

Az *Acaryochloris marina* cianobaktérium kettős
fotokémiai rendszerének D1, D2 és citokróm b₅₅₉
alegységeit, valamint a Hox hidrogenázt kódoló gének
kifejeződésének vizsgálata

Ph.D. értekezés tézisei

Kiss Éva

Témavezető: Dr. Vass Imre

Magyar Tudományos Akadémia

Szegedi Biológiai Kutatóközpont Növénybiológia Intézet

Biológia Doktori Iskola

SZTE TTIK

Szeged

2012

Bevezetés

A cianobakteriális hidrogenázok jelentősége napjainkban előtérbe helyeződött az alternatív energiaforrások kutatása kapcsán. Az egyik biotechnológiai elgondolás szerint fényenergia felhasználásával a fotoszintézis útján állítanánk elő a hidrogénfejlesztéshez szükséges elektronokat és protonokat. Ahhoz azonban, hogy megvalósíthassuk a fényből nyert energia hidrogénben történő átmeneti tárolását, a fotoszintézis és a hidrogénfejlesztés folyamatáról rendelkezésünkre álló ismereteink bővítése elengedhetetlen. Különös fontossággal bír a fejlesztésben használt két kulcsenzim: a vízbontásért felelős kettes fotokémiai rendszer (PSII) és a hidrogenáz enzim működésének tanulmányozása. A jelen dolgozat a PSII reakciócentrumát (RC) valamint a Hox hidrogenázt kódoló gének kifejeződését vizsgálja *Acaryochloris marina* tengeri cianobaktérium fajban.

A fotoszintetizáló prokariota szervezetek rendkívül adaptívak, számos mechanizmust fejlesztettek ki, hogy védjék magukat, elsősorban fotoszintetizáló apparátusukat a környezeti stresszhatásoktól. A cianobaktériumok különböző hullámhosszon elnyelő pigment molekulák rendszerét tartalmazzák, melyek arányának változtatásával is képesek alkalmazkodni a változó környezethez. Az *Acaryochloris marina* egy *d*-klorofill tartalmú cianobaktérium, amely fotoszintézisét távoli vörös fényben gazdag környezethez adaptálta. Elsősorban sokrétű kromatikus akklimációjának köszönhetően képes a látható fénytartomány széles spektrumát hasznosítani, és jelentősen eltérő fényintenzitásokhoz alkalmazkodni.

A cianobaktériumok körében elterjedt másik védekezési mechanizmus a PSII D1/D2 heterodimert kódoló *psbA* és *psbD* gének duplikátumai révén valósul meg. A fotofoszforiláció kezdeti katalitikus lépése, az erősen oxidatív vízbontás a PSII komplexben zajlik. A vízbontás során esetlegesen fellépő

oxidatív stressz elkerülése érdekében a PSII köré komplex védőmechanizmus kiépítésére volt szükség, melynek egyik módja a központi heterodimer vízbontásban leginkább érintett D1 alegységének gyakori lecserélése. A fotoszintetikus védelmi- és akklimációs rendszerük részeként a cianobaktériumok az eukariota szervezetektől eltérő módon gyakran hordoznak egy vagy több *psbA* génduplikátumot, melyek az intenzív D1 szintézishez biztosítanak nagyobb transzkript állományt. Egyes *psbA* duplikátumok szekvencia módosuláson mennek keresztül, és e homológ-variancia révén különböző elsődleges szerkezetű és valamelyest eltérő működésű D1 izoformák jöhettek létre. Az eltérő redox tulajdonságokkal rendelkező izoformák felváltva fejeződhetnek ki, és épülhetnek be a PSII komplexekbe az adott körülményektől függően, így optimalizálhatják a fotoszintetikus elektrontranszportot az eltérő környezeti feltételekhez történő alkalmazkodás során. Az eddig ismert cianobakteriális genomokban a *psbA* géncsaládok 2-5 tagúak, és 1-3 különböző izoformát kódolhatnak. Azonban az eddig ismert cianobaktériumokban a *psbD* génnek legfeljebb egyetlen duplikátuma fordul elő, és a két homológ azonos aminosav szekvenciájú D2 fehérjét kódol.

