovább deszaturálódhatnak (29. ábra, 5, 6, 7 és 9-es út). Zsírsav kicserélődés történhet a PG és másfajta lipidmolekulák között is (30. ábra, 2-es út). Cianobaktériumokban ismert az acil-ACP: lyso-MGDG-aciltranszferáz (Chen és mtsai, 1988), így feltételezhetjük, hogy a 18:2 zsírsav beépülhet a lizo-PG molekula *sn*-2 helyzetébe.

Egy nappal a PG(18:1/18:1) visszaadása után a leggyakoribb ez a PG-típus volt, amely a PG-tartalomnak mintegy 90%-át képviselte. Ennek ellenére nagyon kis mennyiségben kimutathatók a 18:2 és 16:0 tartalmú PG-formák, amelyek a 21 napos PG-éhezés után még a sejtekben maradtak, biztosítva életben maradásukat. A deszaturáció termékei már egy nappal a dioleoil-PG visszaadása után megjelentek. A két hétig dioleoil-PG jelenlétében nevelt sejtek esetében a teljes PG-tartalomnak mintegy 50%-a tartalmazott 18:2-t, amely a leggyakoribb deszaturációs termék volt. A 18:2 az *sn*-1 helyzetben észtereződött. 21 nappal a dioleoil-PG visszaadása után egy

jelentős 16:0 felhalmozódást is megfigyeltünk. Ez a zsírsav a PG-molekuláinak főként *sn*-2 helyzetébe észtereződött.

A fenti enzimatis reakciók képesek a PG-molekula átépítésére, biztosítva egy olyan szabályozó rendszert, amely lehetővé teszi a változó környezeti feltételekhez való alkalmazkodást (Murata és mtsai, 1982; Wada és Murata, 1990). Az általunk javasolt PG-átépítési séma (30. ábra.) elkészítésében alapul szolgáltak a cianobaktériumokban és a magasabbrendű növényekben eddig megismert, a lipidszintézisben szerepet játszó enzimreakciók (Wang, 2001; Wada és Murata, 2007; Yang és mtsai, 2007). Az általam kapott eredmények rámutatnak olyan enzimreakciók léteire, amelyek eddig csak magasabbrendű növényekben voltak ismertek, cianobaktériumokban nem.



30. ábra. Zsírsavak átépülése *sn*-2 és *sn*-1 helyzetekben

A számok ugyanazokat az enzimatis reakciókat jelölik, mint a 29-es ábrán. A használt szimbólumok a kicserélődést (') és a desaturációt (*) jelölik, mind az *sn*-1, mind az *sn*-2 helyzetekben. Az átépült zsírsavak (R₁, R₂) és az ismert enzimek vastagon vannak szedve. A „PG” jelöli a foszfatidil-glicerin fejcsoportját, a foszfoglicerint.

7. Összefoglalás

Munkám során célul tűztem ki olyan PG-hiányos mutáns előállítását, amelyben könnyebben tanulmányozható a PG-nek a PSII szerkezetében és funkciójában betöltött szerepe, mint a korábban már vizsgált mutáns törzseken. Vizsgálni kívántam továbbá azokat az enzimatikus folyamatokat, amelyek lehetővé teszik a kívülről adott szintetikus PG átépítését a cianobaktériumok számára optimális PG-molekulákká.

Kísérleteimet az általunk létrehozott PAL/ Δ *cdsA*, valamint a már korábban is tanulmányozott Δ *pgsA* (Hagio és mtsai, 2000) mutáns törzseken végeztem, amelyek nem képesek PG-t szintetizálni. Az autotrof mutánsokat a PG kívülről történő pótlásával tartottuk fenn. Korábban kimutatták, hogy a PG-nek fontos szerepe van a fotoszintetikus apparátus felépítésében és működésében (Wada és Murata, 2007), de pontos funkciója nem volt ismert.

Kutatásaim eredményeit röviden, pontokban szedve a következőkben foglalom össze:

I. Létrehoztuk a PAL/ Δ *cdsA* mutáns törzset, amelyben inaktiváltuk a *cdsA* gént, amely a CDP-DG szintáz nevű enzimet kódolja, mely a PG-szintézis egyik enzime. A *cdsA* gén inaktiválását a fikobiliszóma-mentes PAL mutánsban hajtottuk végre, hiszen a fikobiliszóma hiánya következtében számos előnyös tulajdonsága van: a PSI RC-hoz képest több PSII RC-ot tartalmaz, mint a vad típusú sejtek, ezért a fluoreszcencia adatok könnyebben értelmezhetők, hiszen a PSII-ből származó jelek nem fednek át a fikobiliszómából jövő jelekkel. Ha a nevelési médiumból a PG-t elvontam, nyomomonkövethettem a PG-megvonás következményeit

II. A sejtek osztódásának sebessége a PG-megvonás hatására fokozatosan csökkent, majd leállt. A sejtek mérete nőtt, hiszen PG hiányában a sejtek megrekedtek az osztódás egy adott fázisában, és nem tudtak kettéválni. A méretnövekedés a PG-nek a sejtosztódás szabályozásában játszott szerepét valószínűsíti. A sejtek klorofilltartalma jelentősen nem változott, de a tilakoidmembránok rendezettsége felbomlott.

III. A PAL/ Δ *cdsA* mutáns ideális kísérleti rendszer a PSII szerkezetének és működésének tanulmányozására. Kétdimenziós gélelektroforézist alkalmazva, PG-megvonás hatására a PSII RCC-ok szerkezetének destabilizációját figyelhetjük meg, amely a CP43 leválásának köszönhető (az RC47 tartalom megnövekedett). Tehát a PG-molekula, mintegy ragasztóként a CP43 klorofill-protein antennát a PSII RCC-hoz

kapcsolja. A PSI RCC trimerek és PSII RCC dimerek lecsökkenése is megfigyelhető, hiszen a PG-nek szerepe van a trimerizációban és a dimerizációban egyaránt. A fehérjeszintézist a [^{35}S] metionin fehérjékbe történő beépülésével követtük. A jelölt metionin beépülése a főbb PSI és PSII fehérjékbe PG hiányában is folyamatosan megtörtént.

Az alacsony hőmérsékletű fluoreszcencia mérések is alátámasztják a CP43 leválását a PSII RCC-ből. PG hiányában az F_{685} nm-es csúcs megnövekedett, hiszen gátolt az energia hatékony továbbadása a CP43-ról a CP47 irányába, amit a CP43 leválása magyarázhat.

PG-megvonás hatására az elektrontranszport-folyamatok zavart szenvedtek. Főként a PSII akceptor oldala sérült. Ezt támasztja alá az oxigénfejlődés inaktíválódása, amely a Q_B környezetében történő változásra utal. A TL-görbe megváltozása, vagyis a B-sávnak Q-sáv irányába való eltolódása, szintén az elsődleges és másodlagos kinon akceptorok közötti elektrontranszportban történő zavart jelez, ami szintén alátámasztja az akceptoroldali gátlást. Az OJIP fluoreszcenciaindukció is megváltozik PG-megvonás hatására, ami szintén a Q_A és Q_B közötti elektrontranszport-folyamatok lassulására utal.

A PG-megvonás a donoroldalt is károsíthatja, valószínűleg egy későbbi stádiumban. Ezt bizonyítja a hőkezelt minták OJIP fluoreszcenciája. Ez a hatás nagyon kicsinek tűnik, és feltételezhető, hogy a CP43-nak a PSII RCC-ből való leválásával hozható összefüggésbe, mivel ez a klorofill-fehérje antenna közvetlenül részt vesz a Mn_4Ca klaszter RC-hoz történő kapcsolódásában.

