A foszfatidil-glicerin szerepe az 1. fotokémiai rendszer szerkezetében és funkciójában

Doktori (PhD) értekezés

Domonkos Ildikó

Témavezető: Dr. Gombos Zoltán

MTA Szegedi Biológiai Központ Növénybiológiai Intézet
Szegedi Tudományegyetem

Szeged
2006

Tartalomjegyzék

Rövidítések 5
1. Bevezetés 7
2. Irodalmi áttekintés 9
2.1. A cianobaktériumok 9
2.1.1. A cianobaktériumok sejtszerveződése, membránrendszerei 9
2.1.2. A *Synechocystis sp.* PCC6803 cianobaktérium 11
2.2. A cianobaktériumok fotoszintetikus membránjának szerkezete, felépítése 12
2.2.1. A tilakoidmembránt felépítő lipidek 12
2.2.2. A glikolipidek bioszintézise 14
2.2.3. Az MGDG szerepe a tilakoidmembránban 16
2.2.4. A DGDG szerepe a tilakoidmembránban 17
2.2.5. Az anionos lipidek jelentősége a tilakoidban 18
2.2.2. A tilakoidmembránt felépítő fehérjék; a fotoszintetikus apparátus 20
2.2.2.1. Az 1. fotokémiai rendszer fehérjéi 23
2.2.2.1.1. A PSI központi magja: PsaA és PsaB 24
2.2.2.1.2. A PSI donor oldala: a lumen felőli felszín 26
2.2.2.1.3. A PSI akceptor oldala: PsaC, PsaD és PsaE alegységek 26
2.2.2.1.4. A monomerek kapcsolódási felszíne: PsaL, PsaI és PsaM 27
2.2.2.1.5. Perifériális membránintegráns alegységek: PsaF, PsaJ és PsaK 28
2.2.2.2. A cianobakteriális és a növényi PSI összehasonlítása 29
2.3. A PG specifikus szerepe az oxigéntermelő fotoszintetikus membránokban 31
2.3.1. A PG előfordulása 31
2.3.2. A PG bioszintézise 33
2.3.3. A PG szerepe a magasabbrendű növényekben és algákban 36
2.3.4. A PG szerepe cianobaktériumokban 39
2.3.4.1. A *Synechocystis sp.* PCC6803 *pgsA* cianobaktérium 40
2.3.4.2. A PG jelentősége a PSII szerkezetének és funkciójának fenntartásában 41
2.3.4.3. A PG szerepe a PSI szerkezetének és működésének fenntartásában 42
3. Célkitűzések 44
4. Kísérleti anyagok és módszerek 46

4.1. *Synechocystis sp*. PCC6803 *pgsA* nevelési körülményei 46
4.2. Morfológiai vizsgálatok: elektronmikroszkópos vizsgálatok 46
4.3. Lipid- és zsírsavanalízis 47
4.3.1. Lipidek extrahálása és elválasztása 47
4.3.2. Zsírsavanalízis 47
4.4. A sejtek pigmenttartalmának vizsgálata 47
4.5. A tilakoidmembrán szerkezetének vizsgálata 48
4.5.1. A tilakoidmembrán izolálása 48
4.5.2. FTIR: Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia 48
4.5.3. DSC: differenciális pásztázó kalorimetria 49
4.6. Fehérje-klorofill komplexek oligomerizációjának vizsgálata 49
4.6.1. Tilakoidizolálás 49
4.6.2. A komplexek elválasztása anion-cserélő kromatográfiával 50
4.6.3. 77 K fluoreszcencia spektroszkópia 51
4.6.4. PSI oligomerek azonosítása gélszűréssel 51
4.7. A PSI-aktivitás mérése 51
4.8. PSI-komplexek fehérje-összetételének vizsgálata 52
5. Eredmények 53
5.1. *Synechocystis sp.* PCC6803 *pgsA* sejtek szaporodása 53
5.2. A sejtek morfológiája 54
5.3. Lipid- és zsírsavtartalom 56
5.4. A *pgsA* sejtek pigmenttartalmának változása a PG kiürülésének hatására 58
5.5. A tilakoidmembrán szerkezetének vizsgálata 60
5.5.1. FTIR: Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia 60
5.5.2. DSC: differenciális pásztázó kalorimetria 61
5.6. A PSI-oligomerizáció vizsgálata 63
5.7. A *pgsA* sejtek PSI aktivitása a PG kiürülése során 67
5.8. A PSI monomerek és trimerek fehérjeösszetétele 68
6. Az eredmények megvitatása 71
7. Összefoglalás 79
8. Idézett közlemények 82

Összefoglalás 96
Summary 102
Publikációs lista 107
Köszönetnyilvánítás 110

Rövidítések

ΔA	abszorpcióváltozás
ACP	acilcarrier-protein
CDP	citidil-difoszfát
CL	kardiolipin
CM	citoplazmamembrán
CMP	citidil-monofoszfát
CP43 *és* CP47	a PSII reakciócentrum belső antenna alegységei
CTP	citidil-trifoszfát
D1 *és* D2	a PSII reakciócentrum fehérjealegységei
Da	dalton
DCMU	diklórfenil-dimetil-urea (herbicid)
DG	diacil-glicerin
DGDG	digalaktozil-diacilglicerin
DM	n-dodecil-β-D-maltozid
DSC	differenciális pásztázó kalorimetria
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
ER	endoplazmás retikulum
ETL	elektrontranszportlánc
FNR	ferredoxin-$NADP^+$-oxidoreduktáz
FTIR	Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia
G3P	glicerol-3-foszfát
HEPES	hidroxietil-piperazinil-etánszulfonsav
LHCI, *ill.* LHCII	a PSI, ill. a PSII külső fénybegyűjtő komplexe növényekben
LPA	lizofoszfatidsav
MES	2-(N-Morpholino)- etán-szulfonsav
MGDG	monogalaktozil-diacilglicerin
MGlcDG	monoglükozil-diacilglicerin
$NADP^+$, *ill.* NADPH	oxidált, ill. redukált nikotinsavamid-adenin-dinukleotid-foszfát
OD	optikai denzitás
P680	a 2. fotokémiai rendszer elsődleges elektrondonorja

P700	az 1. fotokémiai rendszer elsődleges elektrondonorja
PA	foszfatidsav
PCC	Pasteur Culture Collection, cianobaktériumtörzsek gyűjteménye
PG	foszfatidil-glicerin
PGP	foszfatidil-glicerin-foszfát
PLA_2	foszfolipáz A_2
PMSF	fenil-metil-szulfonil-fluorid (proteáz inhibitor)
PSI	1. fotokémiai rendszer
PSII	2. fotokémiai rendszer
Q_A	elsődleges kinon elektronakceptor
Q_B	másodlagos kinon elektronakceptor
R	acilcsoport
RC	reakciócentrum
SDS	Na-dodecil-szulfát
SQDG	szulfokinovozil-diacilglicerin
TES	N-tris-(hidroximetil)-metil-2-aminoetán-szulfonsav
TL	termolumineszcencia
TM	tilakoidmembrán
UDP	uridil-difoszfát
16:0 zsírsav	palmitinsav
16:1 zsírsav	palmitoilsav
18:0 zsírsav	sztearinsav
18:1 zsírsav	olajsav
18:2 zsírsav	linolsav
18:3 zsírsav	linolénsav

1. Bevezetés

A cianobaktériumok vagy kék-zöld algák a Földön kialakult legősibb prokarióta szervezetek közül valók. A legidősebb üledékes kőzetek, melyekben cianobakteriális fosszíliákat találtak, 3,5 milliárd évvel ezelőtt alakultak ki. Az általuk kifejlesztett oxigéntermelő fotoszintézis révén, melynek során napenergia felhasználásával építik be a légköri széndioxidot sejtjeik szerves molekuláiba, elterjedtek az egész Földön, és vízbontásból származó oxigénfejlesztésükkel átalakították bolygónk légkörét. Az endoszimbiózis elmélete szerint az eukarióta növényi sejt 1,5 milliárd évvel ezelőtt alakult ki, miután elődje bekebelezte a mai cianobaktériumok ősét, és együttélésük a kloroplasztisz kialakulásához vezetett. A cianobaktériumok fotoszintetikus apparátusa sikeres volt, és megőrződött a növényvilág evolúciója során, alapot teremtve az állatvilág kifejlődésének és fennmaradásának is ezen a bolygón.

A cianobaktériumok, mint a kloroplasztisz ősei, rendkívül jó modellszervezetek a fotoszintézis tanulmányozásához. Egyszerűbb sejtszerveződésük, könnyű szaporításuk, és egyes törzsek természetes transzformációs kompetenciája révén alkalmasabb alanyai a fotoszintézis kutatásának, mint a nehezebben kezelhető, bonyolultabb sejtszerkezetű, sok sejtorganellummal rendelkező növények. Előnyös a cianobaktériumok felhasználása abból a szempontból is, hogy képesek egyes lipideket a külső környezetből felvenni, ezáltal tanulmányozható ezen lipideknek a membránhoz kötött sejtfunkciókban betöltött szerepe.

A fotoszintézis fényreakciói a tilakoidmembrán lipidrétegébe ágyazott fehérje-pigment komplexekben játszódnak le. A fotoszintetikus apparátus fehérjéi szoros kölcsönhatásban vannak az őket körülvevő lipidmolekulákkal. A lipid-fehérje kölcsönhatások meghatározó szerepet játszhatnak a fotoszintetikus elektrontranszportban, de ezekről jelenleg igen kevés ismerettel rendelkezünk. Az anionos töltést hordozó lipidmolekulák jelenléte feltétlenül szükséges a poláros fehérjéknek az apoláros membránba való beépüléséhez. Míg a nem fotoszintetizáló prokariótákban és az eukarióta szervezetekben a membránok főként foszfolipidekből épülnek fel, cianobaktériumokban egyetlen foszfolipid fordul elő, a foszfatidil-glicerin. A foszfatidil-glicerin ugyan hozzávetőleg csak tizedét teszi ki a tilakoidmembrán lipidjeinek, jelenléte esszenciális a cianobaktériumok sejtfunkcióinak fenntartása szempontjából. Jelenleg nem tisztázott, hogy a foszfatidil-glicerin miért olyan fontos a fotoszintézis folyamatainak működéséhez,

ezért érdekes kihívás a foszfatidil-glicerin lipid-fehérje kölcsönhatásokban való résztvételének tanulmányozása, és ezen kölcsönhatások funkcionális szerepének megértése.

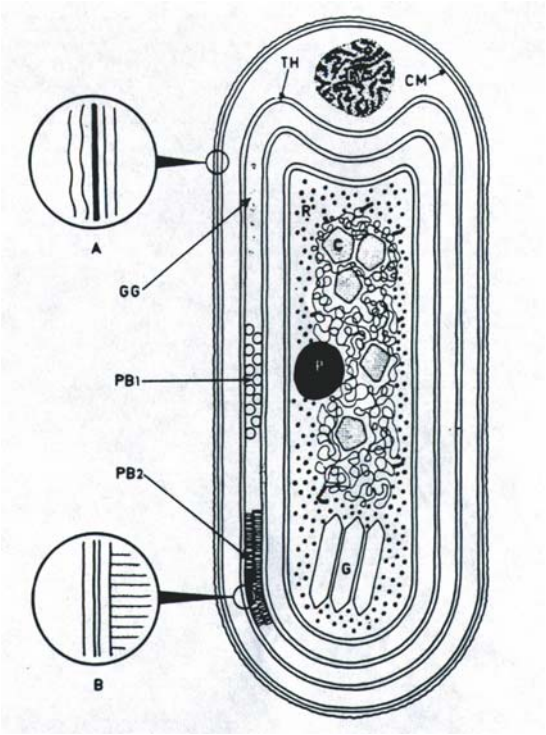
2. Irodalmi áttekintés

2.1. A cianobaktériumok

A cianobaktériumok az egész Földön elterjedt, kb. 2000 fajba sorolt, nagy egyedszámban előforduló prokarióta szervezetek, melyek rendkívül jó alkalmazkodóképességük révén szélsőséges környezeti feltételek között is megélnek. Egyszerű sejtszerveződésük miatt jó modellszervezetek, aránylag gyorsan szaporodnak, könnyen tenyészthetők.

2.1.1. A cianobaktériumok sejtszerveződése, membránrendszerei

A cianobaktériumok egysejtű, fonalas vagy telepes szerveződésű prokarióták (1. ábra).



1. ábra. Cianobaktériumok sejtfelépítése (Stanier és Cohen-Bazire, Annu. Rev. Microbio. 31, 225 (1977) CM: citoplazmamembrán, TH: tilakoidmembrán, PB1 és PB2: fikobiliszómák szemből és oldalnézetből, GG: glikogénszemcse, CY: cianoficinszemcse, P: polifoszfátgranulum, C: karboxiszóma, R: riboszóma, G: gázvezikulum, *A:* a sejtfal rétegei (felnagyítva), *B:* tilakoidmembrán-pár fikobiliszómákkal (felnagyítva)

Sejtfaluk Gram-negatív jellegű, melynek peptidoglikán rétege vastagabb, mint általában a Gram-negatív baktériumoké, és amely főként a mechanikai védelmet szolgálja.

A külső membrán lipopoliszacharid tartalma igen jelentős, és sok fajt nyálkaburok is körülvesz.

A protoplazmában elhelyezkedő genomjuk, amely cirkuláris DNS, akár 7–15 kópiaszámban is előfordulhat. Gyakran hordoznak plazmidokat is. A citoplazmában találjuk még a riboszómákat, valamint különféle granulumokat, melyek raktározott tápanyagokat vagy enzimeket tartalmaznak.

Membránrendszerüket háromféle membrán alkotja. A külső membrán, mely a sejtfal része, főként fehérjékből és lipopoliszacharidokból áll, lipideket és karotinoidokat kisebb arányban tartalmaz. A külső membránban főként különféle transzportermolekulák találhatók: egyrészt passzív diffúziót lehetővé tevő csatornák, melyeket porin típusú fehérjék alkotnak, másrészt „facilitált" diffúziót biztosító csatornák, valamint aktívtranszport-komplexek, melyek összekötik a külső membránt a citoplazmamembránnal, átnyúlva a rigid peptidoglikánréteg pórusain (Gantt, 1994). A külső membrán jelentős mennyiségben tartalmaz még karotinoidkötő fehérjéket, melyek valószinűleg „védőernyőt" képezve óvják a sejtet a túl erős fénytől (Jurgens és Mantele, 1991).

A sejtfalon belül található citoplazmamembrán lipidösszetétele hasonlít a sejt belső (tilakoid) membránrendszeréhez, mely főként glikolipidekből és fehérjékből épül fel, de nem hasonlít a baktériumok főként foszfolipidekből álló membránjára. A citoplazmamembrán fehérjéi között találunk transzportfehérjéket, pl. nitrát- és nitritspecifikus aktívtranszport-rendszereket (Maeda és mtsai, 1998), valamint a légzési elektrontranszportlánc és az oxidatív foszforiláció fehérjéit (Peschek, 1987; Schmetterer, 1994) is, mivel a cianobaktériumok sötétben a légzés biokémiai reakcióin keresztül biztosítják a megfelelő ATP-szintet. A citoplazmamembránnak fontos szerepe van az ozmotikus regulációban is (Inaba és mtsai, 2001).

Az intracelluláris elhelyezkedésű tilakoidmembrán a sejtfallal párhuzamosan futó rétegekből áll, melyek nem tapadnak össze, ellentétben a növények gránumos szerveződésű tilakoidjával, hanem egymástól 60–70 nm távolságban, párosával helyezkednek el. A tilakoidpárok közti tér része a sejt citoplazmájának, míg a tilakoidpár két membránja közti tér alkotja a tilakoid lumenét. A tilakoidmembrán ad teret a fotoszintetikus

elektrontranszportlánc fehérjekomplexeinek és mobilis elemeinek, valamint tartalmazza a légzési elektrontranszportlánc komponenseit is. A cianobaktériumok sajátossága, hogy ugyanabban a sejtkompartmentben képesek oxigéntermelő fotoszintézisre és légzésre is.

Elektronmikroszkópos felvételeken megfigyelhető, hogy a tilakoidmembrán és a citoplazmamembrán több ponton is kapcsolódnak egymáshoz, de a kapcsolat módja, pontos szerkezete nem ismert.

A cianobaktériumok kiválóan használhatók a növényi kloroplasztisz modelljeként. A fotoszintézis folyamatainak tanulmányozása igen nehézkes a növényekben, mert a növényi sejt nagyon bonyolult, sok kompartmenttel bíró sejt, melynek élettani folyamataiba nehéz úgy beavatkozni, hogy kérdéseinkre egyértelmű válaszokat kapjunk. A cianobaktérium, mely őse a kloroplasztisznak, sokkal egyszerűbb szervezet. Ha inaktiváljuk valamely génjét, várhatóan jól körülhatárolható, egyértelmű hatást tapasztalunk. Tehát a cianobaktériumokat felhasználhatjuk azoknak a kérdéseknek a megválaszolására, amelyek tanulmányozása a növényi sejtben nem lehetséges, vagy igen bonyolult.

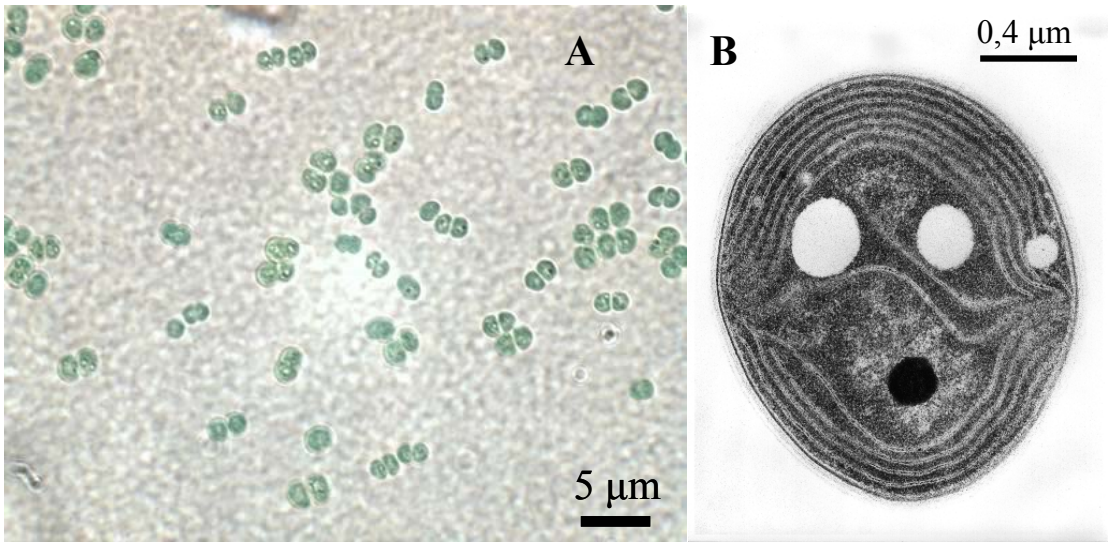
A cianobaktériumok felhasználásának további előnye, hogy a növényi sejttel ellentétben lehetőség van egyes olyan gének inaktiválására is, amelyek a sejt számára esszenciálisak, ha a sejt képes a hiányzó génterméket, vagy az általa katalizált reakció végtermékét felvenni a sejtfalon át a környezetből. Ilyen anyagok pl. egyes lipidek.

2.1.2. A *Synechocystis sp.* PCC6803 cianobaktérium

A *Synechocystis sp.* PCC6803 egysejtű, hőmérsékleti igényét tekintve mezofil cianobaktérium (2. ábra). Természetes transzformációs kompetenciája révén jól transzformálható, homológ rekombinációra képes, és teljes genomszekvenciája ismert (Kaneko és mtsai, 1996). Génmanipulációra alkalmas, kiváló alanya az irányított mutagenezisre alapuló kutatásoknak (Golden és mtsai, 1987).

A *Synechocystis sp.* PCC6803 fotoheterotróf életmódú: életfolyamatai fotoszintézisen alapulnak, de képes szaporodni glükóz szénforráson sötétben is, napi 5 perc megvilágítás mellett (light-activated heterotrophic growth) (Anderson és McIntosh, 1991). Ez utóbbi tulajdonsága lehetőséget ad arra, hogy a fotoszintetikus apparátus kulcsfontosságú enzimeit is inaktiváljuk. Tehát a *Synechocystis*t felhasználhatjuk a fotoszintézis olyan

részfolyamatainak a tanulmányozására, amelyeket a növényi sejtben igen bonyolult lenne vizsgálni.



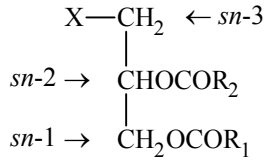
2. ábra. *Synechocyctis sp.* PCC6803 cianobaktérium *A*: fénymikroszkópos; *B*: elektronmikroszkópos felvételen (készítette Toku Kanaseki)

2.2. A cianobaktériumok fotoszintetikus membránjának szerkezete, felépítése

A cianobaktériumok tilakoidmembránja mind lipid- és fehérjeösszetételében, mind működésében nagyon hasonlít a növények kloroplasztiszában levő tilakoidmembránra.

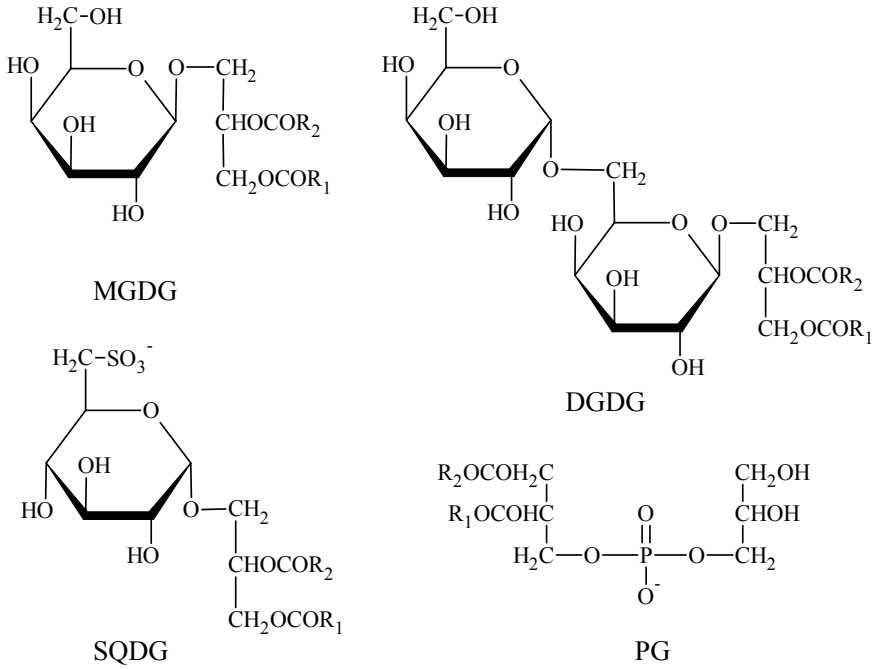
2.2.1. A tilakoidmembránt felépítő lipidek

A tilakoidmembránt négyfajta glicerolipid építi fel. A glicerolipidek vázát glicerin molekula képezi, melyet *sn*-1 és *sn*-2 helyzetben zsírsavláncok észteresítenek, *sn*-3 helyzetbe pedig valamilyen poláros fejcsoport épül be (3. ábra).



3. ábra. Glicerolipidek felépítése. R_1 és R_2: acilcsoportok, X: poláros fejcsoport

A tilakoid glicerolipidjei közül három glikolipid: a neutrális monogalaktozil-diacilglicerin (MGDG) és digalaktozil-diacilglicerin (DGDG), valamint a negatív töltésű szulfokinovozil-diacilglicerin (SQDG) (4. ábra). A cianobaktériumokban előforduló egyetlen foszfolipid a foszfatidil-glicerin (PG) (Block és mtsai, 1983; Wada és Murata, 1998).



4. ábra. Cianobaktériumok glicerolipidjei. DGDG: digalaktozil-diacilglicerid, MGDG: monogalaktozil-diacilglicerid, PG: foszfatidil-glicerin, SQDG: szulfokinovozil-diacilglicerid; R_1 és R_2: acilcsoportok

Az összes glicerolipid több mint fele MGDG, 15–20% DGDG, az SQDG és PG aránya 5–20% között változik. Kis mennyiségben egy ötödik lipidfajta is előfordul a cianobaktériumokban, a monoglükozil-diacilglicerin (MGlcDG). Ez a glikolipid az MGDG szintézise során keletkező köztes termék, melynek aránya általában kevesebb, mint 1% (Sato és Murata, 1982), azonban fényen tartott és az optimálisnál magasabb hőmérsékletnek kitett *Synechocystis* sejtekben megnő a mennyisége a tilakoidban. Ez a megnövekedett mennyiségű, csak telített zsírsavakat tartalmazó MGlcDG, mint „hősokklipid" növeli a membrán rendezettségét, stabilizálja szerkezetét, ezáltal szerepe lehet a magas hőmérséklethez való alkalmazkodásban (Balogi és mtsai, 2005).

A *Synechocystis* PCC6803 cianobaktérium citoplazma és tilakoidmembránjának lipidösszetételét mutatja az 1. táblázat Gombos és mtsai (1996) alapján. Ebben a törzsben nincs lényeges eltérés a kétfajta membrán lipidösszetételében.

	Lipidosztályok (mol%)			
	MGDG	**DGDG**	**SQDG**	**PG**
TM	62	14	18	6
CM	59	18	13	10

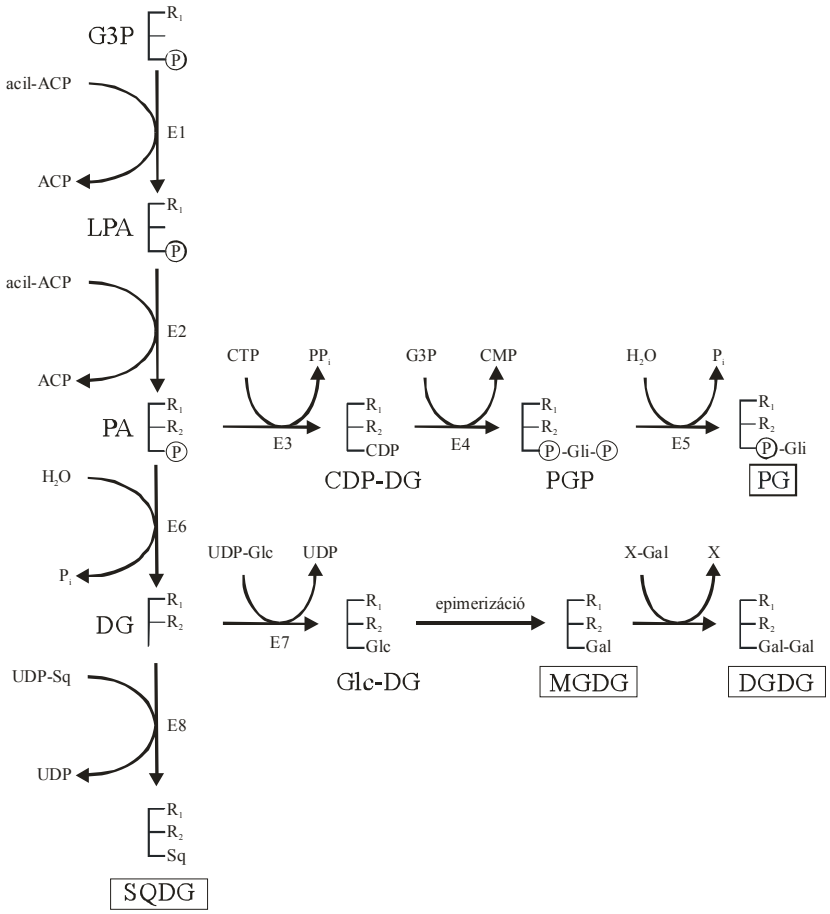
1. táblázat. *Synechocystis sp.* PCC6803 cianobaktérium membránjainak lipidösszetétele Gombos és mtsai (1996) alapján. TM: tilakoidmembrán, CM: citoplazmamenbrán

2.2.2. A glikolipidek bioszintézise

A cianobakteriális glicerolipidek bioszintézisének áttekintő ábráján (5. ábra) látható, hogy az összes membránalkotó lipid szintézise glicerol-3-foszfát (G3P) és egy acil-acilcarrier-protein (acil-ACP) reakciójával indul, ami lizofoszfatidsav (LPA) intermedieren keresztül foszfatidsav (PA) képződéséhez vezet.

A szintézis utak a PA kialakulása után elágaznak, egyrészt a foszfatidil-glicerin képződése felé (részletesebben a 2.3.2. fejezetben), másrészt a glikolipidek szintézise felé. A glikolipidek szintézisének lépései nem pontosan ismertek cianobaktériumokban. Az egyes lépéseket vagy biokémiai úton igazolták, vagy az enzimek génjét növényi vagy bakteriális gének homológjaként azonosították. A glikolipidek szintézise során előbb a PA-foszfatáz lehasítja a foszfátcsoportot a PA-ról diacil-glicerin (DG) képződését eredményezve, majd az MGDG-szintáz egy UDP-vel aktivált glükózmolekulát épít be a DG *sn*-3 pozíciójába, amely epimerizációs átalakulással galaktózzá módosulva hozza létre az MGDG-t, majd egy második galaktóz beépítésével jön létre a DGDG. Az SQDG szintézise során UDP-szulfokinovóz épül be a DG *sn*-3 helyzetébe az SQDG-szintáz közreműködésével (Wada és Murata, 1998).

A glicerolipidbioszintézis fenti lépései során csupán telített lipidek képződnek, melyekben különböző acil-lipid-deszaturázok hoznak létre telítetlen zsírsavláncokat kettős kötések kialakításával az egyes deszaturáz enzimek specificitásának megfelelő pozícióban (Murata és Wada, 1995).



5. ábra. Glicerolipidek bioszintézise cianobaktériumokban Wada és Murata (1998) alapján. ACP: acilcarrier-protein, CDP: citidil-difoszfát, CMP: citidil-monofoszfát, CTP: citidil-trifoszfát, DG: diacil-glicerid, G3P: glicerin-3-foszfát, Gal: galaktóz, Glc: glükóz, Gli: glicerin, LPA: lizofoszfatidsav, PA: foszfatidsav, PGP: foszfatidil-glicerin-foszfát, R1, R2: acilcsoportok, Sq: szulfokinovóz, UDP: uridil-difoszfát, X: ismeretlen galaktózcarrier; Enzimek: E1: G3P-aciltraszferáz, E2: LPA-aciltranszferáz, E3: foszfatidsav-citidiltranszferáz, E4: PGP-szintáz, E5: PGP-foszfatáz, E6: foszfatidsav-foszfatáz, E7: MGDG-szintáz, E8: SQDG-szintáz.

A cianobaktériumok glicerolipidjeinek zsírsavösszetétele fajonként eltér, és függ a környezeti feltételektől, főként az élőhely hőmérsékletétől. A cianobaktériumokat négy csoportra oszthatjuk membránlipidjeik zsírsavösszetétele, zsírsavaik telítetlenségének foka alapján (Kenyon, 1972; Kenyon és mtsai, 1972; Murata és mtsai, 1992b). Az első csoport tagjai mindössze egy telítetlen kötést hozhatnak létre zsírsavlánconként, egyetlen deszaturáz enzimük segítségével. A második és a harmadik csoportba tartozó cianobaktériumok három kettős kötés kialakítására képesek különböző deszaturáz enzimeikkel, míg a negyedik csoport tagjai akár négy telítetlen kötést is kialakíthatnak

ugyanazon a zsírsavláncon. A *Synechocystis* PCC6803 törzset a negyedik csoportba sorolták, melynek jellemző zsírsava a négy telítetlen kötést tartalmazó Δ6,9,12,15-*cisz*-oktadekatetraénsav [18:4(6,9,12,15)]. A 2. táblázat mutatja a 30 °C-on nevelt *Synechocystis*-sejtek lipidosztályainak zsírsavösszetételét Murata és mtsai (1992b) mérései alapján. Az MGDG és a DGDG zsírsavösszetétele hasonló, jellemző a telítetlen kötések nagy száma. A PG és főként az SQDG zsírsavláncai kevésbé telítetlenek.

Lipid osztályok	**Zsírsavak (mol%)**									
	14:0	**16:0**	**16:1**	**18:0**	**18:1**	**18:2**	**18:3α**	**18:3γ**	**18:4**	**ΣC16**
MGDG	1	51	3	t	2	7	t	32	3	54
DGDG	1	51	3	1	2	7	t	32	4	54
SQDG	1	68	5	1	6	13	4	1	t	73
PG	3	51	2	1	5	17	20	1	t	53

2. táblázat. Synechocystis sp. PCC6803 sejtek lipidosztályainak zsírsavösszetétele 30 °C-on Murata és mtsai (1992b) alapján. t: nyomokban (< 0,5%)

2.2.3. Az MGDG szerepe a tilakoidmembránban

A különböző lipidosztályok különböző szerepet töltenek be a tilakoidmembrán szerkezetének fenntartásában és a fotoszintézis folyamataiban.

A glikolipidek szerepét főként magasabbrendű növényekben vizsgálták. *Arabidopsis thalianá*ban 3 gén kódol MGDG-szintáz enzimet. Közülük elsősorban az *MGD1* gén által kódolt MGDG-szintáz felelős a kloroplasztiszban előforduló MGDG-molekulák szintéziséért. Az *Arabidopsis mgd1* mutáns az *MGDI* gén promóter régiójába történt T-DNS inszercióval jött létre, melynek hatására 75%-kal csökkent a génről átíródó mRNS mennyisége. A mutáns sejtekben az MGDG tartalom 42%-kal csökkent, a növények alacsony növésűek voltak, klorofilltartalmuk csökkent, a kloroplasztiszok kevesebb, megváltozott szerkezetű tilakoidot tartalmaztak (Jarvis és mtsai, 2000). Az *mgd1* mutáns tulajdonságai egyértelműen jelezték az MGDG jelentőségét a kloroplasztisz kialakulásában. Az MGDG esszenciális voltát az is jelzi, hogy nem sikerült *mgd1* nullmutánst létrehozni *Arabidopsis*ban (Awai és mtsai, 2001). A tilakoidmembrán szerkezetének kialakítása szempontjából nagy jelentőségű, hogy az MGDG molekula nem „bilayerképző”

lipid. A molekula kicsi fejcsoportja miatt kúp alakú, vizes közegben ún. inverz hexagonális (H_{II}) szerkezetet vesz fel. A tilakoidban előforduló többi lipid „bilayerképző", vizes közegben lamelláris szerkezetet alkot. A „bilayerképző" és a nem „bilayerképző" lipidek aránya meghatározó a fehérje-„folding", a fehérjék membránba ágyazódása és a fehérjék sejten belüli szállítása szempontjából (Gounaris és Barber, 1983; Bogdanov és Dowhan, 1999; Kusters és mtsai, 1994).

A fotoszintetikus reakciók membránkörnyezetének kialakításán kívül a fotoszintetikus apparátus működésében is kimutatható MGDG-molekulák szerepe. Röntgenkrisztallográfiás szerkezet-meghatározás mutatta ki egy MGDG-molekula jelenlétét az első fotokémiai rendszer (PSI) reakciócentrumában (Jordan és mtsai, 2001), 6 MGDG-molekulát írtak le a PSII RC-ban (Loll és mtsai, 2005), valamint MGDG játszik szerepet a xantofill-ciklus működésében, a violaxantin-deepoxidáz aktivitásának fenntartásában is (Latowski és mtsai, 2004).

