

PhD értekezés

**A PhrA fotoliáz és szerkezeti homológja a PhrB kriptokróm
szerepe a *Synechocystis* sp. PCC 6803 kettes fotokémiai
rendszerének javítási ciklusában**

Vass István Zoltán

Témavezetők:

Dr. Vass Imre

Dr. Kós Péter

Biológia Doktori Iskola, SZTE TTIK
MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Növénybiológiai Intézet

Szeged

2014

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	1
Bevezető	3
1. Irodalmi áttekintés	4
1.1. A fotoszintetikus apparátus szerkezete és működése	4
1.1.1. A kettes fotokémiai rendszer szerkezete	6
1.1.2. A D1 fehérje	7
1.1.2.1. A <i>psbA</i> gének	7
1.1.3. A kettes fotokémiai rendszer károsodása és javítása	9
1.1.3.1. A PSII javítási mechanizmus lépései	11
1.1.3.1.1. A károsodott D1 alegységek eltávolítása	11
1.1.3.1.2. Gén-indukció	14
1.1.3.1.3. Pigmentek szerepe a PSII javításában	15
1.1.3.1.4. A PSII összeszerelése	16
1.1.3.1.5. A PSII fotoaktiválása	18
1.2. Fényreceptorok	19
1.2.1. Fitokrómok	20
1.2.2. UVR8, az UV-B receptor	21
1.2.3. Fototropinok	21
1.2.4. A kriptokróm/fotoliáz fehérje család	22
1.2.4.1. Kriptokrómok	22
1.2.4.1.1. A kriptokrómok szerkezete	23
1.2.4.1.2. A kriptokrómok szerepe	24
1.2.4.2. Fotoliázok	25
1.2.4.2.1. A fotoliázok szubsztrátja	26
1.2.4.2.2. A fotoliázok szerkezete	27
1.2.4.2.3. A fotoliázok működési mechanizmusa	28
1.2.4.3. Cry-DASH kriptokrómok	30
1.2.4.3.1. A DASH-kriptokrómok elterjedése és szerepe	30
1.2.4.3.2. A PhrB szerkezete	32

2.	Célkitűzések.....	34
3.	Anyagok és módszerek.....	35
3.1.	Sejttenyészetek.....	35
3.2.	A <i>phrA</i> ⁻ és <i>phrB</i> ⁻ mutánsok	35
3.3.	Kísérleti és mintavételi beállítások	35
3.4.	Fotoszintetikus aktivitás meghatározása	37
3.5.	D1 fehérje stressz-dinamikájának elemzése	37
3.6.	Fehérjék radioaktív jelölése és elválasztása 2D gél módszerrel.....	39
3.7.	Génexpresszió vizsgálatok	39
3.8.	UV-B által indukált DNS károsodás vizsgálata qPCR segítségével.....	41
3.9.	UV-B-indukált DNS károsodás kimutatása alkalikus gél módszerrel	41
3.9.1.	Genomi DNS izolálása	41
3.9.2.	Specifikus DNS károsodások meghatározása	42
3.10.	Szignifikancia-teszt.....	43
4.	Eredmények és kiértékelésük.....	44
4.1.	A fotoliáz hatásának vizsgálata	44
4.1.1.	A PhrA hiányának hatása a PSII komplexek aktivitására	44
4.1.2.	A D1 fehérjemennyiség változása UV-B hatására	47
4.1.3.	UV-B által indukált <i>psbA</i> hRNS állomány változása a VT és a <i>phrA</i> ⁻ sejtekben	48
4.1.4.	UV-B által indukált DNS károsodások számszerűsítése qPCR-el	49
4.1.5.	UV-B-indukált DNS károsodások számszerűsítése alkalikus gélen..	51
4.1.6.	PhrA modell	53
4.2.	A PhrB hatásának vizsgálata	54
4.2.1.	A <i>phrB</i> ⁻ sejtek DNS javítási kapacitása	54
4.2.2.	PSII aktivitás VT és <i>phrB</i> ⁻ sejtekben, UV-B és magas intenzitású látható fény jelenlétében.....	55
4.2.3.	D1 fehérjemennyiség változása UV-B és intenzív FF jelenlétében a VT és <i>phrB</i> ⁻ sejtekben	59
4.2.4.	A PSII komplex összeszerelése PhrB hiányában	61
4.2.5.	A <i>psbA</i> gén indukciója UV-B vagy magas intenzitású FF által, PhrB hiányában illetve jelenlétében.....	63
4.2.6.	A PhrB szerepe a DNS javításban.....	65

4.2.7.	A PhrB hatása az UV-B és magas intenzitású FF által gátolt PSII aktivitásra	66
4.2.8.	A PhrB hatása a PSII pigment-fehérje komplex javítási ciklusára ..	66
4.2.8.1.	A PhrB hatása a CO ₂ háztartásra	67
4.2.8.2.	A PilA1-el társítható funkciók	68
4.2.8.3.	A PhrB hatása a PilA1-re	68
4.2.9.	PhrB modell	71
5.	Összefoglaló	72
5.1.	A PhrA és PhrB hatása hatása a PSII javítási ciklusra	72
5.2.	Összefoglaló modell	74
5.3.	Következtetések	75
6.	Idézett irodalom	76
7.	A Ph.D. értekezés összefoglalója	98
8.	Summary of the Ph.D. thesis	101
	Publikációs lista	104
	Köszönetnyilvánítás.....	105

Rövidítések jegyzéke

8-HDF – 7,8-didemetil-8-hidroxi-5-deazariboflavin

ADP – adenzin difoszfát

ATP – adenzin trifoszfát

CAB – klorofil a/b-t kötő fehérje

CCE – a kriptokróm molekula C-terminális nyúlványa

CCM – CO₂ sűrítő mechanizmus

CN-PAGE – natív poliakrilamid gélelektroforézis

COP1 – E3 ubikvitin ligáz, jelátviteli utak fontos eleme

CP43 – a PSII antennakomplexének 43 kDa-os klorofillt kötő alegysége

CP47 – a PSII antennakomplexének 47 kDa-os klorofillt kötő alegysége

CPD – ciklobután pirimidin dimer

Cry – kriptokróm

Cry-DASH – *Drosophila Arabidopsis Synechocystis Homo* kriptokróm

cyt b₅₅₉ – citokróm-b₅₅₉

cyt b₆/f – b₆/f citokróm komplex

DNS – dezoxiribonukleinsav

FAD – flavin adenin dinukleotid

FeS_A – a PSI komplexhez kötődő és vas-kén redox kofaktort kötő fehérje

FeS_B – a PSI komplexhez kötődő és vas-kén redox kofaktort kötő fehérje

FeS_X – a PSI komplex PsaA (A1) alegységéhez kötődő vas-kén redox kofaktor

FF – fehér fény, látható fény (400-750 nm)

FMN – flavin mononukleotid

FPG – formamido pirimidin DNS-glikoziláz

gDNS – genomi DNS

hRNS – hírvivő RNS

LOV-tartomány – fény, oxigén vagy feszültség által szabályozható fehérje tartomány

MTHF – 5,10-metenil tetrahidrofolát

min – perc

NADPH+H⁺ – redukált és protonált nikotinamid-adenin-dinukleotid foszfát

PAR – fotoszintetikusán aktív sugárzás, látható fény (400-750 nm)

PDM – a PrtA fehérje által meghatározott membrán

PHR – fotoliázzal homológ szakasz kriptokrómban

PhrA – a *Synechocystis* sp. PCC 6803 fotoliáz enzime

PhrB – a *Synechocystis* sp. PCC 6803 DASH kriptokrómja

PSI – egyes fotokémiai rendszer

PSII – kettes fotokémiai rendszer

psbA – a D1 alegység izoformáit kódoló géncsalád

PsbH – a PSII kis molekulásúlyú alegysége

PsbI – a PSII kis molekulásúlyú alegysége

PsbK – a PSII kis molekulásúlyú alegysége

PM – plazmamembrán

PQ – plasztokinon molekula

Q_A – egy plasztokinon állandó kötőhelye a PSII komplex D2 alegységén

Q_B – plasztokinonok átmeneti kötőhelye a PSII komplex D1 alegységén

Q_BH₂ – kétszeresen redukált és protonált plasztokinon molekula

RC – a PSII reakcióközpontja

RCC1 – a PSII alapkompex monomer állapotban

RCC2 – a PSII alapkompex dimer állapotban

RNS – ribonukleinsav

ROS – reaktív oxigénformák

SCP – kis, CAB-szerű fehérje (A-E)

SDS-PAGE – denaturáló poliakrilamid gélelektroforézis

Syn-CRY – PhrB, a *Synechocystis* sp. PCC 6803 DASH kriptokrómja

T4 PDG – T4 endonukleáz V primidin dimer glikoziláz

TM – tilakoid membrán

UV-A – ultraibolya B (315-400 nm)

UV-B – ultraibolya B (280-315 nm)

UV-C – ultraibolya B (100-280 nm)

Bevezető

A napfény a Föld bioszférájának energiaforrása és szabályzó tényezője is egyben. A Naptól származó elektromágneses sugárzás, a légköri szűrőhatás ellenére is széles spektrumban (290-3500 nm) érkezik a Föld felszínére. Százalékos eloszlás alapján e széles spektrumból származó sugarak jelentős része a viszonylag nagy energiájú és rövidebb hullámhosszú 400-750 nm-es tartományba esik. A Földön élő fotoautotróf szervezetek e tartomány energiáját hasznosítják a leghatékonyabban. Ennek megfelelően rendelkeznek olyan molekula komplexekkel, amelyek képesek együtt a napfény energiáját kémiai energiává alakítani (PSII, PSI, cyt b_6/f , ATP-szintetáz), míg más molekulák, bizonyos hullámhossztartományú sugárzás hatására specifikus folyamatokat szabályoznak (fitokrómok, kriptokrómok, fototropinok, UVR8).

Mindezek során, napfény hatására, az illető molekulák átmeneti módosításokon esnek át, viszont a sugárzás intenzitásának és minőségének függvényében az említett molekulák szerepükből kifolyólag maradandó károsodást is szenvedhetnek. E jelenség nemcsak a fény hatására specifikus folyamatokat ellátó molekulákra korlátozódik hanem gyakorlatilag minden fényérzékeny molekulát érint. Ezek közül az egyik legfontosabb a DNS, amelyen az ultraibolya-B (UV-B) sugárzás (280-315 nm) jellegzetes szerkezeti változásokat képes előidézni.

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

A jelen dolgozatban két olyan fehérjével kapcsolatos kutatásaimat mutatom be amelyek jelentős hatással vannak a fotoszintetikus apparátus fénykárosodás utáni kijavítására.