IV. A $\Delta pgsA$ és $\text{PAL}/\Delta cdsA$ sejteket kívülről adott PG(18:1/18:1)-el tartottuk életben. GC vizsgálataink során megfigyeltük, hogy a mutáns sejtek PG-molekulái a 18:1 zsírsavon kívül más zsírsavakat is tartalmaztak. Ez bizonyítja, hogy a szintetikus PG *in vivo* átépült, számos természetes PG-molekulatípust hozva létre. Az átépülés során képződött PG-molekulákat nagyérzékenységű tömegspektrometria módszerével azonosítottuk. Az átépítés termékei bizonyítékkul szolgálnak arra, hogy a vizsgált *Synechocystis* cianobaktérium rendelkezik azzal az enzimmérettel, amely képes átépíteni a PG-molekulát.

Az átépüléshez szükséges enzimek a következők: a PLA1 és PLA2, acil-hidrolázok, amelyek szükségesek a zsírsavaknak a glicerinvázról való lehasításához; a LPG-aciltranszferázok, melyek beépítik az újabb zsírsavakat és az acil-deszaturázok,

amelyek a kettős kötéseket alakítják ki a zsírsavláncban. Ezen enzimeket és génjeiket *Synechocystis* cianobaktériumban eddig még nem sikerült azonosítani.

Kísérleti eredményeim bizonyítják, hogy cianobaktériumokban a PG-átépülési folyamatok zajlanak, amelyek biztosítják a sejek változó környezeti feltételekhez való alkalmazkodását.

8. Idézett közlemények

- Ajlani G, Vernotte C** (1998) Construction and characterization of a phycobiliprotein-less mutant of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Mol Biol* **37**: 577-580
- Akabori K, Tsukamoto H, Tsukihara J, Nagatsuka T, Motokawa O, Toyoshima Y** (1988) Disintegration and Reconstitution of Photosystem-II Reaction Center Core Complex .1. Preparation and Characterization of 3 Different Types of Subcomplex. *Biochim Biophys Acta* **932**: 345-357
- Al'Araji YT, Walton TJ** (1980) Fatty acid biosynthesis in cell free preparations of *Anabaena cylindrica*. In P Mazliak, P Benveniste, C Costes, R Douce, eds, *Biogenesis and Function of Plant Lipids*. Elsevier, North Holland Biochemical Press, Amsterdam, pp 259-262
- Allen MM** (1968) Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. *J Phycol* **4**: 1-4
- Anderson LK, Toole CM** (1998) A model for early events in the assembly pathway of cyanobacterial phycobilisomes. *Mol Microbiol* **30**: 467-474
- Andrizhiyevskaya EG, Chojnicka A, Bautista JA, Diner BA, van Grondelle R, Dekker JP** (2005) Origin of the F685 and F695 fluorescence in Photosystem II. *Photosynth Res* **84**: 173-180
- Barber J** (1994) Molecular basis of the vulnerability of Photosystem II to damage by light. *Aust J Plant Physiol* **22**: 201-208
- Barber J** (2003) Photosystem II: the engine of life. *Q Rev Biophys* **36**: 71-89
- Barber J, Rivas JD** (1993) A functional model for the role of cytochrome b559 in the protection against donor and acceptor side photoinhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 10942-10946
- Benson AA, Maruo B** (1958) Plant Phospholipids. Identification of the phosphatidyl glycerols. *Biochim Biophys Acta* **27**: 189-195
- Benson AA, Maruo B** (1989) A 'nova' in phosphate metabolism, GPG, and discovery of phosphatidylglycerol: a commentary on 'Plant Phospholipids. I. Identification of the Phosphatidyl Glycerols'. *Biochim Biophys Acta* **1000**: 447-451
- Bligh EG, Dyer WJ** (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**: 911-917
- Bricker TM, Frankel LK** (2002) The structure and function of CP47 and CP43 in Photosystem II. *Photosynth Res* **72**: 131-146
- Bryant DA** (2009) *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. p: CP-1

- Chen HH, Wickrema A, Jaworski JG** (1988) Acyl-acyl-carrier protein: lysomonogalactosyldiacylglycerol acyltransferase from the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Biochim Biophys Acta* **963**: 493-500
- Dobakova M, Tichy M, Komenda J** (2007) Role of the PsbI protein in photosystem II assembly and repair in the cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC 6803. *Plant Physiol* **145**: 1681-1691
- Domonkos I, Malec P, Sallai A, Kovacs L, Itoh K, Shen GZ, Ughy B, Bogos B, Sakurai I, Kis M, Strzalka K, Wada H, Itoh S, Farkas T, Gombos Z** (2004) Phosphatidylglycerol is essential for oligomerization of photosystem I reaction center. *Plant Physiol* **134**: 1471-1478
- Dowhan W** (1997) Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids? *Annu Rev Biochem* **66**: 199-232
- Droppa M, Horvath G, Hideg E, Farkas T** (1995) The role of phospholipids in regulating photosynthetic electron transport activities: treatment of thylakoids with phospholipase C. *Photosynth Res* **46**: 287-293
- Duysens LNM, Sweers HE** (1963) Mechanism of the two photochemical reactions in algae as studied by means of fluorescence. In Japanese Society of Plant Physiologists, ed, *Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria*. University of Tokyo Press, Tokyo, pp 353-372
- Enami I, Kitamura M, Tomo T, Isokawa Y, Ohta H, Katoh S** (1994) Is the primary cause of thermal inactivation of oxygen evolution in spinach PS II membranes release of the extrinsic 33 kDa protein or of Mn. *Biochim Biophys Acta* **1186**: 52-58
- Facciotti D, Knauf V** (1998) Triglycerides as products of photosynthesis, genetic engineering, fatty acid composition and structure of triglycerides. In PA Siegenthaler, N Murata, eds, *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp 225-248
- Fodorpataki L** (2004) A fényszakasz fotokémiai folyamatai. A növények fotoszintézise. *Kriterion Kiadó, Kolozsvár*, pp 84-107
- Froehlich JE, Poorman R, Reardon E, Barnum SR, Jaworski JG** (1990) Purification and characterization of acyl carrier protein from 2 cyanobacteria species. *Eur J Biochem* **193**: 817-825
- Fromme P** (1996) Structure and function of photosystem I. *Curr Opin Struct Biol* **6**: 473-484
- Gantt E** (1994) Supramolecular membrane organization. In DA Bryant, ed, *The molecular biology of cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 119-138

- Gombos Z, Wada H, Murata N** (1994) The recovery of photosynthesis from low-temperature photoinhibition is accelerated by the unsaturation of membrane-lipids - A mechanism of chilling tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 8787-8791
- Gombos Z, Kanervo E, Tsvetkova N, Sakamoto T, Aro EM, Murata N** (1997) Genetic enhancement of the ability to tolerate photoinhibition by introduction of unsaturated bonds into membrane glycerolipids. *Plant Physiol* **115**: 551-559
- Gombos Z, Varkonyi Z, Hagio M, Iwaki M, Kovacs L, Masamoto K, Itoh S, Wada H** (2002) Phosphatidylglycerol requirement for the function of electron acceptor plastoquinone Q(B) in the photosystem II reaction center. *Biochemistry* **41**: 3796-3802
- Guskov A, Kern J, Gabdulkhakov A, Broser M, Zouni A, Saenger W** (2009) Cyanobacterial photosystem II at 2.9-angstrom resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride. *Nat Struct Mol Biol* **16**: 334-342
- Hagio M, Gombos Z, Varkonyi Z, Masamoto K, Sato N, Tsuzuki M, Wada H** (2000) Direct evidence for requirement of phosphatidylglycerol in photosystem II of photosynthesis. *Plant Physiol* **124**: 795-804
- Hagio M, Sakurai I, Sato S, Kato T, Tabata S, Wada H** (2002) Phosphatidylglycerol is essential for the development of thylakoid membranes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **43**: 1456-1464
- Hanley J, Deligiannakis Y, Pascal A, Faller P, Rutherford AW** (1999) Carotenoid oxidation in photosystem II. *Biochemistry (Mosc)* **38**: 8189-8195
- Harwood JL, Jones AL, Perry HJ, Rutter AJ, Smith KL, Williams M** (1994) Changes in plant lipids during temperature adaptation. In AR Cossins, ed, *Temperature Adaptation of Biological Membranes*. Portland Press, London, pp 107-118
- Higashi S, Murata N** (1993) An in vivo study of substrate specificities of acyl-lipid desaturases and acyltransferases in lipid synthesis in *Synechocystis* PCC6803. *Plant Physiol* **102**: 1275-1278
- Hsu FF, Turk J** (2001) Studies on phosphatidylglycerol with triple quadrupole tandem mass spectrometry with electrospray ionization: Fragmentation processes and structural characterization. *J Am Soc Mass Spectrom* **12**: 1036-1043
- Isogai Y, Yamamoto Y, Nishimura M** (1985) Association of the 33 kDa polypeptide with the 43 kDa component in Photosystem II particles. *FEBS Lett* **187**: 240-244
- Jordan BR, Chow WS, Baker AJ** (1983) The Role of Phospholipids in the Molecular-Organization of Pea Chloroplast Membranes - Effect of Phospholipid Depletion on Photosynthetic Activities. *Biochim Biophys Acta* **725**: 77-86