Az MGDG szintéziséért felelős gént cianobaktériumban is sikerült azonosítani (Ohta személyes közlése), de ez nem homológ a növényi MGDG-szintáz génekkel, és a róla szintetizálódó fehérje sem hasonlít a növényi enzimre. A feltételezett MGDG-szintáz gén inaktiválása és részleges szegregáltatása után az MGDG szintézise jelentősen csökkent a mutáns sejtekben. MGDG-nullmutáns előállítása nem sikerült, mivel az MGDG esszenciális lipid, és a hiányzó lipid nem pótolható a sejten kívülről, mert ellentétben a PG-vel és az SQDG-vel, az MGDG-t a sejt nem tudja felvenni a sejtfalon át.

2.2.4. A DGDG szerepe a tilakoidmembránban

Dörmann és mtsai 1995-ben DGDG-hiányos mutánst izoláltak *Arabidopsis thalianá*ból. A *dgd1* mutánsban pontmutációval stopkodon jött létre a *DGD1* génben, melynek hatására a sejtek DGDG-tartalma 90%-kal csökkent. A mutáns növények növekedése elmaradt a vad típustól, kevesebb kloroplasztiszt, benne módosult szerkezetű tilakoidot tartalmaztak, a klorofill mennyisége és a fotoszintézis hatásfoka csökkent (Hartel és mtsai, 1997; Reifarth és mtsa, 1997; Hartel és mtsai, 1998), illetve zavart szenvedett a fehérjék kloroplasztiszba történő importja (Chen és Li, 1998). Végül a Kelly és mtsai által 2003-ban létrehozott *dgd1–dgd2-1* kettős mutáns, mely egyáltalán nem szintetizált DGDG molekulákat, egyértelműen megmutatta, hogy a DGDG alapvető szerepet

játszik a normális PSII aktivitás fenntartásában, valamint azt is, hogy a *dgd1* mutánsban még szintetizálódott kevés DGDG esszenciális a funkció szempontjából. Ha ezt a maradék DGDG-t is eltávolítjuk (*dgd1–dgd2-1* kettős mutáns), a növények fejlődése visszamarad, klorofilltartalmuk erősen lecsökken, a fotoszintézis kvantumhatásfoka csökken. Az észlelt nem-lineáris kapcsolat a DGDG mennyisége és a PSII-re kifejtett hatása között jelzi, hogy a tilakoidmembrán DGDG tartalma heterogén: a molekulák egy kisebb része szorosan kötődik a PSII-komplexhez és szükséges annak működéséhez, míg a DGDG molekulák zöme nem játszik közvetlen szerepet a PSII működésében (Steffen és mtsai, 2005). A fentieket igazolják a legújabb röntgenkrisztallográfiás szerkezetkutatás adatai, mely szerint 4 DGDG molekula található a PSII RC-ban az elektrontranszportlánc közelében (Loll és mtsai, 2005).

2.2.5. Az anionos lipidek jelentősége a tilakoidban

Az anionos SQDG és PG a membránalkotó lipideknek csak csekély hányadát teszik ki, de negatív töltésük révén igen jelentős szerepet játszanak a membránlipidek és a fehérjék közötti kölcsönhatásban.

Az SQDG bioszintézise növényekben a kloroplasztiszban történik. A szintézis első enzimét az UDP-szulfokinovóz-szintázt, mely a sztrómában található, növényekben az *SQD1* gén, cianobaktériumokban az *sqdB* gén kódolja. A szintézis másik enzimét, az SQDG-szintázt, mely a kloroplaszt belső burkolómembránjához kötött, növényekben az *SQD2* gén kódolja, cianobaktériumokban az *sqdX*. E két enzim génjeiben létrehozott mutációk segítségével vizsgálták az SQDG szerepét *Arabidopsis thalianá*ban (Essigmann és mtsai, 1998; Yu és mtsai, 2002; Yu és Benning, 2003), *Chlamydomonas reinhardtii* zöldalgában (Sato és mtsai, 1995; Minoda és mtsai, 2002; Riekhof és mtsai, 2003), *Synechococcus* PCC 7942 és *Synechocystis* PCC 6803 cianobaktériumokban (Benning, 1998; Güler és mtsai, 2000; Aoki és mtsai, 2004). Az eredményekből arra következtethetünk, hogy az SQDG szükséges a PSII optimális szerkezetének és aktivitásának fenntartásához, bár a különböző fajokban különböző mértékben. *Synechococcus* és *Arabidopsis* SQDG-hiányos mutánsaiban a PSII aktivitása csak kevéssé csökkent, míg a *C. reinhardtii* mutánsban 40%-kal. A *Synechocystis* PCC 6803 törzsben mind az *sqdB*, mind az *sqdX* inaktiválása letálisnak bizonyult, a mutáns törzsek csak kívülről adagolt SQDG jelenlét-

ében voltak fenntarthatók. Az eltérés oka talán az eltérő evolúciós fejlődésükben keresendő (Güler és mtsai, 2000; Aoki és mtsai, 2004).

A növények növekedése szempontjából gyakran limitáló tényező a talaj vagy a víz anorganikusfoszfát-tartalma. Foszfáthiány esetén nemcsak a növekedés gátolt, de megváltozik a növények lipidösszetétele is: a foszfolipidek aránya csökken, míg az SQDG és DGDG aránya megnő (Essigmann és mtsai, 1998; Dörmann és Benning, 2002; Andersson és mtsai, 2003; Jouhet és mtsai, 2003). A lipidösszetétel oly módon változik, hogy a PG és az SQDG együttes aránya állandó maradjon (Benning, 1998; Dörmann és Benning, 2002; Kelly és mtsai, 2003;), ezáltal a membrán anionos karaktere ne változzon. Hasonló reguláció figyelhető meg SQDG-hiányos mutánsokban is, melyekben optimális körülmények között a megnövekedett mennyiségű PG helyettesíti a hiányzó SQDG-t (Dörmann és Benning, 2002; Yu és mtsai, 2002; Riekhof és mtsai, 2003), ezért ezekben az eukarióta szervezetekben és a *Synechococcus*ban az SQDG nem tűnik esszenciális lipidnek. Érdekes különbség, hogy *Synechocystis*ben nem helyettesíthetik egymást az anionos lipidek, mindkettő nélkülözhetetlen (Aoki és mtsai, 2004).

Az SQDG/PG helyettesítési hipotézis bizonyítására Yu és Benning (2003) elkészítették az *sqd2–pgp1-1* kettős mutánst *Arabidopsis*ban. A kettős mutánsban az SQDG-szintáz enzim génje T-DNS-inszerció következtében inaktiválódott (Yu és mtsai, 2002), ezáltal a mutáns egyáltalán nem szintetizált SQDG-t, a PG szintje pedig a vad típus PG szintjének kb. 30%-a volt, a kloroplasztisz PGP-szintázát kódoló *PGP1* génben létrejött pontmutáció következtében (Xu és mtsai, 2002). A kloroplasztiszban az összes anionos lipid mennyisége 30%-kal csökkent. Az anionos lipidek hiánya szerkezeti változásokat okozott: a levelekben a mezofillumsejtek száma csökkent (nőtt az intercelluláris tér aránya), csökkent a sejtekben levő kloroplasztiszok száma és a plasztiszban levő tilakoid mennyisége is. A tilakoidmembránból szinte teljesen hiányzott a granális szerveződés. A sejtek klorofill- és karotinoidpigment-tartalma harmadára csökkent, a PSII-n áthaladó lineáris elektrontranszport kvantumhatásfoka csökkent, a sejtek DCMU-érzékenysége nőtt, az elsődleges kinon elektronakceptor Q_A redukáltsági állapota módosult az anionos lipidek elvesztésével (Yu és Benning, 2003). Bebizonyosodott, hogy az SQDG hiánya is lehet növekedést gátló tényező, ha a PG-re alapuló kompenzáló mechanizmusok nem

működnek. E kettős mutáns tanulmányozása megerősítette az anionos lipidek, különösen a PG fontosságát a fotoszintetikus folyamatokban.

A cianobaktériumokban és a kloroplasztiszban előforduló egyetlen foszfolipid, a PG nélkülözhetetlen a tilakoidmembrán szerkezetének kialakításához és működésének fenntartásához (Hagio és mtsai, 2000; Hagio és mtsai, 2002). Szerepét *in vitro* és *in vivo* kísérletekkel próbálják tisztázni. A PG specifikus szerepének kifejtése a 2.3. fejezetben található.

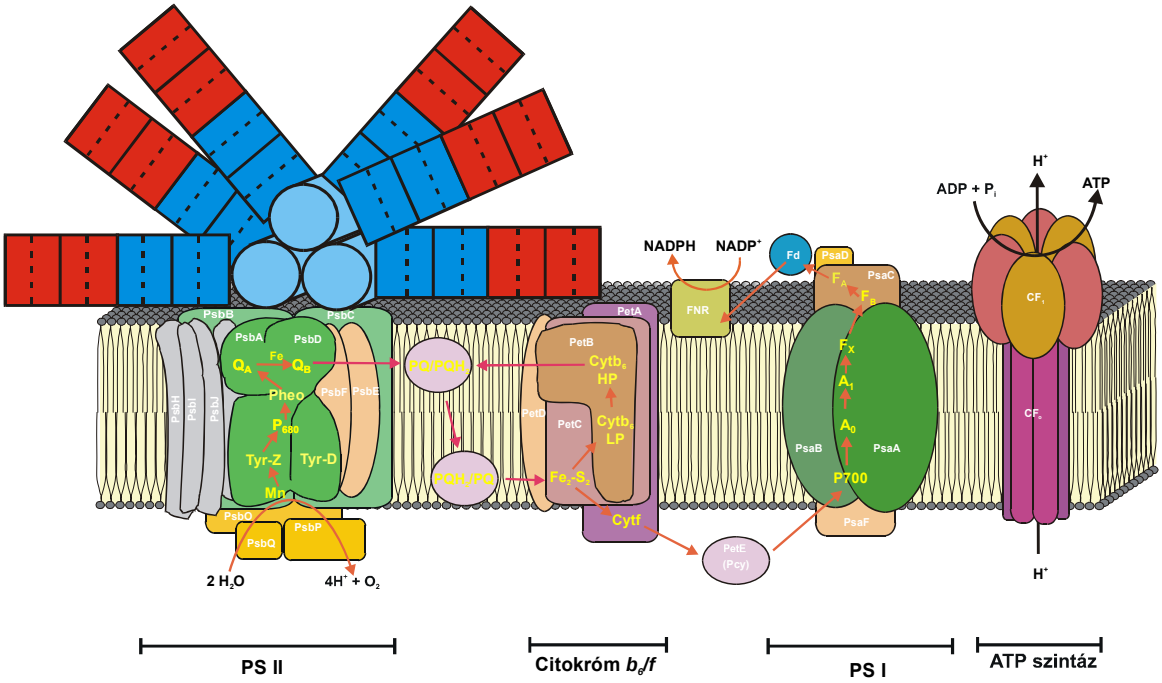
2.2.2. A tilakoidmembránt felépítő fehérjék; a fotoszintetikus apparátus

A tilakoidmembránban igen magas arányban találhatók fehérjék a membrán lipidrétegébe ágyazva, szoros kölcsönhatásban az őket körülvevő lipidmolekulákkal. A lipid-fehérje kölcsönhatások befolyásolják a membrán szerkezetét, és minden bizonnyal erőteljes hatással vannak a tilakoidra jellemző fotoszintetikus elektrontranszportlánc működésére és a membránba ágyazott enzimek aktivitására.

A tilakoidmembrán fehérjéinek legalább a felét a fotoszintetikus apparátus és a fotofoszforiláció enzimei teszik ki, de megtalálhatók itt a légzési lánc enzimei (Schmetterer 1994), a karotinoidok bioszintézisének membránkötött enzimei (Serrano és mtsai, 1990), a nitrogénmetabolizmus enzimei (Guerrero és Lara, 1987), az aszkorbinsav peroxidáz (Miyake és Asada, 1992), a lipid- és zsírsavmetabolizmus enzimei (Wada és mtsai, 1993; Mustárdy és mtsai, 1996).

A fotoszintetikus apparátus két fő fehérjekomplexe az 1. és a 2. fotokémiai rendszer (PSI és PSII), melyekben a fényenergia kémiai energiává alakításának első és legfontosabb lépése zajlik: a fényindukált töltésszétválasztás. A töltésszétválasztás után az elektronok a fotonok energiáját felhasználva mozognak az elektrontranszportláncban (ETL) a PSII reakciócentrumtól (RC) a plasztokinon molekulákon, a citokróm-b_6/f komplexen és a vízoldékony elektronszállító plasztocianin vagy citokróm-c_6 molekulákon keresztül a PSI RC-ig (6. ábra). A PSI RC-ban a fényenergia által gerjesztett P700 reakciócentrum-klorofilltól induló ETL elektronokat juttat a komplex sztróma felőli oldalához kötődő ferredoxinra, mely az elektronokat a ferredoxin-$NADP^+$-oxidoreduktázhoz szállítja, ahol megtörténik a $NADP^+$ redukálása. A $P700^+$ elektronjának pótlását a PSII felől az elektrontranszportláncon át szállított, és a vízoldékony elektronszállító plasztocianin vagy

citokróm-c_6 molekulák által a PSI lumen felőli oldalára juttatott elektronok biztosítják. A PSII-ben a reakciócentrum-klorofill (P680) elektronjának pótlására a PSII vízbontókomplexe által oxidált vízmolekulák szolgálnak elektrondonorként.



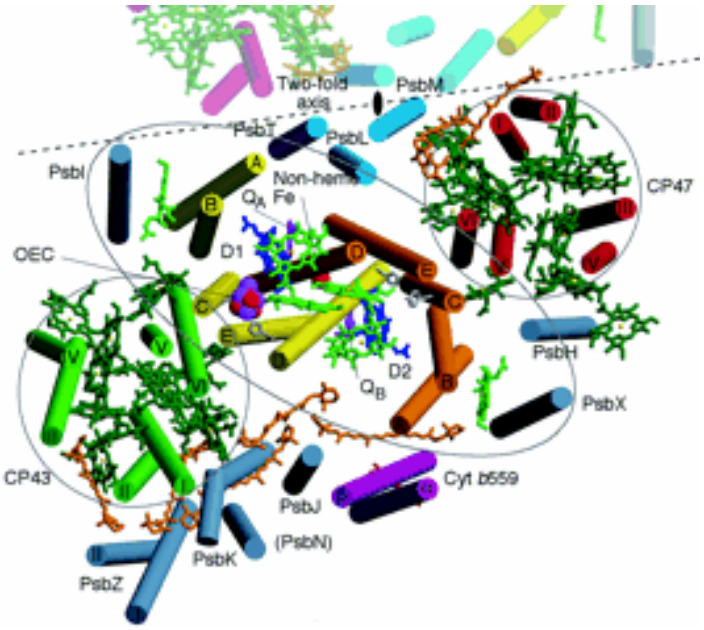
6. ábra. A cianobaktériumok fotoszintetikus apparátusa. (Az ábrát Kovács László készítette D.A.Bryant, ed, 1994, The Molecular Biology of Cyanobacteria, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands címlapja nyomán)

Az elektrontranszfer során protongradiens alakul ki a membrán két oldalán, melynek elektrokémiai potenciálját a membránhoz kötött ATP-szintáz ATP szintézisére fordítja. A képződött ATP- és NADPH-molekulák a légköri CO_2 szénhidrátokká redukálására fordítódnak a későbbi sötétreakciók során.

A PSII komplex homodimerré összeszerelődve vesz részt a fotoszintézisben (Boekema és mtsai, 1995). A PSII komplexhez csatlakozó külső fénybegyűjtő antenna a cianobaktériumok esetében a sztrómában elhelyezkedő fikobiliszóma. A fikobiliszómák hatalmas pigment-fehérje komplexek, amelyek fikobilin pigmenteket tartalmaznak, ezáltal a fikobiliszómák fényelnyelése az 560–650 nm hullámhossztartományba esik. A növényi PSII membránintegráns külső fénybegyűjtő-antennája (LHCII) klorofill-a és kloro-

fill-b pigmenteket kötő fehérjékből áll, melyek trimerré szerveződve veszik körbe a PSII dimereket.

A PSII monomerek középpontja a reakciócentrum, ami a D1 és D2 fehérjékből álló heterodimer, és amelyhez az elektrontranszportlánc kofaktorai kötődnek (7. ábra).



7. ábra. A PSII monomer szerkezeti modellje a tilakoid lumene felől nézve (Ferreira és mtsai, 2004). A transzmembrán hélixek alegységenként különböző színű hengerként ábrázolva, a RC klorofilljai világoszöld, az antennaklorofillok sötétzöld, a feofitin kék, a kinon elektronakceptorok lila, a karotinok narancssárga színnel jelezve. OEC: Mn-komplex.

A D1 és D2 fehérjék koordinálják a P680 reakciócentrumklorofillt, ami klorofill-a molekulákból álló dimer. Az elnyelt fényenergia által gerjesztett P680-ban töltésszétválás történik, s az elektron az elsődleges elektronakceptor feofitin molekulára, onnan a Q_A elsődleges, majd a Q_B másodlagos kinon elektronakceptorra kerül. A Q_B a D1 fehérjéhez mobilisen kötődő plasztokinon molekula, mely a PSII-ről leválva, a membránban mozogva szállítja az elektronokat a citokróm-b_6/f komplexhez.

A töltésszétválasztás után visszamaradt $P680^+$ elektronja a vízbontó komplex felől érkező elektronnal pótlódik. A vízbontó-komplex vagy Mn-komplex a D1 fehérje lumenben elhelyezkedő α-hélixéhez kötődik, és feladata két vízmolekula egyidejű bontása,

melynek során 4 elektron lép az ETL-ba, pótolva a $P680^+$ elektronjait, valamint $4H^+$ távozik a tilakoid lumenébe és egy O_2-molekula szabadul fel. A reakció egyenlete:

$$2\ H_2O \rightarrow O_2 + 4H^+ + 4e^-$$

A komplex lumen felőli oldalán található három vízoldékony molekula: a citokróm-c_{550} (PsbV), a 12 kDa tömegű PsbU, és a 33 kDa tömegű PsbO. Ezek az alegységek a D2 fehérje C-terminális részével együtt egy olyan szerkezetet alakítanak ki, mely befedi a vízbontó-komplexet.

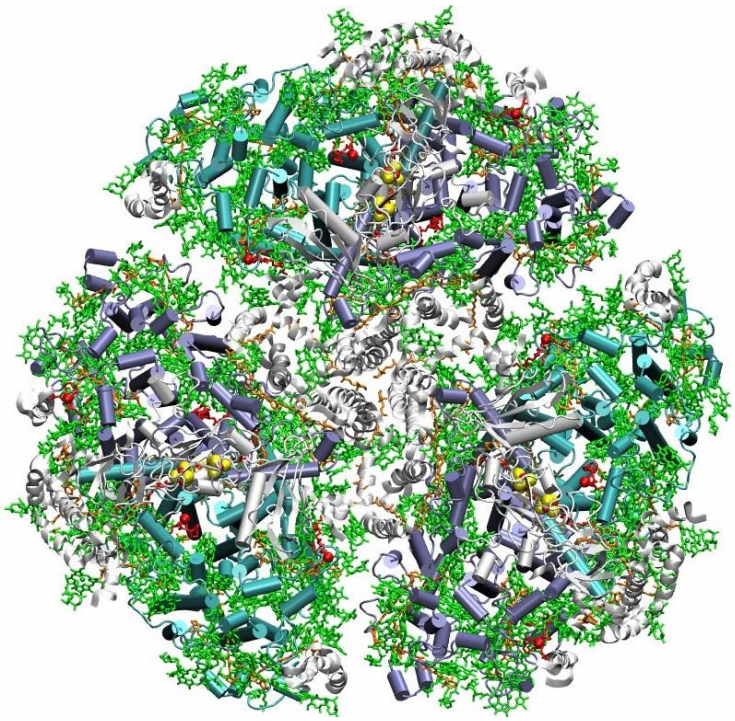
A RC-hoz kapcsolódnak a belső antennaként szolgáló CP43 (PsbC) és CP47 (PsbB) klorofill-tartalmú alegységek és az α- és β-alegységből álló citokróm-b_{559} redox fehérje is. A PSII monomernek része még 10 kisebb, a membránba integrálódott fehérje, melyek valószínűleg a szerkezet stabilizálásában vesznek részt, de szerepük jelenleg nem tisztázott.

Tekintettel a tilakoidmembránban előforduló fehérjék nagy számára és a dolgozat terjedelmi korlátaira, a továbbiakban csak a munkám szempontjából legfontosabb 1. fotokémiai rendszer fehérjéit ismertetem.

2.2.2.1. Az 1. fotokémiai rendszer fehérjéi

A cianobakteriális PSI mind trimer, mind monomer formában megtalálható a fotoszintetikus membránban, de alacsony fényintenzitáson a trimer az uralkodó. Az oligomerizáció jelentősége nem tisztázott, de egy PSI trimer kialakítására képtelen *Thermosynechococcus elongatus* mutáns törzs (Mühlenhoff és mtsai, 1996), mely erős fényben a vad típushoz hasonló ütemben szaporodott, gyenge fényintenzitáson a vad típus szaporodási ütemének csak tizedét érte el (Fromme 1998). Ennek alapján valószínű, hogy a trimer szerkezet alacsony fényintenzitáson feltétlenül szükséges az optimális fénybegyűjtéshez.

A PSI trimer (8. ábra) molekulatömege 1 068 000 Da. Ez a legnagyobb és legösszetettebb membránfehérje, melynek a szerkezetét röntgenkrisztallográfia alapján meghatározták. A 2,5 Å felbontású kristályszerkezet alapján a monomerek 12 fehérjealegységből állnak, melyek összesen 127 kofaktort kötnek, ezekből 96 klorofill-a, 22 β-karotin, 3 [4Fe4S] klaszter, 2 fillokinon és 4 lipid molekula (Jordan és mtsai, 2001).



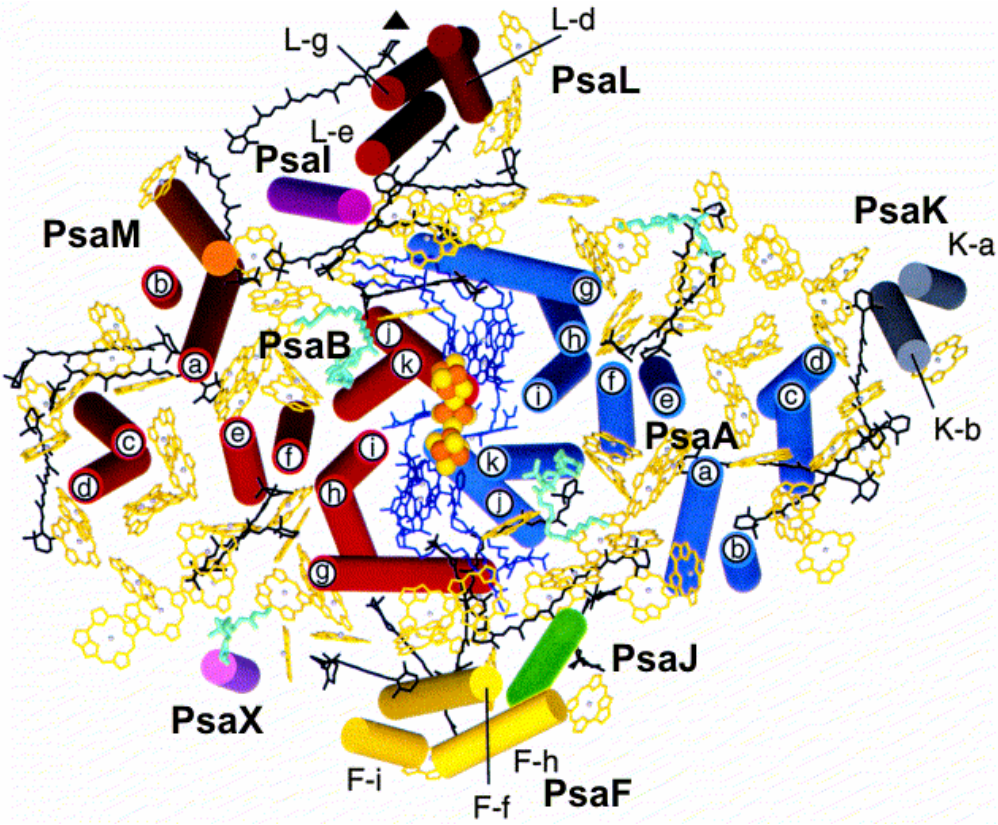
8. ábra. *Thermosynechococcus elongatus* cianobaktériumból kristályosított PSI trimer szerkezete (Grotjohann és Fromme által rendelkezésünkre bocsátott modell).

2.2.2.1.1. A PSI központi magja: PsaA és PsaB

A PSI RC középpontja a PsaA és PsaB fehérjékből álló heterodimer, melyet 83-84 kDa tömegű membránintegráns fehérjék alkotnak (*9*. ábra). A két fehérje erős szekvenciahomológiát mutat, valószínűleg génduplikációval alakultak ki. Mindkettő 11 transzmembrán α-hélixet tartalmaz, N-terminálisuk a sztrómában, C-terminálisuk a lumen felőli oldalon helyezkedik el. A C-terminális 5–5 transzmembrán hélix alkotja a reakciócentrum-domént, mely körbeveszi az elektrontranszportlánc PSI RC-ben elhelyezkedő kofaktorait, és koordinálja az ETL-kofaktorok többségét (Jordan és mtsai, 2001).

A PSI funkcionálisan legfontosabb része az ETL, melyet monomerenként 6 klorofill-a, 2 fillokinon és 3 [4Fe4S] klaszter alkot. A PsaA és PsaB fehérjék RC-doménjei a P700 elsődleges elektrondonor klorofillpárt, az „A" kezdeti elektronakceptorokat, az A_0 első stabil elektronakceptorokat, az A_1 másodlagos elektronakceptor fillokinonokat és első [4Fe4S] klasztert (F_X) koordinálják (Jordan és mtsai, 2001). Az ETL első, F_X-ig tartó szakaszában a kofaktorok párhuzamosan, két ágban helyezkednek el, a PsaA az egyik, a

PsaB a másik ágban működő kofaktorokat köti. Nem ismert, hogy mindkét ág aktív-e, vagy csak az egyik, de a mérések alapján cianobaktériumokban a PsaA által koordinált ágban gyorsabb az elektronok továbbítása (Xu és mtsai, 2003).



9. ábra. A PSI monomer modellje a sztróma felől ábrázolva (Fromme és mtsai, 2001). A transzmembrán α-hélixek alegységenként különböző színű hengerként ábrázolva, az ETL kofaktorai kék színnel, a [4Fe4S] klaszterek sárga/narancssárga, az antennaklorofillok sárga, a karotinok fekete és a lipidek türkisz színnel jelölve.

A PsaA és PsaB alegységek RC-doménje szerkezeti homológiát mutat a bíborbaktériumok fotoszintetikus reakciócentrumával és a PSII D1 ésD2 alegységeivel. Az utóbbiak azonban nem kötnek antennaklorofillokat, szemben a PSI RC-mal, melynek legfőbb szerkezeti sajátossága, hogy a reakciócentrumot alkotó fehérje fúzionált azzal a fehérjével, amely a belső antennaklorofillokat koordinálja (Schubert és mtsai, 1998). A PsaA és PsaB alegységek koordinálják tehát a PSI pigmentjeinek nagy részét: a 90 klorofill-molekulából 79-et, és a 22 β-karotint.

2.2.2.1.2. A PSI donor oldala: a lumen felőli felszín

A PSI monomer lumen felőli felszínét is főként a PsaA és PsaB alegységek alkotják. A plasztocianin vagy a citokróm-c_6 feltételezett kötőhelye egy 10 Å mély üreg, melyet hidrofób aminosav-oldalláncok határolnak, s amelynek kialakításában két α-hélix is közreműködik. Cianobaktériumokban a PsaF alegység nem vesz részt a kötőhely kialakításában, szemben a növényi PSI-gyel, melyben a PsaF fehérjének közvetlen szerepe van a plasztocianin megkötésében (Fromme és mtsai, 2003).

2.2.2.1.3. A PSI akceptor oldala: PsaC, PsaD és PsaE alegységek

A PSI-komplex sztróma felőli felszínét három alegység alkotja, melyek nincsenek a membránba integrálva. Ezek a membránfelszíni alegységek alakítják ki a ferredoxin kötőhelyét. Közülük legfontosabb a PsaC alegység (8,9 kDa), mely a két utolsó [4Fe4S] klasztert (F_A és F_B) koordinálja cisztein oldalláncokon keresztül (Jordan és mtsai, 2001). A PsaC génje tartalmaz két konzervatív szekvenciamotívumot (Hoj és mtsai, 1987), mely több bakteriális ferredoxinban is megtalálható (Oh-oka és mtsai, 1988), ezeknek a ferredoxinoknak a szerkezete is hasonló a PsaC-hez (Adam és Hoffman, 1993; Jordan és mtsai, 2001). Ez a konzervatív rész a PsaC fehérje központi része, melyben két rövid α-hélix köti a két [4Fe4S] klasztert. A nem konzervatív részen egy 10 aminosavból álló hurok nyúlik a feltételezett ferredoxin-kötőhely felé, az N- és C-terminálisok pedig biztosítják a kapcsolatot a PsaD és PsaE fehérjékkel, illetve a pontos illeszkedést a PSI magjához és az ETL-hoz (Melkozernov, 2002).

A PsaD alegység (15,6 kDa) fontos szerepet játszik a ferredoxin kötésében, és az elektronok továbbításában az elektrontraszportlánctól a ferredoxin felé (Chitnis, 1997; Barth és mtsai, 1998). A molekula nagyobb része beágyazódik a PsaC és a PsaA közé, melyekkel ionos kölcsönhatásba lép, egy kinyúló szakasza pedig „átkarolja" a PsaC alegységet, ezáltal stabilizálva annak helyzetét (Fromme és mtsai, 2001). A PsaD C-terminális régiója kapcsolatban áll a PsaL alegységgel is. Megfigyelték, hogy PsaL hiányában a PsaD könnyen destabilizálódik (Armbrust és mtsai, 1996).

A PsaE alegység (8 kDa) egy kompakt szerkezetű, kisméretű fehérje, mely a PsaA, PsaB és PsaC alegységekhez kapcsolódik. Közvetlenül részt vesz a ferredoxin kihorgonyzásában (Rousseau és mtsai, 1993; Sonoike és mtsai, 1993; Weber és Strotmann,

1993) és szerepe van a ciklikus elektrontranszportban is (Zhao és mtsai, 1993). Növényekben kimutatták kapcsolódását a ferredoxin-$NADP^+$-oxidoreduktázzal (FNR) (Andersen és mtsai, 1992), de cianobaktériumokban nem bizonyítottak közvetlen kapcsolatot a PsaE és az FNR között.

2.2.2.1.4. A monomerek kapcsolódási felszíne: PsaL, PsaI és PsaM

Három alegység található a monomerek kapcsolódási felszínén, közülük kettő, a PsaL és a PsaI alkotják a trimer központi magját, a trimerizációs domént. Elsősorban e két fehérje felelős a trimerizációért, PsaL hiányában nem képződik trimer, a PsaI-hiányos mutánsokban pedig csak kevés, instabil trimert lehet kimutatni (Schluchter és mtsai, 1996).

A PsaL alegység (16,6 kDa) a trimer középpontjában található, három transzmembrán α-hélixéből kettő hidrofób kapcsolatban áll a szomszédos monomerekkel. Három karotinmolekula is található a trimerizációs doménben, melyek klorofillmolekulákkal nem állnak kapcsolatban, ezért szerepük valószínűleg a PsaL alegységek összekapcsolódásának stabilizálása (Grotjohann és Fromme, 2005). A PsaL részt vesz három antennaklorofill koordinálásában is, ezek a klorofillok valószínűleg fontos szerepet játszanak a monomerek közötti energiaátadásban (Sener és mtsai, 2004). A fehérje N-terminális része a sztrómában helyezkedik el, ez a szakasz áll kapcsolatban a PSI RC-mal és a PsaD fehérjével is. A C-terminális a lumen felől található, és ezen a szakaszon kötődik egy különleges helyzetű Ca^{2+}-ion, melynek koordinálásában a szomszédos monomerben levő PsaL fehérje is részt vesz. Ez a Ca^{2+}-ion fontos szerepet tölthet be a PSI trimer stabilizálásában (Fromme és mtsai, 2001).

A PsaI a PSI komplex egyik legkisebb alegysége (4,3 kDa), egyetlen transzmembrán α-hélixből áll. A PsaL és PsaM alegységek közé beékelődve helyezkedik el, és azokkal szoros kapcsolatot tart fenn. Klorofill-molekulákat nem köt, de hidrofób kölcsönhatásban áll karotinokkal és a szomszédos monomerrel is (Jordan és mtsai, 2001).

A PsaM (3,4 kDa) egy transzmembrán hélixből áll, ez a fehérje a PSI legkisebb alegysége. Egyetlen klorofill-molekulát koordinál, mely azonban különleges abból a szempontból, hogy kitüntetett szerepe van a monomerek közötti gerjesztési energia átadásában. Sener és mtsai (2004) számításai szerint olyan szoros kapcsolatban áll a szom-

szédos monomerrel, hogy funkcionálisan inkább annak a klorofillhálózatához tartozik. A PsaM aminosavoldalláncain keresztül nem teremt kapcsolatot a monomerek között, de hidrofób kölcsönhatásban áll karotin-molekulákkal, melyek részt vesznek a trimerizációban.

2.2.2.1.5. Perifériális membránintegráns alegységek: PsaF, PsaJ és PsaK

A PsaF fehérje (15,7 kDa) igen szokatlan szerkezetű alegysége a PSI komplexnek. Három doménből áll, melyek közül az N-terminális domén a lumenben helyezkedik el, a C-terminális domén a sztrómában található beékelődve a PsaA és a PsaC alegységek közé, a transzmembrán-domén pedig egy transzmembrán α-hélixből, egy rövid hidrofil hélixből, és két rövidebb hidrofób α-hélixből áll. Ez utóbbiak V-alakban elrendeződve mindössze a membrán harmadáig süllyednek bele a membrán hidrofób rétegébe (Grotjohann és Fromme, 2005). A PsaF N-terminális doménje 2 hidrofil α-hélixet tartalmaz, melyek a membrán síkjával párhuzamosan helyezkednek el 15 Å távolságban a citokróm-c_6 / plasztocianin feltételezett kötőhelyétől. Cianobaktériumokban a PsaF nem vesz részt a vízoldékony elektronszállítók kötésében és az elektrontranszferben, növényekben azonban a PsaF N-terminális doménje 25 aminosavval hosszabb, és ez a hosszabb szakasz közvetlen kapcsolatot alakít ki a plasztocianin és a PSI között (Hippler és mtsai, 1996).

A PsaF fehérje nem koordinál klorofill-molekulákat, de hidrofób kapcsolatban áll néhány klorofillal és β-karotinnal (Fromme és mtsai, 2001).

Cianobaktériumokban két funkciót tulajdonítanak a PsaF-nek. Az egyik, hogy elkülöníti, védi a pigmenteket a lipid fázistól, a másik funkciója pedig a gerjesztési energia továbbítása a bizonyos körülmények között cianobaktériumokban is előforduló külső antenna (fikobiliszóma) felől. A PsaF- és PsaJ-hiányos mutánsokkal végzett kísérletek (Jeanjean és mtsai, 2003; Kouril és mtsai, 2003) azt mutatják, hogy e két alegység fontos, de nem nélkülözhetetlen a PSI és a körülötte vas-hiányban kialakuló IsiA antennagyűrű (Bibby és mtsai, 2001) közti energiatranszferben.

