

Ph.D. értekezés tézisei

A PhrA fotoliáz és szerkezeti homológja a PhrB kriptokróm szerepet játszik a *Synechocystis* sp. PCC6803 kettős fotokémiai rendszerének javítási ciklusában

Vass István Zoltán

Témavezetők:

Dr. Vass Imre, Növénybiológiai Intézet igazgató

Dr. Kós Péter, Növénybiológiai Intézet tudományos főmunkatárs

Biológia Doktori Iskola, SZTE TTIK

MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Növénybiológiai Intézet

Szeged

2014

Bevezető

A napfény a Föld bioszférájának energiaforrása és szabályzó tényezője is egyben. A Naptól származó elektromágneses sugárzás, a légköri szűrőhatás ellenére is széles spektrumban (290-3500 nm) érkezik a Föld felszínére. Százalékos eloszlás alapján e széles spektrumból származó sugarak jelentős része a viszonylag nagy energiájú és rövidebb hullámhosszú 400-750 nm-es tartományba esik. A Földön élő fotoautotróf szervezetek, e tartomány energiáját hasznosítják a leghatékonyabban.

Ennek megfelelően rendelkeznek olyan molekula komplexekkel (PSII, PSI, cyt b_6/f , ATP-szintetáz), amelyek együtt képesek a napfény energiáját kémiai energiává alakítani, míg más molekulák, bizonyos hullámhossztartományú sugárzás hatására specifikus folyamatokat szabályoznak (fitokrómok, kriptokrómok, fototropinok, UVR8). Mindkét folyamat során, napfény hatására, az illető molekulák átmeneti módosításokat szenvednek. E mellett a sugárzás intenzitásának és minőségének függvényében az említett molekulák maradandó károsodást is szenvedhetnek. E jelenség nemcsak a fény hatására specifikus folyamatokat ellátó molekulákra korlátozódik hanem gyakorlatilag minden fényérzékeny molekulát érint. A legfontosabb ezek közül a DNS, amelyen az ultraibolya-B (UV-B) sugárzás (280-315 nm) jellegzetes szerkezeti változásokat képes előidézni.

Természetes körülmények között, a napfény hatására módosítást illetve károsodást szenvedett molekulák vagy kijavítódnak és visszanyerik kiindulási formájukat, vagy helyettük új molekulák szintetizálódnak. E javítási folyamatok rendkívüli fontossággal bírnak, hiszen a fénynek szükségszerűen kitett fotoszintetikus apparátus hatékony működése is ezektől függ.

A doktori tézisemben két olyan fehérjével kapcsolatos kutatásaimat mutatom be, amelyek specifikus szerepe közvetetten befolyásolja a *Synechocystis* sp. PCC6803 (*Synechocystis*) cianobaktérium fotoszintetikus apparátusának fénykárosodás utáni javító folyamatait.

A fotoszintetikus apparátuson belül a kettes fotokémiai rendszer (PSII) kiemelt fontossággal bír, ugyanis a D1 fehérje alegysége hordozza vagy köti a PSII elektrontranszportjában aktívan szerepet játszó redox kofaktorok túlnyomó részét. Ugyanakkor a vízbontó komplex kofaktorainak is a D1 biztosít kötődési helyet.

Szerepüknél fogva a PSII D1 és D2 fehérjéi rendszeresen és viszonylag gyakran károsodnak, az oxigéntermelő komplexszel együtt az UV-B sugárzás és általában a fotoinhibíció elsődleges célpontjának számítanak. A fotoszintetikus szervezetek nagy energiát fektetnek a károsodott alegységek gyors és hatékony pótlásába.

A D1 fehérje pótlása a PSII javítási ciklusának legfontosabb része. A javítási ciklus több lépésből áll: 1. károsodott D1 és D2 alegységek proteolitikus eltávolítása, 2. hírvivő RNS átírása a *psbA* és *psbD* gének alapján, 3. fehérjék *de novo* szintézise a hírvivő RNS-ek alapján, 4. az újonnan szintetizált fehérjék beépülése a PSII komplexbe (Komenda and Barber 1995), 5. a vízbontó komplex, valamint a kis molekulatömegű fehérjék kapcsolódása és a PSII komplex aktiválása. Ha ez a javítási ciklus nem kellően hatékony és a károsodások mértéke elhatalmasodik az illető szervezeten, akkor fotoinhibícióról beszélünk.