1. Irodalmi áttekintés

1.1. A fotoszintetikus apparátus szerkezete és működése

Az irodalmi áttekintés során a jelen dolgozat kísérleti modellszervezetére, a *Synechocystis* sp PCC6803 (*Synechocystis*) kék-zöld baktériumra, fogok koncentrálni kitérve más szervezetekre is ahol szükséges vagy hiányosak a cianobaktériumokra vonatkozó adatok.

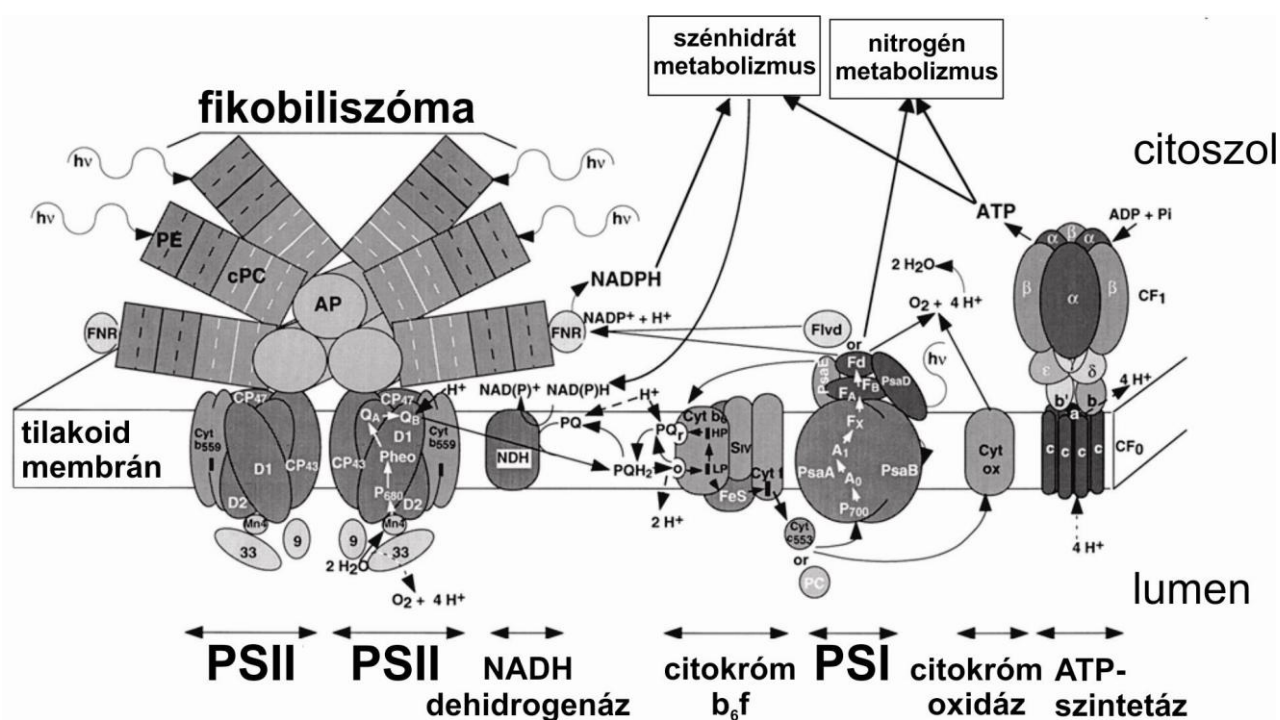
A fotoszintézis kezdeti szakaszában a fény fotonjainak energiája által a NADP^+ $\text{NADPH}+\text{H}^+$ -vá redukálódik H^+ felvételével és ATP keletkezik ADP-ből, miközben vízbontásból származó O_2 szabadul fel. Ez a folyamat jellemzi a fotoszintézis fényszakaszát, aminek során a létrejött $\text{NADPH}+\text{H}^+$ és ATP elengedhetetlenek a fotoszintézis sötétszakaszához, vagyis a szén lekötéséhez, és a glükóz szintetizálásához.

Az oxigéntermelő fotoszintézis fényszakaszát katalizáló négy enzimatis komplex a fotoszintetikus szervezetek tilakoid membránjában (TM) helyezkedik el. A TM kettős rétegben felépülő speciális lipidekből és az ebbe beleágyazódó és hozzá kapcsolódó fehérjékből, valamint fehérje-pigment komplexekből áll. Kloroplasztiszokban a TM-ok sajátos szerkezeti formákat öltve, úgynevezett grána és sztróma régiókba szerveződnek, míg a cianobaktériumokban rétegekben elhelyezkedő, zárt membránrendszert alkotnak.

A négy enzimatis komplex, amelyek a redox funkciójuk által együttesen a fotoszintetikus apparátust alkotják, a következő: kettős fotokémiai rendszer (PSII, víz:plasztokinon-oxidoreduktáz), citokróm b_6/f komplex (plasztokinol:plasztocianin-oxidoreduktáz, ferredoxin:plasztocianin-oxidoreduktáz), egyes fotokémiai rendszer (PSI, plasztocianin:ferredoxin-oxidoreduktáz), ATP-szintetáz (1. ábra). Szerepük az, hogy katalizálják azokat az elektrontranszport lépéseket amelyek $\text{NADPH}+\text{H}^+$ és ATP keletkezéséhez vezetnek.

A fényszakasz a fény energiájának begyűjtésével kezdődik, amely funkciót a cianobaktériumoknál a fikobiliszóma fehérje-pigment komplex lát el. Ez a viszonylag nagy tömegű fénybegyűjtő komplex mindkét fotokémiai rendszert (PSII, PSI) kiszolgálja és fikobiliproteinekből, valamint az ezekhez kovalensen kötött pigmentekből, fikobilinekből áll. A fikobiliszóma nagy hatékonysággal továbbítja a fényenergiát a fotokémiai rendszerek reakcióközpontjaihoz, ahol ezt a reakcióközpontok fehérje egységeihez kötött speciális klorofill-a molekula dimerek nyelik el. Ezek a PSII-ben a P_{680} , a PSI-ben pedig a P_{700} -nak nevezett klorofill komplexek. A PSII reakcióközpontjába eljutó energia létrehozza az elsődleges töltésszétválást, vagyis a fotonok energiája által gerjesztett P_{680} lead egy elektront az elsődleges akceptor feofitin molekulának. Az elektron a feofitin molekuláról

nanoszekundumos időtartományon belül átkerül a stabilan kötődő elsődleges kinon elektorn akceptorra, a Q_A -ra, ahonnan a mikroszekundumos időtartományban a labilisan kötődő másodlagos kinonakceptorra, a Q_B -re kerül. Az elsődleges töltésszétválásnak köszönhetően a gerjesztő energia által oxidált P_{680}^+ maga is erős oxidáló tényezővé válik ami által képes lesz vízmolekulákból elektront elvonni. Ezt a folyamatot a PSII D1 alegységének TyrZ-vel jelölt redox-aktív aminosava közvetíti. A víz oxidációját a PSII lumenális oldalához kapcsolódó vízbontó komplex végzi, amelynek katalitikus helye egy $Mn_4CaO_5Cl_2$ molekula-csoport: A vízbontó komplex öt, fény által indukált oxidációs állapotot (S_0, S_1, S_2, S_3, S_4) halad keresztül, aminek során elektronok valamint protonok szabadulnak fel a vízmolekulákból.



1. ábra: A fotoszintetikus apparátus fő elemei. (Campbell és mtsai. 1998) PSII: kettes fotokémiai rendszer, citokróm b_6/f komplex, PSI: egyes fotokémiai rendszer, ATP-szintetáz .

A feofitintről a Q_A -ra továbbkerülő elektron, valamint a PSII vízbontó komplexe (donor oldali) felől történő P_{680}^+ redukció stabilizálják a töltésszétválást. Két töltésszétválási ciklus után a Q_B^{2-} kétszeresen redukált állapotba kerül és a sztróma felől protonokat vesz fel, létrehozva egy Q_BH_2 protonált kinol molekulát. Ezt követően a Q_BH_2 leválik a Q_B kötőhelyről (PQH_2) és a megüresedett kötőhelyet egy, a kettős lipidrétegben szabadon mozgó, oxidált plasztokinon (PQ), molekula foglalja el. A TM kettős lipidrétegébe kivált plasztokinol (PQH_2), a citokróm b_6/f komplexnek adja át elektronjait, amin keresztül ezek eljutnak a TM lumenális feléhez kapcsolódó hidofil, mobilis molekulához, a plasztocianinhoz.

A PSII-vel párhuzamosan a PSI-ben is megtörténik a töltésszétválás és a gerjesztő fényenergia következtében elvesztett elektronját az oxidált P_{700}^+ a plasztocianintól pótolja. A

töltésszétválás a PSI esetében is csak akkor stabilizálódik, ha a P_{700}^{+} által leadott elektron gyorsan továbblép a PSI reakcióközpontjában található elektronakceptor láncon. Az elektron előbb az A₀ jelzésű elsődleges akceptor klorofill-a monomerhez kerül, amely továbbítja az A1-el jelölt másodlagos akceptorhoz, egy fillokinon molekulához. A fillokinon molekulától az elektront az elsődleges ferredoxin-akceptor, a FeS_x veszi át, majd innen a 4Fe-4S tartalmú FeS_A és FeS_B központra kerül át. Az elektron végül a 2Fe-2S tartalmú ferredoxinra (Fd) jut, amely hidrofíl molekulaként a TM sztróma felőli oldalán mozoghat szabadon. Ezek után a sztróma felőli oldalon levő ferredoxin:NADP⁺-oxidoreduktáz (FNR) közvetítésével az energizált elektron a fényszakasz végső akceptorára, a NADP⁺-ra kerülhet.

Az elektrontranszport reakciókkal párhuzamosan a lumenális oldalon protonok (H⁺) halmozódnak fel. Ezeknek egy része a vízbontásból származik, más részüket pedig a protonált plasztokinok szállítják a sztrómából. A lumenális oldalon jelentkező magas H⁺-koncentráció következtében a TM sztróma és lumen felőli oldala között pH-gradiens jön létre. Ez a pH-gradiens hajtja az ATP-szintetáz enzimet, amely katalizálja az ADP ATP-vé való foszforilálását.

1.1.1. A kettes fotokémiai rendszer szerkezete

A PSII egy kiemelt szerepű pigment-protein komplex a fotoszintetikus szervezetek TM-ban, amely képes fényenergia általi vízbontásra, ílymódon a víz, mint elektron donor hasznosítására, ami egyben az aerob élethez szükséges O₂ felszabadítását is eredményezi. Röntgendiffrakciós eredmények alapján alkotott PSII komplex modellről (Barber 2012) összefoglalójában található részletes beszámoló.