A PsaJ alegység (4,4 kDa) szorosan a PsaF fehérje mellett helyezkedik el, egyetlen transzmembrán hélixet tartalmaz, három klorofillt köt, és hidrofób kölcsönhatásban

áll karotinokkal. Szerepe lehet a PsaF stabilizálásában és a gerjesztési energia átadásában az IsiA-gyűrűtől a PSI felé (Grotjohann és Fromme, 2005).

A PsaX alegységet (3 kDa) eddig csak termofil cianobaktériumokban írták le (Koike és mtsai, 1989; Ikeuchi és mtsai, 1991). A 2,5 Å felbontásban készült szerkezeti modell (Jordan és mtsai, 2001) csak 29 aminosavat tartalmaz, az N-terminális szekvenálással meghatározott 6 aminosav hiányzik, mert azokat, valószínűleg a szerkezet flexibilitása miatt, nem lehetett azonosítani. A PsaX fehérje egy transzmembrán hélixből áll, egy klorofillmolekulát koordinál, és hidrofób kapcsolatban áll néhány β-karotinnal és egy PG-molekulával.

A PsaK alegység (8,5 kDa) perifériális elhelyezkedésű, nincs kapcsolata a többi kis integráns alegységgel, csak a mellette levő PsaA-val. Két transzmembrán α-hélixet tartalmaz és egy hurkot a sztrómában, köt két klorofillt, és kapcsolata van néhány karotinnal (Jordan és mtsai, 2001). Növényekben kimutatták kapcsolatát az LHCI fehérjékkel (Jensen és mtsai, 2000).

2.2.2.2. A cianobakteriális és a növényi PSI összehasonlítása

Az 1. fotokémiai rendszernek, mint energiaátalakító rendszernek a szerkezeti és funkcionális alapjai megőrződtek a növényvilág evolúciójának 1,5 milliárd éve alatt, az elektrontranszportlánc kofaktorai pedig, mint a PSI funkcionálisan legfontosabb részei, azonosnak tekinthetők a cianobaktériumokban és a növényi kloroplasztiszban (Jordan és mtsai, 2001; Ben-Shem és mtsai, 2003).

A legszembeötlőbb különbséget a cianobakteriális és a növényi PSI között annak negyedleges szerkezetében és külső antennáiban találjuk. A cianobaktériumok PSI komplexe a fényviszonyoktól függő arányban trimer szerveződésű, míg a növényi PSI mindig monomer (Kouril és mtsai, 2005), melyhez a külső antenna (LHCI) fehérjéi kapcsolódnak.

Nem ismert, hogy a trimer szerkezetű PSI miért előnyösebb a cianobaktérium számára, azonban kimutatták, hogy a trimerizációra képtelen PsaL-hiányos *Thermosynechococcus elongatus* sejtek szaporodása alacsony fényintenzitáson szinte teljesen leáll (Mühlenhoff és mtsai, 1996; Fromme 1998). Feltételezhető, hogy a trimer szerkezet az optimális fénybegyűjtéshez szükséges alacsony fényintenzitáson, amely a

mélyebb vizekben élő cianobaktériumok számára általánosan előforduló környezeti tényező volt az evolúció során.

A cianobakteriális PSI-hez általában nem kapcsolódik külső antenna, azonban bizonyos körülmények között az egyébként a PSII-höz kötődő fikobiliszómák, eddig fel nem tárt módon a PSI-hez kapcsolódva, gerjesztési energiájukat közvetlenül a PSI-hez továbbítják. Vas-hiány esetén, amikor a fikobiliszómák lebomlanak, a PSI trimerek körül 18 IsiA fehérjéből álló membránintegráns gyűrű alakul ki, amely külső antennaként szolgál (Bibby és mtsai, 2001). Az IsiA-gyűrű a PSII-ben levő CP43 alegységhez hasonló klorofilltartalmú fehérjékből áll, melyek több ponton kapcsolódnak a PSI trimerhez, de főként a PsaF és PsaJ alegységeken keresztül továbbítják a gerjesztési energiát a PSI RC felé.

Sem fikobiliszóma, sem IsiA-gyűrű nincs a zöldalgákban és a magasabbrendű növényekben, helyette klorofilltartalmú membránintegráns fehérjék alkotnak fénybegyűjtőantennát (LHCI és LHCII) a PSI- és PSII-komplexek körül. A PSI külső felszíne mentén elhelyezkedő LHCI antennát fehérjedimerek alkotják, melyek négyféle Lhca fehérjéből állhatnak. Az LHCI antenna fehérjeösszetétele az aktuális fényintenzitástól függ (Ben-Shem és mtsai, 2003).

A cianobakteriális és a növényi PSI kissé különbözik fehérjealegységeiben is. A PsaM és PsaX alegységek csak a cianobaktériumokban fordulnak elő, a növényekben pedig négy új alegység jelent meg az evolúció során. Kisebb változások következtek be a PsaL és a PsaF szerkezetében is: a PsaL megrövidült, hiányzik az a kitüremkedés, amely a szomszédos monomerrel teremt kapcsolatot, a PsaF pedig hosszabb lett.

A PsaF alegység lumenben elhelyezkedő N-terminálisa ment át nagyobb változáson. A lumenális domén 25 aminosavval hosszabb lett, és ez a szakasz közvetlen kapcsolatot hoz létre a vízoldékony elektronszállító plasztocianin és a PSI RC között (Hippler és mtsai, 1996; Hippler és mtsai, 1998). Cianobaktériumoban ez a kapcsolat hiányzik, a PsaF nem vesz részt a vízoldékony elektronszállítók kötésében. Míg a növényekben a plasztocianin a PSI elektrondonora, cianobaktériumok és egyes algák a plasztocianin mellett a citokróm-c_6 molekulát is elfogadják elektrondonorként. Valószínűleg a vastartalmú citokróm-c_6 ősibb elektronszállító, mint a plasztocianin, mivel az oxigénfejlesztő fotoszintézis elterjedése előtti tengerekben a vas-ionok gyakoribbak voltak a rézionoknál.

Ebben az időben a citokróm-c_6 megfelelő elektronszállító volt, később azonban, mikor az atmoszféra oxigénszintje megemelkedett, a vas ritka elemmé vált, ritkábbá, mint a réz, emiatt a kifejlődő növények a réztartalmú plasztocianinnal váltották fel a citokróm-c_6-ot (De la Rosa és mtsai, 2002).

A növényi PSI komplex PsaH alegysége a cianobakteriális PSI trimerizációs doménjében helyezkedik el, ezáltal meggátolva a növényi PSI trimerizációját. Ez az alegység a kötőhelye az LHCII-nek, amikor erős fényen a PSII fénybegyűjtő-komplexe a PSI-hez kapcsolódva, gerjesztési energiáját a PSI-nek adja át (Lunde és mtsai, 2000; Ben-Shem és mtsai, 2003).

A PsaG alegység megjelenése valószínűleg a PsaK fehérje génduplikációjának eredménye. A PsaG kialakulása igen jelentős a PSI fejlődése szempontjából, mivel ez a fehérje teremti meg az egyetlen intramembrán kapcsolatot az LHCI és a RC között. A PsaG az Lhca1 fehérjéhez kötődve erős és stabil kihorgonyzást biztosít az antennaövnek. Ugyanakkor, mivel az antenna többi alegysége az Lhca1-hez kapcsolódik, és közvetlenül a PSI-komplexhez csak gyenge másodlagos kölcsönhatásokkal kötődik, sztöchiometriáját könnyen és gyorsan változtatva alkalmazkodik az aktuális fényviszonyokhoz (Ben-Shem és mtsai, 2003). Ez a variálható antenna előnyösebb a változó fényviszonyok között az óceán felszínén élő algák, és méginkább a szárazföldre lépő növények számára, mint a cianobaktériumok szimmetrikus, kevésbé változtatható fénybegyűjtő-komplexe (Ben-Shem és mtsai, 2004).

2.3. A PG specifikus szerepe az oxigéntermelő fotoszintetikus membránokban

2.3.1. A PG előfordulása

A semleges pH-n negatív töltést hordozó PG szinte minden sejtben előforduló lipid. A nem fotoszintetizáló prokariótákban egyike a legnagyobb mennyiségben előforduló anionos foszfolipideknek. Fontos, de nem nélkülözhetetlen összetevője a prokarióta sejtnek (Matsumoto, 2001). A fotoszintetizáló baktériumok fotoszintetikus reakciócentrumában a PG-nek specifikus szerepe van a Q_B elektronakceptor mikrokörnyezetének kialakításában (Nagy és mtsai, 2004).

A nem fotoszintetizáló eukarióta sejtekben főként a mitokondriumban szintetizálódik, ahol elsősorban a kardiolipin szintézisének prekurzora. A kardiolipin nélkülözhe-

tetlen a légzési lánc és az oxidatív foszforiláció fehérjekomplexeinek összeszerelésében és stabilizálásában (Schlame és mtsai, 2000).

A cianobaktériumokban és magasabbrendű növényekben előforduló PG fő tömegét a tilakoidmembrán tartalmazza, mely az oxidatív fotoszintézis fényreakcióinak színtere. Bár a PG-t növényekben és fotoszintetikus membránokban már régen azonosították (Benson és Maruo, 1958), szerepe sokáig ismeretlen volt. Napjainkban a cianobakteriális és növényi mutánsok létrehozása teremtette meg a lehetőséget funkcionális és membránszerkezeti szerepének felderítésére (Benson és Maruo, 1989).

A tilakoidmembránt főként glikolipidek (MGDG, DGDG és SQDG) építik fel, az egyetlen foszfolipid, a PG aránya mindössze 7–10% (Joyard és mtsai, 1998). A tilakoidmembrán összetételére jellemző a fehérjék igen magas aránya. Főként a fotoszintetikus elektrontranszport és a fotofoszforiláció fehérjekomplexeit tartalmazzák: PSI-, PSII-, citokróm-b_6/f-komplexeket és az ATP-szintázt. Ezek a fehérjekomplexek ionos kölcsönhatásba kerülnek a membránban őket körülvevő lipidekkel. A PG és az SQDG fejcsoportjai biztosítják azt a negatív töltésű környezetet, mely ahhoz szükséges, hogy a hidrofil fehérjék beágyazódhassanak a hidrofób membránba (Douce és Joyard, 1996).

Az utóbbi években lehetővé vált a fotoszintetikus apparátus fehérje–pigment komplexeinek röntgenkrisztallográfiás tanulmányozása. Ezek a vizsgálatok PG molekulákat mutattak ki a PSI és a PSII komplexek reakciócentrumaiban a termofil *Thermosynechococcus elongatus* cianobaktériumban (Jordan és mtsai, 2001; Loll és mtsai, 2005), valamint az LHCII fénybegyűjtő antennában is (Liu és mtsai, 2004), mely a PSII RC-hoz kapcsolódik növényekben. Utóbbi megfigyelések megerősítik a korábbi eredményeket és feltételezéseket, melyek szerint a PG nélkülözhetetlen a tilakoidmembrán fehérjekomplexeinek összeszereléséhez és stabilizálásához.

A növényi sejtek egyéb, a tilakoidtól eltérő összetételű membránjaiban is találunk néhány százalék PG-t. A mitokondrium belső membránjában a PG a kardiolipin szintézisének prekurzora, a kloroplasztisz külső envelopmembránjában pedig részt vesz a genomban kódolt fehérjék plasztiszba történő transzportjában (van't Hof és mtsai, 1993).

2.3.2. A PG bioszintézise

A PG bioszintézisének lépéseit először *E. coli* baktériumban írták le (Kontinen és Tokuda, 1995), majd későbbi vizsgálatok igazolták, hogy a reakcióút cianobaktériumokban és növényekben megegyezik a bakteriális szintézissel (Joyard és mtsai, 1998; Wada és Murata, 1998).

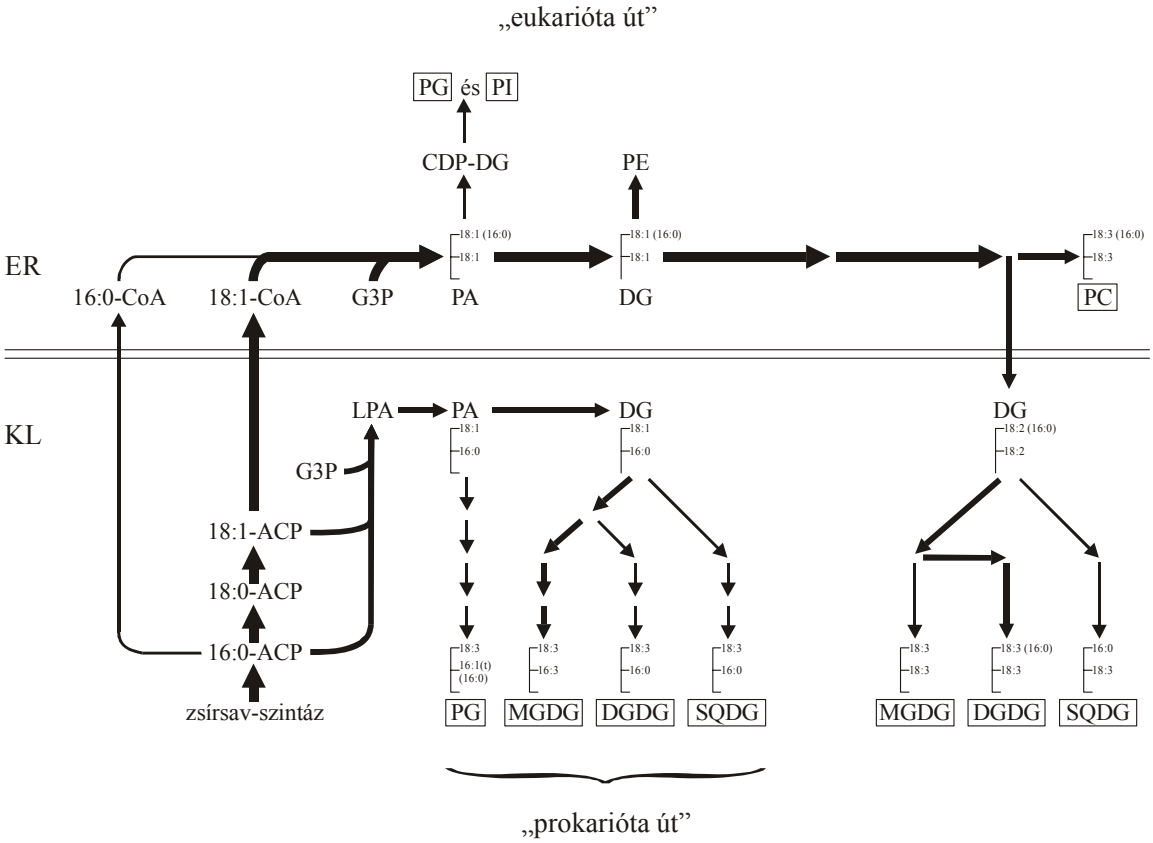
Cianobaktériumokban a PG molekulák szintézise (5. ábra, 15. oldal) glicerol-3-foszfát (G3P) és egy acilcarrier-protein (ACP) által szállított zsírsav (acil-ACP) reakciójával indul, mely lépést a G3P-aciltranszferáz enzim katalizálja, és melyben egy 1-acilglicerol-3-foszfát vagy lizofoszfatidsav (LPA) és szabad ACP jön létre. Az ACP által szállított és a G3P *sn*-1 pozíciójába beépített zsírsav sztearinsav (18:0) vagy palmitinsav (16:0) lehet. A következő lépésben az LPA-aciltranszferáz enzim egy palmitinsavat épít be az *sn*-2 helyzetbe, miáltal foszfatidsav (PA) képződik. A PA a CDP-diacilglicerol-szintáz enzim segítségével és CTP felhasználásával CDP-diacilglicerinné (CDP-DG) alakul, miközben pirofoszfát szabadul fel. A CDP-DG glicerol-3-foszfáttá és PG-foszfáttá (PGP) alakul tovább a PGP-szintáz enzim közreműködésével. A PG bioszintézisének utolsó lépéseként a PGP-foszfatáz lehasítja a foszfát csoportot, így egy P_i felszabadulása közben kialakul a PG-molekula (Wada és Murata, 1998).

A fenti reakciók során képződött PG-molekulák mindegyike telített zsírsavakat tartalmaz, mivel a G3P-aciltranszferáz és az LPA-aciltranszferáz szubsztrátspecificitása következtében 18:0 vagy 16:0 zsírsav épül be a glicerin *sn*-1 pozíciójába, és 16:0 az *sn*-2 helyzetbe. A telített PG molekulákba acil-lipid-deszaturáz enzimek építenek be kettős kötéseket a zsírsavláncok meghatározott helyeire, létrehozva ezzel a különböző telítetlen PG-molekulákat (Murata és Wada, 1995).

A PG bioszintézise során képződött PA intermedier felhasználódhat glikolipidek, MGDG, DGDG és SQDG szintéziséhez is.

A PG szintézisében résztvevő enzimek közül jelenleg háromnak a génje ismert *Synechocystis* PCC6803 cianobaktériumban: LPA-aciltranszferáz (sll1848) (Weir és mtsai, 2005), CDP-DG-szintáz (*cdsA*, slr1369) (Sato és mtsai, 2000) és PGP-szintáz (*pgsA*, sll1522) (Hagio és mtsai, 2000).

Magasabbrendű növényekben a PG bioszintézisének lépései alapvetően megegyeznek a cianobaktériumokban leírtakkal, azonban PG nemcsak a kloroplasztiszban, hanem az endoplazmás retikulumban (ER) és a mitokondriumban is képződik (Mudd és mtsai, 1981) (10. ábra).



10. ábra. A kloroplasztisz glicerolipidjeinek bioszintézise Somerville és Browse (1991) alapján. ACP: acilcarrier-protein, CDP: citidil-trifoszfát, CoA: koenzim-A, DG: diacil-glicerid, ER: endoplazmatikus retikulum, KL: kloroplasztisz, LPA: lipofoszfatidsav, PA: foszfatidsav, PC: foszfatidil-kolin, PE: foszfatidil-etanolamin

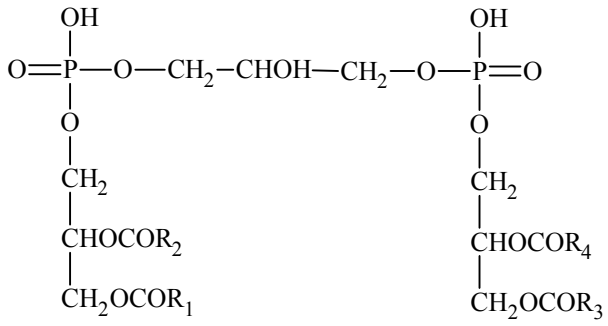
A kloroplasztiszban folyó PG-szintézisben felhasznált zsírsavak a kloroplasztiszban jönnek létre a zsírsav-szintáz közreműködésével, mely főként 16:0-ACP és 18:0-ACP molekulákat szintetizál. A sztrómában elhelyezkedő szolubilis sztearil-ACP-deszaturáz enzim egy kettős kötést hoz létre a sztearinsav Δ9 pozíciójában. A kialakult 18:1-ACP és a 16:0-ACP molekulák nagyrészt foszfatidsav szintéziséhez használódnak fel a plasztiszok borítómembránjában (Andrews és Mudd, 1985). A cianobakteriális úthoz hasonlóan (prokarióta úton) létrejövő PG-molekulákban a borítómembránhoz kö-

tött acil-lipid-deszaturázok segítségével jönnek létre további telítetlen kötések a zsírsav oldalláncokban.

A plasztiszban szintetizált acil-ACP-molekulák egy részéből az oldható acil-ACP-tioészteráz enzim hidrolízissel zsírsavat szabadít fel, mely a borítómembránban lokalizált acil-CoA-szintetáz segítségével acil-CoA-vá alakul. Az acil-CoA-molekulák az ER-ba transzportálódva PG és más foszfolipidek szintéziséhez használódnak fel. Az ER-ban szintetizált PG-molekulák mind az *sn*-1, mind az *sn*-2 pozícióban főként 18:1 zsírsavat hordoznak, mert az ER-ban működő G3P-aciltranszferáz és LPA-aciltranszferáz a 18:1-CoA-t részesítik előnyben. A létrejött PG molekulák deszaturálását az ER-ban lokalizált acil-lipid-deszaturázok végzik (Joyard és mtsai, 1998).

A kloroplasztiszban található PG prokarióta típusú, mivel *sn*-2 helyzetben 16 szénatomszámú zsírsav észteresíti, és egyedi szerkezetű, mert tartalmaz egy *transz* konfigurációjú kettős kötést. Eukarióta szerkezetű PG-t nem figyeltek meg plasztiszban (Dorne és Heinz, 1989).

PG-bioszintézis folyik még a mitokondriumban is, hasonló biokémiai úton, mint a plasztiszban. A mitokondriális PG szintéziséhez használt zsírsavak eredete nem tisztázott. Transzportálódhatnak a plasztiszból acil-CoA formájában, mely a mitokondriumban visszaalakul acil-ACP-vé, vagy szintetizálódhatnak a mitokondriumban is (Wada és mtsai, 1997). A mitokondriumban létrejött PG kardiolipin (CL) (11. ábra) szintézisére használódik fel a CL-szintáz közreműködésével (Katayama és mtsai, 2004).



11. ábra. Kardiolipin.

A CL a mitokondrium belső membránjában halmozódik fel, ahol a légzési elektrontranszport és az oxidatív foszforiláció fehérjekomplexeihez kapcsolódva, azok felépí-

téséért és stabilizálásáért felelős. Baktériumokban igen érdekes és fontos szerepét írták le: a CL a kettéosztódó sejtek pólusain és a sejt középvonalában a plazmamembránban felhalmozódva befolyásolta a kialakuló osztódási gyűrű helyzetét (Mileykovskaya és Dowhan, 2005).

2.3.3. A PG szerepe a magasabbrendű növényekben és algákban

Eukarióta fotoszintetizáló szervezetekben a PG nélkülözhetetlen a működőképes fotoszintetikus apparátus felépítéséhez. Siegenthaler és mtsai 1987-ben, ill. Duchene és mtsai 2000-ben tanulmányozták a PG-molekulák eloszlását a spenótnövény tilakoidmembránjában. Méréseik alapján a PG moláris megoszlása a membrán külső, ill. belső rétegében 58:42, és úgy találták, hogy a fotoszintetikus aktivitás függ a belső membránréteg PG-állományának integritásától. Későbbi kutatások igazolták, hogy a PG fontos szerepet játszik a tilakoidmembrán biogenezisében és a kloroplasztisz differenciálódásában (Xu és mtsai, 2002; Hagio és mtsai, 2002; Babiychuk és mtsai, 2003), valamint a kloroplasztisz külső borítómembránjában lokalizált PG közreműködik a genomban kódolt fehérjék kloroplasztiszba történő importjában (van't Hof és mtsai, 1993).

In vitro kísérletekkel mutatták ki a PG szerepét a PSII komplexhez kapcsolódó fénybegyűjtő komplex (LHCII) trimerizációjában (Nußberger és mtsai, 1993; Kühlbrandt 1994), majd 2004-ben spenót LHCII kristályok röntgenkrisztallográfiás analízise (Liu és mtsai, 2004) bizonyította a PG jelenlétét az LHCII-monomerek trimerizációs felszínén, ahol hidrofób kölcsönhatás révén szerkezetstabilizáló szerepet tölt be.

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 A_2 (PLA_2)-kezelésnek kitett borsó tilakoidmembránban az enzim hidrolizálta a membránban levő PG *sn*-2 helyzetében észteresített zsírsavat, mely a növényekben jellemzően Δ3-transz-hexadecénsav (Jordan és mtsai, 1983). Az emésztés eredményeként a PSII aktivitása csökkent. Fontos megjegyezni, hogy az *in vitro* rendszerekben a foszfolipázkezelés hatására felszabaduló szabad zsírsavak aspecifikus hatásokat válthatnak ki, melyek esetenként téves következtetések levonásához vezethetnek.

Szintén *in vitro* PLA_2 kezelésnek tettek ki Kruse és mtsai (2000) spenótból izolált PSII-dimereket. Két óra PLA_2-kezelés után a dimerek monomerekre estek szét, valamint izoláltak kisebb komplexeket is, melyek tartalmazták a D1, D2 és CP47 fehérjéket, 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. Jelenleg nem állnak rendelkezésünkre olyan röntgenkrisztallográfiás szerkezetvizsgálatból származó adatok, melyet növényből izolált PSII-komplexen mértek, azonban a *Thermosynechococcus elongatus* cianobaktérium PSII-komplexén 3,0 Å felbontásban végzett szerkezetvizsgálat (Loll és mtsai, 2005) igazolta Kruse és mtsai feltételezését: kimutattak egy PG-molekulát, mely a CP43 és a D1 fehérje között helyezkedik el a PSII RC-ban.

Murata és mtsai kimutatták, hogy magasabbrendű növényekben a PG-molekulák zsírsavláncainak telítetlensége befolyásolja a növény hidegérzékenységét (Murata és mtsai, 1982; Murata, 1983). Ezt *in vivo* is igazolták, amikor dohánynövényeket transzformáltak sütőtökből, ill. *Arabidopsis*ból származó G3P-aciltranszferáz génekkel. A G3P-aciltranszferáz specificitása határozza meg a PG-molekula *sn*-1 helyzetébe épített zsírsav telítetlenségét. A sütőtök G3P-aciltranszferáz enzime telített zsírsavat épít a PG-molekulába, míg az *Arabidopsis* enzime telítetlen, főként 18:3 zsírsavakat. A transzgenikus növények hidegérzékenysége korrelált a PG-molekulák telítetlenségével: a telített PG-t szintetizáló transzgenikus növény érzékeny volt az alacsony hőmérsékletű fotoinhibícióra, míg a telítetlen PG-t előállító toleráns (Murata és mtsai, 1992).

A telítetlen PG jelentőségét az alacsony hőmérsékletű fotoinhibíció elleni védelemben más szerzők is megerősítették (Moon és mtsai, 1995; Ariizumi és mtsai, 2002). Deszaturáz génjeikben mutáns cianobaktériumok vizsgálata alapján egyértelművé vált, hogy a membránlipidek telítetlensége alapvető szabályozó eleme a fénystressz elleni védekezésnek. A membránlipidek telítetlenségének csökkenése csökkentette a fénystresszel szembeni rezisztenciát alacsony hőmérsékleten (Gombos éa mtsai, 1994). A membránlipidek telitetlenségének növelése ezzel szemben megnövelte az alacsony hőmérsékletű fotoinhibícióval szembeni toleranciát a transzformált cianobaktériumokban (Wada és mtsai, 1994; Gombos és mtsai, 1994).

A *Chlamydomonas reinhardtii* zöldalga *mf1* és *mf2* PG-mutáns törzseiben a Δ3-*transz*-hexadecénsav-tartalmú PG teljes hiánya az LHCII fénybegyűjtő komplex monomerizációját eredményezte (Maroc és mtsai, 1987; Garnier és mtsai, 1987), és a mutánsok a PSII-aktivitás hiánya miatt képtelenek voltak fotoautotróf növekedésre. A mutáns sejtekben a tilakoid nem vett fel granális szerkezetet, a fotoszintetikus apparátus az alacsony hőmérsékletű fluoreszcencia emisszió alapján képtelen volt a state1/state2 átmenetre, sőt a tilakoidmembránból csak nyomnyi mennyiségben volt kimutatható a PSII core komplex jelenléte. Az LHCII monomerek gerjesztési energiájukat feltehetően állandóan a PSI-nek továbbították (El Maanni és mtsai, 1998; Pineau és mtsai, 2004). A mutáns sejtekhez külsőleg adagolt Δ3-*transz*-hexadecénsavat tartalmazó PG-molekulákkal sikerült előidézni az LHCII monomerek oligomerizációját (Garnier és mtsai, 1990; Dubertret és mtsai, 2002), és egy revertált törzsben, mely normál mennyiségű PG-t szintetizált csökkent Δ3-*transz*-hexadecénsav-tartalommal, a PSII biogenezise is részben helyreállt (Pineau és mtsai, 2004).

Magasabbrendű növényekben a PG szerepét *in vivo* többnyire *Arabidopsis thaliana* mutánsokban tanulmányozzák. *A. thalianá*ban 3 gént találtak, melyek homológok a bakteriális PGP-szintáz génjével. Közülük kettő kódol PGP-szintáz enzimet: a *PGP1* gén terméke a kloroplasztiszba jutva vesz részt a PG szintézisében, a *PGP2* gén terméke pedig az ER-ban folyó PG-bioszintézis enzime. A harmadik génről bebizonyosodott, hogy nem PGP-szintázt kódol, hanem a mitokondriumban folyó kardiolipin-bioszintézis enzimét, a CL-szintázt (Katayama és mtsai, 2004).

Xu és mtsai (2002) izoláltak egy csökkent PGP-szintáz-aktivitású mutánst, amelyben pontmutáció alakult ki a *PGP1* génben. Annak ellenére, hogy a *pgp1* mutánsban a mutáció csak 30%-kal csökkentette a PG szintjét a vad típushoz képest, csökkent a fotoszintézis hatékonysága, a klorofill pigmentek bioszintézise, a fénybegyűjtő komplexek és a PSI és PSII RC-k száma, a növények pedig lassú növekedésűek és halványzöld színűek voltak.

A *pgp1* „knockout" mutánst T-DNS-inszercióval hozták létre szintén a *PGP1* génben (Hagio és mtsai, 2002). A mutáns PG tartalma csak 12%-a volt a vad típusénak,

és ez drámai hatással volt a növény fejlődésére és a sejtek morfológiájára, a kloroplasztisz differenciálódására és a tilakoidmembrán biogenezisére. A levelekben a mezofillumsejtek száma erősen csökkent, a kloroplasztiszokban kevés duzzadt tilakoidmembrán képződött, mely nem alakított ki gránumokat. A kicsiny levelek sárgászöldek, szinte átlátszóak voltak, a fotoszintetikus aktivitás hiánya miatt a növény nem volt képes autotróf növekedésre, csak szacharózzal kiegészített táptalajon tudott fennmaradni. Ez a PG-hiányos mutáns egyértelműen bizonyította, hogy a PG nélkülözhetetlen a kloroplasztisz fejlődéséhez, különösen a tilakoid kialakulásához. Hasonló következtetéseket vontak le Babiychuk és mtsai (2003) is egy másik *Arabidopsis pgp1* „knockout" mutáns tanulmányozása alapján.

2.3.4. A PG szerepe cianobaktériumokban

In vitro kísérletben Kruse és Schmid 1995-ben mutatták ki a PG fontosságát a cianobakteriális PSII-komplex működésében. *Oscillatoria chalybea* cianobaktériumból izolált PSII-partikulumokat foszfolipáz A_2-kezelés után különböző lipidek hozzáadásával próbáltak ismét működőképessé tenni. A vizsgált PG, MGDG és foszfatidil-kolin lipidek közül csak a PG hozzáadásával sikerült az elektrontranszport helyreállítása. Feltételezték, hogy PG szükséges a D1 fehérje optimális konformációjának fenntartásához, ezért PG-specifikus ellenanyagok segítségével PG-kötő régiókat kerestek a D1 molekulán. Megállapították, hogy a PG a D1 proteinnek ahhoz a szakaszához kötődik, amely a fehérje membránba való kihorgonyzásáért felelős. Ismert, hogy mind növényekben, mind cianobaktériumokban a fotoszintetikus apparátus fénystresszre leginkább érzékeny eleme a PSII RC-ban levő D1 fehérje. Fotoinhibíció során a D1 fehérje károsodását annak lebontása és újraszintézise követi (Aro és mtsai, 1993). A *de novo* szintetizált D1 fehérje beépülése a PSII-komplexbe illetve a membránba telítetlen lipidkörnyezetet és PG-t igényel (Wada és mtsai, 1994; Gombos és mtsai, 1994).

A fenti eredményeket jelenleg nem támasztják alá röntgenkrisztallográfiás szerkezetvizsgálatok. A korábban *Thermosynechococcus elongatus* (Zouni és mtsai, 2001; Ferreira és mtsai, 2004) és *Thermosynechococcus vulcanus* (Kamiya és Shen, 2003) termofil cianobaktériumokból kristályosított PSII-komplexekben az elért 3,8–3,7 Å fel-

bontás nem tette lehetővé lipidmolekulák azonosítását. A Loll és mtsai által 2005-ben közölt tanulmány 3,0 Å-s felbontásban írja le a *T. elongatus* PSII-szerkezetét. Ebben a nagyobb felbontásban sikerült azonosítaniuk 11 lipid molekulát a RC körül, és további hármat a monomerek kapcsolódási felszínén. Az azonosított 14 lipidmolekula közül egy PG-molekulát írtak le a D1 fehérje és a CP43 közötti területen. Láttak még 2–3 azonosíthatatlan lipofil molekulát is a Q_B-kötőhely közelében. Sajnos az izolálás és kristályosítás technikája, a detergenskezelés bizonytalanná teszi különösen a fehérjekomplex felszínén, a detergensnek kitett helyeken levő lipid molekulák megtartását és azonosítását.

Az *in vitro* vizsgálatok korábban említett hátrányait kiküszöbölve, az egyes lipidfajták szerepének tanulmányozásában biztosabb eredmények érhetők el cianobaktériumok *in vivo* vizsgálatával, melyre kiváló lehetőséget biztosít, hogy a cianobaktériumok közül elsőként a *Synechocystis sp.* PCC6803 teljes genomszekvenciája ismertté és elérhetővé vált 1996-ban (Kaneko és mtsai, 1996). A *Synechocystis sp*. PCC6803 *pgsA* (Hagio és mtsai, 2000) és *cdsA* (Sato és mtsai, 2000) mutánsai lehetővé tették a PG szerepének *in vivo* tanulmányozását cianobaktériumban.

2.3.4.1. A *Synechocystis sp.* PCC6803 *pgsA* cianobaktérium

A *pgsA* mutánst Hagio és mtsai hozták létre 2000-ben. A *Synechocystis* PCC6803 teljes genomszekvenciájának ismeretében, az *E. coli* PGP-szintáz génjével (Ohta és mtsai, 1981) való homológia alapján azonosították a cianobaktérium PGP-szintáz génjét (sll 1522), és *pgsA*-nak nevezték el. A *pgsA* gén kódoló régiójába kanamicinrezisztencia-kazettát inszertáltak, ezzel inaktiválták a gént, és megteremtették a transzformáns sejtek szelekciójának lehetőségét. Az inaktivált génről nem szintetizálódik a PGP-szintáz enzim, ezáltal a mutáns sejtek nem képesek a PG előállítására, ugyanakkor az enzim inaktiválása nem befolyásolja a többi lipid bioszintézisét (5. ábra, 15. oldal). A mutáns sejtek PG nélkül nem képesek fennmaradni, szaporodásukhoz a tápoldatba adagolt, telítetlen zsírsavláncokat tartalmazó PG-t igényelnek, melyet képesek felvenni a sejtfalon keresztül.

PG-vel kiegészített tápoldatban a mutáns sejtek szaporodása és fotoszintetikus aktivitása a vad típushoz hasonló, azonban a PG-t tartalmazó tápoldatban felszaporodott

kultúrát PG-mentes médiumba áthelyezve, a tilakoid membrán PG-tartalma 5 nap alatt a harmadára csökken, gyengül a fotoszintetikus aktivitás is, a sejtek szaporodása pedig egészen lelassul, szinte leáll (Hagio és mtsai, 2000).