A fotoszintetikus apparátus mellett, az UV-B sugárzás a DNS-t is károsítja. Az UV-B energiájának hatására dimerizálódnak a DNS szerkezeti elemei és az esetek túlnyomó részében ciklobután pirimidin dimerek (CPD) jönnek létre. Mivel ezek a képletek akadályozzák a DNS és RNS polimerázok működését, annak függvényében, hogy a szervezet milyen gyorsan képes megszabadulni tőlük, akár letálisak is lehetnek. A fotoliáz egy olyan enzim, amely az UV-A és a kék fény energiáját közvetítve specifikusan katalizálja a dimerek monomerizálódását, még hozzá gyorsabban és jobb energiahatékonysággal, mint más, nem specifikus folyamatok, amelyek a káros képletek kimetszésén alapulnak. A fotoliáz által katalizált folyamat a fényreaktiváció, amely a DNS javítási ciklus egy specifikus változata.

A PhrB fehérje a *Synechocystis* fotoliázának (PhrA) szerkezeti homológja. Alig több mint egy évtizede azonosították és egy aminósav szekvencián alapuló molekulacsoportba, a DASH kriptokrómok (*Drosophila*, *Arabidopsis*, *Synechocystis*, *Homo*) közé sorolták. Pontos szerepét máig sem sikerült tisztázni. Az irodalomban szerepelt már gyenge fotoliázként, transzkripciós szabályzóként és nem utolsósorban kék fényreceptorként is. Ez arra utal, hogy a fehérjének több folyamatban is szerepe lehet.

Célkitűzések

Fénystressz alatt a fotoszintetikus apparátus fehérjéi fokozott ütemben cserélődnek. A PSII helyreállítási ciklus egyik fontos lépése a fény által károsított D1 alegységek új D1 fehérjével való helyettesítése, amihez *psbA* hRNS molekulák szintézise szükséges. Mivel az UV sugárzás által okozott károsítás potenciálisan meggátolhatja a D1 fehérje szintézishez szükséges hRNS képződést, felmerül az az érdekes lehetőség, hogy az UV-indukált DNS károsítás közvetlen vagy közvetett hatással van a PSII fehérjeszintézistől függő helyreállítási ciklusának működésére. Ennek tisztázására a következő kérdések vizsgálatát tűztük ki célul:

1. Milyen hatása van a PSII helyreállítási ciklusának működésére a DNS javító enzim fotoliáz (PhrA) hiánya a *Synechocystis sp.* PCC 6803 cianobaktériumban?

2. Milyen szerepe van a fotoliázzal homológ PhrB fehérjének az UV-indukált DNS károsítás kijavításában, valamint a PSII helyreállítási ciklusának működésében a *Synechocystis sp.* PCC 6803 cianobaktériumban?

Anyagok és módszerek

Synechocystis sejtek nevelése.

UV-B és magas intenzitású fehér fény használata.

PSII aktivitásának meghatározása fényimpulzus által indukált klorofill-a fluoreszcenciával és oxigéntermelési mérésekkel.

Tilakoidmembrán izolálás, gélelektroforézis, immunoblottolás.

Natív gélektroforézis, 2D fehérjegél.

RNS izolálás, reverz transzkripció, qPCR.

Genomi DNS izolálás, alkalikus gélelektroforézis.

Eredmények és kiértékelésük

Annak érdekében, hogy a DNS és a PSII javítási ciklusának kapcsolatát vizsgáljuk, olyan *Synechocystis* mutánst használtunk, amelyben a fotoliáz hiányának következtében (*phrA*⁻) nem volt jelen az UV-B-re specifikus DNS javítási ciklus. Azt

találtuk, hogy a vad típusal (VT) összehasonlítva, UV-B sugárzás alatt, a *phrA*⁻ sejtek gyorsabban veszítenek PSII aktivitásukból. Fehérjeszintézist gátló linkomicint adagolva a sejttényeszetekhez az is kiderült, hogy az ok, amiért a mutáns sejtek érzékenyebben reagálnak az UV-B sugárzásra, mint a VT, a PSII javítási ciklusának *de novo* fehérjeszintézisének lépésében keresendő.

Az UV-B kezelések alatt vett mintákból tilakoidmembránt izoláltunk ahhoz, hogy megvizsgálhassuk a D1 fehérje pótlásának rátáját a VT-ban illetve a *phrA*⁻ sejtekben. Azt találtuk, hogy míg a VT sejtek a stresszkezelések alatt és után is képesek voltak a stresszmentes állapotokra jellemző mennyiségű D1 fehérjét előállítani, addig a mutáns sejtek D1 mennyisége a kezelések végére jelentősen lecsökkent. Ez utóbbi hatás maradandónak bizonyult, a *phrA*⁻ sejtek nem voltak képesek helyreállítani a D1 állományukat, az UV-B stressz megszűnte után sem.

