

PhD értekezés tézisei

**Modell és biológiai membránok Fourier transzformációs
infravörös és elektronspin-rezonancia spektroszkópiai vizsgálata**

Kóta Zoltán

**MTA Szegedi Biológiai Központ
Biofizikai Intézet
Szeged
2003**

Bevezetés

A biológiai membránoknak központi szerepük van a sejtek szerkezetének és funkciójának biztosításában, ezért nem meglepő, hogy számos tudományág – kezdve a biofizikától a molekuláris biológiáig – jelentős kutatási területét képezik.

A biológiai membránok többkomponensű dinamikus rendszerek, melyek számos sejtfolyamat szabályozásában vesznek részt. Fő komponenseik a lipidek és a fehérjék. A lipidek elsődleges szerepe a szerkezet biztosítása, míg a működésért elsősorban a fehérjék felelősek. A lipid–fehérje kölcsönhatásoknak ugyancsak fontos szerepe van mind a szerkezet, mind a működés vonatkozásában.

A Földön egyik legnagyobb mennyiségben előforduló természetes membrán a tilakoid membrán, mely a fotoszintézis folyamatában a fény fizikai energiáját kémiai energiává, és így szerves vegyületekké képes alakítani. Ha egy növényt sötétben nevelünk, a proplasztisz etioplasztisszá alakul át, mely szerkezetében és összetételében is különbözik a kifejlett kloroplasztisztól. Fény hatására az etioplasztiszból kloroplasztisz lesz. Ezen átalakulás során klorofill molekulák és számos polipeptid szintézise, illetve a plasztisz szerkezetének nagymértékű átrendeződése következik be (zöldülés).

A specifikus fehérjék és pigmentek mellett a tilakoid membránok lipidösszetétele is meghatározó. A monogalaktoszil-diacilglicerolról (MGDG) és még néhány más lipidről kimutatták, hogy erős és specifikus lipid–fehérje kölcsönhatásokban vesznek részt. Számos közlemény olvasható a foszfatidilglicerol (PG) – mely a teljes lipidtartalomnak 5–12% -a – tilakoid membránok szerveződésében és működésében betöltött fontosságáról is. Például, számos magasabbrendű növényben összefüggést találtak a fagyérzékenység és a telített, illetve egyszeresen telítetlen ('magas olvadáspontú'-nak is nevezett) PG molekulák mennyisége között.

A biológiai membránok jelentőségének megfelelően, nagyszámú tanulmány foglalkozik a szerkezet és dinamika, illetve a lipid–fehérje kölcsönhatások vizsgálatával, melyhez különféle fizikai módszerek széles skálája áll rendelkezésre. Bár ilyen vizsgálatok révén már eddig is sok értékes eredmény látott napvilágot, számos részlet még felfedezésre vár.

Célkitűzések

Az értekezést képező munka során két egymást kiegészítő spektroszkópai módszert, a Fourier transzformációs infravörös (FTIR) és az elektronspin-rezonancia (ESR) spektroszkópiát alkalmaztuk különböző modell és tilakoid membránok szerkezetének és dinamikájának, illetve a lipid–fehérje kölcsönhatások tanulmányozására. Célul tűztük ki a következőket:

1. A spektroszkópai technikák hatékonyságának növelése:
 - a lipidek CH₂ vegyértékrezgéseinek, illetve a TEMPO spinjelző ESR spektrumának továbbfejlesztett analízisével,
 - az egymást kiegészítő spektroszkópai adatok kombinálásával,
2. a tilakoid membrán szerkezeti átrendeződésének részletesebb megismerése a zöldülés során, és
3. a PG szerkezeti szerepének tanulmányozása különböző fagyérzékenységű, genetikailag módosított dohány tilakoidokban.

Kísérleti módszerek

A lipid acillánccok konformációjának és a fehérjék szerkezetének és dinamikájának tanulmányozására FTIR spektroszkópiát használtunk. Különböző modell (foszfatidilkolin) és tilakoid membránokat vizsgáltunk. Az infravörös spektrumokban mind a C–H vegyértékrezgések tartományát, mind pedig az 1500–1750 cm⁻¹ közötti tartományt (amid I–II és lipid CO sávok) analizáltuk.

Az ESR mérések során két spinjelzőt (5-SASL és TEMPO) alkalmaztunk, és ezek spektrális paramétereinek analízisével nyertünk információt a membrán szerkezetére és dinamikájára vonatkozóan árpa tilakoidok esetén.

A tilakoidok néhány biokémiai és funkcionális paraméterét (pl. klorofilltartalom, zsírsavösszetétel) irodalomban leírt módszerek alapján határoztuk meg.

Eredmények

Módszertani eredmények

1. Spektrum-szimulációs és illesztési programot fejlesztettünk ki TEMPO spinjelzővel felvett ESR spektrumok analíziséhez. Az eljárással pontosan meghatározható a TEMPO molekula membránbeli relatív mennyisége, melynek segítségével a membrán pakoltságára, és a membrán fluiditására kaphatunk információt. A program alkalmas továbbá a TEMPO molekula rotációs dinamikájának tanulmányozására is.
2. Megmutattuk, hogy az FTIR spektrumok $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sávja felbontható két komponensre, és hogy a sáv látszólagos hőmérséklet-indukálta eltolódása leírható a két komponens versengésével. Az egyik komponenst a lipidek szénhidrogén láncainak rendezett, a másikat a rendezetlen szegmenseivel hoztuk kapcsolatba. A módszert sikeresen alkalmaztuk komplex biológiai membránok esetén is.