2.3.4.2. A PG jelentősége a PSII szerkezetének és funkciójának fenntartásában

Magasabbrendű növények esetén *in vitro* kísérletekben kimutatták, hogy fotoinhibíció után a sérült D1 fehérje kijavítása a PSII-komplex monomerizációjával kezdődik (Baena-Gonzalez és mtsai, 1999), és fény derült a PG meghatározó szerepére is a PSII-komplex dimerizációjában (Kruse és mtsai, 2000).

Az *in vitro* adatokat *in vivo* is megerősítették a *Synechocystis sp.* PCC6803 *pgsA* cianobaktériumon végzett vizsgálatok (Sakurai és mtsai, 2003). A PG szintézisére képtelen mutánst PG-mentes médiumban nevelve, a PG fokozatos kiürülésével párhuzamosan a PSII-komplexek dimer szerkezetét egyre növekvő arányban monomer szerkezet váltotta fel. A folyamat visszafordítható volt, ha a mutáns sejteket PG-vel kiegészített tápoldatba tették át. Ezek az *in vivo* adatok aláhúzzák a PG jelentőségét a PSII-komplex oligomerizációjában.

Hagio és mtsai (2000) a *pgsA* mutáns vizsgálatakor, valamint Sato és mtsai (2000) az általuk előállított CDP-diacilglicerin-szintáz-hiányos, ezáltal PG szintézisére szintén képtelen *cdsA* mutáns vizsgálatakor megfigyelték, hogy a PG kiürülése során csökken a sejtek klorofilltartalma és oxigénfejlesztése. Gombos és mtsai (2002) termolumineszcencia (TL)-mérések alapján kimutatták, hogy a PG-tartalom csökkenése befolyásolja a PSII elektrontranszportját: a PG hiánya gátolja az elektron átjutását az elsődleges (Q_A) és másodlagos ($Q_{B)}$ kinon elektronakceptorok között. A TL mérésekor a PG-vel kiegészített tápoldatban nevelkedett sejtekben megfigyelhető B-sáv a Q_B^- és a Mn-komplex S_2 állapota közti töltésrekombinációból származik, és a Q_A és Q_B közti normális elektrontátadásra utal, míg a PG-mentes médiumban nevelt sejtekben mérhető Q-sáv a Q_A^- és a Mn-komplex közti töltésrekombinációból ered, és a Q_B elektronakceptor inaktiválódását jelzi normális Q_A-működés mellett. A TL eredményekhez hasonlóan a Q_A és Q_B közti elektronátadás gátlását jelzi, hogy mesterséges elektronakceptorok, pl. p-benzokinon, hozzáadásával nem mérhető oxigénfejlődés a PG-hiányos PSII-ben, míg a PG-vel ellátott kontroll sejtben a p-benzokinon fokozza az oxigénfejlődést (Hagio és

mtsai, 2000). Ez a hatás nagyon hasonlít a DCMU herbicid hatására, mely gátolja a Q_A és Q_B közti elektronátadást. Hasonló következtetések vonhatók le klorofillfluoreszcencia-kinetikai mérésekből is. DCMU jelenlétében mind a PG hozzáadásával nevelt, mind a PG-hiányos sejtek fluoreszcenciagörbéje gyorsan emelkedik, jelezve a Q_A normális működését, majd a maximum elérése után lassan cseng le a Q_A^- és a Q_B közti elektronátadás gátlása miatt. A PG-hiányos sejtekben DCMU nélkül mért klorofillfluoreszcencia kinetikája hasonló a DCMU-val mért kinetikához, ami a Q_A^- és Q_B közti elektrontranszfer gátlására utal. A mérések alapján arra következtethetünk, hogy PG hiányában megváltozik a D1 fehérjén a Q_B-kötőhely, és ez megzavarja az elektronok továbbítását Q_A-ról Q_B-re (Gombos és mtsai, 2002).

Sakurai és mtsai (2003) a *pgsA*-sejteken végzett kísérleteik során megfigyelték, hogy a sejtek számára előnytelen PSII dimer/monomer arány a mutáns sejtek fokozott fényérzékenységét eredményezte PG-hiányos állapotban. A fokozott fényérzékenység következtében a sejteket 215 μmol foton $\cdot$ $m^{-2}s^{-1}$ fénnyel megvilágítva a sejtkultúra kifehéredett (ún. „photobleaching" jelenség) a fotoszintetikus pigmentek lebomlása és a sejtek halála miatt. A jelenséget valószínűleg az váltotta ki, hogy a PG-hiányos sejtekben a Q_A és Q_B közti elektronátadás lelassulása miatt megnőtt a redukált Q_A aránya és életideje, ez triplet állapotú klorofill képződéséhez vezetett, mely reaktív oxigéngyökök képződését eredményezte (Vass és mtsai, 1992). A reaktív oxigéngyökök károsítják a fotoszintetikus pigmenteket és főként a PSII komplex legérzékenyebb részét, a D1 fehérjét. Tehát a fokozott fényérzékenységet a fotoinhibícióval hozhatjuk kapcsolatba. Azonban Sakurai és mtsai (2003) úgy találták, hogy a PG hiánya a D1 fehérje turnoverét nem befolyásolta, inkább a sérült D1 fehérje kijavítása és komplexbe építése után a PSII dimerizációjában, ezáltal a PSII komplexek újra-aktiválásában játszhat szerepet.

2.3.4.3. A PG szerepe a PSI szerkezetének és működésének fenntartásában

A cianobakteriális PSI *in vivo* mind trimer, mind monomer formában megtalálható a tilakoidmembránban, de alacsony fényintenzitáson az oligomer forma az uralkodó. A trimer molekulatömege meghaladja az 1 millió Da-t, és a fehérjék mellett tömegének kb. 30%-t a kofaktorok teszik ki, melyek nemcsak a funkció szempontjából fontosak, de sze-

repük van a PSI-komplex összeszerelődésében és a szerkezeti integritás fenntartásában is (Fromme és mtsai, 2001).

A PG fontosságát a cianobakteriális PSI-komplex stabilizálásában Ikegami és Katoh (1991) mutatták ki *in vitro* rekonstrukciós kísérleteikben. Éterrel extrahált PSI-partikulumokból PG és klorofill-a hozzáadásával sikerült helyreállítaniuk az aktív komplexet, ami jelzi a PG fontosságát mind a PSI szerkezete, mind funkciója szempontjából.

Röntgenkrisztallográfiás szerkezetvizsgálatból 2,5 Å-s felbontásban ismerjük a *Thermosynechococcus elongatus* cianobaktérium PSI-komplexének szerkezetét (Jordan és mtsai, 2001). Ez a felbontás már lehetővé teszi az egyes lipidmolekulák felismerését is. Négy lipidmolekulát azonosítottak a PSI-komplex integráns kofaktoraként: 3 PG és egy MGDG-molekulát. Az egyik PG és az MGDG az elektrontranszportlánc egyik tagja, a fillokinon közelében helyezkednek el, ezek eltérő töltésük révén szerepet játszhatnak a kettéágazó elektrontranszportlánc két ágának eltérő viselkedésében. A második PG perifériásan helyezkedik el, szoros kapcsolatban a PsaX alegységgel, míg a harmadik PG molekula a monomer-monomer kapcsolódási felszínen található, ahol egy klorofill-a koordinálásában vesz részt, mely valószínűleg szerepet játszik a monomerek közti energiatranszferben (Fromme és mtsai, 2001).

Annak ellenére, hogy a szerkezetvizsgálatok igazolták PG-molekulák jelenlétét a PSI RC-ban, eddig nem sikerült *in vivo* igazolni a PG jelentőségét a cianobakteriális PSI-komplex szerkezetében és működésében. Míg a *Synechocystis sp.* PCC6803 *pgsA* vizsgálatakor Hagio és mtsai (2000) és Gombos és mtsai (2002) a PG hiányának erős gátló hatását tapasztalták a PSII aktivitására, a PSI működésében nem figyeltek meg változást a PG kiürülése során.

3. Célkitűzések

Hagio és mtsai (2000) már néhány nap PG-megvonás után a PSII aktivitáscsökkenését tapasztalták a *Synechocystis sp*. PCC6803 *pgsA* sejtekben, Gombos és mtsai (2002) pedig kimutatták, hogy már 3 nap PG-megvonás olyan PG-hiányt eredményezett a PSII közelében, ami zavart okozott a Q_A és Q_B közti elektronátadásban. Ellentétben a PG-megvonás PSII-re gyakorolt hatásával, Hagio és mtsai (2000) 9 nap PG-kiürítés alatt sem tapasztaltak változást a PSI aktivitásában. Ez azért is meglepő, mert Jordan és mtsai (2001) röntgenkrisztallográfiás szerkezet-meghatározással kimutatták 3 PG-molekula jelenlétét a PSI RC-ban. Közülük egyik az ETL fillokinon komponense közelében található, és ezért fontos lehet a PSI funkciója szempontjából, egy másik PG pedig a monomerek kapcsolódási felszínén köt egy klorofill-a molekulát. Ezek a PG-molekulák valószínűleg nélkülözhetetlenek a PSI működéséhez, és olyan jól védett, zárt helyen kötődnek a PSI RC alegységeihez, ahonnan nehezebb őket eltávolítani, mint a PSII komplex felszínéről a gyors kicserélődésű D1 fehérje közeléből, pl. a Q_B kötőhely környékéről.

Feltételezésünk szerint, ha a *Synechocystis* PCC6803 *pgsA* sejteket elegendően hosszú ideig neveljük PG-mentes tápoldatban, akkor a PG turnoverétől függően a PSI-komplexek reakciócentrumából is sikerül kiüríteni a PG-t, ami a PSI aktivitásának változását is eredményezheti.

Azonban a *pgsA* sejtek hosszú ideig tartó nevelése PG-mentes médiumban nem egyszerű, mivel a sejtek fényérzékennyé válnak, és 200 $\mu E \cdot m^{-2}s^{-1}$ fényen tartva néhány nap alatt elpusztulnak (Sakurai és mtsai, 2003).

Munkám során előbb célul tűztem ki a *pgsA* sejtek PG-mentes tápoldatban való, kellően hosszú ideig tartó nevelésével a PSI RC-k PG-mentesítését, majd a következő kérdések megválaszolását:

a) Milyen hatása van a PG kiürülésének a *Synechocystis* PCC6803 *pgsA* sejtek életciklusára, szaporodására, morfológiájára, pigmenttartalmára? Az észlelt változások PG hozzáadásával visszafordíthatók-e?

b) A PG kiürülésének hatására hogyan változik a sejtek lipidösszetétele, és ezzel összefüggésben változik-e a tilakoidmembrán fizikai állapota, mikroviszkozitása?

c) Van-e a PG kiürülésének mérhető hatása a PSI aktivitására?

d) Okoz-e a PG kiürülése változásokat a PSI reakciócentrumok szerkezetében, fehérje-összetételében?

4. Kísérleti anyagok és módszerek

4.1. *Synechocystis sp*. PCC6803 *pgsA* nevelési körülményei

A *Synechocystis* sp. PCC6803 *pgsA* mutáns törzsét (Hagio és mtsai, 2000) BG11 médiumban (Allen 1968) neveltük, mely 5 mM HEPES-NaOH (pH 7,5) puffert, 20 μg/ml kanamicint és 20 μM PG-t (18:1, 18:1 foszfatidil-glicerin, Na sója; Sigma, St. Louis) is tartalmazott, melyet etanolban oldva adtunk a sejtekhez. A sejteket 30 ºC-on, folyamatos 30 $\mu mol \cdot m^{-2}s^{-1}$ intenzitású megvilágítás mellett, fehér fényen neveltük. A kultúrák levegőztetését állandó rázatással biztosítottuk (körkörös rázó, 100 rpm).

A PG kiürülésének vizsgálatához a sejtkultúrát lecentrifugáltuk, a PG tartalmú médiumot kimostuk, majd PG-mentes BG11 médiumban neveltük tovább azonos körülmények között, mint a PG-vel kiegészített tápoldatban nevelt sejteket.

A sejtek szaporodását egyrészt az optikai denzitás (OD_{750}) mérésével követtük, másrészt Bürker-kamrás sejtszámlálást is végeztünk.

4.2. Morfológiai vizsgálatok: elektronmikroszkópos vizsgálatok

Az összecentrifugált cianobaktérium sejteket 0,1 M foszfát pufferben (PB, pH: 7,4) oldott 1%-os paraformaldehid és 1%-os glutáraldehid oldatban 4 ºC-on négy órán keresztül fixáltuk. Rövid foszfátpufferes mosás után az utórögzítés 0,1 M PB-ben oldott 1%-os ozmium-tetroxiddal történt. A mintákat növekvő alkoholkoncentrációval (30% – 50% – 70% – 90% – 96% – 100%) víztelenítettük, majd Spurr műgyantába ágyaztuk. A polimerizáció után (56 ºC, 24 óra) a blokkokból Reichert Ultracut E típusú ultramikrotómmal 85–90 nm vastag 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 mm-ben, majd 25–45 adat átlagát felhasználva kiszámítottuk a sejtek térfogatát, feltételezve, hogy azok gömb alakúak. A PG-vel kiegészített tápoldatban nevelt mutáns sejtek átlagos térfogatát egységnyinek véve %-ban fejeztük ki a PG-éheztetett sejtek eltérését.

4.3. Lipid- és zsírsavanalízis

4.3.1. Lipidek extrahálása és elválasztása

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 Sato és Murata (1988) által közölt eljárás alapján végeztük. A lipidek elválasztása szilikagél vékonyréteg lapokon (Merk 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.

4.3.2. Zsírsavanalízis

A lemezről lekapart lipideket 5% HCl-at tartalmazó metanolban 85 °C-on 2 óra hosszat észteresítettük. Az így nyert zsírsav-metilésztereket hexánba átrázva Supelco SP-2330 kapillárisoszlopon Hewlett Packard HP6890 típusú gázkromatográffal választottuk el.

4.4. A sejtek pigmenttartalmának vizsgálata

A *pgsA* sejtek pigmenttartalmának változását abszorpciós spektrumuk felvételével követtük. A spektrumokat Shimadzu UV-1601 spektrofotométeren vettük fel 400–750 nm hullámhossztartományban 1 nm-ként. Hogy a sejtszuszpenzió nagy fényszórásából adódó hibákat csökkentsük, a sejteket 80% szacharóz oldatban szuszpendáltuk fel, és a sejtszámot úgy állítottuk be, hogy a minták 750 nm-en mérve közel azonos optikai denzitásúak legyenek.

A sejtek klorofill- ill. fikocianintartalmának becsléséhez megmértük a sejtszuszpenzió optikai denzitását a klorofillra jellemző csúcs maximumánál 682 nm-en, ill. a fikocianinra jellemző maximális elnyelésnél 630 nm-en. Az adatokat sejtszámra normáltuk.

4.5. A tilakoidmembrán szerkezetének vizsgálata

4.5.1. A tilakoidmembrán izolálása

A szerkezetvizsgálatokhoz tilakoidmembránt izoláltunk Murata és Omata (1988) módszerének kisebb módosításával. Miután a cianobaktérium sejteket centrifugálással (3000 g, 10 perc) összegyűjtöttük, 5 mM TES pH 7,0 pufferben mostuk, a sejtfalat 0,2% lizozimmel emésztettük. Az emésztés 10 mM TES pH 7,0, 5 mM EDTA, 600 mM szacharóz pufferben történt 2 óra hosszat 37 ^{o}C-on. A sejtek feltárása Bead Beater homogenizátorban történt 100 μm átmérőjű üveggyönggyel 8×1 percig őrölve. A sejtek feltárását és a további lépéseket jégen végeztük 1mM PMSF proteázgátló hozzáadásával. A feltárt sejteket 15 perc DNáz kezelés után centrifugálással elválasztottuk a feltáratlan sejtektől és a törmeléktől, majd a membránvezikulumokat tartalmazó szuszpenziót lépcsős cukorgradiensen ultracentrifugáltuk (130 000 g, 16 óra). A lecentrifugált gradiensen a 39%-os és az 50%-os cukorréteg határáról nyertük a tilakoidfrakciót, míg a citoplazmamembrán a 10%-os és a 30%-os cukorréteg határán gyűlt össze. A membránfrakciókat 10 mM TES pH 7,0, 10 mM NaCl pufferrel mostuk, centrifugáltuk (162 000 g, 2 óra), majd 10 mM TES pH 7,0 pufferben felszuszpendálva, 1 mM PMSF hozzáadásával -80 ^{o}C-on tároltuk.

4.5.2. FTIR: Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia

A tilakoidmembrán fizikai állapotának felmérését infravörös spektroszkópia felhasználásával végeztük (Szalontai és mtsai, 2000). Az infravörös spektrumban az elektromos dipólmomentummal rendelkező aszimmetrikus molekulák rezgéseit mérjük. Nagy diplólusmomentuma miatt a víz erősen abszorbeál az infravörös tartományban, igen erős, 1643 cm^{-1} körüli kombinációs rezgése teljesen lefedi a fehérjék amid I sávját, nyújtási rezgése sávjának lába pedig a lipidek vizsgálata szempontjából fontos C-H nyújtási rezgéseket fedi el 2800–3050 cm^{-1} között. Ezért az infravörös spektrum felvétele előtt a membránszuszpenzióban levő H_2O molekulákat mosással D_2O-ra cseréltük. A H→D izotópcsere miatt a D_2O molekulák kombinációs rezgése 1209 cm^{-1}-re tolódik, nyújtási rezgése pedig 2500 cm^{-1} tájára. Ezért D_2O-ban mind a fehérjék, mind a lipidek rezgési sávjai jól láthatóak. A nehézvizes minták spektrumát Philips PU9800 FTIR spektrométerrel vettük fel 2 cm^{-1} spektrális felbontással. A minta és a háttér spektrumát is 128 interferogram

összeadásával nyertük. A hőmérsékletfüggés mérése 5–80 °C tartományban 2 °C-ként, termosztált mintatartó segítségével, a következő mérési ciklus ismételgetésével történt: felvettük a háttér és a minta spektrumát egy adott hőmérsékleten, beállítottuk az új (mindig magasabb) hőmérsékletet, 7 percet vártunk az új hőmérsékletnek megfelelő egyensúly beállására, és itt is felvettük a hátteret és a mintát. A méréseket számítógép vezérletével, az adatok kiértékelését az SPSERV programmal (Bagyinka Csaba, Biofizikai Intézet, SzBK, Szeged) végeztük.

4.5.3. DSC: differenciális pásztázó kalorimetria

A DSC (differential scanning calorimetry) módszerével elsősorban fehérjék hőmérséklet-változás hatására bekövetkező szerkezetfüggő denaturációját követhetjük nyomon. A fehérjék átalakulása (pl. komplexek szétesése vagy fehérjék denaturációja) során a fehérje oldat hőkapacitása megváltozik. A környezet hőmérsékletének növelésével a minta hőkapacitása nő, az átalakulás hőmérsékletén éri el maximális értékét, utána csökken. Az átalakulás hőmérséklete (T_m) a hőkapacitás görbe maximumához tartozó hőmérséklet. Az átalakulás kalorimetrikus entalpiáját (ΔH_{cal}) a görbe alatti területből számíthatjuk ki.

Mivel a tilakoidmembrán kalorimetrikus átalakulása igen érzékeny a szuszpendáló oldat ionerősségére, a méréseket alacsony ionerősség mellett végeztük, a tilakoidmembránt 10 mM TES (pH 7,4), 0,4 M szorbitol médiumban szuszpendálva. A tilakoidmembrán hőkapacitását DASM4 (Biopribor, Puscsino, Oroszország) típusú nagy érzékenységű pásztázó kaloriméterrel 20–100 °C hőmérsékleti tartományban mértük, a hőmérsékletet percenként 1 °C-kal növelve.

4.6. Fehérje-klorofill komplexek oligomerizációjának vizsgálata

4.6.1. Tilakoidizolálás

A fehérje-klorofill komplexek oligomerizációjának vizsgálatához tilakoidot izoláltunk Komenda és Barber (1995) módszere szerint. A centrifugálással (2500 g, 10 perc) összegyűjtött sejteket 50 mM MES (pH 6,5), 2 mM amino-kapronsav proteázgátló, 5 mM EDTA összetételű pufferben tártuk fel, melyet közvetlenül a feltárás előtt 1 mM PMSF proteázgátlóval és 1 mM benzamidin peptidázgátlóval egészítettünk ki. A feltárás során a

sejteket 1:1 térfogatarányban a sejtszuszpenzióhoz adott 0,1 mm átmérőjű üveggyönggyel törtük 15×1 percig jéggel hűtött Bead Beater homogenizátorban (Biospec Products, Bartesville, OK). Az intakt sejtek eltávolítása után a tilakoidot centrifugálással összegyűjtöttük (20 000 g, 30 perc, 4 °C), és 20 mM MES (pH 6,5), 10 mM $CaCl_2$, 10 mM $MgCl_2$, 0,5 M mannitol, 20% (v/v) glicerin, 1 mM PMSF és 1 mM benzamidin tartalmú pufferben felszuszpendálva felhasználásig -80 °C-on tároltuk. A tilakoidmembrán klorofilltartalmát 90%-os acetonnal extraháltuk, és 663 nm-en mért abszorpciója alapján határoztuk meg (Arnon és mtsai, 1974).

4.6.2. A komplexek elválasztása anion-cserélő kromatográfiával

A monomer és oligomer fehérje-klorofill komplexek elválasztását Rögner és mtsai (1990) módszerének kisebb módosításával végeztük. A C pufferben 1 mg · ml^{-1} klorofill-koncentrációban szuszpendált tilakoidot először 0,1% (w/v) n-dodecil-β-D-maltozid (DM) kezelésnek tettük ki 10 percig 4 °C-on sötétben. A tilakoid membránt 30 perc 145 000 g centrifugálással választottuk el a membrán felszínéhez kötődő fikobiliszómáktól és egyéb fehérjéktől. Utána 1% (w/v) DM detergenssel kezeltük a tilakoidot 30 percig 4 °C-on, majd 90 percig 145 000 g centrifugálással választottuk szét a fehérje-klorofill komplexeket tartalmazó fázist a kiülepedett membrántól.

Az extrahált komplexeket HPLC technikával választottuk szét 10 °C-ra hűtött Varian Prostar (Varian, Palo Alto, CA) folyadékkromatográffal. A 100–300 µl térfogatú mintákat MonoQ HR 5/5 oszlopra (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala) töltöttük fel, melyet D pufferrel [20 mM MES, (pH 6,5), 10 mM $CaCl_2$, 10 mM $MgCl_2$, 0,5 M mannitol, 5 mM $MgSO_4$ és 0,03% (w/v) DM] ekvilibráltunk. A komplexeket 5–200 mM $MgSO_4$ lépcsős gradienssel eluáltuk 0,4 ml · $perc^{-1}$ áramlási sebesség mellett, és 437 nm-en mért abszorpcióval klorofillra detektáltuk.

Az eluátumból 1 ml-es frakciókat gyűjtöttünk, melyeknek fehérjeösszetételét 77 K fluoreszcenciaemissziós spektrumuk alapján azonosítottuk. A PSI- ill. PSII-komplexeket tartalmazó frakciók egy részét E pufferrel (20 mM MES pH 6,5 kiegészítve 1 mM PMSF és 1 mM benzamidin inhibitorokkal) szemben egy éjszakán át dializáltuk, majd a dializálómembránban levő híg mintákat szilárd Sephadex G-150 porba ágyazva betöményítettük. A frakciók másik részéből StrataClean gyanta (Stratagene, La Jolla,

CA) felszínére gyűjtöttük a komplexeket. A gyanta alkalmas híg fehérje oldatok koncentrálására, mivel felszínén megkötődnek a fehérjék, és közvetlenül felhasználhatók SDS-gélelektroforézis vizsgálatokhoz.

4.6.3. 77 K fluoreszcencia spektroszkópia

A MonoQ anioncserélő oszlopról gyűjtött 1 ml-es frakciókat (lásd 4.6.2. fejezet) folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, majd folyékony nitrogénnel hűtött Perkin-Elmer LS 50 spektrofluoriméterrel (Foster City, CA), a klorofill 437 nm-es hullámhosszán történt gerjesztés után, 600–780 nm hullámhossztartományban vettük fel a „steady state" fluoreszcencia emissziós spektrumokat.

4.6.4. PSI oligomerek azonosítása gélszűréssel

A MonoQ oszlopon elválasztott PSI-komplexek méretét gélszűréssel határoztuk meg TSK 3000 SW (7,5×600 mm) oszlopon (Tosoh Bioscience, Tokio). Az oszlopot D pufferrel (lásd: 4.6.2. fejezetben) ekvilibráltuk, kalibráláshoz M_r fehérjestandardokat (Bio-Rad, Hercules, CA) használtunk. A szeparálást 0,5 ml · $perc^{-1}$ áramlási sebességgel végeztük.

4.7. A PSI-aktivitás mérése

A sejtek PSI-aktivitását a P700 fényindukált abszorpcióváltozásának mérésével határoztuk meg egy házi készítésű kétsugaras spektrofotométerrel 705 nm hullámhosszon, 15 ^{o}C-ra termosztált 1 cm-es üvegküvettában, intakt sejteken (Hu és mtsai, 1998). A mintát 532 nm hullámhosszúságú Nd-YAG lézerből (Quanta Ray LAB-130-10 TH, Spectra-Physics, California) származó 10 ns hosszú impulzussal gerjesztettük. Egy volfrám-jód lámpa fényéből monokromátorral (MC15, Ritsu, Asaka, Japan) előállított 705 nm-es mérőfény intenzitását fotoelektronsokszorozóval detektáltuk 200 ms-os időtartományban 16–256 ismétlésben 4 másodperces időközökkel. A gerjesztő fényből származó szórt fényt és a minta által kibocsátott fluoreszcenciát a detektor és minta közé helyezett szűrőkkel és monokromátorral küszöböltük ki.

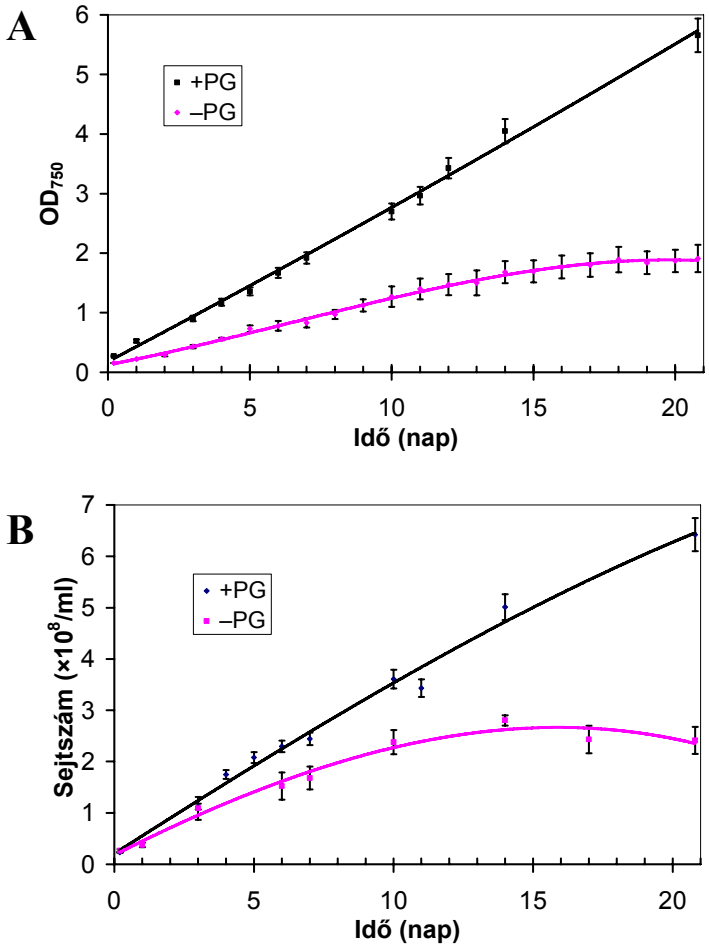
4.8. PSI-komplexek fehérje-összetételének vizsgálata

A MonoQ oszlopon szeparált PSI monomerek és trimerek fehérjealegységeit tricin-SDS poliakrilamid-gélelektroforézis segítségével vizsgáltuk Schagger és von Jagow (1987) által leírt módszer szerint. A frakciók fehérjetartalmát Bradford-féle fehérjemeghatározással (Bradford, 1976) mértük meg, majd a Sephadex-géllel betömé-nyített ill. StrataClean gyantával összegyűjtött fehérjékből azonos mennyiségeket töltöt-tünk 12%-os tricin-SDS gélre. Az elektroforetikus szétválasztás (150 V, 3 óra szobahőn) után a fehérje sávokat ezüstfestéssel tettük láthatóvá (Ausubel és mtsai, 1995), vagy nitrocellulóz membránra (Protran BA85; Schleicher és Schnell, Keene,NH) blottoltuk át Towbin és mtsai (1979) eljárása szerint, 300 mA áramerősséggel 2 óra alatt 4 °C-on. A membránra átvitt fehérjealegységeket *Synechocystis sp.* PCC6803 PsaA és PsaL, vala-mint *Synechococcus sp.* PCC7002 PsaC és PsaD fehérjék ellen nyúlban termeltetett poliklonális ellenanyagokkal reagáltattuk. Az ellenanyagok Dr. John H. Golbeck labora-tóriumában készültek [University of Nebraska Antibody Core Facility; Xu és mtsai, (1994)]. Az ellenanyaggal megjelölt fehérjéket anti-nyúl másodlagos ellenanyaghoz kon-jugált alkalikus-foszfatáz enzim reakciójával tettük láthatóvá a standard NBT/BCIP (nitroblue tetrazólium / 5-bromo-4-kloro-3-indolil foszfát) festési protokoll szerint (Ausubel és mtsai, 1995).

5. Eredmények

5.1. *Synechocystis sp.* PCC6803 *pgsA* sejtek szaporodása

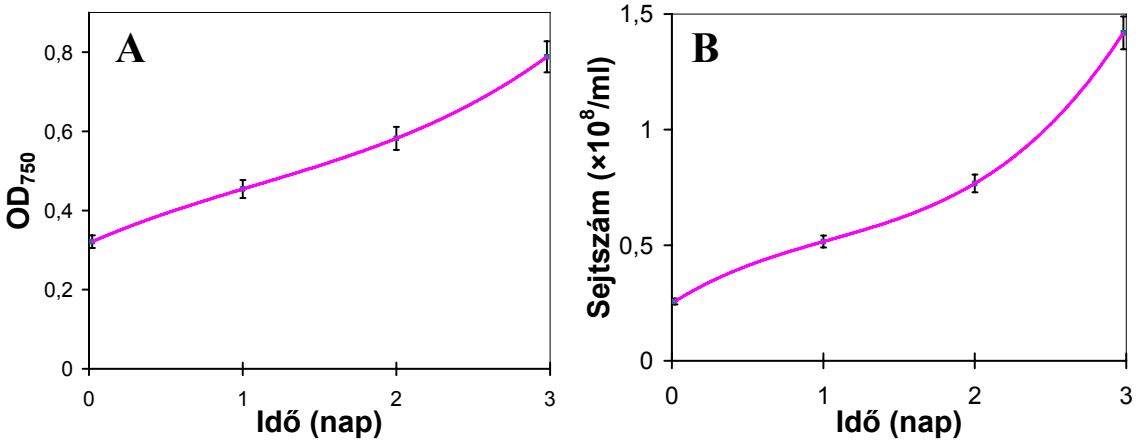
A *pgsA* sejtek PG szükségletének vizsgálatához felvettük a PG-vel kiegészített ill. PG-mentes tápoldatban nevelt sejtek szaporodási görbéit. A kultúrák 750 nm-en mért optikai denzitása alapján a PG-mentes médiumban nevelt sejtek szaporodása jelentősen elmaradt a PG-vel kiegészített médiumban nevelt sejtek szaporodásától. A szaporodás üteme végig lassúbb volt, a 2. hét után az OD már nem növekedett (12/A ábra).



12. ábra. ***Synechocystis* PCC6803 *pgsA* sejtek szaporodása**. A sejtkultúra **A:** 750 nm-en mért optikai denzitásának, és **B:** a tápoldatban levő sejtek számának változása PG-vel kiegészített (♦) és PG-mentes (♦) tápfolyadékban. A görbék három független mérés átlagát és szórását ábrázolják.

A Bürker-kamrás sejtszámlálás is hasonló eredményt adott: két hét PG-éheztetés után a sejtszám nem nőtt, a sejtosztódás leállt (12/B ábra), majd a PG-éhezés 4. hetében a kultúra elpusztult.

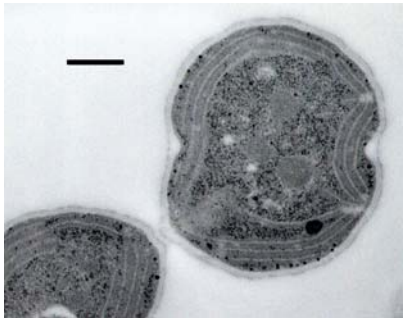
A sejtkultúra pusztulásának folyamata 3 hét PG-éhezés után még visszafordítható volt, ha a sejteket PG-vel kiegészített tápoldatba tettük át, és PG jelenlétében neveltük tovább. A kultúra optikai denzitása lassan ismét növekedett (13/A ábra) és a sejtosztódás megindult (13/B ábra).



13. ábra. 21 napig PG-éheztetett *Synechocystis sp.* PCC6803 *pgsA* sejtek szaporodása PG-vel kiegészített tápoldatban. A sejtkultúra **A:** optikai denzitásának és **B:** sejtszámának növekedése a hozzáadott 20 μM PG hatására. Az ábrázolt adatok három független mérés átlagából származnak.

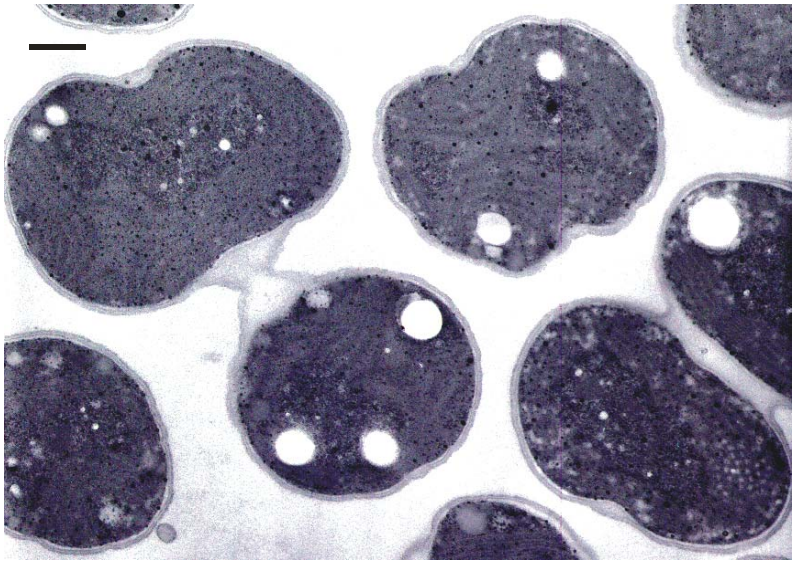
5.2. A sejtek morfológiája

A mutáns sejtek elektronmikroszkópos vizsgálata alapján a PG-vel kiegészített tápoldatban nevelt *pgsA* sejtek morfológiája igen hasonló a vad *Synechocystis* sejtekéhez. A sejtszerkezet ép, a tilakoid mennyisége és rendezettsége átlagos (14. ábra).