A D1/D2 központi heterodimer mellett található a citokróm b559 redox-aktív fehérje, amely két alegységből áll. Mindkét alegység rendelkezik egy-egy konzervált hisztidinnel, amelyek imidazol oldallánca a hemcsoport kötéséért felelős. Minden eddig tanulmányozott, PSII-vel rendelkező szervezetben a citokróm b559 két különböző, α és β , alegységet tartalmazó heterodimerből épül fel. Az α és β alegységeket kódoló *psbE* és *psbF* gének termékei a *psbEFLJ* policisztronos mRNS-ben íródnak át. Ez alól egyetlen kivétel ismert, az eukariota zöldalga, *Chlamydomonas reinhardtii*, ahol a *psbE* és *psbF* gének egymástól szeparáltan, egy *psbE*, és egy *psbFLJ* átíródási egységben kódoltak.

Az *Acaryochloris marina* viszonylag nagyméretű genommal (8.36 Mb), jelentős génállománnyal (8462 gén), és nagyszámú plazmiddal (9 db)

rendelkezik. Ezt a tulajdonságát nagymértékű alkalmazkodó képességével már korábban kapcsolatba hozták. A 2008-ban elérhetővé vált *Acaryochloris marina* teljes genom szekvenciájából három *psbA*, valamint sajátos *psbD*, és az α -citokróm b559 PSII alegységet kódoló *psbE* duplikátumokra derült fény. Eddigi ismereteink szerint az *Acaryochloris* nemzetségbe tartozó cianobaktériumok lehetnek az egyedüli organizmusok, amelyek két D2 izoformát kódoló három *psbD* továbbá kettő *psbE* homológgal rendelkeznek, és feltehetően e génduplikátumok is ezen adaptív fajok fotoszintetikus akklimációját szolgálják. Az *Acaryochloris marina* genomszekvenciájából fény derült továbbá a kétirányú hidrogenázt kódoló *hox* gének meglétére. E gének elrendeződése a *Synechocystis* PCC 6803 fajban leírtakkal analóg, ugyanakkor *Acaryochloris marina* esetében a *hox* klaszter nem a kromoszómán, hanem plazmid DNS-én található.

Célkitűzések

1. A laboratóriumi nevelési körülményektől eltérő, azonban az *Acaryochloris marina* természetes életkörülményeihez hasonlatos hullámhosszú és intenzitású fényviszonyokhoz történő alkalmazkodás során a fotoszintézist, elsősorban a PSII-t érintő változások jellemzése.
2. Az *Acaryochloris marina* fotoszintetikus akklimációjának transzkripciós vizsgálata elsősorban a PSII RC alegységeit kódoló géneket érinti. Ezen homológok változó környezeti viszonyokra mutatott kifejeződésének meghatározását, és e gének valószínűsíthető funkciójának behatárolása volt a fő célunk.
3. A *hox* gének kifejeződését befolyásoló faktorok azonosítása különböző cianobaktériumokban. Az *Acaryochloris marina*-ban található Hox enzim valószínűsíthető funkciójának behatárolása. A *hox* génkifejeződés szabályozásának összehasonlítása három különböző fajban (*Synechocystis sp.*, *Synechococcus sp.* és *Acaryochloris marina sp.*).

Kísérleti anyagok és módszerek

Növekedési és kísérleti körülmények

Az *Acaryochloris marina* sejteket K+ES tápoldatban, 25 °C –on, 10 μmol foton $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a *Synechocystis* PCC 6803 és *Synechococcus* PCC 7942 kultúrákat pedig 30 °C –on, 40 μmol foton $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ folyamatos megvilágítás mellett neveltük.

Alacsony illetve magas intenzitású fénykezelésekhez 1 illetve 100 μmol foton $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ megvilágítást használtunk. Az UV-B sugárzást - melynek emissziós maximuma 312 nm, intenzitása 7 μmol foton $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ volt - növekedési fény háttérben alkalmaztuk. A távoli vörös fény hullámhossza 720 nm, intenzitása 0.18 μmol foton $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ volt. Alacsony oxigén koncentrációjú környezetet (< 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$) argonos buborékoltatással, valamint enzimatikus úton értük el. A specifikus fotoszintetikus elektrontranszport gátlást a 20 μM dibromotimokinon; és 10 μM 3-(3,4-Diklorofenil)-1, 1-dimetilurea használatával értük el.