Oxigéntermelésre képes PSII komplexek monomer és dimer formában egyaránt jelen vannak a *Synechocytis* sejtekben (Nowaczyk és mtsai. 2006). A monomer felépítésében több mint 40 fehérje vesz részt, amelyek tartósan vagy átmenetileg kapcsolódnak a komplexhez (Shi és mtsai. 2012). A PSII monomer központi részét egy heterodimer képezi, a D1 (PsbA) és a D2 (PsbD) homológ fehérjék részvételével. E két fehérje hordozza a PSII-ben végbemenő elektrontranszporthoz szükséges redox kofaktorokat. A reakcióközpont a PSII funkcionális magja, amely a D1 és D2 fehérjéken kívül tartalmazza még a CP43 (PsbC), CP47 (PsbB) klorofillt kötő, membránon belüli antenna komplexeket, valamint a D2 fehérjével asszociált citokróm b559 (Cyt b₅₅₉) molekula α és β alegységeit (PsbE, PsbF). A reakcióközpontban végbemehet az elsődleges töltésszétválás, viszont a vízbontáshoz más alegységekre is szükség van. A PSII tömegének több mint felét a kis molekulatömegű (<15 kDa) fehérje alegységek teszik ki (Shi és Schröder 2004). Ezek az alegységek, amelyek közül 14 átszeli a TM-t

(Pagliano és mtsai. 2013), szerkezeti és funkcionális szerepekkel bírnak, többek között stabilizálják a PSII-höz csatlakozó vízbontó komplexet. Egy PSII monomer, a fehérje alegységeken kívül összességében 35 klorofill-a molekulát, 2 feofitint, 12 karotenoidot, 2 hem csoportot, 1-2 Cl⁻ iont, 3 plasztokinont, 25 lipid molekulát és a CaMn₄ kofaktor csoportot tartalmaz (Guskov és mtsai. 2009).

A D1 fehérje hordozza, vagy köti a reakcióközpont elektrontranszportjában aktívan szerepet játszó redox kofaktorok túlnyomó részét: tirozin 161 (TyrZ), klorofill-a (P680), feofitin (Pheo), a Q_B kötőhelyre kötődő plasztokinon (PQ) molekula. Mindemellett igen fontos szerepe van a vízbontó komplex kialakításában, ugyanis az említett komplex Mn₄CaO₅Cl₂ kofaktorainak egyik fő kötőhelyeként szolgál (Asp170, Glu189, His332, Glu333, Asp342, és a C-terminális Ala344 által). Szerkezeténél fogva főszerepe van a fényszakasz reakcióiban, így a fotoszintetikus szervezetek nagy energiát fektetnek a károsodott D1 fehérjék gyors és hatékony pótlásába (Aro és mtsai. 2005; Vass és mtsai. 2000).

1.1.2. A D1 fehérje

Ez a megközelítőleg 32 kDa molekulatömegű fehérje öt transzmembrán régióval szeli át a TM-t. C-terminális vége a TM lumenje felé néz, az N-terminális vég pedig a sztróma oldalán helyezkedik el.

1.1.2.1. A *psbA* gének

Míg a növényekben csak egy, a *psbA* gén kódolja a D1 alegységet, addig a cianobaktériumokban, fajtól függően 1-6 tagot számláló *psbA* géncsalád tölti be ezt a szerepet (Mulo és mtsai. 2009). *Synechocystis* sp. PCC6803-ban ezt a géncsaládot 3 gén alkotja: a *psbA1*, a *psbA2* és a *psbA3*). Ennek ellenére a legtöbb környezeti stressz jelenlétében, illetve azok hiányában, csak egy D1 izoforma mutatható ki a sejtek TM-jában, amelyet a *psbA2*, *psbA3* egyaránt kódol (Mohamed és mtsai. 1993). A *psbA1* csak specifikus, mikroaerob atmoszférikus körülmények közt íródik át, igaz még így is csak elenyésző mértékben, ami a teljes *psbA* géncsalád hírvivő RNS (hRNS) mennyiségét illeti (Sicora és mtsai. 2009). Stresszmentes nevelési körülmények között a *Synechocystis* *psbA* transzkript mennyiségének több mint 90%-át a *psbA2*-ről átírt hRNS molekulák teszik ki (Mohamed és mtsai. 1993). Stresszkörülmények között, mint amilyen a magas intenzitású fény, vagy az UV sugárzás, a *psbA3* gén transzkript szintje a kiindulási szintjéhez képest akár 20-szorosára is növekedhet, míg a *psbA2* gén transzkript szintje csak 6-7-szeres növekedést mutat. Tehát a *Synechocystis* sejtek emelkedő össz-*psbA* transzkript mennyiséggel reagálnak a stresszre és ezen belül

arányaiban jelentősen megnövekszik a *psbA3* transzkriptok mennyisége (Máté és mtsai. 1998; Vass és mtsai. 2000).

Synechocystis-ben a *psbA* géncsalád kifejeződése többek között transzkripció, transzkript stabilizáció, transláció és redox szabályzás alatt áll és a szabályzás többnyire a környezeti fény jelenlétén illetve hiányán alapszik (Mulo és mtsai. 2009).

A transzkripció szabályzás (Golden 1995; Mohamed és Jansson 1989), amely több szigma faktor (SigB, SigD, SigE) közvetítésével fény által indukálható, optimalizálja a sejtek környezeti változásokhoz való alkalmazkodását (Imamura és Asayama 2009; Pollari és mtsai. 2009). Gyakorlatilag a fény intenzitásának növekedésével növekszik a *psbA2* és a *psbA3* gének átírási szintje (Constant és mtsai. 1997). Mindezen felül a *psbA2* promóteréhez kapcsolódó és azt szabályzó SigD factor, a *Microcystis aeruginosa* cianobaktériumban maga is pozitív szabályzás alatt áll az öt kódoló *rpoD1*-től upstream található DNS szakasz sajátos, harmadlagos szerkezete által (Asayama és mtsai. 1999). Ezek mellett pedig a prokariótákra amúgy nem jellemző, viszont a cianobaktériumokban megtalálható, cirkadián óra is részt vesz a cianobakteriális *psbA2* transzkripció szabályzásában (Agrawal és mtsai. 1999).

A *psbA2* és *psbA3* transzkriptek féléletideje átlagos nevelési megvilágítás alatt 10-20 perc, míg sötétben az elektrontranszport folyamatok leállása mellett, akár órákra is megnövekedhet (Herranen és mtsai. 2001; Mohamed és Jansson 1991). A fényből sötétbe való átmenetnél a *psbA* gének átírása rövid időn belül le is áll, ami feltehetőleg repressziós fehérjék közvetítésével valósul meg (Herranen és mtsai. 2001). E repressziós fehérjék hatása mellett a *psbA2* transzkript halmaz stabilitása függ a *psbA2* gén upstream szomszédságában található úgynevezett AU-box jelenlététől is. Sötétben e szekvencia hiányában a *psbA2* transzkript hosszabb féléletidővel rendelkezik (Agrawal és mtsai. 2001).

Synechocystis sejtekben a transláció kezdetét, valamint a D1 fehérje- prekurzorok átírás utáni módosítását a klorofill bioszintézis is szabályozza (He és Vermaas 1998). Az átírás sikeres indulása után, ha a translációs elongáció során a sejt sötétbe kerül, akkor az átírás és az átíró fehérje TM-ba való beültetése szünetel (Tyystjarvi és mtsai. 2001). A D1 fehérje átírás utáni módosítását és a TM-ba való beültetését számos fehérje alegység szabályozza, amelyek mind hozzájárulnak a PSII komplex összeszereléséhez (Nixon és mtsai. 2010).

Számos tanulmány azt mutatja, hogy az elektrontranszportlánc bizonyos elemeinek redox állapota is hatással van a *psbA* gének indukálására. A Q_A redukált állapotának kialakulása, ami lényegében erős környezeti fényintenzitás következménye, kapcsolatba hozható a *psbA* transzkript szint átmeneti növekedésével (Alfonso és mtsai. 2000). Viszont az

elektrontranszportlánc gátlásával egybekötött magas fényintenzitás mellett az elvártnál alacsonyabb mértékben íródik át a *psbA2* (Sippola és Aro 2000). Ugyanakkor hosszabb, 6 órás Q_A redukciós kísérletek azt mutatták, hogy a membrán lipid fázisában található plasztokinon oxidációja során növekszik meg a *psbA* transzkript szint (Li és Sherman 2000). A PSI oxidoreduktáz működése is szerepet játszhat a *psbA* transzkript-szabályzásban, mivel az általa specifikusan elnyelt fény (>700 nm) jelenlétében fokozódik az átírás (Sippola és Aro 1999). A citokróm b_6f komplex Q_O plasztokinon kötő helyének redukált állapota is pozitívan hat a *psbA* transzkript szintre (El Bissati és Kirilovsky 2001).

1.1.3. A kettes fotokémiai rendszer károsodása és javítása

A fotoszintetikus szervezeteket érő fény potenciálisan károsíthatja a fényérzékeny pigment molekulákat kötő fehérje alegységeket. Ha ezek károsodása olyan mértékű illetve gyakoriságú, hogy az illető szervezet nem képes megjelenésük ütemében kijavítani őket, akkor fotoinhibícióról beszélünk (Aro és mtsai. 1993). A jelenség elsődleges helyszíne a PSII komplex, amelynek károsodása maga után vonja a fotoszintetikus apparátus hatékonyságának jelentős csökkenését illetve leállását. Mivel a fotoszintetikus szervezetek többnyire elkerülhetetlenül ki vannak téve a környezeti fénynek, illetve létük a működőképes fotoszintetikus apparátustól függ, hatékony javítási mechanizmusokkal rendelkeznek a PSII komplex kijavításához. Ezek a javítási folyamatok átlagos feltételek mellett maradéktalanul és létrejöttük ütemében kijavítják a környezeti fény által indukált károsodásokat (Aro és mtsai. 1993), amelynek során a meghibásodott fehérje alegységek eltávolítódnak, majd ezeket *de novo* szintetizált példányok pótolják.

A javítási mechanizmusok viszont önmaguk is ki vannak téve különböző környezeti tényezők (sóstressz, alacsony CO_2 szint, alacsony és magas hőmérséklet) káros hatásainak (Murata és mtsai. 2007), ahogy ezt többek között a *Synechocystis*-ben is leírták (Allakhverdiev és Murata 2004). Ezek a tényezők főleg az általuk indukált reaktív oxigénfajtákon (ROS) keresztül fejtik ki hatásukat, amelyek gátolják a fehérje alegységek *de novo* szintézisét (Nishiyama és mtsai. 2004; Nishiyama és mtsai. 2006). A *Chlamydomonas reinhardtii* zöldalgán végzett tanulmányok azt bizonyítják, hogy a Calvin-Benson ciklus megszakítása, ami CO_2 hiányt imitál akadályozza a PSII javítási folyamatait (Takahashi és Murata 2005). A Calvin-Benson ciklusban termelődő glicerín-3-foszfát normális körülmények között ugyanis elektronokat fogad a NADPH irányából, viszont hiányában emelkedik a ROS szintje, valamint csökken a D1 fehérje szintézisének hatékonysága (Takahashi és Murata 2006). A jelenséget, miszerint a ROS képződés gátolja a D1 fehérje

szintézisét, *Synechocystis*-ben is kimutatták méghozzá a D1 alegység transzlációjának szakaszában (Nishiyama és mtsai. 2011).