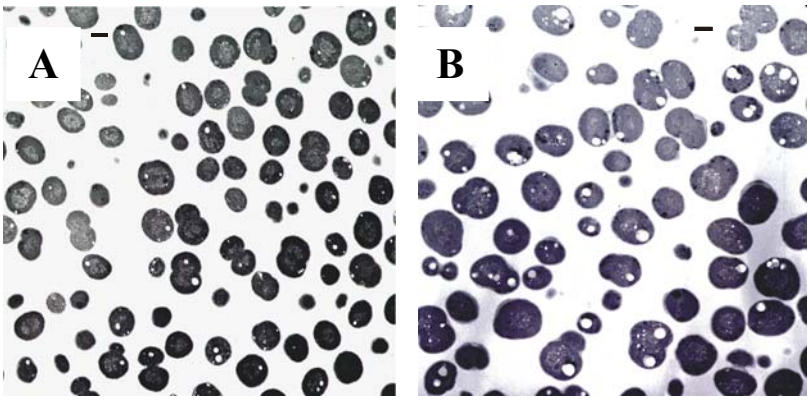
14. ábra. PG-vel kiegészített tápoldatban 5 napig nevelt *Synechocystis* sp. PCC6803 *pgsA* sejt elektronmikroszkópos képe. Lépték: 0,4 μm.

A 21 napig PG-éheztetett sejtek csak kevés tilakoidot tartalmaznak, mely nem mutat szabályos párhuzamos elrendeződést. A sejtek alakja gyakran torz, és sok furcsa, szabálytalanul osztódó sejtet láthatunk (15. ábra).



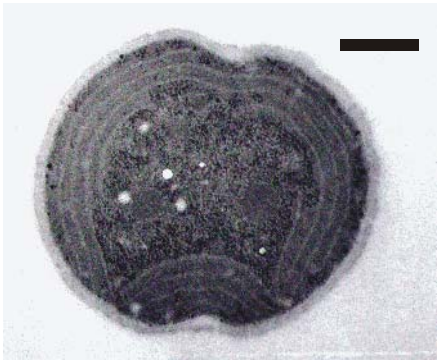
15. ábra. **21 napig PG-mentes tápoldatban nevelt *Synechocystis* sp. PCC6803 *pgsA* sejtek elektronmikroszkópos képe**. Lépték: 0,4 μm.

Mivel a PG-éheztetett sejtkultúrának ebben a stádiumában már sem az optikai denzitása, sem a sejtszáma nem növekszik, feltételezhetjük, hogy a sejtek megrekedtek az osztódás egyik fázisában, azt befejezni már nem képesek. A sejtek felpuffadtak, becsült térfogatuk átlagosan legalább 50%-kal nagyobb a PG hozzáadásával nevelt sejtekénél, de a sejtek 20%-ának térfogata több mint kétszeresére növekedett. Ez a különbség az azonos nagyítású elektronmikroszkópos felvételeken jól látható (16. ábra).



16. ábra. *Synechocystis* sp. PCC6803 *pgsA* sejtek elektronmikroszkópos felvételen. **A:** PG-vel kiegészített tápoldatban nevelt sejtek; **B:** 21 napig PG-mentes médiumban nevelt sejtek. A két felvétel azonos nagyítással készült, lépték: 0,8 μm.

Ha a 21 napig PG-éheztetett sejtekhez PG-t adunk, a hozzáadás után 2–3 nappal ismét szép tilakoidszerkezetű, kisebb méretű sejteket láthatunk (17. ábra), tehát a sejtek tilakoidmembránjának szerkezete és az osztódási képesség helyreállítható a PG visszaadásával.

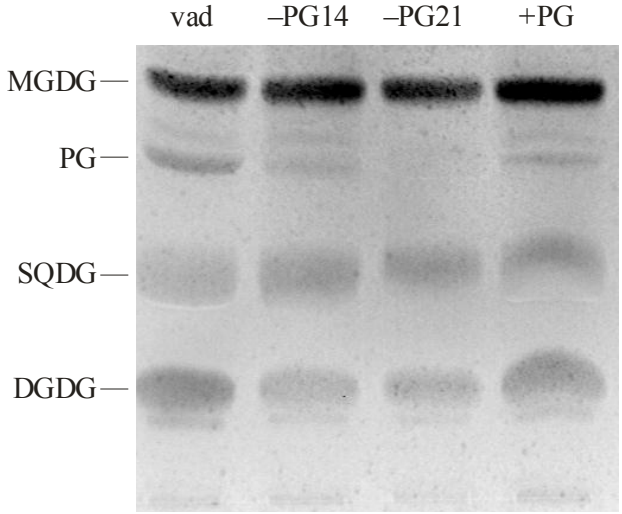


17. ábra. *Synechocystis* sp. PCC6803 *pgsA* sejt, melyet 21 nap PG-éheztetés után 3 napig PG-vel kiegészített tápoldatban neveltünk. Lépték: 0,4 μm.

5.3. Lipid- és zsírsavtartalom

A cianobaktériumok membránját, hasonlóan a növények fotoszintetikus membránjához, négy fajta lipidmolekula építi fel: MGDG, DGDG, SQDG és PG. Kis mennyiségben, főként a citoplazmamembránban előfordul egy ötödik fajta, a MGlcDG is. Megvizsgáltuk, hogy a hosszú időtartamú PG-éhezés hogyan befolyásolja a *pgsA* sejtek lipidösszetételét. A szilikagél vékonyréteg-kromatográfiával elválasztott lipideket (18. ábra) a lemezről lekaparva észteresítettük, majd a metil-észtereket gázkromatográffal szétválasztottuk. A 3. táblázatban foglaltam össze a vad típusú és a mutáns sejtek lipidosztályainak arányait. A PG-vel kiegészített tápoldatban 5 napig nevelt mutáns sejtek lipidösszetétele hasonló az 5 napig nevelt vad típuséhoz, azonban nagyobb arányban tartalmaz PG-t. Ez nem meglepő, hiszen a sejtkultúrához nagy feleslegben adtunk PG-t, melynek egy része a sejtek falához tapadt, illetve a sejtfalon keresztül a membránfrakcióba jutott. A PG-mentes médiumban nevelt sejtekben folyamatosan csökkent a PG aránya, azonban nem sikerült teljesen kiüríteni a PG-t a sejtekből három hét PG-megvonással sem, annak ellenére, hogy három hét után az egész kultúra elpusztult a PG-éhezés következtében. Valószínűleg a sejtek nagyon érzékenyek a tilakoid PG-tartalmának csökkenésére, és amikor a PG-tartalom 4% alá csökkent, a tilakoidba már nem jutott elegendő PG

a PG-függő sejtfunkciók fenntartásához. A PG arányának csökkenésével párhuzamosan az SQDG arányának kismértékű növekedése is megfigyelhető.



18. ábra. *Synechocystis sp.* PCC6803 vad típusú és *pgsA* sejtek lipidosztályai szilikagél vékonyréteg-kromatográfiával elválasztva. +PG: PG-vel kiegészített médiumban 5 napig nevelt sejtek, –PG14: PG-mentes médiumban 14 napig nevelt sejtek, –PG21: PG-mentes médiumban 21 napig nevelt sejtek

	Lipidosztályok (mol%)			
Minta	**MGDG**	**DGDG**	**SQDG**	**PG**
vad	51,45	23,67	16,86	8,02
+PG	43,01	21,10	21,86	14,03
–PG14	54,57	15,95	23,50	5,98
–PG21	52,24	14,76	28,93	4,07

3. táblázat. ***Synechocystis sp.* PCC6803 vad típusú és *pgsA* sejtek lipidosztályainak aránya.** +PG: PG-vel kiegészített médiumban nevelt sejtek, –PG14: PG-mentes médiumban 14 napig nevelt sejtek, –PG21: PG-mentes médiumban 21 napig nevelt sejtek. A táblázatban levő adatok három független mérés átlagai, SD $\leq \pm 0{,}5$ volt minden esetben.

A 4. táblázatban a minták lipidosztályainak zsírsavösszetételét foglaltam össze. A zsírsavösszetétel alapvetően nem változott a mutáció illetve a PG-megvonás hatására, azonban megfigyelhető, hogy a sejtek átépítették a kívülről bevitt PG-molekulákat. A kultúrához adagolt PG mind *sn*-1, mind *sn*-2 helyzetben 18:1 zsírsavakat hordozott, ennek magas aránya (60%) a PG-vel kiegészített médiumban 5 napig nevelt sejtek esetében

még jól megfigyelhető, a 3 hétig PG-mentes tápoldatban tartott sejtek esetében azonban már csak 11%, miközben a 16:0 zsírsav aránya elérte a vad típusra jellemző értéket.

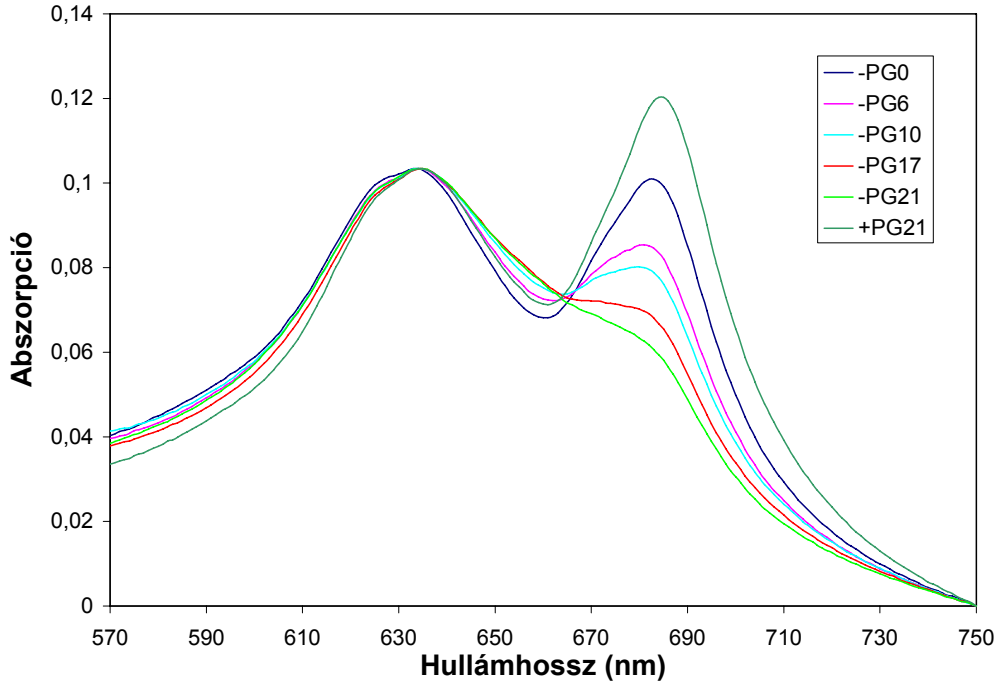
		Zsírsavak (mol%)					
Minta	**Lipid**	**16:0**	**16:1**	**18:0**	**18:1**	**18:2**	**18:3**
vad	**MGDG**	53,74	5,04	ny	5,60	14,90	20,72
	DGDG	51,31	6,18	1,89	3,93	13,18	23,51
	SQDG	71,97	6,31	3,21	8,57	8,70	1,24
	PG	57,09	ny	9,10	**12,93**	20,88	ny
+PG	**MGDG**	51,46	7,42	0,74	4,27	17,10	19,01
	DGDG	51,27	6,32	1,52	5,35	16,90	18,64
	SQDG	69,02	11,07	1,24	7,05	10,44	1,18
	PG	19,04	2,13	9,95	**60,05**	6,80	2,03
–PG14	**MGDG**	48,86	7,96	1,92	6,11	19,51	15,64
	DGDG	49,18	5,72	5,17	8,27	18,09	13,57
	SQDG	62,58	9,61	4,95	8,69	10,89	3,28
	PG	42,69	ny	28,62	**19,34**	9,35	ny
–PG21	**MGDG**	55,71	7,45	1,92	5,58	17,36	11,98
	DGDG	62,94	5,04	4,40	5,81	13,54	8,27
	SQDG	74,29	7,05	4,05	5,91	7,42	1,28
	PG	56,77	3,91	20,21	**11,06**	8,05	ny

4. táblázat. ***Synechocystis sp.*** **PCC6803 vad típusú és *pgsA* sejtek lipidosztályainak zsírsavösszetétele.** +PG: PG-vel kiegészített médiumban nevelt sejtek, –PG14: PG-mentes médiumban 14 napig nevelt sejtek, –PG21: PG-mentes médiumban 21 napig nevelt sejtek, ny: nyomokban (< 0,5). A táblázatban levő adatok három független mérés átlagai, SD ≤ ±0,5 volt minden esetben.

5.4. A *pgsA* sejtek pigmenttartalmának változása a PG kiürülésének hatására

Abszorpciós spektrumok felvételével követtük nyomon a *pgsA* sejtek pigmenttartalmának változását a PG kiürülése során. A 19. ábra mutatja a különböző ideig PG-mentes tápoldatban nevelt mutáns sejtek abszorpciós spektrumát az 570–750 nm hullámhossztartományban. A spektrumokat a fikocianinra jellemző 630 nm-re normáltuk.

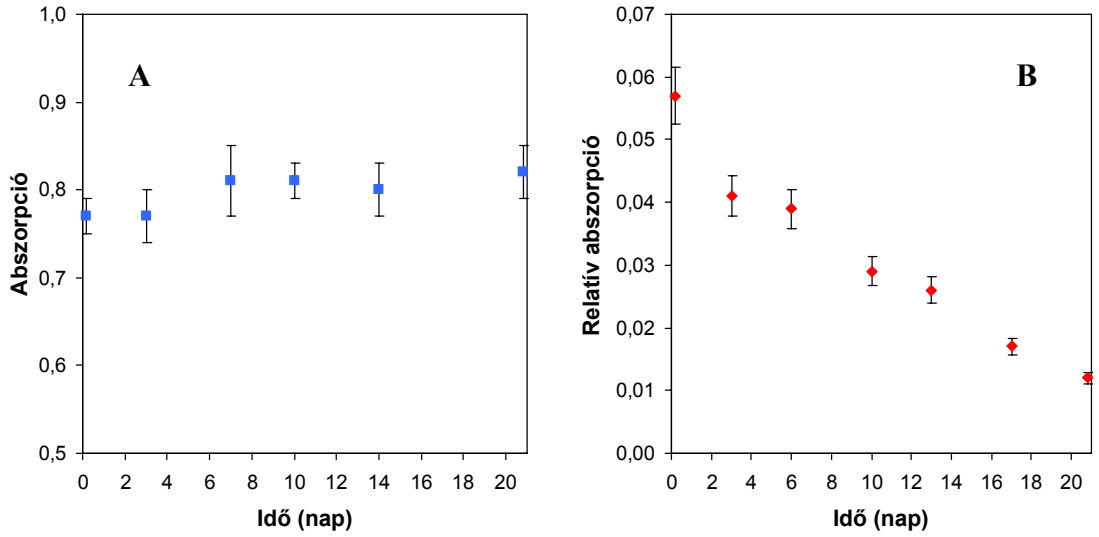
Jól megfigyelhető a 680 nm körül megjelenő klorofillcsúcs csökkenése a PG kiürülése során.



19. ábra. *PgsA* sejtek abszorpciós spektruma. –PG0 – 21: PG-vel kiegészített tápoldatban 5 napig előnevelt, majd különböző ideig (0, 6, 10, 17, 21 napig) PG-mentes tápoldatban nevelt sejtek; +PG21: 21 napig PG-vel kiegészített tápoldatban nevelt sejtek. A spektrumokat 630 nm-re normáltuk.

Annak igazolására, hogy a fikocianin mennyisége nem változik a sejtben a PG-tartalom csökkenésével, megmértük a különböző minták optikai denzitását a fikocianinra jellemző 630 nm-en, majd az értékeket sejtszámra normáltuk. A 20/A ábra mutatja, hogy a sejtek fikocianitartalma nem változik szignifikánsan a PG kiürülésének három hete alatt.

A sejtek klorofilltartalmának becsléséhez a klorofill-csúcs 682 nm-nél mért maximumából kivontuk a fikocianincsúcs klorofillal átfedő értékét, és a különbözetet ábrázoltuk a PG-kiürülés idejének függvényében (20/B ábra). A sejtek klorofilltartalma három hét alatt a PG-éheztetés előtti klorofilltartalom 20%-ára csökkent.



20. ábra. PG-mentes tápoldatban nevelt sejtek A: fikocianin- és B: klorofill-tartalmának változása. A pontok három mérés átlagát és szórását ábrázolják.

Mivel a *Synechocystis* sejtekben a klorofillmolekulák nagyobb része kötődik a PSI-hez, mint a PSII-höz, a sejtek klorofilltartalmának nagyarányú csökkenése azt sejteti, hogy valószínűleg a PSI-komplex működése ill. szerkezete is módosul a PG-kivonás hatására.

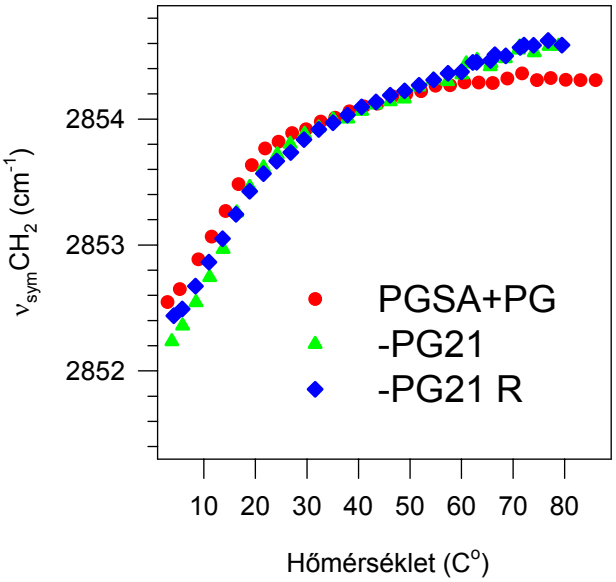
5.5. A tilakoidmembrán szerkezetének vizsgálata

5.5.1. FTIR: Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia

Általában a membránok fizikai állapota, adott hőmérsékleten folyadékkristályos vagy gél fázisa a membránalkotó lipidek fejcsoportjától, a glicerint észteresítő zsírsavláncok hosszától és leginkább ezeknek a zsírsavaknak a telítetlenségétől függ (Ono és Murata, 1981). A növények PG-tartalma és hidegérzékenysége közötti kapcsolat több növény esetében egyértelműen kimutatható volt (Bishop, 1986; Tasaka és mtsai, 1990), ezért megvizsgáltuk, hogy *Synechocystis*ben változik-e a tilakoidmembrán fázisátalakulásának hőmérséklete, ha a PG-t eltávolítjuk a membránból.

A membránok infravörös spektrumának igen jellemző értéke a lipidmolekulák zsírsavláncaiban levő CH_2 csoportok ν_{sym} (szimmetrikus nyújtási) rezgése. A $\nu_{sym}CH_2$ rezgés frekvenciája megváltozik a membrán rendezettségének változásával, ezért ezen

rezgések hőmérsékletfüggő mérésével információt kaphatunk az adott membrán gél–folyadékkristályos fázisátalakulásának hőmérsékletéről.



21. ábra. *Synechocystis pgsA* sejtek tilakoid membránjának $\nu_{sym}CH_2$ rezgéséből meghatározott fázisátmenete. *PgsA+PG*: PG-vel kiegészített tápoldatban nevelt mutáns sejtek; *-PG21*: 21 napig PG-éheztetett *pgsA* sejtek; *-PG21R:* 21 nap PG-éheztetés után 3 napig PG hozzáadásával nevelt *pgsA* sejtek.

A 21. ábra mutatja a *pgsA* sejtek $\nu_{sym}CH_2$ rezgés frekvenciáját a hőmérséklet függvényében. Nem találtunk szignifikáns eltérést a PG hozzáadásával nevelt sejtek tilakoidmembránjának és a PG-éheztetett sejtek tilakoidmembránjának a fázisátalakulási hőmérsékletében. Az átalakulás hőmérséklete minden esetben 19–21 °C volt. Ez az eredmény valószínűleg azzal magyarázható, hogy bár a membrán PG-tartalma csökkent, ez a változás a membrán lipidtartalmának csak kb. 10%-át érintette, így nem befolyásolta az egész membránrendszer fizikai állapotát.

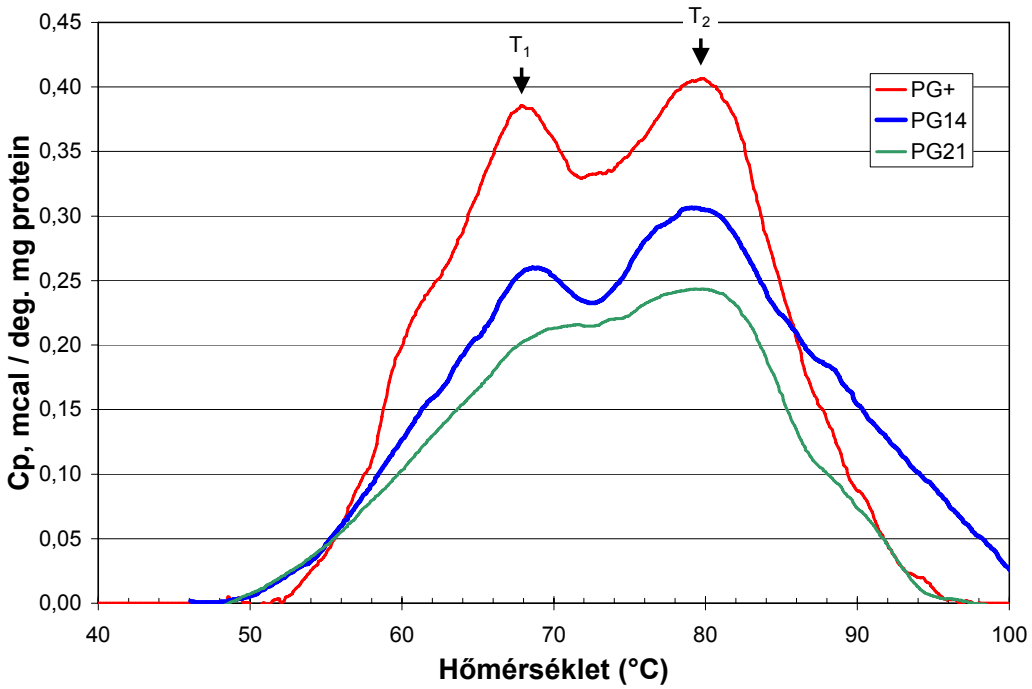
5.5.2. DSC: differenciális pásztázó kalorimetria

A differenciális pásztázó kalorimetria módszerével azt vizsgáltuk, hogy a PG jelenléte illetve hiánya befolyásolja-e a tilakoidmembránba ágyazott fehérjék hőkapacitását. Mivel az irodalomban nem ismeretesek cianobakteriális tilakoidmembránról felvett DSC- görbék, a *Synechocystis sp.* PCC6803 *pgsA* sejtek

tilakoidmembránjának endoterm átalakulásait a magasabbrendű növényekből izolált tilakoidmembránok kalorimetrikus átalakulásai alapján próbáltuk azonosítani.

Magasabbrendű növények tilakoidmembránjában alacsony ionerősség mellett 7 endoterm átalakulást figyeltek meg 40–90 °C tartományban (Thompson és mtsai, 1986; Smith és mtsai, 1989; Nolan és mtsai, 1992). Ebből az első öt (42,5–75,8 °C) a PSII-komplexhez kapcsolódó átalakulásokhoz köthető.

A *Synechocystis sp.* PCC6803 *pgsA* sejtek tilakoidmembránjának jellemző DSC-görbéit mutatja a 22. ábra. Négy endoterm átalakulás figyelhető meg a 40–90 °C hőmérsékleti tartományban, melyek közül két jelentősebb 67,48 °C-nál (T_1) és a 79,66 °C-nál (T_2). A magasabbrendű növényekből meghatározott átalakulási hőmérsékletek alapján a T_1 átalakulás nagy valószínűséggel a PSII-höz kapcsolható, míg a T_2 átalakulás valószínűleg a PSI szerkezetfüggő denaturációját jelzi. A PG kiürülése során a tilakoidmembrán átalakulási hőmérsékletei nem változtak szignifikánsan, azonban az átalakulások kalorimetrikus entalpiaváltozása csökken (5. táblázat).



22. ábra. A *Synechocystis sp.* PCC6803 *pgsA* sejtek tilakoidmembránjának endotermikus átalakulásai. PG+: PG-vel kiegészített tápoldatban nevelt sejtek, PG14: 14 napig PG-mentes tápoldatban nevelt sejtek, PG21: 21 napig PG-mentes tápoldatban nevelt sejtek, T_1 és T_2: különböző fehérjekomplexek maximális hőkapacitása; a görbék egy-egy reprezentatív mérés eredményét mutatják.

	ΔHcal (mcal/mg fehérje)		$\sum\Delta H_{cal}$ (mcal/mg fehérje)
Minta	**T_1**	**T_2**	
+PG	5,77	4,24	10,01
-PG14	4,51	4,04	8,55
-PG21	3,73	2,54	6,27

5. táblázat. A *Synechocystis sp.* PCC6803 *pgsA* sejtek tilakoidmembránjában megfigyelt endotermikus átalakulások kalorimetrikus entalpiaváltozása. $\sum\Delta H_{cal}$: az összes átalakulás kalorimetrikus entalpiaváltozása, +PG: PG-vel kiegészített médiumban nevelt sejtek, -PG14: 14 napig PG-mentes tápoldatban nevelt sejtek, -PG21: 21 napig PG-mentes médiumban nevelt sejtek. A méréseket 3 független kísérletben végeztük, a táblázatban szereplő értékek egy reprezentatív mérés adatai.

A PG sejtekből való kiürítése során megfigyelhető, hogy a T_1 átalakulás kalorimetrikus entalpiaváltozása előbb kezd csökkenni, már két hét PG-éheztetés után jelentősebb, mint a T_2 átalakulásé. Ez megerősíti azt a gyanúnkat, hogy a T_1 átalakulás a PSII-höz köthető, hiszen a PG-tartalom csökkenése már néhány nap után érinti a PSII szerkezetét és működését (Hagio és mtsai, 2000; Gombos és mtsai, 2002; Sakurai és mtsai, 2003), míg a PSI működésében 10 nap PG-éhezés után sem figyeltek meg csökkenést. Három hét PG-éheztetés után már a T_2 átalakulás kalorimetrikus entalpiaváltozása is igen jelentősen csökken, mely a PSI oligomerek szétesésére utalhat.

A termodinamikai paraméterekben megfigyelt változások visszafordíthatók, ha a PG-mentesített sejtekhez ismét PG-t adunk, és 3 napig PG jelenlétében neveljük őket tovább. A visszaállított sejtek endoterm átalakulásának paraméterei megegyeznek a PG-vel kiegészített médiumban nevelt sejtek paramétereivel.

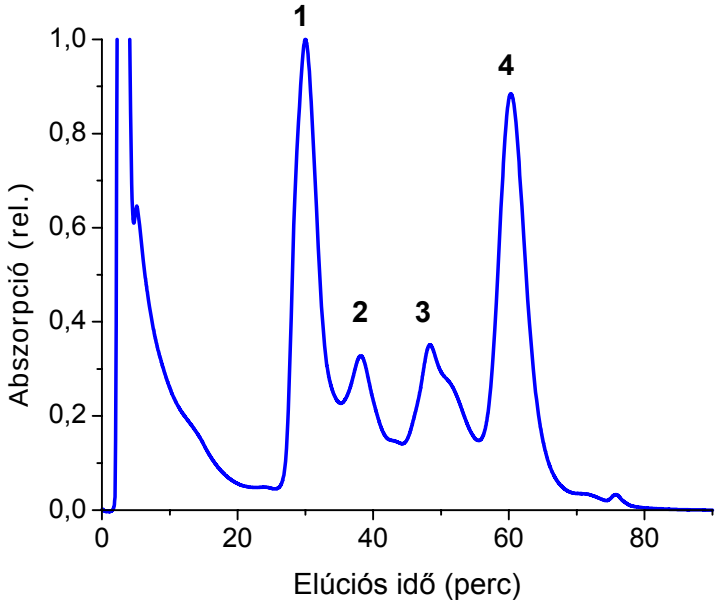
A mért DSC-paraméterek alapján valószínűsíthetjük, hogy a PG kiürülésének hatására a tilakoidmembránban levő fehérjeoligomerek szerkezete fellazult.

5.6. A PSI-oligomerizáció vizsgálata

A DSC-görbéken látható T_2 átalakulás kalorimetrikus entalpiaváltozásának csökkenése a PG kiürülése során felvetette annak lehetőségét, hogy változások következtek be a PSI szerkezetében is. Cianobaktériumokban a PSI RC trimer és monomer formában is előfordul, arányuk függ a nevelési körülményektől, főként a fényintenzitástól. Alacsony

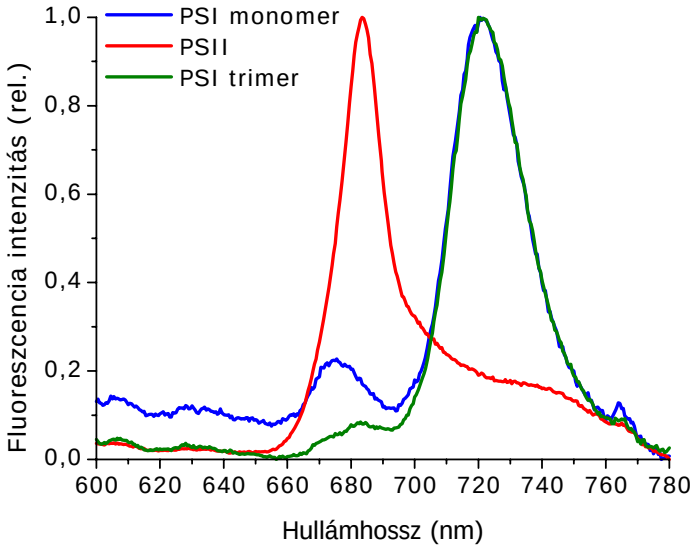
fényintenzitáson a trimer a domináns, valószínűleg azért, mert a trimerekben egyes klorofillmolekulák abszorpciója a szomszédos monomerek klorofilljaival kapcsolatba kerülve eltolódik a hosszabb hullámhosszak felé, ezáltal a mélyebb vízrétegekbe is lejutó, kisebb energiájú fényt is képesek hasznosítani (Fromme és mtsai, 2001).

A PSI RC oligomerizációjának vizsgálatához fehérje-klorofill komplexeket izoláltunk a különböző ideig PG-mentes médiumban nevelt *pgsA* sejtek tilakoidmembránjából. Az 1% dodecil-maltoziddal szolubilizált komplexeket MonoQ anion-cserélő kromatográfiával szeparáltuk. A 23. ábra mutatja a lépcsős $MgSO_4$ gradienssel eluált frakciókat, melyeket PG-vel kiegészített médiumban nevelt sejtek tilakoidjából nyertünk.



23. ábra. PG-vel kiegészített tápoldatban nevelt *pgsA* sejtek 1% β-dodecil-maltoziddal szolubilizált tilakoidmembránjának elúciós profilja MonoQ anioncserélő oszlopon. A detektálás abszorpcióméréssel történt 437 nm-en.

Az eluálás során 1 ml-es frakciókat gyűjtöttünk, melyeknek felvettük az alacsony hőmérsékletű fluoreszcenciaemissziós spektrumát. A kapott 77 K fluoreszcencia-spektrumok (24. ábra) megfeleltek azoknak a spektrumoknak, melyeket Van der Lee és mtsai mértek 1993-ban *Synechocystis* sejtekből tisztított PSI monomerekből és trimerekből.

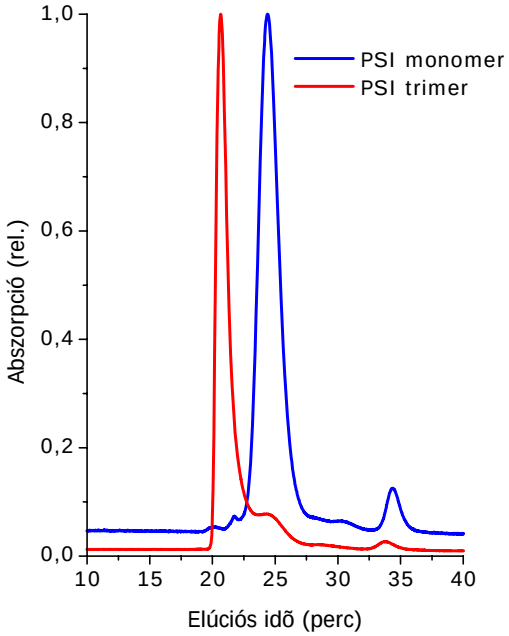


24. ábra. MonoQ oszlopról eluált fehérje-klorofill komplexek 77 K fluoreszcencia emissziós spektruma. (—): az 1. csúcsból nyert PSI; (—): a 3. csúcsból nyert PSII; (—): a 4. csúcsból nyert PSI. A gerjesztés hullámhossza 437 nm volt.

A spektrumok alapján megállapítottuk, hogy a MonoQ oszlopról eluált frakciók közül az 1. és a 4. csúcs PSI komplexeket, a 3. csúcs pedig PSII-komplexeket tartalmaz. A 2. csúcsból vett frakciókban PSI-re és PSII-re jellemző fluoreszcenciaemissziót is mértünk, tehát PSI- és PSII-komplexek keverékét tartalmazza (az ábrán nincs feltűntetve).

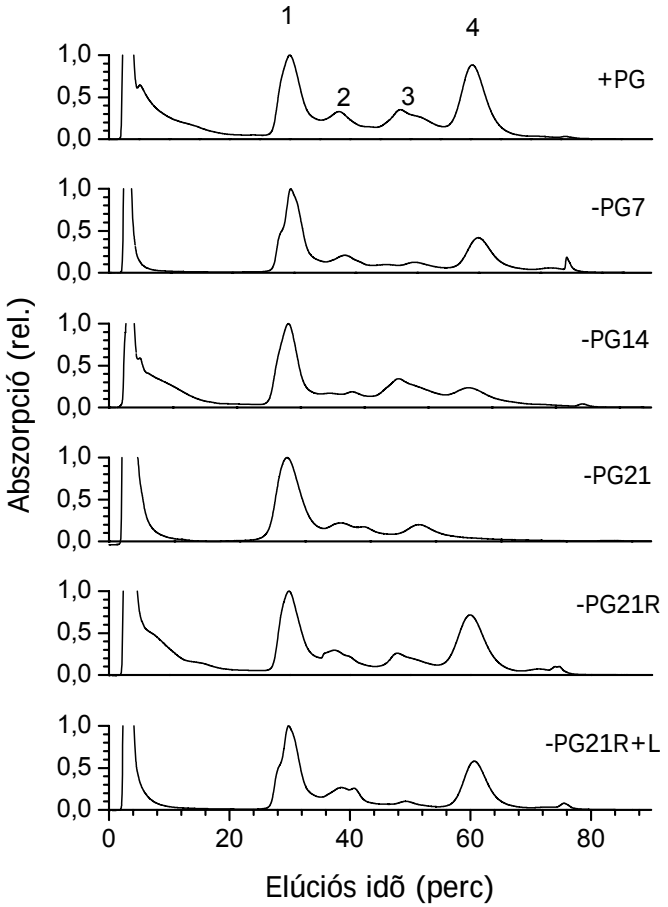
Annak megállapítására, hogy az 1. és 4. csúcsok a PSI-komplexnek milyen oligomerjeit tartalmazzák, a csúcsokból gyűjtött frakciókból gélszűrést végeztünk TSK 3000 SW oszlopon (25. ábra). A gélszűrés megmutatta, hogy az 1. csúcs olyan fehérje-klorofill komplexet tartalmaz, melynek becsült molekulatömege 300 kD körüli, míg a 4. csúcs fehérje-klorofill komplexének becsült molekulatömege meghaladja a 600 kD-t.