- Jordan P, Fromme P, Witt HT, Klukas O, Saenger W, Krauss N** (2001) Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 angstrom resolution. *Nature* **411**: 909-917
- Jurgens UJ, Mantele W** (1991) Orientation of carotenoids in the outer-membrane of *Synechocystis* PCC 6714 (Cyanobacteria). *Biochim Biophys Acta* **1067**: 208-212
- Kamiya N, Shen JR** (2003) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3.7-angstrom resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 98-103
- Kautsky H, Appel W, Mann H** (1960) Chlorophyll fluorescence and carbon assimilation. Part XIII. The fluorescence and the photochemistry of plants. *Biochem Z* **332**: 277-292
- Kok B, Forbush B, McGloin M** (1970) Cooperation of charges in photosynthetic O₂ evolution-I. A linear four step mechanism. *Photochem Photobiol* **11**: 457-475
- Komenda J, Barber J** (1995) Comparison of *psbO* and *psbH* deletion mutants of *Synechocystis* PCC6803 indicates that degradation of D1 protein is regulated by the Q(B) site and dependent on protein synthesis. *Biochemistry (Mosc)* **34**: 9625-9631
- Komenda J, Reisinger V, Muller BC, Dobakova M, Granvogl B, Eichacker LA** (2004) Accumulation of the D2 protein is a key regulatory step for assembly of the photosystem II reaction center complex in *Synechocystis* PCC 6803. *J Biol Chem* **279**: 48620-48629
- Kruse O, Hankamer B, Konczak C, Gerle C, Morris E, Radunz A, Schmid GH, Barber J** (2000) Phosphatidylglycerol is involved in the dimerization of photosystem II. *J Biol Chem* **275**: 6509-6514
- Kuhlbrandt W, Wang DN, Fujiyoshi Y** (1994) Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature* **367**: 614-621
- Kuksis A, Itabashi Y** (2005) Regio- and stereospecific analysis of glycerolipids. *Methods* **36**: 172-185
- Lazar D** (2006) The polyphasic chlorophyll a fluorescence rise measured under high intensity of exciting light. *Funct Plant Biol* **33**: 9-30
- Lem NW, Stumpf PK** (1984) In vitro fatty acid synthesis and complex lipid metabolism in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* .1. Some characteristics of fatty acid synthesis. *Plant Physiol* **74**: 134-138
- Liberton M, Berg RH, Heuser J, Roth R, Pakrasi HB** (2006) Ultrastructure of the membrane systems in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp strain PCC 6803. *Protoplasma* **227**: 129-138

- Lichtenthaler HK** (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol* **148**: 350-382
- Loll B, Kern J, Saenger W, Zouni A, Biesiadka J** (2005) Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II. *Nature* **438**: 1040-1044
- Lynch DV, Thompson GA** (1984a) Chloroplast phospholipid molecular-species alterations during low-temperature acclimation in *Dunaliella*. *Plant Physiol* **74**: 198-203
- Lynch DV, Thompson GA** (1984b) Microsomal phospholipid molecular-species alterations during low-temperature acclimation in *Dunaliella*. *Plant Physiol* **74**: 193-197
- Lynch DV, Thompson GA** (1984c) Retailored lipid molecular-species - a tactical mechanism for modulating membrane-properties. *Trends Biochem Sci* **9**: 442-445
- Maeda S, Okamura M, Kobayashi M, Omata T** (1998) Nitrite-specific active transport system of the cyanobacterium *Synechococcus sp.* strain PCC 7942. *J Bacteriol* **180**: 6761-6763
- Malkin S, Kok B** (1966) Fluorescence induction studies in isolated chloroplasts. I. Number of components involved in the reaction and quantum yields. *Biochim Biophys Acta* **126**: 413-432
- Masamoto K, Furukawa K** (1997) Accumulation of zeaxanthin in cells of the cyanobacterium, *Synechococcus sp.* strain PCC 7942 grown under high irradiance. *J Plant Physiol* **151**: 257-261
- Matos AR, Pham-Thi AT** (2009) Lipid deacylating enzymes in plants: old activities, new genes. *Plan Physiol Biochem* **47**: 491-503
- Matsubara H, Wada K** (1988) Soluble cytochromes and ferredoxins. *Methods Enzymol* **167**: 387-410
- Mignery GA, Pikaard CS, Hannapel DJ, Park WD** (1984) Isolation and sequence-analysis of cDNAs for the major potato-tuber protein, patatin. *Nucleic Acids Res* **12**: 7987-8000
- Mileykovskaya E, Dowhan W** (2000) Visualization of phospholipid domains in *Escherichia coli* by using the cardiolipin-specific fluorescent dye 10-N-nonyl acridine orange. *J Bacteriol* **182**: 1172-1175
- Mileykovskaya E, Dowhan W** (2005) Role of membrane lipids in bacterial division-site selection. *Curr Opin Microbiol* **8**: 135-142
- Moore TS** (1974) Phosphatidylglycerol Synthesis in Castor Bean Endosperm: Kinetics, Requirements, and Intracellular Localization. *Plant Physiol* **54**: 164-168

- Moore TS** (1982) Phospholipid Biosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **33**: 235-259
- Mudd JB, Dezacks R** (1981) Synthesis of Phosphatidylglycerol by Chloroplasts from Leaves of *Spinacia-Oleracea* l (Spinach). *Arch Biochem Biophys* **209**: 584-591
- Munday JC, Jr., Govindjee** (1969) Light-induced changes in the fluorescence yield of chlorophyll a in vivo. III. The dip and the peak in the fluorescence transient of *Chlorella pyrenoidosa*. *Biophys J* **9**: 1-21
- Murata N, Nishida I** (1987) Lipids in blue-green algae (cyanobacteria). In PK Stumpf, ed, *The Biochemistry of Plants*. Academic Press, Orlando, pp 315-347
- Murata N, Siegenthaler PA** (1998) Lipids in photosynthesis: an overview. In PA Siegenthaler, N Murata, eds, *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp 1-20
- Murata N, Wada H** (1995) Acyl-lipid desaturases and their importance in the tolerance and acclimatization to cold of cyanobacteria. *Biochem J* **308**: 1-8
- Murata N, Nishimura M, Takamiya A** (1966) Fluorescence of chlorophyll in photosynthetic systems. Emission and action spectra of fluorescence--three emission bands of chlorophyll a and the energy transfer between two pigment systems. *Biochim Biophys Acta* **126**: 234-243
- Murata N, Sato N, Takahashi N, Hamazaki Y** (1982) Compositions and positional distributions of fatty-acids in phospholipids from leaves of chilling-sensitive and chilling-resistant plants. *Plant Cell Physiol* **23**: 1071-1079
- Murata N, Ishizakinishizawa Q, Higashi S, Hayashi H, Tasaka Y, Nishida I** (1992a) Genetically engineered alteration in the chilling sensitivity of plants. *Nature* **356**: 710-713
- Murata N, Wada H, Gombos Z** (1992b) Modes of fatty-acid desaturation in cyanobacteria. *Plant Cell Physiol* **33**: 933-941
- Mustardy L, Los DA, Gombos Z, Murata N** (1996) Immunocytochemical localization of acyl-lipid desaturases in cyanobacterial cells: Evidence that both thylakoid membranes and cytoplasmic membranes are sites of lipid desaturation. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 10524-10527
- Neubauer C, Schreiber U** (1987) The polyphasic rise of chlorophyll fluorescence upon onset of strong illumination: I. Saturation characteristics and partial control by the photosystem II acceptor side. *Z Naturforsch* **42C**: 1246-1254
- Nishida I, Murata N** (1996) Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: The crucial contribution of membrane lipids. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**: 541-568