Ezek fényében nyilvánvaló, hogy a PSII komplex javítási ciklusának hatékonysága számos paraméter függvénye, amelyek így módon közvetetten negatív hatással lehetnek a fotoszintézis fényszakaszának folyamataira (Takahashi és Murata 2008).

Akciós spektrumának meghatározása alapján a PSII károsodása több fotoszintetikus modellszervezetben is főleg az UV-B, UV-A és a kék fény tartományába eső sugárzásokhoz köthető (Ohnishi és mtsai. 2005; Takahashi és mtsai. 2010). Említésre méltó ugyanakkor, hogy ép ózónréteg alatt, a fitoplanktonok esetében a fotoszintézist leginkább az UV-A sugárzás gátolja (Cullen és mtsai. 1992). A PSII komplexen belül az UV-B sugárzás elsődleges hatóhelye a vízbontó komplex $\text{Mn}_4\text{CaO}_5\text{Cl}_2$ kofaktorainak csoportja (Vass és mtsai. 1999). Ezt többek között az is alátámasztja, hogy a PSII károsodás akciós spektruma hasonlóságot mutat a vízbontó komplex $\text{Mn}_4\text{CaO}_5\text{Cl}_2$ kofaktorainak abszorpciós spektrumával (Hakala és mtsai. 2005). A vízbontó komplex károsodása pedig gátolja a fényindukált elektrontranszportot (Ohnishi és mtsai. 2005; Vass és mtsai. 1996; Vass és mtsai. 1999). Mivel a vízbontó komplex kofaktori megkötésében kulcsfontosságú a D1 fehérje, ezért kiemelt célpont a PSII komplex károsodásában. Stresszérzékenységet megsokszorozza, hogy a fotoszintetikus elektrontranszportlánc több elemét is köti vagy szerkezetében hordozza (Adir és mtsai. 2003; Aro és mtsai. 1993).

A fényenergia nemcsak a vízbontó komplex károsításán keresztül hathat negatívan a fotoszintetikus apparátusra, hanem közvetlenül is képes kárt tenni a PSII komplex fehérje alegységeinek szerkezetében. Az UV-B sugárzás a D1 és D2 alegységeken belül, specifikusan a TyrZ és TyrD elektron donorokat valamint a Q_A és Q_B kinonkötő helyeket is inaktiválhatja (Vass és mtsai. 1996; Vass és mtsai. 1999). Míg az UV-B sugárzás a D1 és a D2 fehérjéket egyaránt károsítja (Melis és mtsai. 1992), a látható fény célpontja elsősorban a D1 fehérje (Aro és mtsai. 1993). Ha az oxidált P_{680}^+ nem képes a károsodott vízbontó komplextől, illetve a TyrZ-től redukálódni, akkor jelentősen megnövekedik a féléletideje és erős oxidatív hatása révén közvetlenül képes károsítani a PSII komplex fehérje alegységeit (Aro és mtsai. 1993).

Mindezek mellett a PSII komplex csökkent aktivitásának leggyakoribb forrása a reaktív oxigénformáktól (ROS) származó oxidatív károsodás. Ha a Q_A és Q_B kötőhelyek károsodnak vagy bármilyen más oknál fogva (pl. redukált plasztokinon állomány) tartósan redukálódnak akkor a plasztokinonok irányába folyó elektrontranszport leáll és töltésrekombináció léphet a D1 alegységen belül, ami ge

gerjesztett $^3\text{P}_{680}$ vagyis triplet klorofillt (^3Chl) eredményezhet (Noguchi 2002). E molekulák képesek közvetlenül oxigénnek átadni a gerjesztett elektronjaikat, így szingulett

oxigént ($^1\text{O}_2$) hozva létre, ami jelentős oxidatív károsodást okozhat a PSII komplex fehérje alegységein (Krieger-Liszkay és mtsai. 2008). A PSI komplex akceptor oldala megfelelő affinitású elektron akceptor molekula hiányában képes szuperoxid gyökké (O_2^-) redukálni az oxigént, ami hidrogén peroxiddá (H_2O_2), valamint hidroxil gyökké ($\bullet\text{OH}$) alakulhat (Asada 1999). A ROS-ok jellemzően közvetetten károsítják a fotokémiai rendszereket, amely során a károsodott alegységek pótlására szánt *de novo* fehérje szintézist akadályozzák (Nishiyama és mtsai. 2004; Nishiyama és mtsai. 2006). Több tanulmány is kimutatta, hogy a ROS-ok specifikusan és jelentős mértékben képesek gátolni D1 fehérje szintézisét (Allakhverdiev és Murata 2004; Nishiyama és mtsai. 2004). A ROS-ok káros hatását a *Synechocystis* enzimatikusan és nem enzimatikusan is képes hatékonyan elhárítani. Genomja egy szuperoxid diszmutázt (Nakao és mtsai. 2010), egy kataláz peroxidázt (Tichy és Vermaas 1999), öt peroxiredoxint (Stork és mtsai. 2005) és két glutation peroxidázt kódol (Gaber és mtsai. 2001), amelyek bizonyos mértékig képesek semlegesíteni az oxidatív stresszt.

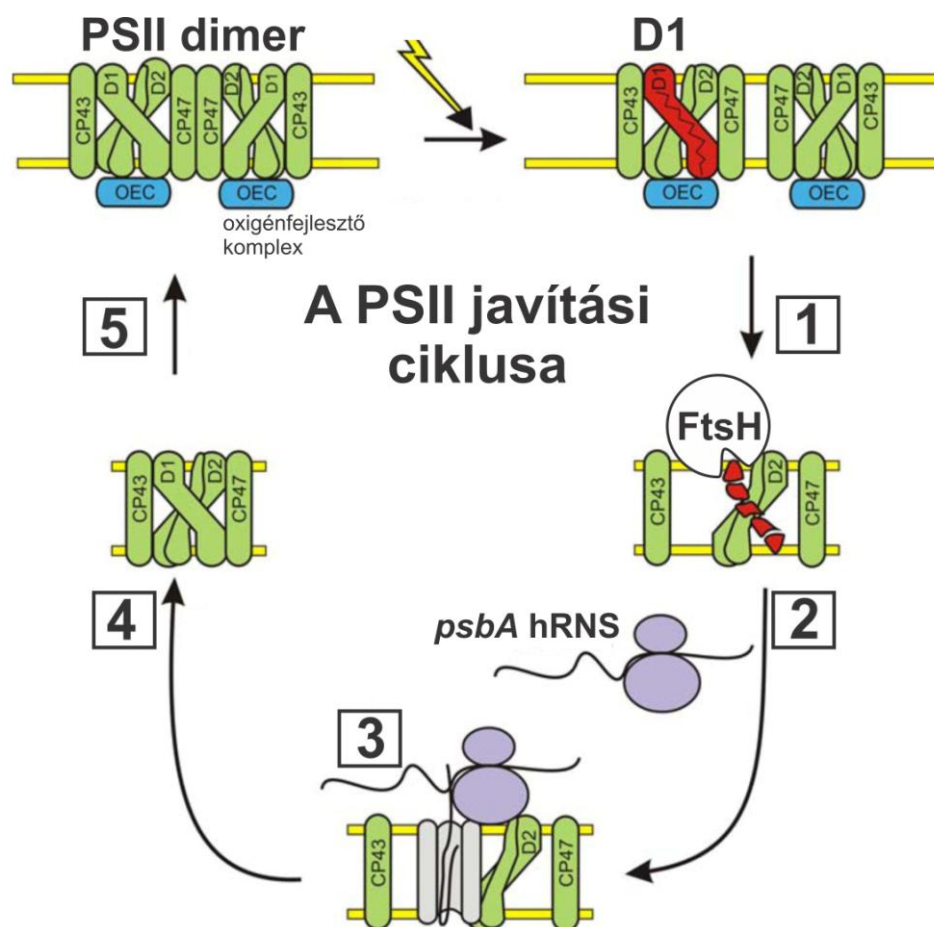
1.1.3.1. A PSII javítási mechanizmus lépései

Egy fotoszintetikus szervezet PSII populációjának hatékony működését alapvetően a PSII javítási ciklus biztosítja, melynek keretén belül a hibás alegységek újonnan szintetizáltakra cserélődnek. A javítási ciklus lépései a következők: 1. károsodott D1 és D2 alegységek proteolitikus eltávolítása, 2. hRNS átírása a *psbA* és *psbD* gének alapján, 3. fehérjék *de novo* szintézise a hRNS-ek alapján, 4. az újonnan szintetizált fehérjék beépülése a PSII komplexbe (Komenda és Barber 1995), 5. a vízbontó komplex, valamint a kis molekulatömegű fehérjék kapcsolódása és a PSII komplex aktiválása (2. ábra).

1.1.3.1.1. A károsodott D1 alegységek eltávolítása

A PSII javítási ciklus talán legfontosabb lépése a hibás D1 alegység lecserélése egy *de novo* átírt fehérjére (Aro és mtsai. 1993; Nixon és mtsai. 2005). Szerepéből adódóan a D1 fehérje alacsony fényintenzitás mellett is károsodik és átlagos körülmények között is néhány óránként lecserélődik. Nagy energiájú sugárzás hatására azonban ez az idő drámaian lecsökken, elérve akár a 20 percenkénti D1 pótlást is (Vasilikiotis és Melis 1994). Ezzel a különösen gyors javítási ciklussal válik a D1 fehérje a TM leggyorsabban cserélődő fehérjéjévé (Mattoo és mtsai. 1984). Normális körülmények között a D2 fehérje lecserélődése nem zajlik a D1-hez mérhető gyorsasággal, mivel féléletideje hosszabb a D1-énél, viszont UV

sugárzás hatására a D2 javítási ciklusa is felgyorsul (Jansen és mtsai. 1999; Jansen és mtsai. 1996).



2. ábra: A PSII javítási ciklus lépései. (Mulo és mtsai. 2009) 1. A D1 alegység károsodása és a PSII inaktiválása 2. hRNS átírása a *psbA* génekről 3. Fehérje alegységek *de novo* szintézise 4. Az alegységek beépülése a PSII komplexbe 5. A vízbontó komplex kapcsolódása és a PSII komplex fényaktiválása.

A fehérjék lecserélődése egy specifikus folyamat. A D1 fehérje esetében a hibás alegységek lebontásának mértéke látszólag összhangban áll a rendelkezésre álló *psbA* transzkript illetve a már átírt D1 fehérje mennyiséggel. Fehérjeszintézist gátló vegyszer jelenlétében, illetve alacsony *psbA* transzkript szint mellett, a károsodott D1 lebontása is csökken (Komenda és mtsai. 2000; Komenda és Barber 1995).