Mivel elméletben a hatékony *de novo* fehérjeszintézis egy bőséges hírvivő RNS (hRNS) tartományra támaszkodik, megvizsgáltuk, hogy UV-B sugárzás alatt hogyan alakul a D1-et kódoló és stresszkörülmények által indukált *psbA3* transzkript szintje a két sejtvonalban. Az eddigi eredményeket tükrözve a VT sejtekben, az alkalmazott UV-B stressz hatékonyan indukálta a *psbA3* átírását és a stressz megszűntével visszaesett a kiindulási szintre. A stresszmentes regenerációt követő második adag UV-B sugárzással kimutattuk, hogy a VT-ban ismételtén is indukálható a *psbA3* átírása. Ezzel szemben a *phrA*⁻ sejtekben már az első szakasznyi UV-B kezelés végére jelentősen alacsonyabban volt a sejtek *psbA3* szintje a VT-hoz képest, ami a stressz hiányában sem változott, nem esett vissza az UV-B kezelés előtti szintre. A kezelés utáni, maradandó alacsony D1 szintet magyarázva a második adag UV-B sugárzás már nem hozott *psbA3* indukciót a fotoliáz hiányos sejtekben. Mivel az első kezelés végétől fogva, a regenerációs szakaszon keresztül, a második kezelés végéig nem változott jelentősen a mutáns sejtek *psbA3* szintje, arra következtettünk, hogy az UV-B által okozott specifikus képletek akadályozzák az RNS polimerázok működését. Így sem újabb *psbA3* hRNS nem tudott képződni, sem pedig olyan hRNS molekulák, amelyek a már meglévő RNS állomány lebontásához szükséges fehérjéket kódolják.

A DNS károsodások számszerűsítéséhez és azonosításához kétféle módszert alkalmaztunk: qPCR és alkalikus gélelektroforézis. A qPCR-re alapozott eljárás nem

tesz különbséget a károsodások között, minden olyan képletet kimutat, amely akadályozza a DNS polimeráz működését. Segítségével azt derítettünk ki, hogy az UV-B kezelés végére, a *phrA*⁻ sejtekben, átlagosan majdnem 1 károsodás jut a genom minden 1kb szakaszára. Mivel a *Synechocystis* átlag génhossza 1kb körül van, ez egy igen szignifikáns jelenség. Ahhoz, hogy megállapíthassuk, hogy az ilyen mértékben felhalmozódott, DNS polimerázt gátló károsodások milyen arányban azonosak az UV-B által létrehozott CPD képletekkel, genomi DNS-t (gDNS) izoláltunk a sejtvonalakból és Endonukleáz V PDG enzimmal emésztettük. Ez utóbbi enzim specifikusan a CPD-nél hasítja a DNS molekulát, így minél több a károsodás annál kisebb fragmentumok jönnek létre az emésztés után. Alkalikus gélen a különböző méretű fragmentumok elmosódott foltként jelennek meg és minél lennebb fut a folt, annál kisebb fragmentumok alkotják, tehát annál több szubsztrátumra lelt az enzim. A géleképeket kiértékelve és számszerűsítésével azt találtuk, hogy a DNS polimerázt gátló képletek jelentős része UV-B által indukált CPD volt.

A PhrB fehérje hatását a *phrB*⁻ sejtek és a VT összehasonlítása alapján vizsgáltuk. Azt találtuk, hogy a *phrB*⁻ sejtek nemcsak UV-B stresszre, hanem magas intenzitású fehér fényre (FF) is érzékenyebben reagálnak mint a VT. Ez arra engedett következtetni, hogy a PhrB hatásköre nem korlátozódik az UV-B által létrehozott specifikus képletek kijavítására. Linkomicin alkalmazásával kiderítettük, hogy a *phrA*⁻ sejtvonalhoz hasonlóan a *phrB*⁻ sejtek fokozott stresszérzékenysége a PSII javítási ciklus *de novo* fehérjeszintézisével hozható kapcsolatba.

Ugyanakkor, UV-B kezelés után, hiányában nem halmozódott fel kimutatható mennyiségű CPD és az egyik leggyakrabban előforduló, oxidatív stressz következtében kialakuló 7,8-dihidro-8-oxoguanin DNS károsodás sem volt kimutatható. Ez arra engedett következtetni, hogy a fotoliázzal ellentétben a PhrB nem a DNS javításán keresztül fejt ki hatását a PSII javítási ciklusára.

Megerősítve a PhrB és a PSII javítási ciklusa közti összefüggést, kimutattuk, hogy míg a VT-ban nincs jelentős változás a D1 fehérjeállományban, sem az UV-B, sem pedig a FF stresszkezelések után, addig a *phrB*⁻ sejtekben az jelentősen csökken.