- Nussberger S, Dorr K, Wang DN, Kuhlbrandt W** (1993) Lipid-protein interactions in crystals of plant light-harvesting complex. *J Mol Biol* **234**: 347-356
- Ohlrorge J** (1987) Biochemistry of plant acyl carrier proteins. In PK Stumpf, ed, *The Biochemistry of Plants Vol 9*. Academic press, New York, pp 137-157
- Ohlrogge J, Browse J** (1995) Lipid biosynthesis. *Plant Cell* **7**: 957-970
- Ohta A, Waggoner K, Radominskapyrek A, Dowhan W** (1981) Cloning of genes involved in membrane lipid synthesis - effects of amplification of phosphatidylglycerophosphate synthase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **147**: 552-562
- Okazaki K, Sato N, Tsuji N, Tsuzuki M, Nishida I** (2006) The significance of C16 fatty acids in the *sn*-2 positions of glycerolipids in the photosynthetic growth of *Synechocystis* sp PCC6803. *Plant Physiol* **141**: 546-556
- Olive J, Ajlani G, Astier C, Recouvreur M, Vernotte C** (1997) Ultrastructure and light adaptation of phycobilisome mutants of *Synechocystis* PCC 6803. *Biochim Biophys Acta* **1319**: 275-282
- Peschek GA** (1987) Respiratory electron transport. In P Fay, C van Baalen, eds, *The cyanobacteria*. Elsevier, New York, USA, pp 119-161
- Roughan PG, Slack CR** (1982) Cellular organization of glycerolipid metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **33**: 97-132
- Sakamoto T, Los DA, Higashi S, Wada H, Nishida I, Ohmori M, Murata N** (1994) Cloning of omega-3 desaturase from cyanobacteria and its use in altering the degree of membrane-lipid unsaturation. *Plant Mol Biol* **26**: 249-263
- Sakurai I, Hagio M, Gombos Z, Tyystjarvi T, Paakkarinen V, Aro EM, Wada H** (2003) Requirement of phosphatidylglycerol for maintenance of photosynthetic machinery. *Plant Physiol* **133**: 1376-1384
- Sakurai I, Shen JR, Leng J, Ohashi S, Kobayashi M, Wada H** (2006) Lipids in oxygen-evolving photosystem II complexes of cyanobacteria and higher plants. *J Biochem (Tokyo)* **140**: 201-209
- Sakurai I, Mizusawa N, Ohashi S, Kobayashi M, Wada H** (2007) Effects of the lack of phosphatidylglycerol on the donor side of photosystem II. *Plant Physiol* **144**: 1336-1346
- Sato N, Murata N** (1982a) Lipid biosynthesis in the blue-green-alga, *Anabaena variabilis* .1. Lipid Classes. *Biochim Biophys Acta* **710**: 271-278
- Sato N, Murata N** (1982b) Lipid biosynthesis in the blue-green-alga, *Anabaena variabilis* .2. Fatty-acids and lipid molecular-species. *Biochim Biophys Acta* **710**: 279-289

- Sato N, Murata N** (1988) Membrane lipids. *Methods Enzymol* **167**: 251-259
- Sato N, Seyama Y, Murata N** (1986) Lipid-linked desaturation of palmitic acid in monogalactosyl diacylglycerol in the blue-green alga (cyanobacterium) *Anabaena variabilis* studied *in vivo*. *Plant Cell Physiol* **27**: 819-835
- Sato N, Hagio M, Wada H, Tsuzuki M** (2000) Requirement of phosphatidylglycerol for photosynthetic function in thylakoid membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 10655-10660
- Schafer L, Vioque A, Sandmann G** (2005) Functional in situ evaluation of photo synthesis-protecting carotenoids in mutants of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. *J Photochem Photobiol B: Biol* **78**: 195-201
- Schagger H, von Jagow G** (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane-protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* **199**: 223-231
- Schansker G, Toth SZ, Strasser RJ** (2005) Methylviologen and dibromothymoquinone treatments of pea leaves reveal the role of photosystem I in the Chl a fluorescence rise OJIP. *Biochim Biophys Acta* **1706**: 250-261
- Schansker G, Toth SZ, Strasser RJ** (2006) Dark recovery of the Chl a fluorescence transient (OJIP) after light adaptation: The qT-component of non-photochemical quenching is related to an activated photosystem I acceptor side. *Biochim Biophys Acta* **1757**: 787-797
- Schmetterer G** (1994) Cyanobacterial respiration. In DA Bryant, ed, *The molecular biology of cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 409-435
- Schreiber U, Neubauer C, Klughammer C** (1989) Devices and methods for room-temperature fluorescence analysis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **323**: 241-251
- Shen GZ, Vermaas WFJ** (1994) Chlorophyll in a *Synechocystis* sp. PCC 6803 mutant without Photosystem I and Photosystem II core complexes-evidence for peripheral antenna chlorophylls in cyanobacteria. *J Biol Chem* **269**: 13904-13910
- Shibuya I** (1992) Metabolic regulations and biological functions of phospholipids in *Escherichia coli*. *Prog Lipid Res* **31**: 245-299
- Sidler WA** (1994) Phycobilisome and phycobiliprotein structures. In DA Bryant, ed, *The molecular biology of cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp 139-216
- Stamatakis K, Tsimilli-Michael M, Papageorgiou GC** (2007) Fluorescence induction in the phycobilisome-containing cyanobacterium *Synechococcus* sp PCC 7942:

- Analysis of the slow fluorescence transient. *Biochim Biophys Acta* **1767**: 766-772
- Stapleton SR, Jaworski JG** (1984a) Characterization and purification of malonyl coenzyme A: [Acyl-Carrier-Protein] transacylases from spinach and *Anabaena variabilis*. *Biochim Biophys Acta* **794**: 240-248
- Stapleton SR, Jaworski JG** (1984b) Characterization of fatty acid biosynthesis in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Biochim Biophys Acta* **794**: 249-255
- Stewart DH, Cua A, Chisholm DA, Diner BA, Bocian DF, Brudvig GW** (1998) Identification of histidine 118 in the D1 polypeptide of photosystem II as the axial ligand to chlorophyll Z. *Biochemistry (Mosc)* **37**: 10040-10046
- Tasaka Y, Gombos Z, Nishiyama Y, Mohanty P, Ohba T, Ohki K, Murata N** (1996) Targeted mutagenesis of acyl-lipid desaturases in *Synechocystis*: evidence for the important roles of polyunsaturated membrane lipids in growth, respiration and photosynthesis. *EMBO J* **15**: 6416-6425
- Telfer A, Rivas JD, Barber J** (1991) Beta-carotene within the isolated Photosystem II reaction center, photooxidation and irreversible bleaching of this chromophore by oxidized P680. *Biochim Biophys Acta* **1060**: 106-114
- Toth SZ, Schansker G, Garab G, Strasser RJ** (2007) Photosynthetic electron transport activity in heat-treated barley leaves: The role of internal alternative electron donors to photosystem II. *Biochim Biophys Acta* **1767**: 295-305
- Tracewell CA, Cua A, Stewart DH, Bocian DF, Brudvig GW** (2001) Characterization of carotenoid and chlorophyll photooxidation in photosystem II. *Biochemistry (Mosc)* **40**: 193-203
- Vangrondelle R, Dekker JP, Gillbro T, Sundstrom V** (1994) Energy transfer and trapping in photosynthesis. *Biochim Biophys Acta* **1187**: 1-65
- Varkonyi Z, Masamoto K, Debreczeny M, Zsiros O, Ughy B, Gombos Z, Domonkos I, Farkas T, Wada H, Szalontai B** (2002) Low-temperature-induced accumulation of xanthophylls and its structural consequences in the photosynthetic membranes of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*: An FTIR spectroscopic study. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 2410-2415
- Vass I, Horvath G, Herczeg T, Demeter S** (1981) Photosynthetic energy conservation investigated by thermoluminescence. Activation energies and half-lives of thermoluminescence bands of chloroplasts determined by mathematical resolution of glow curves. *Biochim Biophys Acta* **634**: 140-152
- Wada H, Murata N** (1989) *Synechocystis* PCC6803 mutants defective in desaturation of fatty-acids. *Plant Cell Physiol* **30**: 971-978