A D1 fehérje PSII komplexből való eltávolításában valamint lebontásában az FtsH proteázoknak kiemelt szerepük van (Cheregi és mtsai. 2007; Komenda és mtsai. 2006; Nixon és mtsai. 2005; Silva és mtsai. 2003). Az FtsH proteázok a TM-nal asszociálható, ATPáz aktivitású, Zn^{2+} kötőhellyel rendelkező metallopeptidázok (Ito és Akiyama 2005), amelyek hexamer hetero-oligomer gyűrűbe szerveződnek (Krzywda és mtsai. 2002). *Synechocystis*-ben a genom 4 homológ FtsH proteáz kódol, amelyek közül kettő létfontosságú (*slr1390*: FtsH1, *slr1604*: FtsH3), egy nem mutat feltűnő fenotípust (*slr1463*: FtsH4) (Mann és mtsai.

2000), egy pedig igen fontos szerepet játszik a D1 fehérje lebontásában (*slr0228*: FtsH2) (Cheregi és mtsai. 2007; Silva és mtsai. 2003). A hexamer hetero-oligomer gyűrűket, amelyekkel a proteáz aktivitás társítható, feltehetőleg az FtsH2 és FtsH3 alegységek alkotják (Boehm és mtsai. 2012). Δ FtsH2 (Δ Slr0228) mutáns sejtekben megnő a károsodást szenvedett D1 mennyisége és nem halmozódnak fel az esetleges fehérje bontásból származó kisebb fragmentumok (Komenda és mtsai. 2006), tehát az FtsH2-nek kulcsfontosságú szerepe van a D1 degradációban.

Jelenlegi ismeretek szerint az FtsH2 a D1 fehérje N-terminális végén kezdi a lebontást (Komenda és mtsai. 2007), aminek előfeltétele az alegység destabilizációja, ahhoz, hogy a proteáz hozzáférhessen a lebontandó fehérjéhez. Több tanulmány alátámasztja azt a modellt, miszerint a D1 fehérje lebontását a fotoinhibíción kívül számos más stressztényezőtől (hő, ammónia, mesterséges genetikai beavatkozás) adódó szerkezeti destabilizáció is indukálhatja (Drath és mtsai. 2008; Kamata és mtsai. 2005; Komenda és mtsai. 2010). A destabilizáció magába foglalja a PSII komplex részleges vagy teljes felbomlását és akár a pigment molekulák leválását az apoproteinjeikről. Mindez feltehetőleg oxidatív károsodás folytán valósul meg (Nixon és mtsai. 2005). A destabilizált D1 alegység N-terminális vége kristályszerkezeti adatok alapján (Ferreira és mtsai. 2004; Loll és mtsai. 2005) a PSII komplexből a sztrómába nyúlik, ahol a hossza függvényében (Chiba és mtsai. 2002) feltehetően képes kölcsönhatásba lépni az FtsH proteázzal. A hibás fehérje PSII komplexből való kiemelését a D1 alegység körül található lipid gyűrű is elősegíti (Loll és mtsai. 2007). A hibás D1 ezután áthalad az FtsH gyűrűjén, miközben egy ATP-függő folyamatban lebomlik a proteáz aktív Zn^{2+} kötőhelyén (Silva és mtsai. 2003). Az FtsH proteáz hatékonysága és stabilitását, *Arabidopsis*-ban jelentős mértékben befolyásolja az erősen konzervált és *Synechocystis*-ben is megtalálható Psb29 (Thf1) alegység (Zhang és mtsai. 2009). Ebben a modellben az FtsH proteáz egyedüli enzimként is képes a destabilizált D1 fehérje hatékony lebontására és ezáltal elősegíteni a PSII javítási ciklusát és mérsékelni a fotoinhibíció káros hatását (Cheregi és mtsai. 2007; Silva és mtsai. 2003). Ezzel szemben a D1 degradáció abban az esetben sem áll le teljesen ha a sejtekből hiányzik az FtsH2 és FtsH3, ami felveti a D1 degradáció egy alternatív útvonalának létezését (Komenda és mtsai. 2010).

Arabidopsis esetében a proteázok egy másik csoportjának, a DegP/HtrA proteáz-családnak is szerepet tulajdonítanak a D1 fehérje degradációban (Huesgen és mtsai. 2009). Az FtsH proteázok itt is kitüntetett szerepet kapnak (Kato és Sakamoto 2009). Ugyanakkor közvetlenül vagy közvetetten a Deg proteázok is részt vesznek a D1 lebontásában, ahogy ezt *in vitro* és *in vivo* kísérletek is alátámasztják (Haussuhl és mtsai. 2001). Mindemellett a Deg proteázok fontosságát, a D1 alegység degradációjában, számos tanulmány kétségbe vonja.

Synechocystis sejtekben a D1 fehérje szelektív és gyors lebontását nem akadályozza a Deg proteázok (*slr1204*, *sll1679*, *sll1427*) teljes hiánya (Barker és mtsai. 2006) és *Arabidopsis*-ban is zavartalanul végbemehet a D1 gyors lecserélődése, a D1 degradációjával asszociált Deg5 és Deg8 hiányában (Sun és mtsai. 2007).

1.1.3.1.2. Gén-indukció

A *psbA* géncsalád elemeinek hRNS-é való átírása a már leírt módokon szabályozott. A D1 károsodásával párhuzamosan a kárt okozó sugárzás a *psbA2* és *psbA3* gének átírását is indukálja, ami által a stressznek kitett sejtekben megnövekszik az össz-*psbA* hRNS szint. Ezzel együtt a növekvő össz-*psbA* mennyiségen belül megnövekszik a *psbA3* hRNS molekulák aránya (Máté és mtsai. 1998; Vass és mtsai. 2000).

A D1 fehérje átírása a PSII javítási ciklus keretében feltételezhetően a TM-nal asszociálható riboszómákon történik (Herrin és Michaels 1985), amelyekhez a *psbA* hRNS molekulák már a citoszólban kapcsolódnak és az átírás már itt elkezdődik. Ez a modell azonban árnyaltabbá vált, mivel elektronmikroszkópos felvételek azt mutatják, hogy a riboszómák elsősorban nem a TM rétegei közt helyezkednek el (van de Meene és mtsai. 2006).

Synechocystis-nél, a magasabbrendű növényekkel ellentétben hiányzik a transzláció kezdeményezésének szabályozása (Tyystjarvi és mtsai. 2001). Ezzel szemben az átírás elongációs szakasza, az 1.1.2.1 fejezetben leírt módon fontos helyszíne a D1 szintézis szabályzásának. *De novo* PSII komplex-képzés során a növekvő polipeptidlánc egy hiányos PSII reakcióközpont felé irányítódik, ami minimum a cyt b_{559} és D2 alegységekből áll (Tyystjarvi és mtsai. 2001; Zhang és mtsai. 1999). Ettől eltérően, a D1 szelektív kicserélődése folyamán az újonnan képződött alegység az RC47 ($psbI + D1 + cyt\ b_{559} + D2 + CP47 + psbH$) komplexbe épül be, ami a D1-nél kevésbé károsodik stressz körülmények alatt. A CP47 alegység például, radioaktív izotópos vizsgálatok alapján, a PSII komplex egyik legidőtállóbb eleme, ami viszonylag ritkán cserélődik le (Komenda és mtsai. 2004). A PSII-be való beépülés előfeltételeként a D1 fehérje stabilizációjához kulcsfontosságú a D2 fehérje jelenléte a TM-ban (Komenda és mtsai. 2004). A fény jelenléte pedig elengedhetetlen a D1 fehérje átírásának befejezéséhez (Tyystjarvi és mtsai. 2001). Az átírás egy kb. 34 kDa nagyságú prekursor fehérjét (pD1) eredményez (Herrin és Michaels 1985). Ahhoz, hogy a vízbontó komplex kofaktorai az újonnan szintetizált D1-hez kapcsolódhassanak a pD1 C-terminális 16 aminosav hosszú nyúlványának módosításokon kell átmennie (Anbudurai és mtsai. 1994; Nixon és mtsai. 1992). A CtpA proteáz hasítja ezt a C-terminális nyúlványt, létrehozva egy

átmeneti D1 (iD1) formát, amelynek így még mindig marad egy 8 aminosavnyi C-terminális része (Komenda és mtsai. 2007a). Ez az átmeneti forma főleg a minimális reakcióközponttal (RC: psbI+iD1+D2+Cyt b₅₅₉) asszociálható (Nixon és mtsai. 2010). Annak részleteire, hogy a D1 alegység a PSII komplexbe egész pontosan hogyan épül be nincsenek kísérletes adatok, viszont az ismert, hogy a folyamat maga nagyon gyors. Komenda és munkatársai (Komenda és mtsai. 2004) radioaktívan jelölt D1 alegységek segítségével kimutatták, hogy a TM-ban sem a D1, sem a pD1, sem pedig az iD1 nem halmozódik fel nagy mennyiségben a minimális reakcióközpontokban (RC) vagy szabadon. A D1 prekursorok kiemelkedően az RC47 kialakításában vesznek részt, ami az átírással párhuzamosan zajló beépülésre utal (Komenda és mtsai. 2004; Zhang és mtsai. 1999). Az említett D1, pD1 és iD1 termékek felhalmozódnak viszont az *ftsH* mutánsokban, ami egy szelektív, átírás utáni szerepet tulajdonít a proteáznak (Komenda és mtsai. 2006). Ugyancsak fontos szerepet tulajdonítanak az átírás utáni folyamatokban az YCF48 fehérjének, amely stabilizálja a pD1 alegységet és elősegíti a reakcióközpont összeállítását (Komenda és mtsai. 2008). A PsbH a CP47 alegységhez kötődik és részt vesz a D1 fehérje átírás utáni módosításában és beépítésében (Komenda és mtsai. 2005). PsbH alegység hiányában a *Synechocystis* sejtek érzékenyebbek a fotoinhibícióra, mivel e fehérje nélkül kevésbé hatékony a PSII javítási ciklusa amiatt, hogy a D1 nem képes beépülni a komplexbe (Komenda és mtsai. 2002; Komenda és mtsai. 2005). A PsbH alegység fontosságát hangsúlyozza a gyakori szintézise is (Bergantino és mtsai. 2003).