Mivel a *phrB*⁻ sejtek genomjában nem halmozódott fel kimutatható mennyiségű DNS károsodás, nem szolgált meglepetésként, hogy a mutáns sejtek *psbA3* hRNS állománya a VT-hoz hasonló indukciót mutatott, mind UV-B, mind

pedig FF hatására, illetve ezek hiányában egyaránt. Ez a jelenség arra utalt, hogy a PhrB nem a hRNS állományon keresztül fejt ki hatását a PSII javítási ciklusára illetve a D1 fehérje pótlására.

Ezek alapján megvizsgáltuk azt, hogy a PhrB hatása csak a D1 fehérjére szorítkozik-e, vagy netán általánosabb ennél. A 2D natív géles kísérletünk arra világított rá, hogy PhrB hiányában több fehérjének a mennyisége is lecsökken. Ezek közül a legfigyelemreméltóbbak a CO₂ sejten belüli koncentrációjában szerepet játszó SbtA bikarbonát transzporter, a RuBisCO kis alegységét alkotó RsbC és a sejt motilitásáért felelős, valamint feltehetően klorofill molekula kötésére képes PilA1 voltak.

Mind az SbtA, mind pedig az RsbC csökkent mennyisége potenciálisan hatással lehet a *psbA* gének átírására, mivel a Calvin-Benson ciklus csökkent működését vonná maguk után, ami pedig reaktív oxigénformák képzéséhez vezet és ezek képesek gátolni a D1 szintézisét. A PilA1 a PSII komplex összeszerelésében játszhat szerepet a klorofill kötő képessége által. Hiányában kevesebb klorofill állhat a rendszer rendelkezésére, így kevesebb funkcionális PSII képződése várható.

Következtetések

- Az UV-B sugárzásból származó DNS károsodások befolyással vannak a fotoszintetikus folyamatokra.
- A fotoliáz (PhrA) enzim hiánya súlyosbítja az UV-B stressz során keletkező károsodásokat a *Synechocystis* sejtek PSII komplexében.
- Az emelkedett UV-B érzékenység a DNS javítás hiánya következtében felhalmozódó DNS károsodások miatt jelentkezik, amelyek jelentősen csökkentik a PSII komplex működéséhez elengedhetetlen *psbA* géncsalád elemeinek hatékony kifejeződését.
- Az UV-B által indukált károsodások enyhítésében fontos szerepet játszó két javító mechanizmus, a DNS javítási folyamata és a PSII komplex javítási folyamata, közvetlenül kapcsolatban áll egymással.
- A PhrB hiánya gátolja a sejtek, UV-B sugárzás valamint a magas intenzitású FF következtében szerzett károsodások kijavítását.
- A hatását, a PhrA-val ellentétben nem a specifikus UV-B-károsodások visszafordítása, sem pedig ROS-ok által létrehozott 8-oxoG kijavítása útján fejt ki.
- A PhrB a PSII javítási ciklusban fellelhető, javításban vagy a fehérje komplex összeszerelésében szerepet játszó, fehérjék szabályzásában fejt ki hatását.
- Ezek közül, funkcióik alapján, kitűnnek a CO₂ fixálással asszociálható SbtA és RbcS fehérjék, valamint a Pila1 fehérje, amelynek főleg a sejtek motilitásában tulajdonítanak szerepet, viszont jelenlétük a klorofill molekulák szállításához, illetve tárolásához is köthető.

Publikációs lista

A dolgozatban felhasznált közlemények:

Vass IZ, Kós PB, Sass L, Nagy CI, Vass I. “The ability of cyanobacterial cells to restore UV-B radiation induced damage to Photosystem II is influenced by photolyase dependent DNA repair”, *Photochemistry and Photobiology* (2013) 89: 384–390.

Vass IZ, Kós PB, Knoppová J, Komenda J, Vass I “The cry-DASH cryptochrome encoded by the *sll1629* gene in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 is required for Photosystem II repair”, *Journal of Photochemistry and Photobiology* (2014) 130: 318–326

Egyéb közlemények:

Fodorpataki L, **Vass IZ** “Changes in chlorophyll fluorescence during the greening of etiolated leaves”, *Studia Universitas Babeş-Bolyai, Biologia* (2005) issue no 1.

Vass IZ “The effect of environmental pollutants on the induced chlorophyll fluorescence of greening leaves”, *Acta Scientiarum Transylvanica – Múzeumi Füzetek* (2007) 14-1.

Bírálat alatt: Nagy CI, Vass I, Rákhely G, **Vass IZ**, Tóth A, Duzs Á, Peca L, Kruk J, Kós PB “Functional link between sulfide:quinoneoxidoreductase and arsenic resistance genes in *Synechocystis* sp. PCC6803 regulated by an ArsR-type repressor of dual substrate specificity: a reminiscence of ancient anaerobic metabolism

Vass István Zoltán “Egy baktérium a Napra néz” *Élet és Tudomány* LXIX 10:294-296.