A fluoreszcenciaspektrumok és a gélszűrés eredményei alapján megállapítottuk, hogy a MonoQ anion-cserélő oszlopról eluált frakciók a következő fehérje-klorofill komplexeket tartalmazzák: 1. csúcs: PSI monomerek, 2. csúcs: PSI- és PSII-komplexek, 3. csúcs: PSII oligomerek, 4. csúcs: PSI trimerek.



25. ábra. PSI oligomerek elúciós profilja TSK 3000 SW gélszűrő oszlopon. ─ MonoQ oszlopról eluált 1. csúcsból nyert PSI monomer, becsült moltömege: 300 kD; ─ MonoQ oszlopról eluált 4. csúcsból nyert PSI trimer, becsült moltömege meghaladja a 600 kD-t.

A 26. ábra mutatja a *pgsA* sejtek szolubilizált tilakoidmembránjának MonoQ elúciós profilját a PG kiürülésének különböző fázisaiban. Jól látható, hogy a PG kiürülése során a PSI trimereket tartalmazó 4. csúcs aránya egyre csökken, a 21 napig PG-mentes médiumban nevelt sejtek tilakoidjából már kimutathatatlan. Ha a 21 napig PG-mentes tápoldatban nevelt sejtekhez ismét PG-t adunk és további 3 napig PG-vel kiegészített médiumban neveljük, ismét kimutatható a PSI trimerek jelenléte a tilakoidban. A PSI RC-k PG hozzáadására bekövetkező trimerizációja megfigyelhető abban az esetben is, ha a PG hozzáadásával egyidejűleg 0,4 mg · ml^{-1} linkomicin proteinszintézis-gátlót is adunk a sejtekhez, tehát a visszaállás nem igényel *de novo* fehérjeszintézist.



26. ábra. *PgsA* sejtek β-dodecil-maltoziddal szolubilizált tilakoid-membránjának elúciós profilja MonoQ anioncserélő oszlopon. *+PG:* PG-vel kiegészített médiumban nevelt sejtek; *-PG7*: 7 napig PG-mentes médiumban nevelt sejtek; *-PG14*: 14 napig PG-mentes tápoldatban nevelt sejtek; *-PG21*: 21 napig PG-mentes médiumban nevelt sejtek; *-PG21R*: 21 napig PG.mentes tápoldatban, majd 3 napig PG-vel kiegészített tápoldatban nevelt sejtek; *-PG21R+L*: olyan 21 napig PG-éheztetett, majd 20 órán át PG jelenlétében nevelt sejtek, melyekhez a PG hozzáadásakor 0,4 mg · ml^{-1} linkomicint is adtunk.

5.7. A *pgsA* sejtek PSI aktivitása a PG kiürülése során

A sejtek PSI-aktivitását az intakt sejtek 705 nm-en mért fényindukált abszorpció-változásából (ΔA_{705}) határoztuk meg. A ΔA_{705} mérésével detektálhatjuk a P700 klorofill dimerek redoxállapotának változását, mely arányos a fotooxidálható P700 mennyiségével. A mérési eredményeket a 6. táblázatban összegeztem.

	PG-éheztetés ideje (nap)						
	0	**3**	**7**	**10**	**14**	**21**	**R**
ΔA_{705}/µg klorofill	3,25	3,07	3,20	2,96	2,51	1,34	3,11

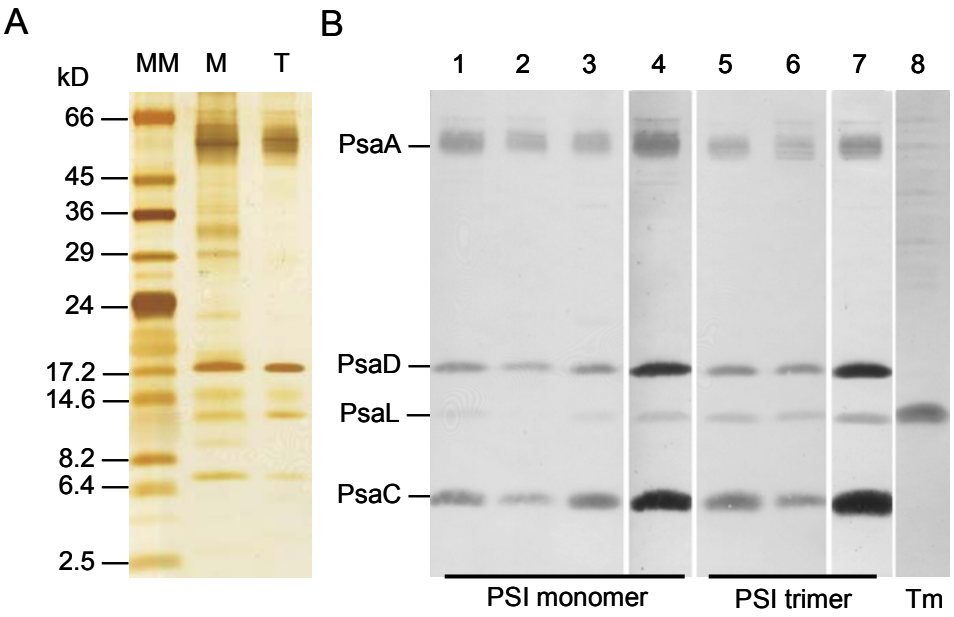
6. táblázat. A *Synechocystis sp.* PCC6803 *pgsA* sejtek PSI-aktivitása a PG kiürítése során. ΔA_{705}: 705 nm-en mért fényindukált abszorpcióváltozás, R: 21 nap PG-éheztetés után 3 napig PG-vel kiegészített tápoldatban nevelt sejtek; az adatok 3 független kísérlet átlagából számított értékek, SD $\leq \pm 0{,}1$ volt minden esetben.

A PG-mentes tápoldatban nevelt *pgsA* sejtekben a fotooxidálható P700 mennyisége a PG-éheztetés első hetében nem mutat eltérést a PG-vel kiegészített tápoldatban nevelt sejtekhez képest. A PG-éheztetés második hetében kb. 20 % aktivitásvesztés figyelhető meg, a harmadik hét végére azonban már csak a kezdeti aktivás 40%-a mérhető a sejtekben. Ha 21 nap PG-éheztetés után a sejteket PG-vel kiegészített médiumban neveljük további 3 napig, a sejtekben levő fotooxidálható P700 mennyisége visszaáll a PG-éheztetés előtti szintre.

Mérési eredményeink megerősítik azt a feltételezést, hogy a hosszúidejű PG-éheztetés hatással van a PSI RC működésére és/vagy mennyiségére is.

5.8. A PSI monomerek és trimerek fehérjeösszetétele

Az anioncserélő kromatográfiával elválasztott PSI monomer és trimer frakciók fehérjeösszetételét SDS-gélelektroforézis és immunoblot módszerrel analizáltuk. A frakciók fehérjetartalmát 12%-os tricin-SDS-poliakrilamid-gélen megfuttattuk (27/A ábra), majd nitrocellulózmembránra blottolva, cianobakteriális PsaA, PsaC, PsaD és PsaL fehérjék ellen termeltetett poliklonális ellenanyaggal megjelöltük (27/B ábra).



27. ábra. A pgsA sejtekből izolált PSI oligomerek fehérjetartalmának analízise. A: PG hozzáadásával nevelt sejtekből származó PSI frakciók 12% tricin-SDS-PAGE képe ezüstfestéssel. M: PSI monomer; T: PSI trimer. **B: PSI frakciók immunoblot analízise.** *1. sáv*: PG jelenlétében nevelt sejtekből tisztított PSI monomer; *2. sáv*: 21 napig PG-éheztetett sejtekből izolált PSI monomer; *3. sáv*: 21 napig PG-mentes médiumban, majd 3 napig PG-vel kiegészített tápoldatban nevelt sejtekből izolált PSI monomer; *4. sáv*: linkomicin és PG hozzáadásával 20 órán át nevelt, előtte 21 napig PG-éheztetett sejtekből tisztított PSI monomer; *5. sáv*: PG jelenlétében nevelt sejtekből származó PSI trimer; *6. sáv*: 21 napig PG-éheztetett, majd 3 napig PG-vel kiegészített médiumban nevelt sejtekből származó PSI trimer; *7. sáv*: linkomicin és PG hozzáadásával 20 órán át nevelt, előtte 21 napig PG-éheztetett sejtekből izolált PSI trimer; *8. sáv*: 21 napig PG-mentes tápoldatban nevelt sejtekből izolált tilakoidmembrán. A membrán 1–7 sávját cianobakteriális PsaA, PsaC, PsaD és PsaL fehérjék ellen termelt poliklonális ellenanyagokkal, a 8. sávot pedig csak PsaL elleni ellenanyaggal jelöltük.

A PsaA, PsaC és PsaD fehérjék esetében nem találtunk eltérést a jelölődésben a PG hozzáadásával ill. PG-mentes médiumban nevelt mintákból izolált PSI trimer és monomer frakciókban, a PsaL jelölődésében azonban különbségeket figyeltünk meg. Az összes minta trimer frakciójából (27/B ábra 5–7. sáv) jelentős mennyiségű PsaL fehérjét sikerült kimutatni, míg a monomer frakciókban (27/B ábra 2–4. sáv) sokkal kisebb jelölődést kaptunk. A 21 napig PG-mentes tápoldatban nevelt sejtekből szeparált PSI monomerekben a PsaL fehérje mennyisége a kimutathatóság szintje alatt maradt (27/B ábra 2. sáv), de a PG hozzáadásával visszaállított trimerekből (27/B ábra 6. sáv) és a monomerekből (27/B ábra 3. sáv) is ismét kimutatható volt. Feltételezhetjük, hogy a PsaL fehérje

PG hiányában levált a PSI RC-ról. A PsaL fehérjét tartják a trimerizációért felelős alegységnek (Chitnis és Chitnis, 1993), mivel a PsaL-hiányos mutánsokban nem alakulnak ki trimerek (Schluchter és mtsai, 1996). Annak ellenére, hogy a 21 napig PG-éheztetett sejtek PSI komplexében nem tudtuk kimutatni a PsaL alegységet, az ugyanebből a mintából származó tilakoidmembránban nagy mennyiségű PsaL fehérjét sikerült detektálnunk (27/B ábra 8. sáv). Ez utóbbi megfigyelés megmagyarázhatja azt a jelenséget, hogy a három hétig PG-éheztetett sejtekben PG hozzáadására a PSI monomerek trimerizációja következik be abban az esetben is, ha fehérjeszintézis-gátló linkomicint adunk a sejtekhez (26. ábra). A trimerek kialakulhatnak linkomicin jelenlétében is, mert *de novo* fehérjeszintézis nem szükséges a trimerek felépüléséhez, mivel a trimerizációhoz szükséges PsaL fehérjealegységek jelen vannak a tilakoidban.

6. Az eredmények megvitatása

Célul tűztük ki annak felderítését, hogy a foszfatidil-glicerin milyen szerepet tölt be a fotoszintézis egyes folyamataiban és más sejtfunkciókban. Vizsgálatainkat a *Synechocystis sp.* PCC6803 *pgsA* cianobaktérium törzs felhasználásával végeztük, mely a PGP-szintáz enzim génjének inaktiválása miatt a PG előállítására képtelen, de amely fenntartható és szaporítható a PG kívülről történő pótlásával. A *Synechocystis* sejtek ugyanis, ellentétben a növényi sejtekkel, fel tudják venni a PG-t és az SQDG-t a körülöttük levő médiumból, ezáltal lehetséges olyan mutáns törzsek előállítása és tanulmányozása is, amelyek az egyébként esszenciális lipideket nem tudják szintetizálni. Hasonló mutánsok előállítása növényekben nem lehetséges, de a *Synechocystis* sejten, mint a kloroplasztisz modellszervezetén, tanulmányozható az anionos lipidek fotoszintetikus membránokban betöltött szerepe. A *Synechocystis sp*. PCC6803 *pgsA* törzsön korábban kimutatták, hogy a PG megvonásának hatása kezdetben a PSII működésének zavarában nyilvánult meg (Hagio és mtsai, 2000, Gombos és mtsai, 2002, Sakurai és mtsai, 2003), és Loll és mtsai (2005) ki is mutattak egy PG-molekulát a PSII RC-ban. A PSII működését befolyásoló PG-molekulák azonban főként a PSII komplex felszínéhez kötődnek és könnyen leválnak a komplexről, ezért láttunk változásokat a PSII működésében már a PG kiürülésének kezdetén. A szerkezetvizsgálatok során a kristályosítást megelőző detergenskezelés eltávolította a PG-molekulákat a komplex felszínéről, ezért azok nem látszottak a kristályszerkezetben. A legutóbbi röntgenkrisztallográfiai szerkezetvizsgálat (Loll és mtsai, 2005), melyben egy PG-molekulát találtak a másodlagos kinon elektronakceptor fehérjekörnyezetét jelentő D1 fehérje és a CP43 alegység között, magyarázhatja azt a korábbi eredményt, mely szerint a PG kivonása gátolta az elsődleges és másodlagos kinon elektronakceptorok közötti elektrontranszportot (Gombos és mtsai, 2002). A PSI komplexek esetében a röntgenkrisztallográfiás szerkezetvizsgálat egyértelműen kimutatta 3 PG-molekula kötődését a PSI RC-hoz jól fedett, a detergensektől elzárt helyzetben (Jordan és mtsai, 2001). Felmerült, hogy a rövid ideig tartó PG-éheztetés után a sejtekben megmaradó néhány PG-molekula, erősen kötődve a PSI RC fehérjéihez, elegendő lehet a PSI funkciójának fenntartásához. Ezért próbáltuk a *pgsA* sejteket olyan hosszú ideig fenntartani PG-mentes tápoldatban, ami a PG teljes kiürülését eredményezi, eltávolítva a PG-molekulákat a PSI reakciócentrumából is.

Gyenge fényen és optimális hőmérsékleten a *pgsA* sejtek 3–4 hétig életben tarthatók voltak PG-mentes tápoldatban is. A PG-megvonás hatására a sejtkultúra optikai denzitásának növekedése már egy hét után jelentősen lassult, a sejtek éltek, de a sejtszám növekedése, az osztódó sejtek aránya lecsökkent. A sejtek szaporodásának leállása a nem túlságosan hosszú ideig (kb. 3 hét) tartó PG-éheztetés után még visszafordítható volt, ha a tápoldathoz ismételten PG-t adagoltunk, de a PG-megvonás 4. hetében a sejtek károsodása már olyan mértéket ért el, hogy a folyamat visszafordíthatatlanná vált, és az egész kultúra elpusztult. A sejtek osztódásának gyors leállása arra utalt, hogy a PG kiürülése befolyásolhatta a sejtosztódás folyamatának valamely lépését.

A morfológiai vizsgálatok a sejtszerkezet torzulását mutatták a PG kiürülése során. A tilakoid szerkezetének felbomlása mellett a sejtek térfogatának növekedését is megfigyeltem, ami utalhat arra, hogy a sejtek felkészültek az osztódásra, genetikai állományukat és enzimkészletüket felszaporították, de nem képesek osztódni. Nagyszámú torzan osztódó sejtet figyeltem meg a hosszú ideig PG-éheztetett kultúrából készített elektronmikroszkópos felvételeken: ezek a sejtek megkezdték az osztódást, de nem tudták befejezni, mintegy „befagytak” az osztódás egy fázisában. Korábbi irodalmi adatok nem utaltak arra, hogy a PG-nek szerepe lehet az osztódásban, azonban néhány éve ismert, hogy baktériumokban a PG-ből szintetizálódó kardiolipin fontos szerepet tölt be az osztódás folyamatában (Dowhan és mtsai, 2004; Mileykovskaya és Dowhan, 2005). A sejt pólusain halmozódik fel a plazmamembránban, és ez a CL-felhalmozódás figyelhető meg az osztódó sejtek középső régiójában is, ahol specifikus fehérjékhez kapcsolódva a CL részt vesz az osztódási gyűrű kialakításában (Mileykovskaya és Dowhan, 2000). Az osztódási gyűrűből indul el az a folyamat, mely végül kialakítja az utódsejteket elválasztó haránt plazmamembránt és sejtfalat. A CL jellegzetesen nem „bilayerképző” lipid, mely ha nagyobb koncentrációban fordul elő a membránban, hajlamos inverz hexagonális fázist kialakítani, különösen kétértékű kationok jelenlétében. Ennek a nem „bilayer” szerkezetnek valószínűleg szerepe van a sejtosztódáskor a sejt középvonalában formálódó szeptum kialakításában (Kawai és mtsai, 2004). Cianobaktériumokban nem szintetizálódik CL, de a megfigyelt osztódási rendellenességek alapján felmerült, hogy a PG-nek hasonló szerepe lehet a cianobaktériumok osztódásában, mint a CL-nek a baktériumok esetében, különösen annak ismeretében, hogy *in vitro* kísérletekben kimutatták a PG-

molekulákból álló membrán inverz hexagonális fázisba való átalakulását Ca^{2+} ionok jelenlétében (Harlos és Eibl, 1980).

A PG fokozatos kiürülése során megfigyeltem a sejtek klorofilltartalmának erőteljes csökkenését is. Hosszabb ideig tartó PG-éheztetés után szinte eltűnt az abszorpciós spektrumból a klorofillra jellemző, 680 nm-en mérhető csúcs, ugyanakkor a fikobiliproteinek koncentrációja nem változott szignifikánsan. A klorofilltartalom ilyen nagymértékű csökkenése nemcsak a PSII működésének zavarával állhatott kapcsolatban [melyet korábban Hagio és mtsai (2000), Gombos és mtsai (2002) és Sakurai és mtsai (2003) már leírtak], de valószínűleg érintette a PSI működését ill. mennyiségét is. A klorofillmolekulák nagyobb része ugyanis a PSI-hez kötődik, mivel a *Synechocystis* sejtek nagyobb számban tartalmaznak PSI komplexeket, mint PSII-t, és a PSI RC-k több klorofillt kötnek, mint a PSII RC-k (Zouni és mtsai, 2001; Jordan és mtsai, 2001).

A PG kiürülése során a *pgsA* sejtek lipidosztályainak arányai csak kismértékben változtak. Megfigyeltem, hogy a PG nem ürült ki teljesen a sejtekből, még a kultúra pusztulása előtt néhány nappal is kimutatható volt néhány százalék PG jelenléte. Ennek oka valószínűleg a PG egyenlőtlen eloszlása a sejtekben a sejtfal-citoplazmamembrán és a tilakoidmembrán frakciók között. Ha a PG szintje néhány százalék alá csökkent, már nem jutott elegendő PG a tilakoidba, hogy fenntartsa a fotoszintetikus folyamatokat és az energiatermelést, ami a már nem osztódó, csak vegetáló sejtek gyors pusztulásához vezetett.

Érdekes megfigyelés, hogy a PG mennyiségének csökkenése az SQDG mennyiségének kismértékű növekedésével járt együtt. Ez ellentmond azoknak a korábbi tapasztalatoknak, miszerint a *Synechocystis* sejtekben az anionos lipidek nem képesek helyettesíteni egymást (Aoki és mtsai, 2004). Valószínűleg vannak olyan funkciók, amelyekben a szulfolipid átveheti a PG szerepét *Synechocystis* sejtekben is, de teljes mértékben nem helyettesítheti azt.

A *pgsA* sejtek lipidosztályainak zsírsavösszetételében nem találtunk lényeges eltérést a vad típushoz képest a PG kiürítése során, azonban igen figyelemreméltó, hogy a *Synechocystis* sejtek átépítették a külső környezetből felvett PG-molekulákat a vad típusban termelődőhöz hasonló molekulatípusra. A kívülről felvett lipidmolekulák zsírsavainak kicserélődését már mások is megfigyelték (H. Wada személyes közlése), azonban

eddig még nem publikálták. *Synechocystis*ben még nem írtak le lipáz enzimeket sem, melyek a lipimolekulákból zsírsavakat hasítanának le, de a zsírsavkicserélődésben szerepet játszó lizo-MGDG–aciltranszferáz (Wada és mtsai, 1993) és lizo-PG–aciltranszferáz (Weier és mtsai, 2005) enzimeket már sikerült azonosítani.

A *pgsA* sejteken felvett FTIR spektrumok egyértelműen azt mutatják, hogy a tilakoidmembrán lipidfrakciójának fizikai állapotát, mikroviszkozitását nem változtatta meg az egyébként is alacsony arányban jelenlevő PG mennyiségének csökkenése. Ez a megfigyelés ellentmondani látszik a korábban transzgenikus dohány tilakoidján végzett méréseknek (Szalontai és mtsai, 2003), melyben az FTIR vizsgálatok a PG telítetlenségétől függő szerkezeti változásokat mutattak ki. Esetünkben a tilakoid PG-tartalmának jelentős csökkenését értük el, de a PG-molekulák telítetlensége nem változott. Ennek lehetséges okait az előző bekezdésben a zsírsavösszetétel változásaival kapcsolatban fejtettem ki. A két mérési eredmény közötti különbséget magyarázhatják a cianobaktérium és a magasabbrendű növény tilakoidjának szerkezetében lévő eltérések.

A lipidtartalom változásával kapcsolatos funkcionális változásokat vizsgálva megállapíthattam, hogy a PG fokozatos kiürülése során a sejtekben mérhető PSI-aktivitás csökkent, mely különösen a több mint két hétig tartó PG-éheztetés után vált jelentőssé. Feltételezhetjük, hogy hosszabb ideig tartó PG-megvonás után érte el a PG-hiány azt a szintet, amikor már a PSI RC-ból is kezdtek kiürülni a PG-molekulák. Három hét PG-éheztetés után a sejtek PSI-aktivitása már a felét sem érte el a PG-megvonás előtti értéknek, de ha a sejtekhez ismét PG-t adtunk, az aktivitás visszaállt a kezdeti szintre.

Feltételeztük, hogy a fotoszintetikus funkciók változásának hátterében a funkciókhoz kapcsolható fehérjekomplexek oligomerizációjában és fehérjeösszetételében bekövetkezett változások állhatnak. Korábbi vizsgálatok kimutatták a PSII RC dimerek monomerizációját a PG-tartalom csökkenésének hatására (Sakurai és mtsai, 2003). Ezek a megfigyelések alapot szolgáltattak arra, hogy hasonló szerkezeti változásokat feltételezzek a PSI aktivitáscsökkenése mögött is. A szerkezetvizsgálatokat nagynyomású folyadékkromatográfiával elválasztott PSI oligomereken végeztem. A PSI aktivitásának csökkenésével párhuzamosan megfigyeltem a PSI trimerek arányának csökkenését és a monomerek arányának növekedését a tilakoidban a PG kiürülése során. Ezek a megfigyelések vezettek a *pgsA* sejtek tilakoidmembránjában levő fehérjekomplexek szerkezeti sta-

bilitásának vizsgálatához, DSC-paraméterek mérésével. Megállapítottam, hogy a tilakoidba ágyazott fehérjék hőkapacitása a PG kiürülésével párhuzamosan folyamatosan csökkent, és ennek alapján feltételezhettem, hogy a PG kiürülése nemcsak a PSII már ismert monomerizációját okozta (Sakurai és mtsai, 2003), de a PSI szerkezetét is befolyásolta.

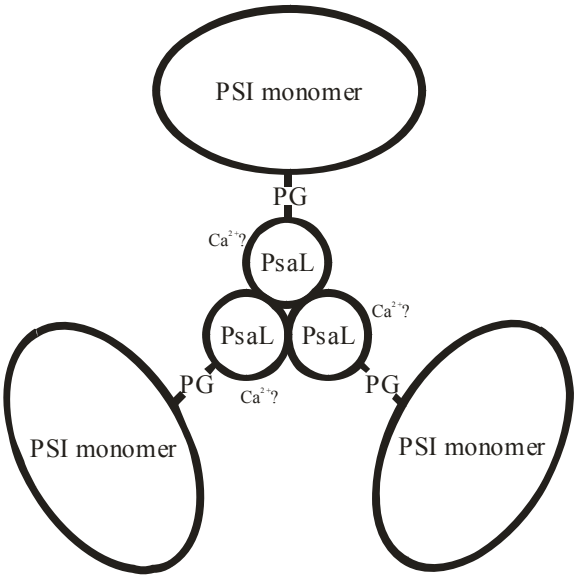
Kromatográfiás vizsgálataim fényt derítettek arra, hogy az elegendően hosszú ideig tartó PG-éheztetés után már csak PSI monomerek találhatók a membránban, a trimerek teljesen eltűntek a tilakoidból. A PSI monomerizálódása visszafordítható volt: ha a PG-hiányos sejtekhez kívülről PG-t adtunk, a PSI trimerek aránya visszaállt a PG-éheztetés előtti szintre. A visszaállás bekövetkezett akkor is, ha linkomicin fehérjeszintézis-gátló szert is adtunk a sejtekhez, tehát a trimerek nem *de novo* szintetizált fehérjékből, hanem a meglévő monomerekből alakultak ki a PG hatására.

A PG-hiánynak a PSI oligomerizációjára és aktivitására kifejtett hatásáról számoltak be Sato és mtsai (2004) is a *Synechocystis sp.* PCC6803 *cdsA* mutánson (mely szintén képtelen a PG szintézisére) végzett kísérleteik alapján. A tilakoid fehérjekomplexeit dodecil-β-D-maltozid-gélelektroforézissel elválasztva úgy találták, hogy már egészen rövid ideig tartó PG-éheztetés után bekövetkezett a PSI monomerizációja, miközben a PsaA és PsaB reakciócentrum-fehérjék mennyisége is erősen lecsökkent. Ennek ellentmond, hogy ugyanakkor nem tapasztalták a PSI aktivitásának csökkenését. Ellentmondásos megfigyeléseik részben abból adódhattak, hogy a miénktől eltérő kísérleti körülményeket alkalmaztak, különös tekintettel a fény- és hőmérsékleti viszonyokra, valamint a széndioxiddal buborékoltatott kultúrák felhasználására. A buborékoltatott rendszer gyorsabb osztódást, a kultúra hirtelen felszaporodását jelenti, mely felgyorsítja a fiziológiás folyamatokat, és a felgyorsult változások nem teszik lehetővé a részletes vizsgálatokat. Ennek a problémának az elkerülésére használtam rázatott kultúrákat, amelyek finomabb és részletesebb vizsgálatokat tettek lehetővé.

A fehérjék oligomerizációjában bekövetkező változások a szerkezethez kapcsolódó funkciókat is megváltoztathatják. Bár a PSI oligomerizációjának szerepe nem tisztázott, némely szerző szerint a funkcionális változások hátterében többféle szerepet is feltételezhetünk. Az oligomer szerveződés megvédheti a PSI RC-t a fénystressztől, lehetővé téve a többlet gerjesztési energia sugárzásmentes eloszlatását és hővé alakítását (Mukerji

és Sauer, 1989; Karapetyan és mtsai, 1999). Mások szerint, a trimer szerkezetben a hosszabb hullámhosszokon elnyelő, ún. „red" klorofill molekulák kapcsolatba kerülnek a szomszédos monomerek klorofilljaival, ezáltal abszorpciójuk eltolódik a magasabb hullámhosszak felé, szélesítve azt a hullámhossztartományt, amelyben hasznosítani tudják a fényt (Trissl, 1993). A hosszúhullámú klorofillok képesek az általuk elnyelt kisebb energiájú fény energiáját továbbítani a P700 felé (van Grondelle és mtsai, 1994; Shubin és mtsai, 1995). Sener és mtsai (2004) szerint egyrészt a trimer szerkezet stabilabb, mint a monomer, mert a monomerekről könnyen leválnak a perifériás alegységek, valamint a klorofill és a karotinoid molekulák egy része is. Másrészt, mivel alacsony fényintenzitáson a PSI/PSII arány és a PSI trimer/monomer arány megnő, és előtérbe kerül a PSI körüli ciklikus elektrontranszport, a trimer szerveződés szerepet játszhat a ciklikus elektrontranszport működtetésében és a fikobiliszómáknak a PSI RC-hoz való kapcsolódásában is. Különbséget találtak a gerjesztési energia átadásában is a monomer és a trimer között, de a mért kis különbség nem magyarázza a trimer szerveződés előtérbe kerülését.

Az oligomerek szétesése együttjárhat a fehérjeösszetétel megváltozásával is, ennek vizsgálatához a fehérjeanalitikában használatos gélelektroforézist, és az egyes fehérjék azonosítására szolgáló immunojelölést alkalmaztam. Ezekkel a módszerekkel a PG kiürülése során monomerizálódó PSI komplexekben megfigyeltem a PsaL fehérjealegység leválását a reakciócentrumról. A PsaL fehérjéről ismert, hogy a monomerek kapcsolódási felszínén helyezkedik el, és elsősorban ez a fehérje felelős a trimerizációért (Chitnis éa Chitnis, 1993). PsaL-hiányos mutánsokban nem képződtek trimerek, csak PSI monomerek (Schluchter és mtsai, 1996). A *pgsA* sejtekben a PG kiürítése és a PSI monomerizálódása után nem volt kimutatható a PsaL alegység jelenléte a PSI monomerekben. Bebizonyosodott, hogy a PG hiánya nem a PsaL fehérje szintézisét gátolta, mivel ha PG-t adtunk a sejtekhez, a PsaL fehérje linkomicin fehérjeszintézis-gátló jelenlétében is beépült a reakciócentrumba. A PG-hiányos tilakoidmembránban kimutatott PsaL fehérjék azt bizonyítják, hogy a PsaL alegységek nem bomlottak le, csak leváltak a PSI RC-ról, és ha a sejtekhez kívülről PG-t adtunk, képesek voltak a PSI monomerekbe ismét beépülni és trimereket kialakítani. A 28. ábra azt mutatja, hogyan kapcsolódnak a PSI monomerek PG-molekulákon keresztül, a PsaL alegységek összekapcsolódásával trimerré.



28. ábra. PSI monomerek összekapcsolódása trimerré a PG-molekulákhoz kötődő PsaL alegységeken keresztül.

Bár a cianobakteriális PSI 2,5 Å felbontású kristályszerkezete, melyet Jordan és mtsai közöltek 2001-ben, tartalmaz egy PG-molekulát a monomerek kapcsolódási felszínén, ez a PG-molekula nem kapcsolódik a PsaL-hez, hanem a PsaA-hoz kötődve egy klorofill-a koordinálásában vesz részt. Azonban a Grotjohann és Fromme által 2005-ben megjelentetett összefoglaló tanulmány közli, hogy a PsaL fehérje közelében láttak egy másik lipidjellegű molekulát is, melyet elektrondenzitása alapján nem sikerült azonosítaniuk (ezért korábban nem is publikálták), de amelyhez valószínűleg 4 zsírsavlánc tartozik. Elképzelhető egy olyan, 4 zsírsavláncot hordozó molekulaszerkezet, melyben 2 PG-molekulát egy Ca^{2+} ion köt össze. A Ca^{2+} ion szerepét a PSII és a PSI-aggregációjában már kimutatták *in vitro* kísérletekben (Fragata és mtsai, 1997; Yang és mtsai, 2005; Wu és mtsai, 2005), miszerint a Ca^{2+} ion elősegíti a komplexek oligomerizációját, valamint képes ionpárt kialakítani egy vagy több lipidmolekula foszfáttartalmú fejcsoportjával. Elképzelésünket az *in vitro* mérések tapasztalatain túl megerősíti, hogy a kristályszerkezetben is látható egy Ca^{2+} ion a PsaL-hez kötődve a PSI trimerizációs felszínén (Jordan és mtsai, 2001; Fromme és mtsai, 2001). Amennyiben feltételezésünk helyes, és az azonosítatlan lipidmolekula PG, az közvetlen szerkezeti igazolását adná eredményeinknek, mi-

szerint a PG meghatározó szerepet játszik a PSI komplex PsaL fehérjealegységének kötésében és ezáltal a PSI trimerizációjában.

Eredményeim alapján megállapítottam, hogy a PG-molekulák meghatározó szerepet játszanak a fotoszintetikus szervezetek energiatermelésében létfontosságú fehérjék szerveződésében. Olyan, eddig még nem ismert fehérje-lipid kölcsönhatásokra sikerült felhívnom a figyelmet, amelyeknek a részletesebb felderítése az egyes fehérjék és PG-molekulák által létrehozott fehérjedomének funkciójának megértéséhez vezethet. Először sikerült kimutatnom a PG-molekulák jelentőségét olyan lipid-fehérje kölcsönhatásban, mely a PSI szerkezete és funkciója szempontjából létfontosságú. Ezek további vizsgálata áll jelenlegi kutatásaim homlokterében.

7. Összefoglalás

Kísérleteinket a *Synechocystis sp*. PCC6803 *pgsA* cianobaktérium törzsön végeztük, mely a PGP-szintáz enzim génjének inaktiválása miatt a PG előállítására képtelen, de amely fenntartható és szaporítható a PG kívülről történő pótlásával. Ezen a mutánson korábban kimutatták, hogy a PG megvonása kezdetben a PSII működésének zavarát okozza, de nem tapasztaltak eltéréseket a PSI működésében (Hagio és mtsai, 2000; Gombos és mtsai, 2002; Sakurai és mtsai, 2003). Miután a röntgenkrisztallográfiás szerkezetvizsgálatok PG-molekulákat mutattak ki a PSI RC-ban (Jordan és mtsai, 2001), felmerült, hogy a PG hiánya azért nem okoz változást a PSI működésében, mert a PSI reakciócentrumból nem sikerült eltávolítani a szorosan kötött PG-molekulákat.

Munkám kiindulási pontjaként célul tűztem ki a PG kiürítését a PSI reakciócentrumából is, majd az ennek következtében megnyilvánuló szerkezeti és funkcionális változások felmérését. A PG fokozatos kiürülése során megfigyelt hatások és megmért paraméterek alapján kérdéseinkre a következő válaszokat kaptuk:

a) Az alkalmazott hő- és fényviszonyok között a *pgsA* sejtek 3–4 hétig tarthatók életben PG-mentes tápoldatban. A sejtosztódás kb. két hét PG-megvonás után leállt, de 3 hét PG-éheztetés után a sejtosztódás gátlása még visszafordítható volt, ha a médiumba PG-t adagoltunk. Hosszabb PG-megvonás a sejtek pusztulásához vezetett.

   Az elektronmikroszkópos morfológiai vizsgálatok alapján a PG kiürülése a tilakoid szerkezetének felbomlását eredményezte, valamint a PG-hiányos sejtek térfogata átlagosan legalább 50%-kal nőtt, de a sejtek egyötöde több mint kétszeresére duzzadt, és osztódási rendellenességeket is mutattak. Megállapítottam, hogy a PG hiánya gátolta a sejtek osztódását.