1.1.3.1.3. Pigmentek szerepe a PSII javításában

A PSII alegységeinek komplexszé való összeállása egy összetett, lépésekben zajló folyamat, amire jelentős mértékben hatással vannak az illető sejtben szintetizálódott pigmentek. Így például *Synechocystis*-ben β -karotin szükséges a működőképes PSII komplex összeszereléséhez (Masamoto és mtsai. 2004). Klorofill-a hiányában nem jelennek meg PSII komplexek a TM-ban, viszont jelen lehetnek az alegységek átmeneti formái mint például az iD1 (Wu és Vermaas 1995). A klorofill bioszintézisében résztvevő NADPH-protoklorofillid oxidoreduktáz (POR) enzimmel asszociálható és a TM-hoz kötődő Pitt fehérje (Slr1644) hiányában csökken a *Synechocystis* klorofill-bioszintézise (Schottkowski és mtsai. 2009a). A Pitt fehérje membrán lokalizációja pedig nagymértékben függ a PSII bioszintézisében igen fontos PratA fehérje jelenlététől (Schottkowski és mtsai. 2009b), amelyről kimutatták, hogy a D1 fehérjével asszociálható és szükséges ennek módosításához (Klinkert és mtsai. 2004; Schottkowski és mtsai. 2009a). Ezeknek fényében elképzelhető, hogy a *Synechocystis* sejt klorofill szintézise a TM közvetlen közelében zajlik, és D1 fehérje és a klorofill szintézisének

összehangolása valószínűleg a D1 translációja során történik (He és Vermaas 1998). A klorofill nem képződik olyan gyorsan újra, mint a D1 fehérje (Vavilin és mtsai. 2005), így feltételezhető, hogy egyrészt a klorofill molekulák részben újrahasznosulnak (Vavilin és Vermaas 2007), másrészt pedig, hogy az újrahasznosulás folyamatában ideiglenesen egy, a PSII komplex éppen szétszerelődött, és pótlódó alegységeitől különböző fehérjéhez kötődve raktározódnak. Ez utóbbi szerep betöltésére az egyik jelölt a CAB-szerű fehérjék családja, amelynek egyes tagjai a PSII-vel, azon belül is a CP47 alegységgel asszociálhatók (Kufryk és mtsai. 2008; Promnares és mtsai. 2006). A magasabbrendű növényekből ismert klorofill kötő fehérjékhez (CAB) hasonló, és öt példányban (Funk és Vermaas 1999) a *Synechocystis*-ben is megtalálható, kis CAB-szerű fehérjék (SCP) képesek klorofill molekulát kötni (Storm és mtsai. 2008). Az SCP-k hiánya lerövidíti a PSII komplexszel asszociálható klorofill molekulák féléletidejét (Vavilin és mtsai. 2007) és csökkenti a sejtek klorofill tartalmát a tetrapirrol bioszintézis befolyásolása által (Xu és mtsai. 2004). Továbbá, valószínűleg ebből kifolyólag csökken a PSII komplexek bioszintézise is (Hernandez-Prieto és mtsai. 2011). Ez utóbbi feltevést támasztja alá az is, hogy a klorofill bioszintézisének megszakítása a POR szintjén negatívan hat a PSII és PSI komplexek TM-beli mennyiségére (Kopečná és mtsai. 2013). Mivel az SCP-k csak viszonylag magas fényintenzitás, illetve a PSII-re nézve stressz körülmények mellett válnak fontos tényezővé feltételezhető, hogy specifikusan csak a javítás folyamatában lévő PSII komplexek klorofill molekuláit kötik ideiglenesen (Vavilin és mtsai. 2007). A klorofill molekulák ideiglenes, apoproteinhez való kötése nemcsak az újrahasznosításuk miatt fontos jelenség, hanem azért is mert a szabad klorofill veszélyes ROS forrást képez a sejtben (Krieger-Liszkay és mtsai. 2008). Az SCP családon kívül más fehérjék is vannak a *Synechocystis*-ben, amelyek potenciálisan klorofill kötő, illetve hordozó szerepet látnak el. A Lila (Slr1544) fehérje specifikusan asszociálható a PSII komplexhez, és az SCP-hez való hasonlósága alapján feltehetően képes klorofill kötésére is (Kufryk és mtsai. 2008). A Pila fehérje elsődlegesen a sejtek motilitásában játszik szerepet (Bhaya és mtsai. 2000), ugyanakkor klorofill molekulák kötésével és szállításával is asszociálhatók (He és Vermaas 1999).

1.1.3.1.4. A PSII összeszerelése

A PSII komplex teljesen újonnan képződött alegységekből való összeállításának lépései többnyire ismertek. Ebben az esetben nem csak a meghibásodott alegységek pótlódnak az amúgy újrahasznosuló komplexben, hanem *de novo* komplex képződés zajlik. A citokróm-_{b559} jelenléte látszólag nem függ más alegységek jelenlététől és nukleációs magként szolgál.

Előbb a D2 fehérje alegységgel hozza létre a D2-Cyt b_{559} komplexet, majd ehhez csatlakoznak a D1 és PsbI alegységek, és együtt létrehozzák a minimális PSII reakcióközpontot (RC,,: PsbI+D1+D2+Cyt b_{559}). Egy következő lépésben bekötődik a CP47 alegység, létrehozva az RC47 komplexet, amely ugyan nem képes kötni a vízbontó komplexet, viszont redox reakciók végbemehetnek rajta. A CP43 alegység kötődésének előfeltétele a CP47 jelenléte, és ez előbbivel, valamint a CP47-el egyidőben bekötődő PsbH-val és a CP43-al egyidőben bekötődő PsbK-val kiegészülve létrejön a monomer PSII alapkomplex (RCC1: PsbK + CP43 + PsbI + D1 + D2 + Cyt b_{559} + CP47 + PsbH) (Nixon és mtsai. 2010). Ehhez a monomerhez kapcsolódik a vízbontó komplex.

A PSII komplex képződésének és általában a TM létrejöttének helyszíne nem teljesen tisztázott. A kísérleti adatok azt mutatják, hogy mind a PSII (D1, D2, Cyt b_{559}), mind a PSI (PsaA, PsaB) komplex alapelemei jelen vannak a plazmamembránban (PM) is (Zak és mtsai. 2001) és olyan mértékben össze vannak szerelve, hogy töltésszétválásra is képesek (Keren és mtsai. 2005). A CP43 és CP47 antennafehérjék viszont kizárólag csak a TM-ban vannak jelen, ezért az összeszerelés végső szakasza feltehetően a TM-ban zajlik (Zak és mtsai. 2001). A pontos hely felkutatásához azonban kétség kívül nemcsak az alegységek jelenlétét, hanem azok képződését illetve módosítását is követni kell. Ebből a szempontból a már említett PratA fehérje jó nyomravezetőnek bizonyult. Ez a fehérje, amely szolubilis és nagyrészt a sejt periplazmájában lokalizálható, a D1 alegység módosításában játszik fontos szerepet (Klinkert és mtsai. 2004; Schottkowski és mtsai. 2009) és befolyással van a PSII összeszerelését szabályzó YCF48 és Slr1471 fehérjék membránbeli elhelyezkedésére (Rengstl és mtsai. 2011). Mindemellett a PratA Mn^{2+} -t köt, és *in vivo* kísérletek szerint szállít a PSII komplexhez (Stengel és mtsai. 2012). A PratA olyan üledékes és sűrűségű membránnal asszociálható, ami különbözik mind a plazma-, mind pedig a TM-tól (Schottkowski és mtsai. 2009). E membránfrakció neve a PratA által meghatározott membrán (PDM). *Synechocystis*-ben a PDM-ben található a legmagasabb klorofill prekursor koncentráció (Hinterstoisser és mtsai. 1993). Mivel a PDM klorofill és D1 fehérje prekursorokat egyaránt tartalmaz, a jelenlegi modell szerint egy bioszintézis-központként működik, amely kapcsolatban áll mind a PM-el, mind pedig a TM-el és ahol részben összeszerelődik a PSII pigment-protein komplex (Nickelsen és Rengstl 2013). Ezzel együtt, valószínűleg a PDM az, amely körbeveszi az elektronmikroszkópos felvételeken látható henger alakú úgynevezett tilakoidközpontokat (van de Meene és mtsai. 2006), amelyekből szétágaznak a TM-ok (Kunkel 1982).

A jelenlegi ismeretek szerint a PSII komplex károsodás utáni javítása és a PSII komplex *de novo* összeállítása helyileg elkülönülő folyamatok, amelyek feltehetően csak az utolsó lépésekben találkoznak. Míg a *de novo* összeállítás feltehetően nagyrészt a PDM-ben

zajlik, több jel is arra utal, hogy a PSII javítása a TM-hez köthető folyamat. Az egyik legfontosabb jel az, hogy az FtsH proteáz, amely eltávolítja a károsodott D1 fehérjét a PSII komplexből csak a TM-ben található meg (Komenda és mtsai. 2006). A másik nagyon fontos támpont az, hogy a pD1 fehérje a nemcsak a PDM-ben, hanem a TM-ben is kimutatható (Schottkowski és mtsai. 2009), ami nagy fontossággal bír, ugyanis a javításhoz részben szétszerelődött PSII komplex, vagyis a RC47, gyorsan destabilizálódhat, ha nem pótlódik a D1. Ez utóbbit kiegészítve, az is alátámasztja a TM-ben zajló javítási ciklus modellt, hogy kísérletekből ismert gyors és hatékony PSII javítási ciklus (Aro és mtsai. 1993; Komenda és mtsai. 2004) nem összeegyeztethető egy olyan lassú folyamattal, amely magába foglalná az összes károsodott makromolekula diffúzióját a TM-ből, a PDM-be. Annál is inkább, mivel a TM meglehetősen sok fehérjét tartalmaz (Kirchhoff és mtsai. 2002; Mullineaux 1999). Ez megnöveli ugyan a fényelnyelés és elektrontranszport hatékonyságát, viszont csökkentheti a fehérjék diffúzióját (Ellis 2001). Ez főleg a nagy komplexekre igaz, mint amilyen a többnyire mozdulatlan PSII (Sarcina és Mullineaux 2004), amely csak bizonyos körülmények között, például magas intenzitású vörös fényben válik mobilissá (Sarcina és mtsai. 2006). A két rendszer közti különbséget legjobban a *Chlamydomonas reinhardtii* algában tapasztalt D1 szintézis szemlélteti: az újonnan összeszerelődő PSII komplex esetében a D1 transzlációs szabályzás alatt áll és a D2 jelenlététől függ, míg a PSII javítási ciklusban ez a szabályzás nincs jelen (Minai és mtsai. 2006).

1.1.3.1.5. A PSII fotoaktiválása

A vízbontó komplex kofaktorainak bekötése, vagyis a PSII komplex fotoaktiválása egy fontos mozzanat, ugyanis amíg a PSII komplex csak a töltésszétválás helyszíne és nem képes vizet bontani, a szingulett oxigén termelésén keresztül fennáll az oxidatív stressz veszélye. A monomer PSII, vagyis az RCC1 komplex összeállása előfeltétele a vízbontó komplex bekötésének (Nixon és mtsai. 2010). A kofaktorok bekötése, mivel a PratA által a Mn^{2+} jelenléte adott, valószínűleg a TM, PDM-hez közeli tartományában történik (Stengel és mtsai. 2012). Ugyanakkor ez a szerkezet valószínűleg csak a TM-be jutva aktiválódik, ahol a töltésszétválás során keletkezett energia elvezetődhet, és így potenciálisan kevés kárt okozhat.