- Wada H, Murata N** (1990) Temperature-induced changes in the fatty-acid composition of the cyanobacterium, *Synechocystis* PCC6803. *Plant Physiol* **92**: 1062-1069
- Wada H, Murata N** (1998) Membrane lipids in cyanobacteria. In PA Siegenthaler, N Murata, eds, *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics* Vol 6. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 65-81
- Wada H, Murata N** (2007) The essential role of phosphatidylglycerol in photosynthesis. *Photosynth Res* **92**: 205-215
- Wada H, Gombos Z, Sakamoto T, Murata N** (1992) Genetic manipulation of the extent of desaturation of fatty-acids in membrane-lipids in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. *Plant Cell Physiol* **33**: 535-540
- Wada H, Schmidt H, Heinz E, Murata N** (1993) In vitro ferredoxin-dependent desaturation of fatty acids in cyanobacterial thylakoid membranes. *J Bacteriol* **175**: 544-547
- Wang X** (2001) Plant phospholipases. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**: 211-231
- Wang XM** (2004) Lipid signaling. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 329-336
- Weier D, Muller C, Gaspers C, Frentzen M** (2005) Characterisation of acyltransferases from *Synechocystis* sp PCC6803. *Biochem Biophys Res Commun* **334**: 1127-1134
- Wolter FP, Schmidt R, Heinz E** (1992) Chilling sensitivity of *Arabidopsis-thaliana* with genetically engineered membrane-lipids. *EMBO J* **11**: 4685-4692
- Xu CC, Hartel H, Wada H, Hagio M, Yu B, Eakin C, Benning C** (2002) The *pgp1* mutant locus of *Arabidopsis* encodes a phosphatidylglycerolphosphate synthase with impaired activity. *Plant Physiol* **129**: 594-604
- Yamaguchi N, Takahashi Y, Satoh K** (1988) Isolation and characterization of a Photosystem II core complex depleted in the 43 kDa chlorophyll-binding subunit. *Plant Cell Physiol* **29**: 123-129
- Yamane Y, Kashino Y, Koike H, Satoh K** (1998) Effects of high temperatures on the photosynthetic systems in spinach: Oxygen-evolving activities, fluorescence characteristics and the denaturation process. *Photosynth Res* **57**: 51-59
- Yang W, Devaiah SP, Pan X, Isaac G, Welti R, Wang X** (2007) AtPLAI is an acyl hydrolase involved in basal jasmonic acid production and *Arabidopsis* resistance to *Botrytis cinerea*. *J Biol Chem* **282**: 18116-18128
- Zouni A, Witt HT, Kern J, Fromme P, Krauss N, Saenger W, Orth P** (2001) Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 angstrom resolution. *Nature* **409**: 739-743

Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani mindazon munkatársaknak, akik az MTA Szegedi Biológiai Központ Növénybiológiai Intézetében segítségemre voltak és munkámat támogatták.

Megkülönböztetett köszönettel tartozom csoport- és témavezetőmnek, Gombos Zoltánnak sokoldalú és értékes segítségével és támogatásáért. Csoportunk, a Növényi lipid szerkezet és funkció csoport tagjainak támogatását is köszönöm, közülük is főként Sallai Anna, Ughy Bettina és Domonkos Ildikó segítségével jelentett számomra sokat.

Köszönettel tartozom a Tilakoidmembrán energetizációs csoport tagjainak, a fluoreszcencia mérésekben nyújtott segítségükért Tóth Szilviának és Zsíros Ottónak, a termolumineszcenciás kísérletek esetében Kovács Lászlónak. Köszönöm a Biofizika Intézetben Párducz Árpádnak a morfológiai vizsgálatokhoz nyújtott segítségét. Josef Komendának (Csehország) köszönettel tartozom a gélelektroforézisben nyújtott hasznos segítségével. Köszönöm a tömegspektrometriai mérésekben nyújtott értékes segítségét Prókai Lászlónak (USA) és Petr Fryčáknak (USA).

Köszönet illeti Solymosy Ferencet és Szekeres Miklóst az angol nyelvű közleményeim lektorálásáért.

Köszönöm édesanyámnak és családomnak támogatását, barátaimnak pedig segítségüket.

A foszfatidil-glicerin meghatározó szerepe a fotoszintetikus szervezetek sejtfunkcióiban

Összefoglaló

A fotoszintetikus szervezetek a Napból érkező energiát hasznosítják, amely fotoszintézisük révén kémiai energiává alakul, amely az életműködések fenntartásához szükséges. A legősibb oxigéntermelő fotoszintetizáló szervezetek a cianobaktériumok, amelyek mintegy 3.5 milliárd évvel ezelőtt alakultak ki és vízbontásból származó oxigénfejlesztésükkel átalakították bolygónk légkörét. Az endoszimbióta elmélet szerint a növényi kloroplasztisz őseinek a cianobaktériumokat tekintjük. A cianobaktériumok kitűnő modellszervezetek a fotoszintézis tanulmányozására, éppen ezért választottam kísérleteimhez. Számos előnyös tulajdonsággal rendelkeznek. Egyszerűbb felépítésűek a bonyolultabb, sok sejtorganelumot tartalmazó növényekkel szemben. Sok faj teljes genomszekvenciája ismert, könnyen transzformálhatók, gyorsan osztódnak.

A fotoszintézis fényreakcióinak színhelye a tilakoidmembránok, amelyek lipid-kettősrétegbe ágyazva fehérjekomplexeket tartalmaznak. Ezért a lipid-fehérje kölcsönhatásoknak igen fontos szerepe van a fotoszintézis szabályozásában. A cianobaktériumok tilakoidmembránjainak jellegzetes a lipidösszetétele, mely főként glikolipidekből áll: a monogalaktozil-diacilglicerin, digalaktozil-diacilglicerin, szulfokinovozil-diacilglicerin, mellettük kis mennyiségben található a foszfatidil-glicerin (PG) (Wada és Murata, 1998). A nem fotoszintetizáló baktériumok és az eukarióta sejtek membránjait főként foszfolipidek alkotják, a cianobaktériumokban és a növényi tilakoidban azonban a PG az egyetlen foszfolipid. A PG a cianobaktériumokban az összlipidtartalomnak kb. 8-15%-át teszi ki, mely eszenciálisnak bizonyult az életfolyamatok fenntartásában (Hagio és mtsai, 2000; Wada és Murata, 2007). A PG-molekula zsírsavösszetétele változó, telített és telítetlen zsírsavak észteresítik a glicerinvázat. A PG-molekulák típusa függ a fajtól, nevelési körülményektől (Wada és Murata, 1990). A röntgenkrisztallográfiás módszerek kimutatták a PG-molekulák jelenlétét a PSII-ben (Loll és mtsai, 2005; Guskov és mtsai,