   A PG kiürülésével párhuzamosan erősen lecsökkent a *pgsA* sejtek klorofilltartalma, ami a fotokémiai rendszerek PG hiányában bekövetkező sérülésével állt kapcsolatban. A fikobiliproteinek szintézisét, szerkezetét és működését nem érintette a PG-hiány.

b) A *pgsA* sejtek PG-tartalma folyamatosan csökkent a PG-éheztetés során, azonban nem sikerült teljesen kiüríteni a PG-t a sejtekből. Ha a sejtekben a PG aránya 4%

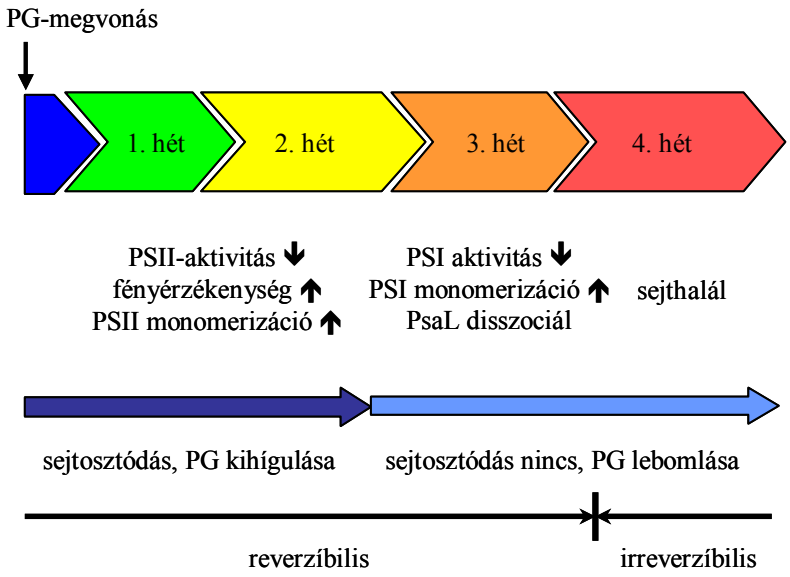
alá csökkent, a kultúra elpusztult. Kimutattam, hogy a *pgsA* sejtek a tápoldatból felvett PG-molekulák zsírsavait kicserélték, a molekulákat átépítették a fajra jellemző lipidszerkezetre.

A *pgsA* sejtek tilakoid membránján felvett FTIR-spektrumok alapján a PG-molekulák nagy részének eltávolítása nem változtatta meg a tilakoid lipidfrakciójának mikroviszkozitását.

c) A *pgsA* sejtekben a fotooxidálható P700 mennyisége két hét PG-éheztetés után kezdett csökkenni, ekkor kezdtek a PSI RC-ból is kiürülni a PG-molekulák. A sejtekben mérhető PSI-aktivitás csökkenése 3 hét PG-megvonás után még visszafordítható volt a PG kívülről történő pótlásával. Kimutattam, hogy elegendően hosszú ideig tartó PG-megvonással a PSI RC-ból is eltávolíthatók voltak a PG-molekulák, és ez befolyásolta a sejtekben levő, fotooxidálható P700 mennyiségét.

d) A sejtekben mért PSI-aktivitás csökkenésével párhuzamosan szerkezeti változások is bekövetkeztek a PG kiürülése során. A DSC-görbék a tilakoidban levő fehérjekomplexek hőkapacitásának csökkenését, szerkezetének felbomlását mutatták. A PSI komplexek oligomerizációjának vizsgálata a PSI trimerek arányának fokozatos csökkenését, monomerizációját tárta fel. A PSI monomerekből PG hiányában leváltak a trimerizációért felelős PsaL fehérjealegységek, melyek a tilakoidban maradva PG hatására képesek voltak ismét trimereket kialakítani a PSI monomerekből. Megállapítottam, hogy a PSI monomerek trimerizációjához szükséges, hogy a PsaL fehérjealegységek a PG-molekulákon keresztül stabilan kötődjenek a PSI reakciócentrumokhoz.

A PG-kiürülés következményeként a sejtfunkciókban és a fotoszintetikus membrán szerkezetében bekövetkező változások kronológiai sorrendjét a 29. ábrán foglaltam össze.



29. ábra. **A PG-éheztetés hatásai a *pgsA* sejtek funkcióira a PG kiürülésének függvényében**

A *Synechocystis sp*. PCC6803 *pgsA* sejteken végzett méréseink *in vivo* bizonyítják a PG-molekulák meghatározó szerepét a fotoszintetikus folyamatokban és a sejtosztódásban.

8. Idézett közlemények

Adam Z, Hoffman NE (1993) Biogenesis of a photosystem-I light-harvesting complex - evidence for a membrane intermediate. Plant Physiology **102**: 35-43

Allen MM (1968) Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. J Phycol **4**: 1-4

Andersen B, Scheller HV, Moller BL (1992) The PSI-E subunit of photosystem-I binds ferredoxin:$NADP^+$ oxidoreductase. Febs Letters **311**: 169-173

Anderson SL, McIntosh L (1991) Light-activated heterotrophic growth of the cyanobacterium *Synechocystis sp.* strain PCC6803 -a blue-light-requiring process. Journal of Bacteriology **173**: 2761-2767

Andersson MX, Stridh MH, Larsson KE, Lijenberg C, Sandelius AS (2003) Phosphate-deficient oat replaces a major portion of the plasma membrane phospholipids with the galactolipid digalactosyldiacylglycerol. Febs Letters **537**: 128-132

Andrews J, Mudd JB (1985) Phosphatidylglycerol synthesis in pea chloroplasts - pathway and localization. Plant Physiology **79**: 259-265

Aoki M, Sato N, Meguro A, Tsuzuki M (2004) Differing involvement of sulfoquinovosyl diacylglycerol in photosystem II in two species of unicellular cyanobacteria. European Journal of Biochemistry **271**: 685-693

Ariizumi T, Kishitani S, Inatsugi R, Nishida I, Murata N, Toriyama K (2002) An increase in unsaturation of fatty acids in phosphatidylglycerol from leaves improves the rates of photosynthesis and growth at low temperatures in transgenic rice seedlings. Plant and Cell Physiology **43**: 751-758

Armbrust TS, Chitnis PR, Guikema JA (1996) Organization of photosystem I polypeptides examined by chemical cross-linking. Plant Physiology **111**: 1307-1312

Arnon DI, McSwain BD, Tsujimoto HY, Wada K (1974) Photochemical activity and components of membrane preparations from blue-green algae. I. Coexistence of two photosystems in relation to chlorophyll a and removal of phycocyanin. Biochimica et Biophysica Acta **357**: 245

Aro EM, Virgin I, Andersson B (1993) Photoinhibition of photosystem II - inactivation, protein damage and turnover. Biochimica et Biophysica Acta **1143**: 113-134

Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. Short protocols in molecular biology. [Chapter 10]. 1995. New York, John Wiley.

Awai K, Marechal E, Block MA, Brun D, Masuda T, Shimada H, Takamiya K, Ohta H, Joyard J (2001) Two types of MGDG synthase genes, found widely in both 16 : 3 and 18 : 3 plants, differentially mediate galactolipid syntheses in photosynthetic and nonphotosynthetic tissues in *Arabidopsis thaliana*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**: 10960-10965

Babiychuk E, Muller F, Eubel H, Braun HP, Frentzen M, Kushnir S (2003) *Arabidopsis* phosphatidylglycerophosphate synthase 1 is essential for chloroplast differentiation, but is dispensable for mitochondrial function. Plant Journal **33**: 899-909

Baena-Gonzalez E, Barbato R, Aro EM (1999) Role of phosphorylation in the repair cycle and oligomeric structure of photosystem II. Planta **208**: 196-204

Balogi Z, Torok Z, Balogh G, Josvay K, Shigapova N, Vierling E, Vigh L, Horvath L (2005) "Heat shock lipid" in cyanobacteria during heat/light-acclimation. Archives of Biochemistry and Biophysics **436**: 346-354

Barth P, Lagoutte B, Setif P (1998) Ferredoxin reduction by photosystem I from *Synechocystis sp.* PCC **6803**: Toward an understanding of the respective roles of subunits PsaD and PsaE in ferredoxin binding. Biochemistry **37**: 16233-16241

Ben Shem A, Frolow F, Nelson N (2003) Crystal structure of plant photosystem I. Nature **426**: 630-635

Ben Shem A, Frolow F, Nelson N (2004) Evolution of photosystem I - from symmetry through pseudosymmetry to asymmetry. Febs Letters **564**: 274-280

Benning C (1998) Biosynthesis and function of the sulfolipid sulfoquinovosyl diacylglycerol. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **49**: 53-75

Benson AA, Mauro B (1958) Plant phospholipids. I. Identification of the phosphatidylglycerols. Biochimica et Biophysica Acta **27**: 189-195

Benson AA, Maruo B (1989) A nova in phosphate-metabolism, GPG, and discovery of phosphatidylglycerol - commentary. Biochimica et Biophysica Acta **1000**: 447-458

Bibby TS, Nield J, Barber J (2001) Three-dimensional model and characterization of the iron stress-induced CP43 '-photosystem I supercomplex isolated from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. Journal of Biological Chemistry **276**: 43246-43252

Bishop DG (1986) Chilling sensitivity in higher-plants - the role of phosphatidylglycerol. Plant Cell and Environment **9**: 613-616

Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol **37**: 911-917

Block MA, Dorne AJ, Joyard J, Douce R (1983) Preparation and characterization of membrane-fractions enriched in outer and inner envelope membranes from spinach-chloroplasts .II. Biochemical characterization. Journal of Biological Chemistry **258**: 3281-3286

Boekema EJ, Hankamer B, Bald D, Kruip J, Nield J, Boonstra AF, Barber J, Rogner M (1995) Supramolecular structure of the photosystem-II complex from green plants and cyanobacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **92**: 175-179

Bogdanov M, Dowhan W (1999) Lipid-assisted protein folding. J Biol Chem **274**: 36827-36830

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry **72**: 254

Chen LJ, Li HM (1998) A mutant deficient in the plastid lipid DGDG is defective in protein import into chloroplasts. Plant J **16**: 33-39

Chitnis VP, Chitnis PR (1993) PsaL subunit is required for the formation of photosystem I trimers in the cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC6803. Febs Letters **336**: 334

Chitnis VP, Ke A, Chitnis PR (1997) The PsaD subunit of photosystem I (mutations in the basic domain reduce the level of PsaD in the membranes). Plant Physiology **115**: 1699-1705

De la Rosa MA, Navarro JA, Diaz-Quintana A, De la Cerda B, Molina-Heredia FP, Balme A, Murdoch PD, Diaz-Moreno I, Duran RV, Hervas M (2002) An evolutionary analysis of the reaction mechanisms of photosystem I reduction by cytochrome c_6 and plastocyanin. Bioelectrochemistry **55**: 41-45

Dormann P, Hoffmannbenning S, Balbo I, Benning C (1995) Isolation and characterization of an *Arabidopsis* mutant deficient in the thylakoid lipid digalactosyl d iacylglycerol. Plant Cell **7**: 1801-1810

Dormann P, Benning C (2002) Galactolipids rule in seed plants. Trends in Plant Science **7**: 112-118

Dorne AJ, Heinz E (1989) Position and pairing of fatty-acids in phosphatidylglycerol from pea leaf chloroplasts and mitochondria. Plant Science **60**: 39-46

Douce R, Joyard J (1996) Biosynthesis of thylakoid membrane lipids. In D.R.Ort, C.F.Yocum, eds, Oxygenic photosynthesis: the light reactions., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 69-101

Droppa M, Horváth G, Hideg É, Farkas T (1995) The role of phospholipids in regulating photosynthetic electron transport activities: Treatment of thylakoids with phospholipase C. Photosynthesis Research **46**: 287-293

Dubertret G, Gerard-Hirne C, Tremolieres A (2002) Importance of trans-D3-hexadecenoic acid containing phosphatidylglycerol in the formation of the trimeric light-harvesting complex in *Chlamydomonas*. Plant Physiology and Biochemistry **40**: 829-836

Duchene S, Smutny J, Siegenthaler PA (2000) The topology of phosphatidylglycerol populations is essential for sustaining photosynthetic electron flow activities in thylakoid membranes. Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes **1463**: 115-120

El Maanni A, Dubertret G, Delrieu MJ, Roche O, Tremolieres A (1998) Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* affected in phosphatidylglycerol metabolism and thylakoid biogenesis. Plant Physiology and Biochemistry **36**: 609-619

Essigmann B, Guler S, Narang RA, Linke D, Benning C (1998) Phosphate availability affects the thylakoid lipid composition and the expression of *SQD1*, a gene required for sulfolipid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**: 1950-1955

Ferreira KN, Iverson TM, Maghlaoui K, Barber J, Iwata S (2004) Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. Science **303**: 1831-1838

Fragata M, Nenonene EK, Maire V, Gabashvili IS (1997) Structure of the phosphatidylglycerol-photosystem II complex studied by FTIR spectroscopy. Mg(II) effect on the polar head group of phosphatidylglycerol. Journal of Molecular Structure **405**: 151-158

Frentzen M (2004) Phosphatidylglycerol and sulfoquinovosyldiacylglycerol: anionic membrane lipids and phosphate regulation. Current Opinion in Plant Biology **7**: 270-276

Fromme P, Jordan P, Krauss N (2001) Structure of photosystem I. Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics **1507**: 5-31

Fromme P, Melkozernov A, Jordan P, Krauss N (2003) Structure and function of photosystem I: interaction with its soluble electron carriers and external antenna systems. Febs Letters **555**: 40-44

Gantt E (1994) Supramolecular membrane organization. In D.A.Bryant, ed, The Molecular Biology of Cyanobacteria, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 119-138

Garnier J, Maroc J, Guyon D (1987) Characterization of new strains of photosynthesis mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. I V. Impaired excitation energy transfer in three low fluorescent mutants. Plant and Cell Physiology **28**: 1117-1131

Garnier J, Wu BR, Maroc J, Guyon D, Tremolieres A (1990) Restoration of both an oligomeric form of the light-harvesting antenna CPII and a fluorescence state-I I-state-I transition by D-3-*trans*-hexadecenoic acid-containing phosphatidylglycerol, in cells of a mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* . Biochimica et Biophysica Acta **1020**: 153-162

Golden SS, Brusslan J, Haselkorn R (1987) Genetic engineering of the cyanobacterial chromosome. Methods in Enzymology **153**: 215-231

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. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **91**: 8787-8791

Gombos Z, Wada H, Varkonyi Z, Los DA, Murata N (1996) Characterization of the Fad12 mutant of *Synechocystis* that is defective in D12 acyl-lipid desaturase activity. Biochimica et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism **1299**: 117-123

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

Gounaris K, Barber J (1983) Monogalactosyldiacylglycerol - the most abundant polar lipid in nature. Trends in Biochemical Sciences **8**: 378-381

Grotjohann I, Fromme P (2005) Structure of cyanobacterial photosystem I. Photosynthesis Research **85**: 51-72

Guerrero MG, Lara C (1987) Assimilation of inorganic nitrogen. In Fay P, van Baalen, eds, The Cyanobacteria, Elsevier, New York, pp 163-186

Guler S, Essigmann B, Benning C (2000) A cyanobacterial gene, *sqdX*, required for biosynthesis of the sulfolipid sulfoquinovosyldiacylglyerol. Journal of Bacteriology **182**: 543-545

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 Physiology **124**: 795-804

Harlos K, Eibl H (1980) Influence of calcium on phosphatidylglycerol. II. Separate lamellar structures. Biochemistry **19**: 895-899

Hartel H, Lokstein H, Dormann P, Grimm B, Benning C (1997) Changes in the composition of the photosynthetic apparatus in the galactolipid-deficient *dgd1* mutant of *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology **115**: 1175-1184

Hartel H, Lokstein H, Dormann P, Trethewey RN, Benning C (1998) Photosynthetic light utilization and xanthophyll cycle activity in the galactolipid deficient *dgd1* mutant of *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology and Biochemistry **36**: 407-417

Hippler M, Reicher J, Sutter M, Zak E, Altschmied L, Schroer U, Herrmann RG, Haehnel W (1996) The plastocyanin binding domain of photosystem I. Embo Journal **15**: 6374-6384

Hippler M, Drepper F, Haehnel W, Rochaix JD (1998) The N-terminal domain of PsaF: Precise recognition site for binding and fast electron transfer from cytochrome c_6 and plastocyanin to photosystem I of *Chlamydomonas reinhardtii*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**: 7339-7344

Hoj PB, Svendsen I, Scheller HV, Moller BL (1987) Identification of a chloroplast-encoded 9-Kda polypeptide as a 2[4Fe-4S] protein carrying center-A and center-B of photosystem-I. Journal of Biological Chemistry **262**: 12676-12684

Hu Q, Miyashita H, Iwasaki I, Kurano N, Miyachi S, Iwaki M, Itoh S (1998) A photosystem I reaction center driven by chlorophyll *d* in oxygenic photosynthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**: 13319-13323

Ikegami I, Katoh S (1991) Antenna chlorophyll-a has a structural role in stabilizing the functional conformation of P-700-chlorophyll-protein complexes. Biochimica et Biophysica Acta **1059**: 275-280

Ikeuchi M, Nyhus KJ, Inoue Y, Pakrasi HB (1991) Identities of four low-molecular-mass subunits of the photosystem-I complex from *Anabaena variabilis* ATCC-29413 - Evidence for the presence of the *psaI* gene-product in a cyanobacterial complex. Febs Letters **287**: 5-9

Inaba M, Sakamoto A, Murata N (2001) Functional expression in *Escherichia coli* of low-affinity and high-affinity $Na^+(Li^+)/H^+$ antiporters of *Synechocystis*. Journal of Bacteriology **183**: 1376-1384

Iwaki M, Itoh S, Kamei S, Matsubara H, Oh-oka H (1999) Time-resolved spectroscopy of chlorophyll-a like electron acceptor in the reaction center complex of the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*. Plant and Cell Physiology **40**: 1021-1028

Jarvis P, Dormann P, Peto CA, Lutes J, Benning C, Chory J (2000) Galactolipid deficiency and abnormal chloroplast development in the *Arabidopsis* MGD synthase 1 mutant. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97**: 8175-8179

Jeanjean R, Zuther E, Yeremenko N, Havaux M, Matthijs HCP, Hagemann M (2003) A photosystem I *psaFJ-null* mutant of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 expresses the *isiAB* operon under iron replete conditions. Febs Letters **549**: 52-56

Jensen PE, Gilpin M, Knoetzel J, Scheller HV (2000) The PSI-K subunit of photosystem I is involved in the interaction between light-harvesting complex I and the photosystem I reaction center core. Journal of Biological Chemistry **275**: 24701-24708

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. Biochimica et Biophysica 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 A resolution. Nature **411**: 909-917

Jouhet J, Marechal E, Bligny R, Joyard J, Block MA (2003) Transient increase of phosphatidylcholine in plant cells in response to phosphate deprivation. Febs Letters **544**: 63-68

Joyard J, Marechal E, Miege C, Block MA, Dorne A-J, Douce R (1998) Structure, distribution and biosynthesis of gycerolipids from higher plant chloroplasts. In P-A.Siegenthaler, N.Murata, eds, Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 21-52

Jurgens UJ, Mantele W (1991) Orientation of carotenoids in the outer-membrane of *Synechocystis* PCC-6714 (cyanobacteria). Biochimica et Biophysica Acta **1067**: 208-212

Kamiya N, Shen JR (2003) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3.7-A resolution. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**: 98-103

Kaneko T, Sato S, Kotani H, Tanaka A, Asamizu E, Nakamura Y, Miyajima N, Hirosawa M, Sugiura M, Sasamoto S, Kimura T, Hosouchi T, Matsuno A, Muraki A, Nakazaki N, Naruo K, Okumura S, Shimpo S, Takeuchi C, Wada T, Watanabe A, Yamada M, Yasuda M, Tabata S (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis sp* . PCC6803: II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. DNA Research **3**: 109-136

Karapetyan NV, Holzwarth AR, Rogner M (1999) The photosystem I trimer of cyanobacteria: molecular organization, excitation dynamics and physiological significance. Febs Letters **460**: 395-400

Katayama K, Sakurai I, Wada H (2004) Identification of an *Arabidopsis thaliana* gene for cardiolipin synthase located in mitochondria. Febs Letters **577**: 193-198

Kawai F, Shoda M, Harashima R, Sadaie Y, Hara H, Matsumoto K (2004) Cardiolipin domains in *Bacillus subtilis* Marburg membranes. Journal of Bacteriology **186**: 1475-1483

Kelly AA, Froehlich JE, Dormann P (2003) Disruption of the two digalactosyldiacylglycerol synthase genes *DGD1* and *DGD2* in *Arabidopsis* reveals the existence of an additional enzyme of galactolipid synthesis. Plant Cell **15**: 2694-2706

Kenyon CN (1972) Fatty acid composition of unicellular strains of blue-green algae. Journal of Bacteriology **109**: 827-834

Kenyon CN, Rippka R, Stanier RY (1972) Fatty acid composition and physiological properties of some filamentous blue-green algae. Archives in Microbiology **83**: 216-236

Koike H, Ikeuchi M, Hiyama T, Inoue Y (1989) Identification of photosystem-I components from the cyanobacterium, *Synechococcus vulcanus* by N-terminal sequencing. Febs Letters **253**: 257-263

Komenda J, Barber J (1995) Comparison of PsbO and PsbH deletion mutants of *Synechocystis* PCC-6803 indicates that degradation of D1 protein is regulated by the Q_B site and dependent on protein-synthesis. Biochemistry **34**: 9625-9631

Kontinen VP, Tokuda H (1995) Overexpression of phosphatidylglycerophosphate synthase restores protein translocation in a s*ecG* deletion mutant of *Escherichia coli* at low-temperature. Febs Letters **364**: 157-160

Kouril R, Yeremenko N, D'Haene S, Yakushevska AE, Keegstra W, Matthijs HCP, Dekker JP, Boekema EJ (2003) Photosystem I trimers from *Synechocystis* PCC 6803 lacking the PsaF and PsaJ subunits bind an IsiA ring of 17 units. Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics **1607**: 1-4

Kouril R, van Oosterwijk N, Yakushevska AE, Boekema EJ (2005) Photosystem I: a search for green plant trimers. Photochemical & Photobiological Sciences **4**: 1091-1094

Kruse O, Schmid GH (1995) The role of phosphatidylglycerol as a functional effector and membrane anchor of the D1-core peptide from photosystem-II particles of the cyanobacterium *Oscillatoria chalybea*. Zeitschrift fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences **50**: 380-390

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. Journal of Biological Chemistry **275**: 6509-6514

Kuhlbrandt W, Wang DN, Fujiyoshi Y (1994) Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. Nature **367**: 614-621

Kusters R, Breukink E, Gallusser A, Kuhn A, de Kruijff B (1994) A dual role for phosphatidylglycerol in protein translocation across the *Escherichia coli* inner membrane. J Biol Chem **269**: 1560-1563

Latowski D, Akerlund HE, Strzalka K (2004) Violaxanthin de-epoxidase, the xanthophyll cycle enzyme, requires lipid inverted hexagonal structures for its activity. Biochemistry **43**: 4417-4420

Loll B, Kern J, Saenger W, Zouni A, Biesiadka J (2005) Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 A resolution structure of photosystem II. Nature **438**: 1040-1044

Lunde C, Jensen PE, Haldrup A, Knoetzel J, Scheller HV (2000) The PSI-H subunit of photosystem I is essential for state transitions in plant photosynthesis. Nature **408**: 613-615

Maeda S, Okamura M, Kobayashi M, Omata T (1998) Nitrite-specific active transport system of the cyanobacterium *Synechococcus sp*. strain PCC 7942. Journal of Bacteriology **180**: 6761-6763

Maroc J, Tremolieres A, Garnier J, Guyon D (1987) Oligomeric form of the light-harvesting chlorophyll *a*+*b*-protein complex CPII, phosphatidyldiacylglycerol, D 3-*trans*-hexadecenoic acid and energy transfer in *Chlamydomonas reinhardtii*, wild type and mutants. Biochimica et Biophysica Acta **893**: 91-99

Matsumoto K (2001) Dispensable nature of phosphatidylglycerol in *Escherichia coli:* dual roles of anionic phospholipids. Molecular Microbiology **39**: 1427-1433

Melkozernov AN (2001) Excitation energy transfer in photosystem I from oxygenic organisms. Photosynthesis Research **70**: 129-153

Mileykovskaya E, Dowhan W (2005) Role of mernbrane lipids in bacterial division-site selection. Current Opinion in Microbiology **8**: 135-142

Minoda A, Sato N, Nozaki H, Okada K, Takahashi H, Sonoike K, Tsuzuki M (2002) Role of sulfoquinovosyl diacylglycerol for the maintenance of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*. European Journal of Biochemistry **269**: 2353-2358

Miyake C, Michihata F, Asada K (1991) Scavenging of hydrogen-peroxide in prokaryotic and eukaryotic algae - acquisition of ascorbate peroxidase during the evolution of cyanobacteria. Plant and Cell Physiology **32**: 33-43

Moon BY, Higashi SI, Gombos Z, Murata N (1995) Unsaturation of the membrane-lipids of chloroplasts stabilizes the photosynthetic machinery against low-temperature photoinhibition in transgenic tobacco plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **92**: 6219-6223

Mudd JB, Dezacks R (1981) Synthesis of phosphatidylglycerol by chloroplasts from leaves of *Spinacia oleracea* (Spinach). Archives of Biochemistry and Biophysics **209**: 584-591

Mukerji, I. and Sauer, K. Temperature dependent steady-state and picosecond kinetic fluorescence measurements of a Photosystem I preparation from spinach. W.Briggs. [8.], 105-122. 1989. New York, Alan R. Liss. Progress in Photosynthesis.

Murata N, Sato N, Takahashi N, Hamazaki Y (1982) Compositions and positional distributions of fatty-acids in phospholipids from leaves of chilling-sensitive and c hilling-resistant plants. Plant and Cell Physiology **23**: 1071-1079

Murata N (1983) Molecular-species composition of phosphatidylglycerols from chilling-sensitive and chilling-resistant plants. Plant and Cell Physiology **24**: 81-86

Murata N, Omata T (1988) Isolation of cyanobacterial plasma membranes. Methods in Enzymology **167**: 245-251

Murata N, Wada H, Gombos Z (1992) Modes of fatty-acid desaturation in cyanobacteria. Plant and Cell Physiology **33**: 933-941

Murata N, Ishizakinishizawa Q, Higashi S, Hayashi H, Tasaka Y, Nishida I (1992) Genetically engineered alteration in the chilling sensitivity of plants. Nature **356**: 710-713

Murata N, Wada H (1995) Acyl-lipid desaturases and their importance in the tolerance and acclimatization to cold of cyanobacteria. Biochemical Journal **308**: 1-8

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. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**: 10524-10527

Mühlenhoff U, Zhao JD, Bryant DA (1996) Interaction between photosystem I and flavodoxin from the cyanobacterium *Synechococcus sp.* PCC 7002 as revealed by chemical cross-linking. European Journal of Biochemistry **235**: 324-331

Nagy L, Milano F, Dorogi M, Agostiano A, Laczkó G, Szebényi K, Váró Gy, Trotta M, Maróti P (2004) Protein/lipid interaction in the bacterial photosynthetic reaction center: phosphatidylcholine and phosphatidylglycerol modify the free energy levels of the quinones. Biochemistry **43**: 12913-12923

Nolan WG, Hopkins HP, Kalini SAM (1992) Differential scanning calorimetric investigation of pea chloroplast thylakoids and thylakoid fractions. Archives of Biochemistry and Biophysics **297**: 19-27

Nussberger S, Dorr K, Wang DN, Kuhlbrandt W (1993) Lipid-protein interactions in crystals of plant light-harvesting complex. Journal of Molecular Biology **234**: 347-356

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*. Journal of Bacteriology **147**: 552-562

Ono TA, Murata N (1981) Chilling susceptibility of the blue-green-alga *Anacystis n idulans* .I. Effect of growth temperature. Plant Physiology **67**: 176-181

Peschek GA (1987) Respiratory electron transport. In P.Fay, C.van Baalen, eds, The Cyanobacteria, Elsevier, New York, pp 119-161

Pineau B, Girard-Bascou J, Eberhard S, Choquet Y, Tremolieres A, Gerard-Hirne C, Bennardo-Connan A, Decottignies P, Gillet S, Wollman FA (2004) A single mutation that causes phosphatidylglycerol deficiency impairs synthesis of photosystem II cores in *Chlamydomonas reinhardtii*. European Journal of Biochemistry **271**: 329-338

Reifarth F, Christen G, Seeliger AG, Dormann P, Benning C, Renger G (1997) Modification of the water oxidizing complex in leaves of the *dgd1* mutant of *Arabidopsis thaliana* deficient in the galactolipid digalactosyldiacylglycerol. Biochemistry **36**: 11769-11776

Riekhof WR, Ruckle ME, Lydic TA, Sears BB, Benning C (2003) The sulfolipids 2 '-O-acyl-sulfoquinovosyldiacylglycerol and sulfoquinovosyldiacylglycerol are absent from a *Chlamydomonas reinhardtii* mutant deleted in *SQD1*. Plant Physiology **133**: 864-874

Rogner M, Nixon PJ, Diner BA (1990) Purification and characterization of photosystem-I and photosystem-II core complexes from wild-type and phycocyanin-deficient strains of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC-6803. Journal of Biological Chemistry **265**: 6189-6196

Rogner M, Muhlenhoff U, Boekema EJ, Witt HT (1990) Monomeric, dimeric and trimeric PS-I reaction center complexes isolated from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus sp.* - size, shape and activity. Biochimica et Biophysica Acta **1015**: 415-424

Rousseau F, Setif P, Lagoutte B (1993) Evidence for the involvement of PSI-E subunit in the reduction of ferredoxin by photosystem-I. Embo Journal **12**: 1755-1765

Sakurai I, Hagio M, Gombos Z, Tyystjarvi T, Paakkarinen V, Aro EM, Wada H (2003) Requirement of phosphatidylglycerol for maintenance of photosynthetic machinery. Plant Physiology **133**: 1376-1384

Sato N, Murata N (1982) Lipid biosynthesis in the blue-green-alga (cyanobacterium), *Anabaena variabilis* .III. UDP-glucose-diacylglycerol glucosyltransferase activity *in vitro*. Plant and Cell Physiology **23**: 1115-1120

Sato N, Murata N (1982) Lipid biosynthesis in the blue-green-alga, *Anabaena variabilis* .I. Lipid classes. Biochimica et Biophysica Acta **710**: 271-278

Sato N, Murata N (1988) Membrane lipids. Methods in Enzymology **167**: 251-259

Sato N, Tsuzuki M, Matsuda Y, Ehara T, Osafune T, Kawaguchi A (1995) Isolation and characterization of mutants affected in l ipid-metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*. European Journal of Biochemistry **230**: 987-993

Sato N, Hagio M, Wada H, Tsuzuki M (2000) Requirement of phosphatidylglycerol for photosynthetic function in thylakoid membranes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97**: 10655-10660

Sato N, Suda K, Tsuzuki M (2004) Responsibility of phosphatidylglycerol for biogenesis of the PSI complex. Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics **1658**: 235-243

Schagger H, von Jagow G (1987) Tricine sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide-gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1-kDa to 100-kDa. Analytical Biochemistry **166**: 368-379

Schlame M, Rua D, Greenberg ML (2000) The biosynthesis and functional role of cardiolipin. Progress in Lipid Research **39**: 257-288

Schluchter WM, Shen GH, Zhao JD, Bryant DA (1996) Characterization of *psaI* and *psaL* mutants of *Synechococcus sp.* strain PCC **7002**: A new model for state transitions in cyanobacteria. Photochemistry and Photobiology **64**: 53-66

Schmetterer G (1994) Cyanobacterial respiration. In D.A.Bryant, ed, The Molecular Biology of Cyanobacteria, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 409-435

Schubert WD, Klukas O, Saenger W, Witt HT, Fromme P, Krauss N (1998) A common ancestor for oxygenic and anoxygenic photosynthetic systems: A comparison based on the structural model of photosystem I. Journal of Molecular Biology **280**: 297-314

Sener MK, Park S, Lu DY, Damjanovic A, Ritz T, Fromme P, Schulten K (2004) Excitation migration in trimeric cyanobacterial photosystem I. Journal of Chemical Physics **120**: 11183-11195

Serrano A, Gimenez P, Schmidt G., Sandmann G (1990) Immunocytochemical localization and functional determination of phytoene desaturase in photoautotrophic prokaryotes. J Gen Microbiol **136**: 2465-2469

Shubin VV, Bezsmertnaya IN, Karapetyan NV (1995) Efficient energy-transfer from the long-wavelength antenna chlorophylls to P700 in photosystem-I complexes from *Spirulina platensis*. Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology **30**: 153-160

Siegenthaler PA, Smutny J, Rawyler A (1987) Involvement of distinct populations of phosphatidylglycerol and phosphatidylcholine molecules in photosynthetic electron-flow activities. Biochimica et Biophysica Acta **891**: 85-93

Smith KA, Ardelt BK, Huner NPA, Krol M, Myscich E, Low PS (1989) Identification and partial characterization of the denaturation transition of the light harvesting complex-II of spinach chloroplast membranes. Plant Physiology **90**: 492-499

Somerville C, Browse J (1991) Plant lipids: metabolism, mutants, and membranes. Science **252**: 80-87

Sonoike K, Hatanaka H, Katoh S (1993) Small subunits of photosystem-I reaction center complexes from *Synechococcus elongatus* .II. the *psaE* gene-product has a role to promote interaction between the terminal electron-acceptor and ferredoxin. Biochimica et Biophysica Acta **1141**: 52-57

Steffen R, Kelly AA, Huyer J, Dormann P, Renger G (2005) Investigations on the reaction pattern of photosystem II in leaves from *Arabidopsis thaliana* wild type plants and mutants with genetically modified lipid content. Biochemistry **44**: 3134-3142

Szalontai B, Nishiyama Y, Gombos Z, Murata N (2000) Membrane dynamics as seen by Fourier transform infrared spectroscopy in a cyanobacterium, *Synechocystis* PCC 6803 - The effects of lipid unsaturation and the protein-to-lipid ratio. Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes **1509**: 409-419

Tasaka Y, Nishida I, Higashi S, Beppu T, Murata N (1990) Fatty-acid composition of phosphatidylglycerols in relation to chilling sensitivity of woody-plants. Plant and Cell Physiology **31**: 545-550

Thompson LK, Sturtevant JM, Brudvig GW (1986) Differential scanning calorimetric studies of photosystem-II - evidence for a structural role for cytochrome-*b559* in the oxygen evolving complex. Biochemistry **25**: 6161-6169

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets - procedure and some applications. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **76**: 4350-4354

Trissl HW (1993) Long-wavelength absorbing antenna pigments and heterogeneous absorption-bands concentrate excitons and increase absorption cross-section. Photosynthesis Research **35**: 247-263

van't Hof R, Vanklompenburg W, Pilon M, Kozubek A, Dekortekool G, Demel RA, Weisbeek PJ, Dekruijff B (1993) The transit sequence mediates the specific interaction of the precursor of ferredoxin with chloroplast envelope membrane-lipids. Journal of Biological Chemistry **268**: 4037-4042

Van der Lee J, Bald D, Kwa SLS, Vangrondelle R, Rogner M, Dekker JP (1993) Steady-state polarized-light spectroscopy of isolated photosystem-I complexes. Photosynthesis Research **35**: 311-321

van Grondelle R, Dekker JP, Gillbro T, Sundstrom V (1994) Energy transfer and trapping in photosynthesis. Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics **1187**: 1-65

Vass I, Styring S, Hundal T, Koivuniemi A, Aro EM, Andersson B (1992) Reversible and irreversible intermediates during photoinhibition of Photosystem II. Stable reduced Q_A species promote chlorophyll triplet formation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **89**: 1408-1412

Wada H, Gombos Z, Murata N (1994) Contribution of membrane lipids to the ability of the photosynthetic machinery to tolerate temperature stress. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **91**: 4273-4277

Wada H, Shintani D, Ohlrogge J (1997) Why do mitochondria synthesize fatty acids? Evidence for involvement in lipoic acid production. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94**: 1591-1596

Wada H, Murata N (1998) Membrane lipids in cyanobacteria. In NM P-A.Siegenthaler, ed, Lipids in Photosynthesis, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 65-81

Weber N, Strotmann H (1993) On the f unction of subunit-PsaE in chloroplast photosystem-I. Biochimica et Biophysica Acta **1143**: 204-210

Weier D, Muller C, Gaspers C, Frentzen M (2005) Characterisation of acyltransferases from *Synechocystis sp.* PCC6803. Biochemical and Biophysical Research Communications **334**: 1127-1134

Wu F, Yang SL, Su XH, Gong YD, Kuang TY (2005) Molecular reorganization induced by Ca^{2+} of plant photosystem I reconstituted into phosphatidylglycerol liposomes. Chemistry and Physics of Lipids **136**: 73-82

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 Physiology **129**: 594-604

Xu Q, Jung Y-S, Chitnis VP, Guikema JA, Golbeck JH, Chitnis PR (1994) Mutational analysis of Photosystem I polipeptides in *Synechocystis* sp. PCC 6803. Journal of Biological Chemistry **269**: 21512-21518

Xu W, Chitnis PR, Valieva A, van der Est A, Brettel K, Guergova-Kuras M, Pushkar YN, Zech SG, Stehlik D, Shen GZ, Zybailov B, Golbeck JH (2003) Electron transfer in cyanobacterial photosystem I - II. Determination of forward electron transfer rates of site-directed mutants in a putative electron transfer pathway from A(0) through A(1) to F-x. Journal of Biological Chemistry **278**: 27876-27887

Yang Z, Su X, Wu F, Gong Y, Kuang T (2005) Photochemical avtivities of plant photosystem I particles reconstituted into phosphatidylglycerol liposomes. Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology **78**: 125-134

Yu B, Xu CC, Benning C (2002) *Arabidopsis* disrupted in *SQD2* encoding sulfolipid synthase is impaired in phosphate-limited growth. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**: 5732-5737

Yu B, Benning C (2003) Anionic lipids are required for chloroplast structure and function in *Arabidopsis*. Plant Journal **36**: 762-770

Zhao J, Snyder WB, Muhlenhoff U, Rhiel E, Warren PV, Golbeck JH, Bryant DA (1993) Cloning and characterization of the *psaE* gene of the cyanobacterium *Synechococcus sp.* PCC 7002 - characterization of a *psaE* mutant and overproduction of the protein in *Escherichia coli*. Molecular Microbiology **9**: 183-194

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 A resolution. Nature **409**: 739-743

Összefoglalás

A cianobaktériumok vagy kék-zöld algák a Földön kialakult legősibb prokarióta szervezetek közül valók. Az általuk kifejlesztett oxigéntermelő fotoszintézis révén, melynek során napenergia felhasználásával építik be a légköri széndioxidot sejtjeik szerves molekuláiba, elterjedtek az egész Földön, és vízbontásból származó oxigénfejlesztésükkel átalakították bolygónk légkörét. Az endoszimbiózis elmélete szerint az eukarióta növényi sejt 1,5 milliárd évvel ezelőtt alakult ki, miután bekebelezte a mai cianobaktériumok ősét, és együttélésük a kloroplasztisz kialakulásához vezetett.