A Psb27 az egyik olyan külső fehérje alegység, amely a CP43 lumenális oldalához kötődve, más alegységek kötődése mellett elősegíti a vízbontó komplex Mn_4CaO_5 kofaktorainak kötődését a fotoinhibíciót követő javítási ciklusban (Nowaczyk és mtsai. 2006; Roose és Pakrasi 2008). Ahhoz, hogy a vízbontó komplex betölthesse szerepét több külső, kis molekulatömegű fehérjének is csatlakoznia kell a PSII komplex lumenális oldalához.

Cianobaktériumoknál ezek a PsbO, PsbP, PsbQ, PsbV és PsbU alegységek, amelyek közül a magasabb rendű növényeknél és algáknál csak a PsbO, PsbP, PsbQ található meg (Bricker és mtsai. 2012). A PsbO alegység az, amely minden oxigéntermelő fotoszintetikus élőlényeknél fellelhető (De Las Rivas és Barber 2004) és amelynek főszerepet tulajdonítanak a vízbontó komplex kofaktorainak stabilizálásában (De Las Rivas és Barber 2004). Az eltérő alegységek változatosságáról és létezésük lehetséges okairól De Las Rivas és munkatársai (De Las Rivas és mtsai. 2007) számolnak be részletesen. A már említett három alegység fontos védelmi szerepet lát el a vízbontó komplex körül, miközben megakadályozzák azt, hogy vizen kívül más oxidálandó szubsztrátok is bejuthassanak a komplexbe (Barber 2012). PsbO nélkül nem dimerizálódik a PSII komplex (Komenda és mtsai. 2010). A PsbV hiányában *Synechocystis*-ben gátlódik a vízbontás (Shen és mtsai. 1995). A PsbO magasfokú konzerváltsága ellenére sincs nagy befolyással a vízbontás folyamatára cianobaktériumokban, viszont hiányában jelentősen megnő ezek fényérzékenysége (Philbrick és mtsai. 1991) és magasabbrendű növényekben gátolt a PSII komplexek működőképes egységgé való összeszerelése (Sang és mtsai. 2005). A PsbU alegység hiánya mellett a *Synechocystis* sejtek normális működést mutatnak, viszont valamelyest csökken az oxigéntermelésük, érzékenyebbé válnak a fény és hőstresszre, valamint csökken a fikobiliszómáktól a reakcióközpontok irányába zajló energiaátadás hatékonysága (Bricker és mtsai. 2012).

A PSII komplexek dimerizációjában elengedhetetlen szerepet játszanak a TM-t átszelő, belső, kis molekulatömegű alegységek. A *Thermosynechococcus elongatus* cianobaktériumon végzett röntgendiffrakciós tanulmányok alapján, a PSII monomerek dimerizációs felületén a PsbL, PsbM és PsbT polipeptidek figyelhetők meg (Ferreira és mtsai. 2004). A PsbL alegység dohányban valóban szerepet játszik a PSII dimerizációjában (Swiatek és mtsai. 2003) és hiánya következtében *Synechocystis*-ben leáll az oxigéntermelés, valamint a sejtek nem képesek növekedésre (Anbudurai és Pakrasi 1993). A PsbM és PsbT együttes hiánya megszünteti a PSII dimerizációját (Bentley és mtsai. 2008), valamint *Chlamydomonas reinhardtii* zöldalgában a PsbT alegység szerepet játszik a PSII komplex összeszerelésének korai lépéseiben is (Ohnishi és Takahashi 2008).

1.2. Fényreceptorok

A fény létfontosságú információkat szolgáltat a fotoszintézisre képes szervezetek számára a környezetükről. Ezt olyan fényérzékeny fehérjék teszik lehetővé, amelyek képesek a fény intenzitását és változó paramétereit kémiai jelekké alakítani. E fehérjék specificitását a

hozzájuk kötődő kromofór molekulák adják, amelyek nélkül csak az ultraibolya tartomány sugarait nyelnék el.

1.2.1. Fitokrómok

A fényreceptorok közül a fitokrómokat írták le elsőként, amint ez többek között Briggs és Olney összefoglalójából is kiderül (Briggs és Olney 2001). A velük kapcsolatos kutatások zöme magasabbrendű növényekre vonatkozik, viszont fotoszintetizáló eukarióta (Suetsugu és Wada 2003) és prokarióta (Yeh és mtsai. 1997) szervezetekben egyaránt megtalálhatók. Eukarióta szervezetekben 3-5 tagú géncsaládok kódolják (Mathews 2006), míg cianobaktériumokban ehhez hasonlóan 1-5 tagú kis géncsaládok felelősek a fitokrómok kódolásáért (Sharrock 2008).

A tipikus fitokróm molekula homodimer, amelyen belül mindkét monomer kovalensen köt egy-egy lineáris tetrapirrol kromofór molekulát. Cianobaktériumok esetében ez a kromofór a fikocianobilin, más baktériumoknál a biliverdin IX α , míg a növényeknél és zöldalgáknál a fitokromobilin tölti be a színanyag szerepét (Rockwell és Lagarias 2011). Szerkezetileg és szerepéből adódóan a fitokróm két részre, fényérzékeny N-terminális és szabályzó C-terminális részre osztható (Montgomery és Lagarias 2002). Az N-terminális szakasz alkotásában és szerepének betöltésében a GAF és PAS tartományok bírnak fontossággal, amelyekhez flavin, flavonoid és tetrapirrol molekulák kötődhetnek.

A prokarióta fitokrómok szerkezete változatosnak mondható, ha az eukarióta szerkezetet tekintjük standard modellnek. Egyeseknél, mint amilyen például a *Synechocystis* Cph2 (Fiedler és mtsai. 2005), hiányozhat az N-terminális PAS-tartomány, míg másoknál a fitokróm csupán a GAF-tartomány jelenlétében is képes betölteni szerepét. Ez utóbbiakat cianobakteriokrómoknak (CBCR) nevezik és jó példa rájuk a *Fremyella diplosiphon* komplementáris kromatikus alkalmazkodását szabályozó RcaE (Kehoe és Gutu 2006).

A fitokrómok jellegzetesen a vörös fény által kiváltott válaszreakciókat közvetítik. Szerepükhöz hozzátartozik, hogy megvilágítás függvényében kétféle szerkezeti állapotban lehetnek jelen. Vörös fény (650-670 nm) elnyelése következtében a Pr alapállapotból a molekula a viszonylag stabil Pfr állapotba kerül. Ez utóbbi távoli vörös fény (705-730 nm) elnyelésére képes, és ennek hatására, illetve sötétadaptáció után visszakerül a Pr alapállapotba (Hughes 2010). A változatos prokarióta szerkezetek változatos fényelnyelési tulajdonságokat hoznak magukkal. A prokarióta fitokrómok fényelnyelése gyakorlatilag a látható fény teljes spektrumát lefedi. A *Synechocystis* CikA alapállapota például az ibolya tartományban (Pv, 400 nm) nyel el, míg a változott szerkezetű állapot a sárga tartományt (Py, 565 nm) képes

hasznosítani (Narikawa és mtsai. 2008). A *Synechocystis* egy másik fitokrómja, a CcaS alapállapota a zöld tartomány (Pg, 535 nm) által szenved szerkezeti változást, míg az utóbbi a vörös tartomány (Pr, 672 nm) fotonjai hatására kerül vissza alapállapotába (Hirose és mtsai. 2008). A szerkezeti változás, amely megváltoztatja a kromofór fényelnyelő tulajdonságát, indítja el a jelátviteli folyamatot. Ennek forrása a molekula C-terminális része.

Synechocystis sejtekben több fitokróm és fitokrómhoz hasonló molekula is előfordul: Cph1, Cph2, CcaS, PlpA, CikA, TaxD1, RGS.

1.2.2. UVR8, az UV-B receptor

Annak ellenére, hogy a magasabbrendű növények specifikus UV-B érzékelése régen is ismert volt, csak a közelmúltban sikerült azonosítani a közvetítő fényreceptort. Az UVR8 molekulát már 2002-ben azonosították *Arabidopsis*-ban (Kliebenstein és mtsai. 2002), viszont döntő bizonyítékokat, miszerint ez egy specifikus UV-B receptor, csak 2009 után publikált tanulmányok hoztak (Favory és mtsai. 2009; Rizzini és mtsai. 2011). A fehérje konzervált szekvenciája számos magasabbrendű fotoszintetikus szervezetben előfordul (Tilbrook és mtsai. 2013), viszont tulajdonságait eddig csak *Arabidopsis*-ban vizsgálták.

Az UVR8 fehérje UV-B sugárzás hiányában homodimerként van jelen az illető szervezetben. UV-B hatására, azonban monomerizálódik, és a monomerek pedig szignáltranszdukciós utat indítanak azáltal, hogy kölcsönhatásba lépnek a COP1-el (Constitutive Photomorphogenesis 1), amely egy E3 ubikvitin ligáz és több jelátviteli út fontos eleme. A COP1-nek többek között a HY5, HYH és HFR1 transzkripciót szabályzó molekulák lebontásában van szerepe. Az UV-B sugárzást specifikusan felfogó kromofór szerepét az UVR8 számos triptofán aminosav alegysége tölti be (Rizzini és mtsai. 2011). A keletkezett monomerek dimerizációjában és ezáltal a UV-B által indukált szignáltranszdukció szabályzásában specifikus szerepet töltenek be RUP1 és RUP2 (Repressor of UV-B Photomorphogenesis) fehérjék (Heijde és Ulm 2013).

Synechocystis-ben és általában cianobaktériumokban mindeddig nem sikerült UVR8-at vagy szekvenciájában hasonló fehérjét kódoló gént azonosítani.

1.2.3. Fototropinok

A fototropin a növények egyik kék fény receptora, amelyet elsőként az *Arabidopsis* *nph1* (non-phototropic hypocotyl 1) mutánsában írták le (Liscum és Briggs 1995). Innen kapta a csoport a nevét. Az Nph1 egy PM-hez kötődő fehérje, amely fontos szerepet játszik az

Arabidopsis legtöbb kék fényfüggő fototropizmusában. A fototropinok szerepéről és szerkezetéről részletesen többek között Briggs és Christie 2002-es valamint Kagawa 2003-as cikkében olvashatunk (Briggs és Christie 2002; Kagawa 2003).