2009) és a PSI-ben (Jordan és mtsai, 2001) egyaránt. A legújabb kristályszerkezet vizsgálat alapján a *Thermosynechococcus elongatus* PSII-ben két PG-molekulát találtak a CP43 és D1 fehérje között. (Guskov és mtsai, 2009). A PG fotoszintetikus funkciókban betöltött szerepét korábban elsősorban *in vitro* kísérletekben vizsgálták. Foszfolipáz A₂-t alkalmaztak a PG sn-2 zsírsavjának eltávolítására, ami 16:1(Δ 3t), borsó növény izolált tilakoidmembránjain, és kimutatták, hogy a PSII aktivitása csökkent (Jordan és mtsai, 1983). A PG szerepét *in vivo* is tanulmányozták *Arabidopsis thaliana* mutánsokban. Xu és mtsai (2002), Hagio és mtsai (2002) és Babiychuk és mtsai (2003) kimutatták, hogy a PG esszenciális a kloroplasztiszok kialakulásában és a tilakoidmembránok felépítésében. A növényekben nem sikerült eddig olyan PG-mutánst előállítani, amely egyáltalán nem képes PG szintézisére, hiszen a növényekben két kompartmentbe is zajlik a PG szintézise, valamint nem képesek a külső médiumból a PG felvételére.

A lipidek szerepének és biokémiájának tanulmányozásánál igen fontos szempont, hogy a cianobaktériumok, a növényekkel ellentétben, képesek a külső nevelési tápoldatból felvenni és membránjaikba beépíteni a PG-t. A modern molekuláris biológiai technikák, valamint a *Synechocystis* sp. PCC6803 teljes genomszekvenciájának ismerete lehetővé tette olyan PG-mutánsok előállítását, mint a Δ pgsA (Hagio és mtsai, 2000) és Δ cdsA (Sato és mtsai, 2000), amelyek nem képesek PG-t előállítani. Ezekben a mutánsokban a PG bioszintézisének kulcsenzimeit, a PGP-szintázt, vagy a CDP-DG szintázt inaktívtázták. Ezen mutánsokat alkalmazva korábban kimutatták, hogy a PG-nek szerepe van a PSII dimerek (Sakurai és mtsai, 2003) és a PSI trimerek (Domonkos és mtsai, 2004) kialakításában, valamint az elektrontranszport-folyamatok szabályozásában a másodlagos kinon elektronakceptor, a Q_B közelében kifejtve hatásukat (Gombos és mtsai, 2002).

A PG-nek számos hatása nem ismert, ezért tűztem ki célul a PG sejtfunkciókban játszott szerepének részletesebb tanulmányozását: a sejtek morfológiájára, pigment tartalmára gyakorolt hatását, a PSII szerkezetében és működésében betöltött szerepét. A PG-hiányos mutánsok vizsgálata során megfigyeltük a PG-molekulák kémiai szerkezetének átépülését, amelynek révén a sejtek alkalmazkodni tudnak a változó környezeti feltételekhez. Az átépülés lényege a PG-ben lévő zsírsavak megváltozása. Célunk volt a PG-átépülés enzimatisz lépéseinek felderítése. A PG szerepének

tanulmányozásához létrehoztunk egy PG-bioszintézisben gátolt mutánst, a *Synechocystis* sp. PCC6803 PAL/ Δ cdsA. A PG bioszintézisének a génjét a PAL mutánsban inaktiváltuk, mivel előnyös tulajdonságai vannak. Ilyen előnyös tulajdonsága, hogy nem rendelkezik fikobiliszómával, ezért könnyebben értelmezhetők a fluoreszcenciaemissziós jelek változása a PG kiürülése folyamán, mivel a PSII-ből jövő fluoreszcencia jelek nem fednek át a fikobiliszómából jövő jelekkel. A fikobiliszóma hiányát a sejtek a CP43 és CP47 belső klorofill-protein antennák mennyiségének megnövelésével kompenzálja, így magas a PSII/PSI arányuk. Ez egy újabb előnyt jelent a PG-nek a PSII tanulmányozásához. Ha a nevelési médiumból a PG-t elvontuk, nyomonkövethettük a PG-megvonás következményeit a mutáns sejtekben.

A sejtek szaporodása a PG-megvonás hatására fokozatosan lassult, és 14 nap elteltével majdnem teljesen leállt a kultúra növekedése. Az elektronmikroszkópos morfológiai vizsgálatok a sejt méret növekedését, a sejtszerkezet torzulását, tilakoidszerkezet felbomlását mutatták a PG kiürülése során. A sejtek térfogatának megnövekedése következménye lehet annak, hogy a sejtek felkészültek az osztódásra, de nem képesek azt végrehajtani. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a PG-nek a baktériumok kardiolipinjéhez hasonló szerepe lehet a sejtek osztódásában (Mileykovskaya és Dowhan, 2000), vagyis résztvehet az osztódási gyűrű kialakításában.

Kétdimenziós blue-natív gélelektroforézis segítségével nyomon követtük a tilakoidmembránok PSII és PSI komplexeinek összeszerelődését PG-megvonás alatt. A PSI RCC trimerek és PSII RCC dimerek mennyiségének lecsökkenését figyeltük meg. Ezen tapasztalatok összhangban vannak a korábbi kutatásokkal, amikor is rámutattak, hogy a PG-nek szerepe van a trimerizációban és dimerizációban egyaránt (Hagio és mtsai, 2000; Sakurai és mtsai, 2003; Domonkos és mtsai, 2004). Megfigyeltük, hogy PG-megvonás hatására a PSII RCC-ok szerkezete destabilizálódik, amely a CP43 leválásának köszönhető (az RC47 tartalom megnövekedett). Tehát a PG-molekula, mintegy ragasztóként viselkedve, a CP43 klorofill-protein antennát a PSII RCC-hoz kapcsolja. A mutáns sejtekben radioaktív izotópos jelöléssel követtük a fehérjék bioszintézisét. A [³⁵S] Met beépülése a fehérjékbe arra utal, hogy PG hiányában is a főbb PSI és PSII fehérjék bioszintézise megtörténik, csak a komplexek

összeszerelődésében lép fel zavar. A 2D-BN/SDS-PAGE alapján nem lehet egyértelműen eldönteni, hogy az RC47-ből *in vivo* válik le a CP43, vagy nagyon lazán kötött, és a natív gélelektroforézishez szükséges detergenskezelés okozza-e a leválását. Az alacsony hőmérsékletű fluoreszcencia mérések eredményei arra utalnak, hogy a CP43 *in vivo* válik le, mivel a 685 nm-es fluoreszcencia csúcs megnövekedett PG hiányában. Az emisszió növekedése arra utal, hogy a CP43 nem tudott bekötődni, így nem történt meg az energia hatékony továbbadása a CP47 irányába. ez is utal a CP43 *in vivo* leválására. A fluoreszcencia méréseket egész sejteken végeztük, nem izolált tilakoidmembránokon, ez is utal a CP43 *in vivo* leválására.

Kíváncsiak voltunk, hogy PG hiányában a PSII akceptor vagy donor oldala sérül-e. Éppen ezért megmértük a PAL/ Δ *cdsA* sejtek oxigénfejlődését, termolumineszcenciáját és OJIP fluoreszcenciaemisszió kinetikáját. PG-megvonás hatására az elektrontranszport-folyamatok zavart szenvedtek. Ennek okaként a Q_A és Q_B közötti elektrontranszport lelassulását valószínűsítették. Főként a PSII akceptor oldala sérült. Ezt támasztja alá az oxigénfejlődés inaktiválódása. A termolumineszcencia görbe megváltozása, vagyis a B-sávnak Q-sáv irányába való eltolódása, szintén az elsődleges és másodlagos kinon elektronakceptorok közötti elektrontranszport-folyamatok szintjén zavart jelez, vagyis szintén alátámasztja az akceptoroldali gátlást. Az OJIP fluoreszcenciaindukció mérések esetében a A PAL/ Δ *cdsA* sejtek PG éhezése alatt megfigyelhettük a fluoreszcencia J fázisának fokozatos növekedését, hasonlóan a növekvő koncentrációjú DCMU vagy dibromothymoquinone jelenlétében észlelteknél (Schansker és mtsai, 2005). Ez szintén utal a Q_A és Q_B közötti elektrontranszport-folyamatok lelassulására. A PG-megvonás a donoroldalt is károsíthatja, valószínűleg a PG-megvonás egy későbbi stádiumában, ezt bizonyítja a hőkezelt minták OJIP fluoreszcenciája. Ez a hatás nagyon kicsinek tűnik, és feltételezhető, hogy a CP43-nak a PSII RCC-ből való leválásával hozható összefüggésbe, mivel ez a klorofill-fehérje antenna közvetlenül résztvesz a Mn_4Ca klaszter kapcsolásában (Loll és mtsai, 2005).