Biológiai alkalmazások

Zöldülés – árpa tilakoidok

3. Sikeresen alkalmaztunk egy keresztivonásos módszert az 5-SASL spinjelzővel felvett ESR spektrumokon. Eredményképpen hozzájutottunk egy immobilis és egy mobilis komponens spektrumhoz, melyek segítségével meg tudtuk határozni a fehérjékkel kölcsönhatásban lévő lipidek relatív mennyiségét árpa tilakoidokban.
4. Adataink alapján nyilvánvalóvá vált, hogy egyre erősödő csatolás alakul ki a zöldülő membrán fő lipid és fehérje komponensei között. A zsírsavösszetétel és az újonnan szintetizálódott fehérjék stabilitása összehangoltan változik: a többszörösen telítetlen lipidek felszaporodása megfelelő környezetet biztosít a nagyobb stabilitással rendelkező, fotoszintetikusán aktív fehérjekomplexek kialakulásához.
5. Követtük a – döntően LHCII-vel kapcsolatos – fehérjekomplexek képződését. Megállapítottuk, hogy a fehérjék átlagos oligomer mérete kb. hétszeresére növekszik a zöldülés során.
6. A zöldülés molekuláris történéseinek sorozatát egy háromfázisú modellel írtuk le. A klorofill felhalmozódással összhangban a zöldülés egy ‘kiindulási’ fázissal kezdődik, melyet a legnagyobb változásokat magába foglaló ‘átrendeződési’ fázis követ. A funkcionális membrán az ‘érés’ fázisban alakul ki teljesen.

7. Kimutattuk, hogy a fehérjekomplexek részleges hődenaturációja a lipideknek egy jelentős szerkezeti átrendeződését kezdeményezi a tilakoid membránban. Ez valószínűleg összefüggésben van az MGDG lipid molekulák kettősréteg \rightarrow inverz hexagonális fázisátmenetével.

Genetikailag módosított dohány tilakoidok

8. A $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sáv kétkomponenses analízisét felhasználva, a PG molekulák szerkezeti szerepét, illetve a PG telítettségének szerepét vizsgáltuk genetikailag módosított dohány növényekben. FTIR adataink alapján megállapítottuk, hogy a PG kapcsolatban van a membránfehérjékkel, biztosítja a fehérjék működéséhez szükséges lipidkörnyezet megfelelő dinamikáját, de nem felelős a fehérjék szerkezeti stabilitásának fenntartásáért. Kimutattuk, hogy a PG-nek van szerkezeti szerepe, amit eddig biokémiai módszerekkel nem tudtak detektálni. Ez magyarázatot ad a vad típusú és genetikailag módosított dohány növények között megfigyelt fiziológiás különbségekre.

Tudományos közlemények

Az értekezés anyagát képező közlemények

- I. Droppa, M., Kóta, Z., Páli, T., Szalontai, B., Horváth, L. I., and Horváth, G.
Structural–functional organization of thylakoids in developing chloroplasts
In The Chloroplasts: From Molecular Biology to Biotechnology, eds. Argyroudi-Akoyunoglou, J. H., Senger, H. (Kluwer Academic Publishers), pp. 55–60., 1999
- II. Kóta, Z., Szalontai, B., Droppa, M., Horváth, G., and Páli, T.
Fourier transform infrared and electron paramagnetic resonance spectroscopic studies of thylakoid membranes
J. Mol. Struct. **480–481**, 395–400, 1999
- III. Kóta, Z., Debreczeny, M., Szalontai, B.
Separable contributions of ordered and disordered lipid fatty acyl chain segments to νCH_2 bands in model and biological membranes: A Fourier transform infrared spectroscopic study
Biospectroscopy **5**, 169–178, 1999
- IV. Kóta, Z., Szalontai, B., Droppa, M., Horváth, G., and Páli, T.
The formation of an inverted hexagonal phase from thylakoid membranes upon heating
Cell. Mol. Biol. Lett. **7**, 126–128, 2002
- V. Kóta, Z., Horváth, L. I., Droppa, M., Horváth, G., Farkas, T., and Páli, T.
Protein assembly and heat stability in developing thylakoid membranes during greening
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99**, 12149–12154, 2002
- VI. Szalontai, B., Kóta, Z., Nonaka, H., and Murata, N.
Structural consequences of genetically engineered saturation of the fatty acids of phosphatidylglycerol in tobacco thylakoid membranes. An FTIR study
Biochemistry **42**, 4292–4299, 2003

Egyéb közlemények

- I. Kóta, Z., Páli, T., and Marsh, D.
Orientation and lipid–peptide interactions of gramicidin A in lipid membranes: polarised ATR infrared spectroscopy and spin-label electron spin resonance
Biophys. J., In press
- II. Csányi, L. J., Jáky, K., Dombi, Gy., Evanics, F., Dezső, G., and Kóta, Z.
Onium-decavanadate ion-pair complexes as catalysts in the oxidation of hydrocarbons by O₂
J. Mol. Cat. A **195**, 101–111, 2003
- III. Csányi, L. J., Jáky, K., Kóta, Z., and Páli, T.
Oxidation of hydrocarbons by O₂ in the presence of onium salts and onium ion-pair complexes as catalysts
J. Mol. Cat. A, In press
- IV. Páli, T., Garab, G., Horváth, L. I., and Kóta, Z.
Functional significance of the lipid–protein interface in photosynthetic membranes
Cell. Mol. Life Sci. **60**, 1591–1606, 2003