Klorofill koncentráció meghatározása

A klorofill koncentrációt etanos pigment kivonat abszorpciójából *d*-klorofillra a $(\text{OD}_{696} \cdot 12.0995) - (\text{OD}_{665} \cdot 0.2006)$, *a*-klorofillra a $(\text{OD}_{665} \cdot 11.978) - (\text{OD}_{696} \cdot 2.3238)$ egyenlet alapján számoltuk.

Relatív mRNS mennyiségek meghatározása kvantitatív RT-PCR módszerrel

A totál-RNS kivonása a „forró-fenol” protokoll szerint történt. Az RNS mintákból cDNS-t szintetizáltunk H-MuLV reverz transzkriptáz enzim és

random hexamer primerek felhasználásával. A cDNS mintákat templátként, gén-specifikus primereket tartalmazó 2×Power SYBR Green Master Mix elegyben használtuk fel a Q-PCR reakcióhoz. A belső kontrol génként az *rnpB*-t használtuk.

A fotoszintetikus oxigénfejlesztő aktivitás mérése

A kultúrák oxigénfejlesztő és respirációs aktivitását intakt sejteken, Clark-típusú oxigénelektóddal 1.5-3 perces megvilágítás illetve 10-15 perces sötétadaptálás során mértük. Az oxigénfejlesztést a teljes lineáris elektrontranszport láncra ($H_2O \rightarrow CO_2$), valamint dimetilbenzokinon és kálium ferri-cianid jelenlétében csak a PSII oxigénfejlesztő képességére vonatkozóan mértük.

A klorofill fluoreszcencia mérése

A OJIP tranzienst sötétadaptált mintán, 10 μs - 1 s időintervallumban gyors fluoriméterrel mértük. A gerjesztés 640 nm hullámhosszú, 1000 μmol foton $m^{-2} s^{-1}$ intenzitású fénnel történt. Az így kapott OJIP tranzienst logaritmikus skálán ábráztuk.

***In silico* fehérje analízis**

Az aminosav szekvenciákat a cyanobase, valamint az NCBI protein adatbázisából töltöttük le. A szekvenciák többszörös illesztését a CLUSTALW programcsomaggal végeztük. A filogenetikai fa a „maximum likelihood” elv alapján a PhyML, a filogram grafikus megjelenítése pedig a Dendroscope internetes bioinformatikai programcsomag felhasználásával készült.

Eredmények

Az *Acaryochloris marina* 3 *psbA* és 3 *psbD* génje közül 2-2 a kontrol körülmények között dominánsan jelenlevő $D1_m$, illetve $D2_m$ (m =major) izoformát kódolja, a harmadik transzkript pedig a *psbA* és *psbD* homológok esetében egyaránt egy eltérő elsődleges szerkezetű izoformát kódol. Az α -citokróm b559 PSII alegységet kódoló *psbE* homológok közül a *psbE1* feltételezett terméke jelentősen eltér a *psbE2* által kódolt fehérje- és a konszenzus aminosav szekvenciától. A divergens fehérje kópiákat a PSII-E', $D1'$ és $D2'$ elnevezéssel illettük követve a $D1$ izoformákra felállított funkcionális nevezéktant.

1. Az *Acaryochloris marina* sötétben erős respirációs oxidáz aktivitást mutat, amelynek következtében ennél a fajnál a cianobaktériumok nagy részétől ellentétes módon sötétben a plasztokuinon molekulák állományában (PQ) az oxidált kinon molekulák redukált kinolokhoz viszonyított aránya megnövekszik. Szélsőségesen alacsony intenzitású megvilágítás során is a PQ állományt kioxidáló folyamatok kerülnek előnybe a PSII által történő PQ redukcióval szemben. Mivel a PSII centrumok szuperkomplexet alkotnak a 645 nm-en elnyelő PBP antennákkal, ezért a 720 nm hullámhosszú fény a PSI gerjesztés szempontjából kedvezőbb, így távoli vörös fényben szintén az oxidált PQ molekulák kerülnek túlsúlyba.