Gázkromatográfiás vizsgálataink során megfigyeltük, hogy a PAL/ Δ *cdsA* mutáns sejtek életben tartásához kívülről adagolt szintetikus PG-molekula átépül, megváltozik zsírsavösszetétele. Célul tűztük ki annak az enzimatis folyamatnak a felderítését, amely képes átépíteni a PG-t, hiszen ennek a biokémiája nem teljesen ismert. Kísérleteimhez a Δ *pgsA* már jellemzett törzsét használtam, mivel csak PG-

bioszintézisben gátolt mutáns és korábban már részletesen tanulmányozták fiziológiáját. A sejteket PG-mentesítettük, majd visszadtuk a PG-t a nevelési médiumhoz és nyomon követtük az PG időbeni átépülését. Az átépítés termékeit, a különböző zsírsavösszetételű PG-molekulát FTICR (hibrid lineáris ioncsapdás-Fourier transzformációs ionciklotron rezonancia tömegspektrométer) segítségével azonosítottuk.

Kísérleteink igazolják, hogy a szintetikus PG *in vivo* átépült számos természetes PG-típust hozva létre. Az átépítés termékei bizonyítéknak szolgálnak arra, hogy a *Synechocystis* rendelkezik azzal az enzimmérettel (foszfolipázok, acil-hidrolázok, aciltranszferázok, deszaturázok), amely képes átépíteni a PG-molekulát. A *Synechocystis* cianobaktériumokban a foszfolipázokat, acil-hidrolázokat és azok génjeit még nem sikerült azonosítani. A homológ szekvenciák keresése nem hozott pozitív eredményeket, ami azt valószínűsíti, hogy ha a cianobaktériumokban vannak is foszfolipázok és acil-hidrolázok akkor azok lényegesen eltérőek a magasabbrendű növények megfelelőitől. Érdekes jövőbeni kihívás lehet ezen géneknek és enzimeknek az azonosítása is.

Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a PG-molekulának fontos szerepe van a CP43-nak a PSII RCC-ba való beépülésében. Rámutattunk a foszfolipázok és acil-hidrolázok valószínű jelenlétére a cianobaktériumokban, amelyek az aciltranszferázokkal és deszaturázokkal együtt résztvesznek a PG átépítésében. Eddigi ismereteink alapján ez az első kísérlet, amely bizonyítja egy szintetikus lipidmolekula átépülését természetes típusú egy prokariota szervezetben.

Role of phosphatidylglycerol in cellular functions of photosynthetic organisms

Summary

Photosynthetic organisms capture solar energy and store it to be used in a series of biochemical reactions that convert pure energy of light into biochemical energy needed for life. Cyanobacteria are among the oldest prokaryotic photosynthetic organisms. The oldest known cyanobacterium fossils emerged 3.5 billion years ago. Photosynthetic oxygen production by cyanobacteria changed the reductive atmosphere to an oxidative one, opening the way for the emergence of new types of life. According to the endosymbiotic theory cyanobacteria are the ancestors of chloroplasts.

Cyanobacteria are ideal model organisms for the investigation of oxygenic photosynthetic processes, therefore we have chosen a cyanobacterial strain for our experiments. Their simple cell structure, easy culturing potential, and the natural transforming competence of some strains make them attractive subjects for photosynthesis research. Photosynthetic reactions occur in pigment-protein complexes embedded in a lipid bilayer, the thylakoid membrane.

This shows that lipid-protein interactions play an important role in the regulation of photosynthetic processes. Thylakoid membranes of cyanobacteria possess a characteristic membrane lipid composition that consists of glycolipids such as: monogalactosyldiacylglycerol, digalactosyldiacylglycerol, and sulfoquinovosyldiacylglycerol as major components. The anionic phospholipid, phosphatidylglycerol (PG) is a minor component of photosynthetic membranes (Wada and Murata 1998). In non-photosynthetic bacteria and eukaryotic cells the membranes contain mainly various forms of phospholipids. In cyanobacteria and in thylakoids of higher plants, however, PG is the only phospholipid. In cyanobacteria PG represents 8-15% of the total lipid content, but it is an indispensable molecule to keep the cells alive (Hagio et al., 2000; Wada and Murata, 2007). The glycerol backbone of PG is esterified with saturated or unsaturated fatty acids whose proportion depends on the strain and on the growing temperature (Wada and Murata, 1990; Domonkos et al., 2008).

X-ray crystallographic studies revealed the presence of PG molecules both in PSII (Loll et al., 2005; Guskov et al., 2009) and in PSI (Jordan et al., 2001) reaction centers (RCs) of cyanobacteria. The most recent X-ray crystallography structure of

Thermosynechococcus elongatus showed the presence of two PG molecules between protein CP43 and protein D1 in PSII (Guskov et al., 2009). The role of PG synthesis has previously been studied *in vitro*, by treating thylakoid membranes of pea with phospholipase A₂ known to remove the fatty acid of PG from *sn*-1 position. It has been shown that PSII activity decreased in the absence of PG (Jordan et al., 1983). The role of PG has been studied *in vivo* using *Arabidopsis thaliana* PG mutants. Xu et al (2002), Hagio et al (2002) and Babiychuk et al (2003) showed that PG was indispensable for the biosynthesis of chloroplasts and also needed for the formation of thylakoid membrane structure.

Cyanobacteria provide a unique system for studying the remodeling of this lipid since, unlike higher plants, they can take up PG from the medium by passive transport.

The availability of the complete genome sequence of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 opened the way for studying the structural and functional role of PG *in vivo*: by creating PG-deficient mutants, $\Delta pgsA$ (Hagio et al., 2000) and $\Delta cdsA$ (Sato et al., 2000), molecular genetic approaches could be employed. These mutants are not able to synthesize PG because the genes encoding certain key enzymes of PG biosynthesis have been inactivated. Genes *pgsA* and *cdsA* encode PGP synthase and CDP-DG synthase, respectively. Using these mutants it has been shown that PG plays an important role in PSII dimer (Sakurai et al., 2003) and PSI trimer formation (Domonkos et al., 2004), and in the regulation of electron transport processes on the acceptor side of PSII, in the vicinity of Q_B (Gombos et al., 2002). Both prokaryotes and eukaryotes respond to a variety of environmental stress (Harwood1998) by altering the fatty acid composition of their membrane lipids. The extent of unsaturation or the chain length of fatty acids in thylakoid membranes is affected by environmental temperatures. Previously, for PG remodeling studies genetic manipulation of acyltransferases and desaturases have been used to reveal the protective role of various PG molecular species in resistance to low and high temperature stress in both higher plants and cyanobacteria (Wada and Murata, 1990; Wada et al., 1992; Wolter et al., 1992; Murata et al., 1992; Tasaka et al., 1996).