A cianobaktériumok, mint a kloroplasztisz ősei, rendkívül jó modellszervezetek a fotoszintézis tanulmányozásához. Egyszerűbb sejtszerveződésük, könnyű szaporításuk, és egyes törzsek természetes transzformációs kompetenciája révén alkalmasabb alanyai a fotoszintézis kutatásának, mint a nehezebben kezelhető, bonyolultabb sejtszerkezetű, sok sejtorganellummal rendelkező növények. A fotoszintézis fényreakciói a tilakoidmembrán lipidrétegébe ágyazott fehérjekomplexekben játszódnak le, melyek közül kulcsfontosságúak az 1. és a 2. fotokémiai rendszer (PSI és PSII). A fotoszintetikus apparátus fehérjéi szoros kölcsönhatásban vannak az őket körülvevő lipidmolekulákkal. A lipid-fehérje kölcsönhatások jelentősen befolyásolhatják a fotoszintetikus elektrontranszportot, de ezekről jelenleg igen kevés ismerettel rendelkezünk.

A cianobaktériumok, a zöldalgák és a magasabbrendű növények tilakoidmembránjának lipidösszetétele igen jellegzetes. Főként glikolipidek építik fel, melyek közül a neutrális monogalaktozil-diacilglicerin (MGDG) és digalaktozil-diacilglicerin (DGDG) a fő membránkomponensek. A tilakoid lipidjeinek mindössze 20–30%-át teszik ki az anionos lipidek, a szulfokinovozil-diacilglicerin (SQDG) és a foszfatidil-glicerin (PG) (Block és mtsai, 1983; Wada és Murata, 1998). A nem fotoszintetizáló baktériumok és az eukarióta sejtek membránjait főként foszfolipidek alkotják, a cianobaktériumokban és a tilakoidban azonban a PG az egyetlen foszfolipid.

A PG fotoszintetikus funkciókban betöltött szerepét korábban elsősorban *in vitro* kísérletekben vizsgálták. Borsó növény leveléből izolált tilakoid membránt foszfolipáz C enzimmel kezeltek Droppa és mtsai (1995). Az enzim lehasította a PG-molekulák fejcsoportját, és ez a PSII aktivitásának csökkenését eredményezte. Kruse és mtsai (2000) foszfolipáz A_2 enzimmel kezeltek izolált PSII komplexeket. Az enzim a foszfolipidek

egyik zsírsavát hasítja le, minek következtében a PSII szerkezetének felbomlását figyelték meg. Az enzim hatására felszabadult PSII-alegységek alapján feltételezték PG-molekulák jelenlétét a CP43 alegység és a PSII reakciócentrum (RC) D1-D2-CP47 szubkomplexe között. Feltételezésüket megerősítették a nemrég 3 Å felbontásban készült röntgenkrisztallográfiás szerkezetmeghatározás eredményei (Loll és mtsai, 2005).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 kialakulásához és a tilakoidmembránok felépítéséhez.

A *Synechocystis sp*. PCC6803 cianobaktérium teljes genomszekvenciájának megismerése (Kaneko és mtsai, 1996) lehetővé tette a PG szerkezeti és funkcionális szerepének *in vivo* tanulmányozását cianobaktériumokban, a molekuláris biológia módszereinek felhasználásával. A *Synechocystis* sejtek képesek a PG-t felvenni a sejtfalon át a külső környezetből. Ez a tulajdonságuk lehetővé tette, hogy a PG bioszintézisében résztvevő enzimek inaktiválásával, és a PG kívülről történő pótlásával szabályozzuk a sejtek PG-tartalmát. Hagio és mtsai (2000) a PG-foszfát-szintáz enzim *pgsA* génjét inaktiválták kanamicin rezisztenciakazetta beépítésével, míg Sato és mtsai (2000) egy másik, PG-szintézisben résztvevő gént, a CDP-diacilglicerin-szintáz *cdsA* génjét inaktiválták hasonló módon.

Amikor a PG-vel kiegészített tápoldatban nevelt *pgsA* sejteket PG-mentes médiumba áttéve nevelték tovább, Hagio és mtsai (2000) a sejtek oxigénfejlesztésének csökkenését fegyelték meg, valamint mesterséges kinonok hozzáadásával gátolni tudták a PSII működését. Gombos és mtsai (2002) kimutatták, hogy PG hiányában zavar támadt a másodlagos kinon elektronakceptor (Q_B) kötőhelye környékén a PSII RC-ban, ezáltal gátlódott az elektronok átadása az elsődleges kinon elektronakceptor (Q_A) molekuláról a Q_B-re. Ezek az eredmények megmutatták a PG fontosságát a PSII szerkezetében és működésében.

Bár a röntgenkrisztallográfiás mérések három PG-molekula jelenlétét mutatták ki az 1. fotokémiai rendszer reakciócentrumában (Jordan és mtsai, 2001), a PSI aktivitását nem zavarta meg a *pgsA* sejtek 9 napos PG-éheztetése sem (Hagio és mtsai, 2000). Felmerült, hogy a rövid ideig tartó PG-éheztetés után a sejtekben megmaradó PG-molekulák, erősen kötődve a PSI RC fehérjéihez, elegendőek lehetnek a PSI funkciójá-

nak fenntartásához. Feltételeztük, hogy ha a *Synechocystis* PCC6803 *pgsA* sejteket elegendően hosszú ideig neveljük PG-mentes tápoldatban, akkor a PG turnoverétől függően a PSI-komplexek reakciócentrumából is sikerül kiüríteni a PG-t, ami a PSI aktivitásának változását is eredményezheti.

Célul tűztük ki annak felmérését, hogy a hosszú ideig tartó PG-éheztetés hogyan befolyásolja a sejtek szaporodását, pigmenttartalmát és morfológiáját, és annak kiderítését, hogy a PG-kiürítés hatására bekövetkező változások visszafordíthatók-e a PG visszaadásával. Megmértük a sejtek lipidösszetételének változását a PG kiürülésének hatására, valamint ellenőriztük, hogy a PG kiürülése befolyásolja-e a tilakoidmembrán mikroviszkozitását. Valamint célul tűztük ki annak a kérdésnek a megválaszolását, hogy vajon hosszú ideig tartó PG-éheztetéssel el lehet-e érni a PSI aktivitásának csökkenését, és ez okoz-e szerkezeti változásokat a PSI oligomerekben és azok fehérjeösszetételében.

Gyenge fényen és optimális hőmérsékleten a *pgsA* sejtek 3–4 hétig életben tarthatók voltak PG-mentes tápoldatban is. A PG-megvonás hatására a sejtkultúra optikai denzitásának növekedése már egy hét után jelentősen lassult, a sejtek éltek, de a sejtszám növekedése, az osztódó sejtek aránya lecsökkent. A sejtek szaporodásának leállása három hétig tartó PG-éheztetés után még visszafordítható volt, ha a tápoldathoz ismételten PG-t adagoltunk, de a PG-megvonás 4. hetében a sejtek károsodása már olyan mértéket ért el, hogy a folyamat visszafordíthatatlanná vált, és az egész kultúra elpusztult.

Az elektronmikroszkópos morfológiai vizsgálatok a sejtszerkezet torzulását mutatták a PG kiürülése során: a tilakoid szerkezete felbomlott, a sejtek térfogata megnövekedett, ami utalhat arra, hogy a sejtek felkészültek az osztódásra, de nem képesek azt végrehajtani. Torzan osztódó sejtek voltak megfigyelhetők a hosszú ideig PG-éheztetett kultúrában: ezek a sejtek megkezdték az osztódást, de nem tudták befejezni, mintegy „befagytak” az osztódás egy fázisában. Korábbi irodalmi adatok nem utaltak arra, hogy a PG-nek szerepe lehet az osztódásban, azonban néhány éve ismert, hogy baktériumokban a PG-ből szintetizálódó kardiolipin (CL) fontos szerepet tölt be az osztódás folyamatában (Dowhan és mtsai, 2004; Mileykovskaya és Dowhan, 2005). A CL a sejt pólusain és az osztódó sejtek középső régiójában halmozódik fel a plazmamembránban, ahol specifikus fehérjékhez kapcsolódva részt vesz az osztódási gyűrű kialakításában (Mileykovskaya és Dowhan, 2000). A CL jellegzetesen nem kettősréteg képző lipid,

mely ha nagyobb koncentrációban fordul elő a membránban, hajlamos inverz hexagonális fázist kialakítani, különösen kétértékű kationok jelenlétében. Ennek a kettősrétegtől eltérő szerkezetnek valószínűleg szerepe van a sejtosztódáskor a sejt középvonalában formálódó szeptum kialakításában (Kawai és mtsai, 2004). Cianobaktériumokban nem szintetizálódik CL, de a megfigyelt osztódási rendellenességek alapján felmerült, hogy a PG-nek hasonló szerepe lehet a cianobaktériumok osztódásában, mint a CL-nek a baktériumok esetében, különösen annak ismeretében, hogy *in vitro* kísérletekben kimutatták a PG-molekulákból álló membrán inverz hexagonális fázisba való átalakulását Ca^{2+} ionok jelenlétében (Harlos és Eibl, 1980).

A PG fokozatos kiürülése során a sejtek klorofilltartalma erőteljesen csökkent. Hosszabb ideig tartó PG-éheztetés után szinte eltűnt az abszorpciós spektrumból a klorofillra jellemző, 680 nm-en mérhető csúcs, ugyanakkor a fikobiliproteinek koncentrációja nem változott szignifikánsan. A klorofilltartalom ilyen nagymértékű csökkenése jelezte a PSII korábban már megfigyelt működési zavarán túl (Hagio és mtsai 2000; Gombos és mtsai, 2002; és Sakurai és mtsai, 2003), a PSI működésének zavarát is, mivel a klorofillmolekulák nagyobb része kötődik a PSI-hez, mint a PSII-höz (Zouni és mtsai, 2001; Jordan és mtsai, 2001).

A *pgsA* sejtek lipidösszetételét vékonyréteg-kromatográfiával határoztuk meg. A PG kiürülése során a *pgsA* sejtek lipidosztályainak arányai csak kismértékben változtak, a PG-tartalom folyamatos csökkenése ellenére sem sikerült a PG-t teljesen kiüríteni a sejtekből, még a kultúra pusztulása előtt néhány nappal is kimutatható volt néhány százalék PG jelenléte. Ennek oka valószínűleg a PG egyenlőtlen eloszlása a sejtekben a sejtfal-citoplazmamembrán és a tilakoidmembrán frakciók között. Ha a PG szintje néhány százalék alá csökkent, már nem jutott elegendő PG a tilakoidba, hogy fenntartsa a fotoszintetikus folyamatokat és az energiatermelést, ami a sejtek gyors pusztulásához vezetett. Megfigyeltük, hogy a PG mennyiségének csökkenése az SQDG mennyiségének kismértékű növekedésével járt együtt. A *pgsA* sejtek lipidosztályainak zsírsavösszetételét gázkromatográfiával meghatározva, nem találtunk lényeges eltérést a vad típushoz képest a PG kiürítése során, azonban igen figyelemreméltó, hogy a *Synechocystis* sejtek átépítették a külső környezetből felvett PG-molekulákat a vad típusban termelődőhöz hasonló molekulatípusokra. A *pgsA* sejteken felvett FTIR spektrumok egyértelműen azt mutatják, hogy a

tilakoidmembrán lipidfrakciójának fizikai állapotát, mikroviszkozitását nem változtatta meg az egyébként is alacsony arányban jelenlevő PG mennyiségének csökkenése.

A PSI funkcióját a 705 nm-en mért abszorpcióváltozás detektálásával követtük, mely a P700 elsődleges elektrondonor redox állapotának változását jelzi, és arányos a sejtekben levő fotooxidálható P700 mennyiségével. Megállapítottuk, hogy a PG fokozatos kiürülése során a sejtekben mérhető PSI-aktivitás csökkent, mely különösen a több mint két hétig tartó PG-éheztetés után vált jelentőssé. Valószínűleg hosszabb ideig tartó PG-megvonás után érte el a PG-hiány azt a szintet, amikor már a PSI RC-ból is kezdtek kiürülni a PG-molekulák. Három hét PG-éheztetés után a PSI-aktivitás már a felét sem érte el a PG-megvonás előtti értéknek, de ha a sejtekhez ismét PG-t adtunk, az aktivitás visszaállt a kezdeti szintre.

A PSI-aktivitás csökkenése mögött hasonló szerkezeti változásokat feltételeztünk, mint amit Sakurai és mtsai (2003) tapasztaltak, akik PSII RC dimerek monomerizációját írták le a PG-tartalom csökkenésének hatására. Ezért megvizsgáltuk a *pgsA* sejtek tilakoidmembránjában levő fehérjekomplexek szerkezeti stabilitását differenciális pásztázó kalorimetria módszerével. A tilakoidba ágyazott fehérjék hőkapacitása a PG kiürülésével párhuzamosan folyamatosan csökkent, és ennek alapján feltételezhettük, hogy a PG kiürülése nemcsak a PSII már ismert monomerizációját okozta, de a PSI szerkezetét is befolyásolta. A PSI oligomerizációjában bekövetkezett változásokat HPLC technikával vizsgáltuk. Cianobaktériumokban a PSI mind trimer, mind monomer formában megtalálható a tilakoidmembránban, de alacsony fényintenzitáson a trimer az uralkodó. A PSI trimerek fziológiai szerepe nem tisztázott (Sener és mtsai, 2004). Méréseink során a PSI oligomereket MonoQ anioncserélő oszlopon elválasztva, a PSI aktivitásának csökkenésével párhuzamosan a trimerek mennyiségének csökkenését és a monomerek arányának növekedését tapasztaltuk. Három hétig tartó PG-éheztetés után már csak PSI monomereket találtunk a membránban, a trimerek teljesen eltűntek a tilakoidból. A PSI monomerizálódása visszafordítható volt: ha a PG-hiányos sejtekhez kívülről PG-t adtunk, a PSI trimerek aránya visszaállt a PG-éheztetés előtti szintre. A visszaállás bekövetkezett akkor is, ha linkomicin fehérjeszintézis-gátló szert is adtunk a sejtekhez, tehát a trimerek nem *de novo* szintetizált fehérjékből, hanem a meglévő monomerekből alakultak ki a PG hatására.

A MonoQ oszlopon elválasztott PSI trimerek és monomerek fehérjeösszetételét SDS-poliakrilamid-gélelektroforézis és immunoblot módszerével tanulmányoztuk. Immunjelöléssel a PSI komplex 4 fontos fehérjealegységét vizsgáltuk, melyek közül a RC-ot alkotó PsaA, valamint a sztróma felőli felszínen elhelyezkedő PsaC és PsaD minden mintában hasonló jelölődést mutatott a trimerekben és a monomerekben. A PG kiürülése során monomerizálódó PSI komplexekben azonban megfigyeltük a PsaL fehérjealegység leválását a reakciócentrumról. A PsaL fehérjéről ismert, hogy a monomerek kapcsolódási felszínén helyezkedik el, és elsősorban ez a fehérje felelős a trimerizációért (Chitnis és Chitnis, 1993). A *pgsA* sejtekben a PG kiürítése és a PSI monomerizálódása után nem volt kimutatható a PsaL alegység jelenléte a PSI monomerekben. Bebizonyosodott, hogy a PG hiánya nem a PsaL fehérje szintézisét gátolta, mivel ha PG-t adtunk a sejtekhez, a PsaL fehérje linkomicin fehérjeszintézis-gátló jelenlétében is beépült a reakciócentrumba. A PG-hiányos tilakoidmembránban kimutattuk a PsaL fehérjék jelenlétét, ami azt bizonyítja, hogy a PsaL alegységek nem bomlottak le, csak leváltak a PSI RC-ról. Ha a sejtekhez kívülről PG-t adtunk, képesek voltak a PSI monomerekbe ismét beépülni és trimereket kialakítani. Bebizonyítottuk a PG-molekulák szerepét a PsaL alegység kötésén keresztül a PSI trimerek kialakításában.

Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a PG-molekulák meghatározó szerepet játszanak a 1. fotokémiai rendszer szerveződésében. Először nekünk sikerült kimutatnunk a PG-molekulák jelentőségét olyan lipid-fehérje kölcsönhatásban, mely a PSI szerkezete és funkciója szempontjából létfontosságú.

Summary

The role of phosphatidylglycerol in the structure and function of Photosystem I

Cyanobacteria represent one of the oldest groups of prokaryotic organisms. The oldest known cyanobacterium fossils emerged 3.5 billion years ago. Photosynthetic oxygen production by cyanobactaria changed the reductive atmosphere to oxidative one, opening the way for new types of life. Photosynthesis provided various N-, C- and O-containing organic compounds, which served as food supply for all living organisms on Earth. Eukaryotic plant cells developed 1.5 billion years ago by the incorporation of ancestors of cyanobacteria. This endosymbiotic interaction led to the evolution of the chloroplast-containing cells of higher plants.

Cyanobacteria, the ancestors of chloroplasts, can be considered as ideal model organisms for the investigation of the processes of oxygenic photosynthesis. Their simple cell structure, easy culturing, and the natural transforming competence of some strains make them attractive subjects for photosynthesis research. Photosynthetic reactions occur in pigment-protein complexes embeded in the thylakoid membrane. Lipid-protein interactions play an important role in photosynthetic electron transport, but these interactions are little-known yet.

Thylakoid membranes of cyanobacteria, green algae and higher plants possess a characteristic membrane lipid composition. They contain two neutral galactolipids, monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) and digalactosyldiacylglycerol (DGDG), as major components. The anionic phospholipids, such as phosphatidylglycerol (PG) and sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG), are minor components of photosynthetic membranes (Block et al., 1983; 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 phospholipids, and in photosynthetic membranes it is present at relatively low level.

Previously the role of PG was investigated by *in vitro* experiments. Thylakoid membranes isolated from pea leaves were treated by phospholipase C (Droppa et al., 1995). Photosystem II (PSII) activity of the membrane decreased after removing the headgroup of the PG molecules by the enzyme. Isolated PSII dimers were treated by

phospholipase A_2, and the disintegration of the PSII complexes following the treatment suggested the presence of a PG molecule between CP43 subunit and the CP47-D1-D2 subcomplex (Kruse et al., 2000). Recently this suggestion has been confirmed by X-ray crystallography at 3 Å resolution (Loll et al., 2005). The role of PG was studied *in vivo* in *Arabidopsis thaliana* mutants. Xu et al. (2002), Hagio et al. (2002) and Babiychuk et al. (2003) demonstrated that PG is essential for the development of the chloroplasts, and that it is needed for the formation of the thylakoid membrane structure.

The availability of the complete genome sequence of the cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC6803 (Kaneko et al., 1996) opened the way for studying the structural and functional roles of PG *in vivo*, via molecular genetic approaches. *Synechocystis* cells are able to uptake PG from culture medium through the cell wall. This makes possible to maintain mutants lacking essential enzymes in PG biosynthesis. The *pgsA* gene encoding PG phosphate synthase, was inactivated by the insertion of a kanamycin resistance gene cassette (Hagio et al., 2000). Another gene that plays a crucial role in PG biosynthesis, *cdsA* that encodes CDP-diacyglycerol synthase, was disrupted similarly by Sato et al. (2000). Both mutants required supplementation of PG in the culture medium for growth.

When the *pgsA* cells grown in PG-supplemented medium were transferred to medium without PG, Hagio et al. (2000) observed a 40% decrease in photosynthetic oxygen evolving activity in the cells, and they were able to inhibit PSII activity by artificial quinones. Gombos et al. (2002) demonstrated a perturbation of the surroundings of the secondary quinone acceptor (Q_B) in PG-depleted *pgsA* cells. They found that the lack of PG can block the electron transport between the primary quinone electron acceptor (Q_A) and Q_B. Other investigations showed the role of PG in the maintanence of the dimer structure of PSII (Sakurai et al., 2003). These results indicated that PG molecules are essential constituents of PSII.

Although, X-ray crystallographic measurements indicated the presence of three PG molecules in PSI reaction centers (RCs; Jordan et al., 2001), PSI activity was not significantly affected by PG depletion, even after 9 days (Hagio et al., 2000). This finding suggested that the strength of PG binding by PSII might be much weaker than that of the PSI RCs. Accordingly, following 9 days of PG depletion, cells still may contain enough

PG to maintain PSI activity, but looser binding could lead to the loss of PSII activity at an earlier stage.

We supposed that, using a long-term PG depletion of *pgsA* cells, we could remove the PG molecules from PSI RCs, as well. Our aim was to determine the effect of the long-term PG depletion on the cell cycle, growth, pigment content and morphology of the *pgsA* cells, as well as the reversibility of the observed effects by re-adding PG. We measured the lipid content of PG depleted cells, and the changes in the thylakoid membrane fluidity of the cells induced by long-term PG depletion. We determined the effect of long-term PG depletion on the activity, structure and protein content of PSI RCs.

The *pgsA* cells remained viable for 3–4 weeks in PG-free medium in low light and at optimal temperature. The growth of the culture was blocked after two weeks of PG depletion, but the cessation of growth was reversible by adding PG until the forth week of PG deprivation. The block of the growth suggests that PG could influence processes, required for cell division. Morphological investigations by electron microscopy revealed a deformation of the PG-depleted cells. The PG-depleted cells lost the structure of their thylakoids and the volume of the cells increased. This latter finding suggests that the cells were ready for division but it could not occur. Following the re-addition of PG to such cells we could observe normal cell division, which resulted in the formation of small cells with normal morphology.

Although, there is no direct evidence for a role of PG in cell division, recently it has been shown that the cardiolipin (CL) synthesized from PG is important for cell division in bacteria (Dowhan et al., 2004; Mileykovskaya and Dowhan, 2005). CL accumulates in the mid-cell membrane and takes part in the formation of the Z-ring of cell division (Mileykovskaya and Dowhan, 2000). CL is a non-bilayer forming lipid, which can form inverse hexagonal phase in the presence of bivalent cations. This non-bilayer structure may have a role in forming the septum in the mid-cell part (Kawai et al., 2004). There is no CL in cyanobacteria, but the observed anomaly of cell division suggests that PG might have a similar function in cell division. This supposition is confirmed by earlier *in vitro* results that demonstrated the conversion of an artificial PG-membrane into inverse hexagonal phase by Ca^{2+} ions (Harlos and Eibl, 1980).

The absorption spectra of intact *pgsA* cells showed that the chlorophyll content decreased gradually during PG depletion; even though, the phycocyanin content remained constant. Since, more chlorophyll molecules bind to PSI than to PSII, one can assume that PSI functions are more severely affected by PG depletion than those of PSII (Zouni et al., 2001; Jordan et al., 2001). This could explain the dramatic decrease in chlorophyll content.

The lipid composition of *pgsA* cells was determined by thin layer chromatography. The PG content in the PG-depleted cells decreased, but PG was not removed from the cells completely. In parallel with the decrease of the PG content, we observed an increase of the SQDG content. This seems contradict earlier results suggesting that PG and SQDG are not able to substitute each other in *Synechocystis* cells (Aoki et al., 2002). We assume that in some processes SQDG can substitute PG. The fatty acid composition of the lipids from *pgsA* cells was measured by gas chromatography. We could observe that, except for the fatty acid composition of PG, the deprivation did not alter significantly the fatty acid composition of other lipids. Exogenously added synthetic dioleoyl-PG molecules were re-tailored, and the PG molecules were transformed to lipid species similar to those of the wild type.

PSI activity was monitored in intact cells by measuring absorbance changes at 705 nm. This method detects changes in the redox state of PSI. When PG-depletion affected not only the PSII environment but also the PSI structure, this decreased dramatically the function of the PSI RCs. Behind the functional changes we assumed structural alterations in PG-depleted cells. Sakurai et al. (2003) earlier demonstrated the effect of PG depletion on the oligomerization of PSII. Differential scanning calorimetric (DSC) measurements indicated that PG depletion resulted in a decrease of the structural integrity of protein complexes in isolated thylakoid membranes in *pgsA* cells.

In cyanobacteria PSI RCs exist in trimeric and monomeric forms (Chitnis 1996; Fromme et al., 2001). In thylakoid membranes a dynamic equilibrium exists between these forms of PSI, but PSI trimers dominate at low light conditions. The physiological role of the PSI trimers is not clear (Sener et al., 2004). We investigated the oligomerization state of PSI RCs by separation of PSI trimers and monomers using anion-exchange chromatography. In parallel with the decrease in PSI activity,

monomerization of PSI trimers was detected in PG-depleted thylakoid membranes. PSI trimers completely disappeared from thylakoids after three weeks of PG starvation. This observation is in good agreement with the DSC data.

The protein composition of isolated PSI trimers and monomers was analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting. We used specific antibodies for detecting PsaA (one of the RC subunits), PsaC and PsaD proteins on stromal side of the PSI, and PsaL protein. All of the studied protein subunits were present in the PSI monomers separated from the *pgsA* cells, however, the content of PsaL was much lower than in the isolated trimers. PsaL protein is the key component of the trimer-forming domain in PSI complexes (Chitnis and Chitnis, 1993; Schluchter et al., 1996). PsaL subunits were not present in PSI monomers isolated from PG-depleted cells, in spite of the fact that we could detect the presence of PsaL proteins in the thylakoid membranes. Following the re-addition of PG to the PG-depleted cells, PsaL proteins could bind again to the PSI monomers and promote trimerization of PSI RCs.The PG-induced reconstitution of PSI trimers in the presence of linkomycin (a protein synthesis inhibitor) confirmed that *de novo* protein synthesis is not required for the restoration of PSI trimers.

In summary, we could generate a PG-deficient cyanobacterial mutant and we could use it as a model system to demonstrate the importance of PG molecules in lipid-protein interactions that are essential for the structural and functional integrity of Photosystem I.

Publikációs lista

A dolgozatban felhasznált közlemények

Ildikó Domonkos, Przemyslaw Malec, Anna Sallai, László Kovács, Kunihiro Itoh, Gaozhong Shen, Bettina Ughy, Balázs Bogos, Isamu Sakurai, Mihály Kis, Kazimierz Strzalka, Hajime Wada, Shigeru Itoh, Tibor Farkas and Zoltán Gombos (2004): Phosphatidylglycerol is essential for oligomerization of PSI reaction center. Plant Physiol **134**:1471-1478. IF: 5,881

Ildikó Domonkos, Przemyslaw Malec, Anna Sallai, László Kovács, Isamu Sakurai, Kazimierz Strzalka, Hajime Wada, Shigeru Itoh and Zoltán Gombos (2004) The role of phosphatidylglycerol in oligomerization of photosynthetic reaction centers. Cell Mol Biol Lett **9**:17-18. IF: 0,495

Ildikó Domonkos (2003) The role of phosphatidylglycerol in the photosynthetic electron transport processes. Acta Biologica Szegediensis **47**(1-4):57

A dolgozat témájához kapcsolódó közlemények

Emilia Apostolova, **Ildikó Domonkos,** Anelia G. Dobrikova, Ivana B. Petkanchin, Anna Sallai, Balázs Bogos, Hajime Wada, Zoltán Gombos, Stefka G. Taneva (2006): Effect of phosphatidylglycerol depletion on the surface electric properties of thylakoid membranes. J Photochem Photobiol (benyújtva)

Josef Komenda, Masayuki Komura, Bettina Ughy, **Ildikó Domonkos**, Anna Sallai, Yoshimasa Fukushima, Balázs Bogos, Hajime Wada, Zoltán Gombos and Shigeru Itoh (2006) Requirement of phosphatidylglycerol for the assembly and function of photosystem I and II reaction centers (kézirat)

Egyéb közlemények

Zsuzsanna Várkonyi, Kazuomori Masamoto, Mónika Debreczeny, Ottó Zsiros, Bettina Ughy, Zoltán Gombos, **Ildikó Domonkos**, Tibor Farkas, HajimeWada, and Balázs Szalontai (2002): Low-temperature-induced accumulation of xanthophylls and its structural consequences in the photosynthetic membranes of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. An FTIR spectroscopic study. PNAS **99**:2410-2415. IF: 10,700

I. Domonkos, I. Ocsovszki, H. Hulesch, J. Fischer and Zs. Nagy (1994): Expression of Poly-N-acetyllactosamines on Rat Leukocytes; in: "Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry, Volume 10" (E. van Driessche, J. Fischer, S. Beeckmans, T.C. Bøg-Hansen, eds.) pp. 78-81. TEXTOP, Hellerup, Denmark

Kongresszusi kiadványok

I. Domonkos, P. Malec, A. Sallai, L. Kovács, K. Strzalka, H. Wada, S. Itoh, T. Farkas, Z. Gombos (2005) The role of phosphatidylglycerol in PSI oligomerization. (IVth Euroconference on the Molecular Bioenergetics of Cyanobacteria, San Feliu de Guixols, Spain)

B. Bogos, Y. Gombos, M. Kiss, **I. Domonkos**, A. Sallai (2005) A novel genetic system for *in vivo* studies of gene expression in *Thermosynechococcus elongatus* BO-1 and *Synechococcus* sp. PCC7942. (IVth Euroconference on the Molecular Bioenergetics of Cyanobacteria, San Feliu de Guixols, Spain)

Domonkos, Ildikó; Malec Przemyslaw; Sallai, Anna; Kovács, László; Itoh, Shigeru; Wada, Hajime; Farkas, Tibor; Gombos, Zoltán (2004) The role of phosphatidylglycerol in the photosynthetic processes. (16th International Plant Lipid Symposium, Budapest, Hungary)

Gombos, Zoltán**; Domonkos, Ildikó**; Malec, Przemyslaw; Sallai, Anna; Kovács, László; Strzalka, Kazimierz; Wada, Hajime; Itoh, Shigeru; Farkas, Tibor; (2004) Phosphatidylglycerol is a substantial component of photosynthetic membranes for oligomerization of PS I reaction centers. (16th International Plant Lipid Symposium, Budapest, Hungary)

Domonkos I, Malec P, Sallai A, Kovács, L, Strzalka K, Wada H, Itoh S, Farkas T, Gombos Z (2004) The role of phosphatidylglycerol in PSI oligomerization. (The 14th Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology, Cracow, Poland)

Domonkos I, Malec P, Sallai A, Kovács, L, Strzalka K, Wada H, Itoh S, Farkas T, Gombos Z (2004) Phosphatidylglycerol is an indispensable component of photosynthetic membranes. (The 14th Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology, Cracow, Poland)

Bogos B, Gombos Z, Sallai A, **Domonkos I**, Kiss M (2004) A novel genetic system for *in vivo* studies of gene expression in *Thermosynechococcus elongatus* BO-1 and *Synechococcus* sp. PCC7942. (The 14th Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology, Cracow, Poland)

Domonkos Ildikó, Przemyslaw Malec, Sallai Anna, Kovács László, Hajime Wada, Shigeru Itoh, Gombos Zoltán (2003) A foszfatidil-glicerin szerepe a cianobakteriális fotoszintetikus reakciócentrumok oligomerizációjában. (V. Magyarországi Fotoszintézis Konferencia, Noszvaj)

Gombos Zoltán, Sallai Anna, Kovács László, **Domonkos Ildikó** (2003) A foszfatidil-glicerin funkcionális és szerkezeti szerepe fotoszintetizáló szervezetekben. (V. Magyarországi Fotoszintézis Konferencia, Noszvaj)

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 segítségéért és támogatásáért. Csoportunk, a Növényi lipid szerkezet és funkció csoport tagjainak támogatását is köszönöm, közülük is főként Sallai Anna és Ughy Bettina segítsége jelentett számomra sokat.

Köszönettel tartozom a Tilakoidmembrán energetizációs csoport tagjainak is, különös tekintettel Kovács László szakmai és baráti támogatására.

Köszönöm a Biofizika Intézetben Párducz Árpádnak a morfológiai vizsgálatokhoz nyújtott segítségét, és Szalontai Balázsnak az infravörös spektroszkópiai mérések lebonyolítását.

A krakkói Jagello Egyetem Növényélettani és biokémiai Tanszékén Przemyslaw Malecnek köszönöm együttműködését és kölünösen a HPLC-mérésekhez nyújtott értékes segítségét, valamint Kazimierz Strzalka tanszékvezetőnek köszönöm, hogy megszervezte és lehetővé tette, hogy tanszékén dolgozzak.

Köszönöm a DSC-mérésekben való közreműködésüket a Bolgár Tudományos Akadémia Biofizikai Intézetében Emilia Apostolovának és munkatársainak.

Wada Hajimének a Tokiói Egyetemről köszönöm, hogy rendelkezésemre bocsátotta a vizsgált mutáns cianobaktérium törzset, valamint köszönet Itoh Shigerunak és munkatársainak a Nagoyai Egyetemen a biofizikai mérésekhez nyújtott segítségükért.

Köszönet illeti Szekeres Miklóst az angol nyelvű közleményeim lektorálásáért.

Végül köszönettel tartozom családomnak, gyermekeimnek türelmükért, és férjemnek Racskó Tamásnak támogatásáért, valamint a komputertechnikával való küzdelmeimhez nyújtott segítségéért.