2. A 720 nm-es megvilágítás által történő hatékonyabb PSI gerjesztést a sejtek PSII állományuk megnövelésével illetve fikobiliprotein tartalmuk csökkentésével ellensúlyozzák. Az alacsony intenzitású látható fény begyűjtésének optimalizálására a *d*-klorofill tartalmú Pcb antennákat érintő fehérjekörnyezettel összefüggésben álló kromatikus átrendeződést a *d*-klorofill csúcsban mutatkozó vörös eltolódás jelzi.

3. Az *Acaryochloris marina* laboratóriumi körülmények között a PSII központi heterodimerének D1_m és D2_m izoformáit kódoló 2 *psbA* és 2 *psbD* génjét fejezi ki. Ezekből az abundáns fehérjéktől eltérő AS szekvenciájú D1' és D2' izoformákat kódoló *psbA1* és *psbD3* gének kifejeződése kontroll körülmények között elhanyagolható. Erős intenzitású fény stressz és UV-B sugárzás hatására a D1_m és D2_m izoformákat kódoló *psbA2*, *psbA3*, és *psbD2* transzkriptek relatív szintje megemelkedik.

4. Az *Acaryochloris marina* alacsony intenzitású látható- valamint távoli vörös fényhez történő fotoszintetikus akklimációjában feltehetően szerepet játszik az addicionális D2' izoforma, amelynek *psbD3* génje e körülmények során aktiválódik.

5. A lineáris és ciklikus elektron transzport gátlása a cit b₆/f Q_o kötőhelyére beülő dibromotimokinonnal megakadályozza a D1_m és D2_m izoformákat kódoló *psbA2*, *psbA3* és *psbD2* gének fény stressz-aktivációját, és a D1' izoformát kódoló *psbA1* transzkript felhalmozódását idézi elő.

6. Az *Acaryochloris marina* genomja a citokróm b559 α alegységét kódoló *psbE* gén két formáját, *psbE1* és *psbE2* homológokat tartalmazza, amelyek közül az utóbbi a relatív mRNS szintje alapján az abundáns kópia. A *psbE1* gén aktivitása rendkívül alacsony, és e homológ által kódolt feltételezett α-citokróm b559 termék aminosav szekvenciájában mutációk halmozódtak fel. A *psbE1* géntől közvetlen „downstream” található β-citokróm b559 kifejeződése a *psbE1* génhez hasonlóan elhanyagolható mértékű. Következésképpen, a citokróm b559 α és β alegységek mennyisége között transzkriptom szinten két nagyságrendnyi különbség adódik.

7. A *Synechocystis* PCC 6803 Hox hidrogenázának kifejeződését a fény, a fotoszintetikus elektrontranszport és az oxigén befolyásolja. Az *Acaryochloris marina* hox génjeit az oxigénhiányos környezet, a sötét, az alacsony fényintenzitás, és a távoli vörös megvilágítás aktiválja.

A dolgozatban felhasznált közlemények:

É. Kiss, P. B. Kós, I. Vass, (2009) Transcriptional regulation of the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803 J Biotechnol 142 (1):31-7

É. Kiss, P. B. Kós, Min Chen I. Vass, (2010) The regulation of the bidirectional hydrogenase in different unicellular cyanobacterial strains Proceedings of 15th International Congress on Photosynthesis

É. Kiss, P. B. Kós, Min Chen I. Vass, (2012) A unique regulation of the expression of the *psbA*, *psbD*, and *psbE* genes, encoding the D1, D2 and cytochrome b559 subunits of the Photosystem II complex in the chlorophyll *d* containing cyanobacterium *Acaryochloris marina* BBA Bioenergetics <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.04.010>

Társszerzői lemondó nyilatkozat

Alulírott nyilatkozom, hogy Kiss Éva téziseit ismerem, az azokban foglalt eredményeket tudományos fokozat megszerzéséhez nem használtam fel, s tudomásul veszem, hogy azokat ilyen célból a jövőben sem használhatom fel.

Dr. Vass Imre, tudományos tanácsadó

Dr. Kós Péter Balázs, tudományos főmunkatárs

Szeged, 2012. május 4.