A variety of specific roles of PG has not been revealed yet. My aim was to study the role of PG in these hitherto neglected fields such as: cell morphology, pigment composition, PSII structure and function and also to unravel some of the PG

remodeling enzymatic processes. For studying the role of PG in cellular functions we created a *Synechocystis* sp. PCC6803 PAL/ Δ *cdsA* mutant, which has a lot of advantage in understanding the multi-faceted role of PG molecules. The PAL/ Δ *cdsA* is a mutant that does not have phycobilisomes and cannot synthesize PG. In this phycobilisomeless mutant the cells use intrinsic chlorophyll-protein complexes for light harvesting and they increase the PSII/PSI ratio (Ajlani and Vernotte, 1998). This strain allows quite an easy interpretation of PSII fluorescence emission spectra and decay kinetics without the contribution of phycobilisomes.

The PAL/ Δ *cdsA* mutant provided a unique experimental system for detailed studies of the function of PG in PSII. The mutant required supplementation of PG in the culture medium for growth. By PG depletion we were able to follow the changes caused by a gradual depletion of PG. In the PG-depleted medium the growth rate decreased gradually from the 4th day, and almost stopped on the 14th day of the PG depletion period. Morphological investigations by electron microscopy revealed a deformation of the PG-depleted cells. The PG-depleted cells had a unstructured cell interior with deformed thylakoid membranes. The volume of the cells increased. This latter finding suggests that the cells were ready for division which, however, did not take place. We think that PG might have the same role in cell division in *Synechocystis* as cardiolipin has in other bacteria (Mileykovskaya and Dowhan, 2000), in which lipid accumulates in the mid-cell membrane and takes part in the formation of the Z-ring of cell division.

In order to reveal the assembly of main proteins into PSII and PSI RCs we analyzed the protein composition of the thylakoid membranes of PG-depleted and PG-supplemented PAL/ Δ *cdsA* mutant cells by two dimensional gelelectrophoresis. Our analyses confirmed the earlier conclusions obtained from analyses of PSII complexes of the Δ *pgsA* strain: PG depletion led to the destabilization of both dimeric PSII and trimeric PSI complexes (Hagio et al., 2000; Sakurai et al., 2003; Domonkos et al., 2004). However, we also demonstrated a new aspect of PG depletion, which was not identified before, namely, detachment/destabilization of binding of CP43 to PSII reaction center core-complex (PSII RCC). PG served like as a glue required for the binding of CP43 to RCII.

By using [³⁵S]-labeled methionine we also followed the synthesis of PSII protein subunits and their incorporation into PSII complexes. We confirmed that PG depletion

does not inhibit the synthesis of the large PSII subunits. Low temperature fluorescence data also confirmed the detachment of CP43 from RCII upon PG depletion. The increase of the 685 nm peak seems to indicate an increase in fluorescence yield owing to detachment of CP43 antenna protein from RCII. This supports the data obtained by gelelectrophoresis.

To clarify whether PG depletion affected the donor or acceptor side of PSII, we measured the oxygen-evolving activity, thermoluminescence and OJIP fluorescence of the PAL/ $\Delta cdsA$ mutant cells. PG depletion severely affected the electron transport processes and a damage occurred mainly on the acceptor side. This was confirmed by inactivation of oxygen-evolution, and by a slowing down of electron transport from the Q_A to the Q_B site. Due to PG depletion a shift of the B TL band toward the Q band has been demonstrated by thermoluminescence measurements. This underlined inhibition on the acceptor side. Changes in OJIP fluorescence curve kinetics also revealed suppression of electron transport processes between Q_A and Q_B .

PG depletion may also affect the donor side of PSII but at a later stage, as suggested by the thermoluminescence and OJIP fluorescence of heat-treated cells. This effect, however, seems to be small and might be associated with the release of CP43 from PSII RCC, as this antenna chlorophyll protein is directly involved in liganding the Mn_4Ca cluster (Loll et al., 2005).

Gas chromatographic analyses showed that the exogenously added artificial PG was remodeled, fatty acid content was modified in the PAL/ $\Delta cdsA$ mutant cells. This remodeling of lipids is an intensive studied phenomenon in mammalian systems, however, it is not well known in photosynthetic organisms. Therefore our aim was to reveal the enzymatic processes, which can lead to the remodeling of PG in a prokaryote organism. For this purpose we used a well characterized PG-deficient mutant, $\Delta pgsA$. We induced PG depletion of the cells, then we re-added the PG to the medium and we followed the remodeling process. We confirmed the formation of new, retailed PG species by using negative-ion electrospray ionization–Fourier-transform ion cyclotron resonance and ion trap tandem mass spectrometry. Our experiments with these mutant cells demonstrated remodeling of lipids in a prokaryotic photosynthetic bacterium and implicated a biosynthetic pathway involving phospholipase A_1 and A_2 , acyl-hydrolase, lysophosphatidylglycerol acyltransferase and acyl-lipid desaturases for such a

remodeling of diacylphosphatidylglycerol molecules. In *Synechocystis*, the phospholipases, acyl-hydrolase and their genes have not yet been identified. Sequence homology search did not provide positive results, suggesting that if there are phospholipases and acyl-hydrolase in *Synechocystis*, these are substantially different from the known phospholipases, acyl hydrolase of higher plants. Identification of these genes and enzymes would be an interesting challenge in the future.

To conclude, our results demonstrated that PG plays an important role in the binding of CP43 antenna-protein to PSII RCC and is also important in electron transport processes, mainly at the acceptor side of PSII. Our data provide evidence that cyanobacteria possess the enzymatic machinery for PG remodeling and point to the existence of yet unknown enzymes that mediate this process. To our knowledge, this is the first direct demonstration of PG remodeling in a photosynthetic prokaryote.

Publikációs lista

A dolgozatban felhasznált közlemények

Laczko-Dobos H, Ughy B, Toth SZ, Komenda J, Zsiros O, Domonkos I, Parducz A, Bogos B, Komura M, Itoh S, Gombos Z (2008) Role of phosphatidylglycerol in the function and assembly of Photosystem II reaction center, studied in a *cdsA*-inactivated PAL mutant strain of *Synechocystis* sp. PCC6803 that lacks phycobilisomes. *Biochim Biophys Acta* **1777**: 1184-1194. IF: 3.835

Laczko-Dobos H, Fryčák P, Ughy B, Domonkos I, Wada H, Prokai L, Gombos Z (2009). Remodeling of Phosphatidylglycerol in *Synechocystis* PCC6803/ Δ *pgsA*. *BBA Molecular and Cell Biology of Lipids* (benyújtva).

Domonkos I, **Laczko-Dobos H**, Gombos Z (2008) Lipid-assisted protein-protein interactions that support photosynthetic and other cellular activities. *Prog Lipid Res* **47**(6): 422-435. IF: 11.194

A dolgozat témájához kapcsolódó közlemények

Domonkos I, Malec P, **Laczko-Dobos H**, Sozer O, Klodawska K, Wada H, Strzalka K, Gombos Z (2009) Phosphatidylglycerol depletion induces an increase in myxoxanthophyll biosynthetic activity in *Synechocystis* PCC6803 cells. *Plant Cell Physiol.* **50**(2): 1-9. IF: 3.31

Bogos B, Ughy B, Domonkos I, **Laczko-Dobos H**, Komenda J, Abasova L, Cser K, Vass I, Sallai A, Wada H, Gombos Z (2009). Phosphatidylglycerol depletion affects

photosystem II activity in *Synechococcus* sp. PCC 7942 cells. *Photosynth Res* (kiadás alatt).

Laczko-Dobos H, Szalontai B (2009). Lipids, proteins, and their interplay in membrane dynamics. *Biochemistry* (kiadás alatt).

Sozer O, Komenda J, Ughy B, Domonkos I, **Laczko-Dobos H**, Malec P, Gombos Z and Kis M (2009). Involvement of Carotenoids in the Synthesis and in the Assembly of Protein Subunits of Photosynthetic Reaction Centers of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol* (benyújtott).

Absztrakt

Gombos Z, Toth S, Laczko-Dobos H, Ughy B (2007) Involvement of phosphatidylglycerol in the assembly and function of photosystem II. *Photosynth Res* 91: 141