A fototropinok körülbelül 120 kDa nagyságú fehérjék, amelyek 2 N-terminális PAS-tartománnyal és egy C-terminális szerin-treonin kináz tartománnyal rendelkeznek (Huala és mtsai. 1997). Az előbbieket LOV-tartománynak is nevezik, mivel hasonló szerkezetet mutatnak olyan fehérjékkel, amelyek fehérje-fehérje kölcsönhatásokban játszanak szerepet és amelyek szabályzásában szerepet játszik a fény, oxigén és elektromos feszültség (Huala és mtsai. 1997). Alapállapotában a fototropin fehérje két flavin mononukleotid (FMN) molekulát köt nem kovalensen (Christie és mtsai. 1999). Szerepet játszanak a csíranövények fototropizmusában, a sztómányílások szabályzásában és a kloroplasztiszok sejten belüli mozgásában (Kagawa 2003). *Synechocystis*-ben ezidáig nem sikerült fototropint vagy szekvenciájában hasonló fehérjét kódoló gént azonosítani.

1.2.4. A kriptokróm/fotoliáz fehérje család

A kriptokrómok és fotoliázok magasfokú szekvencia-hasonlóságot mutató fehérjék. Míg a fotoliázok fényfüggő DNS-javító enzimekként működnek, a kriptokrómok többnyire jelátviteli molekulaként hasznosulnak (Chaves és mtsai. 2011; Müller és Carell 2009). A magasfokú szekvencia-hasonlóság ellenére a kriptokrómok nem képesek DNS-javításra, ami a két molekula aktív helyein jelentkező apró, de fontos szerkezeti különbségeknek tulajdonítható (Mees és mtsai. 2004; Pokorny és mtsai. 2008).

1.2.4.1. Kriptokrómok

Az első kriptokróm molekulát alig több mint két évtizede azonosították (Ahmad és Cashmore 1993), mindazonáltal a növények kék fényre adott reakciói, amelyeket többek között a kriptokrómok is közvetítenek, már jóval azelőtt ismertek voltak (Gressel 1979).

A kriptokrómok jellemzően flavin kromofórt tartalmazó kék fény receptorok. A növényi kriptokrómok többnyire kék fényre adott válaszreakciókat közvetítenek, amelyek többek között a növények naphossz-érzékelését is szabályozzák (Yu és mtsai. 2010). Ezek széles körben elterjedtek, előfordulnak egyszikűekben (pl. rizs, *Oryza sativa*), kétszikűekben (pl. paradicsom, *Solanum lycopersicum*), mohában (pl. *Physcomitrella patens*), harasztban (pl. *Adiantum capillus-veneris*), algában (pl. *Chlamydomonas*) (Imaizumi és mtsai. 2000; Imaizumi és mtsai. 2002; Ninu és mtsai. 1999; Perrotta és mtsai. 2001; Small és mtsai. 1995).

Az állatokban előforduló kriptokrómok két csoportra oszlanak. Az I-es típusú kriptokrómok, a növényekéhez hasonlóan fény receptorként működnek (Zhu és mtsai. 2005). Ilyen molekulát találunk pl a *Drosophila*-ban (Emery és mtsai. 1998). A II-es típusú kriptokrómok fénytől független génátírás-gátló szereppel bírnak (Yuan és mtsai. 2007). Ez a molekula emlősökre és más gerincesekre egyaránt jellemző: *Xenopus laevis*, *Gallus gallus*, *Mus musculus*, *Homo sapiens* (Lin és Todo 2005). A vizsgált rovarok többsége mindkét típusú kriptokrómmal rendelkezik (pl *Danaus plexippus*), csakúgy, mint a zebrahal (*Danio rerio*) (Kobayashi és mtsai. 2000; Zhu és mtsai. 2008).

1.2.4.1.1. A kriptokrómok szerkezete

Szerkezetileg a legtöbb kriptokróm molekula két fő tartományra osztható. Az N-terminális PHR régió (Photolyase-Homologous Region) jelentős hasonlóságot mutat a fotoliáz enzimek N-terminális régiójával (Todo 1999). Kromofórok kötésében és a kriptokrómok dimerizációjában játszik szerepet (Sang és mtsai. 2005). A C-terminális régió nyúlványa (CCE) viszont csak a kriptokrómokra jellemző, fotoliáz fehérjéken nem fordul elő (Sancar 2003). Ha a nyúlványban mutációk lépnek fel a kriptokrómok elvesztik szabályozó képességüket, ami arra enged következtetni, hogy a kiinduló jelátviteli utak forrása a CCE (Ahmad és Cashmore 1993; Chaves és mtsai. 2006; Yang és mtsai. 2000). A CCE hosszúsága fajtól függően néhány tíz (*Drosophila*) és néhány száz (*Chlamydomonas*) aminosav között változik. A kriptokrómok és fotoliázok közös gyökereit a szekvencia-hasonlóság mellett az azonos kromofór molekulák kötése is megerősíti. A PHR régió nem kovalensen köt egy flavin adenin dinukleotidot (FAD) (Lin és Todo 2005), ami megegyezik a fotoliázok elsődleges kromofórával (Öztürk és mtsai. 2008). Ezzel együtt egyes kriptokrómoknál (pl *Arabidopsis* 1-es kriptokrómja, AtCry1) egy második kromofór, az 5,10-metenil tetrahidrofolát (MTHF) is kötődik (Selby és Sancar 2006).

A kriptokrómok, fajtól függetlenül, minden szövetben kifejeződnek (Ahmad és Cashmore 1993; Lin és Todo 2005).

Eukarióta sejtekben a kriptokrómok jellegzetesen a sejtmagban vannak jelen és a génátírást szabályozzák, viszont, ahogy ezt az emberi retinában is kimutatták a citoszólban is előfordulhatnak (Thompson és mtsai. 2003). Az I-es és II-es típusú állati kriptokrómok a cirkadián óra fényfüggő és fénytől független szabályzásában töltenek be fontos szerepet (Emery és mtsai. 1998; van der Horst és mtsai. 1999). A növényi kriptokrómok szerepkörét legrészletesebben *Arabidopsis*-ban tanulmányozták. Csírázás közben számos kulcsfontosságú folyamat áll kriptokróm szabályzás alatt: hipokotil megnyúlása, a sziklevelesek megnyúlása,

kloroplasztiszok fejlődése, a sztóma járulékos sejtjeinek fejlődése. Az előbbieken túl kiemelt szerepe van a virágzás szabályozásában, valamint a napszak hosszának érzékelésében és közvetítésében, vagyis a cirkadián óra szabályzásában (Emery és mtsai. 1998; Harmer 2009).

Az *Arabidopsis*-ban kifejeződő kriptokrómok (AtCry1 és AtCry2) génjeinek átírása cirkadián szabályzás alatt áll, habár ez csak kis amplitúdójú változásban nyilvánul meg (Harmer 2009). Paradicsomban és *Chlamydomonas*-ban nem fényfüggő a kriptokrómok kifejeződése, míg például a csírázó harasztban jelentős pozitív szabályzást mutat a kék és vörös fény (Imaizumi és mtsai. 2000; Perrotta és mtsai. 2000; Small és mtsai. 1995). Az AtCry2 esetében a kék fény negatív szabályzást mutat (Yu és mtsai. 2009), az AtCry1 fehérje mennyisége pedig fénytől független (Lin és mtsai. 1998).

1.2.4.1.2. A kriptokrómok szerepe

A kriptokrómok jelátviteli folyamatainak értelmezése két modell alapján történhet. A molekulák kék fény hatására redox és szerkezeti változásokat szenvednek, amelyek külön-külön és/vagy együttesen jelátviteli folyamatokat indítanak el. A kék fény fotonját elnyelve az oxidált FAD^+ kromofór gerjesztett állapotba kerül, ami egyszeresen redukált szemikínonokat (FADH^+ vagy $\text{FAD}^{\bullet+}$) vagy kétszeresen redukált hidrokínonokat (FADH^+ vagy FADH_2) eredményez (Öztürk és mtsai. 2008). A fotoliáz enzimeknél az így létrejött gerjesztett és redukált FAD formák szolgáltatják az elektront a már kötött DNS molekulán található CPD képlet felbontásához (Sancar 2003; Thiagarajan és mtsai. 2011). Az egyik jelátviteli elmélet alapján a kriptokrómok aktivitása ehhez, a kék fénytől függő redox állapotukhoz köthető (Banerjee és mtsai. 2007; Bouly és mtsai. 2007). Ez esetben a jelátvitel eleme a szemikínon $\text{FAD}^{\bullet+}$ gyök által szolgáltatott elektron lenne, amely leadása után a FAD visszakerülne oxidált kiindulási állapotába, ezzel bezárva a fotociklust (Yu és mtsai. 2010). Ezzel együtt, kék fény nem csak a kromofórok redox változásához járul hozzá, hanem hatására foszforilálódnak a kriptokrómok. Ez a jelenség elengedhetetlen az aktivitásukhoz (Shalitin és mtsai. 2003). Ugyancsak fényfüggő folyamatban szerkezeti változások lépnek fel a CCE-ben (Partch és mtsai. 2005), amelyről kimutatták, hogy részt vesz génszabályzást eredményező fehérje-fehérje kölcsönhatásokban (Wang és mtsai. 2001; Yang és mtsai. 2001). Ezek a fehérje-fehérje kölcsönhatások adják az alapját a másik jelátviteli elméletnek. Egyes elképzelések szerint a foszforiláció által létrehozott elektrosztatikus állapot befolyásolja a kriptokrómok és más fehérjék közti kölcsönhatásokat, illetve hatására a PHR és CCE tartományok szétválhatnak, ami szintén jelátvitelt képezhet (Yu és mtsai. 2007; Yu és mtsai. 2009). *Arabidopsis*-ban 3 fehérjét (fitokróm A: PhyA, COP1, CIB1) azonosítottak,

amelyekről kimutatták, hogy fizikai kölcsönhatásba lépnek a kriptokrómokkal (Ahmad és mtsai. 1998; Liu és mtsai. 2008; Wang és mtsai. 2001). Ezek közül a COP1 különösen fontos mivel fényfüggő módon több ismert, transzkripciót szabályzó molekula (HY5, HYH, HFR1) lebontását célozza (Yu és mtsai. 2010). Rajta keresztül integrálódhat a kriptokrómok által elnyelt kék fény hatása, génszabályozást eredményezve (Wang és mtsai. 2001). Az AtCry1 és a COP1 közti kölcsönhatás előfeltétele a kriptokróm homodimerizációja (Sang és mtsai. 2005). A kék fénynek feltételezhetően nem a kölcsönhatás létrejöttében van szerepe (Wang és mtsai. 2001; Yang és mtsai. 2001), hanem a kötődés után a kriptokróm molekulán bekövetkezett konformáció változás által fejti ki a gátló hatását a COP1-re (Li és Yang 2007). Az *Arabidopsis* kriptokrómjai a COP1-en keresztül a PhyA lebontásában és ezzel a stabilitásában is szerepet játszhatnak (Debrieux és mtsai. 2013).

Jelenleg az állati modellek jelátviteli útjai részletesebben ismertek, mint az *Arabidopsis* modell hasonló fehérje-fehérje kölcsönhatásai. *Drosophila*-ban és egérben a kriptokrómok más, génátírást szabályzó fehérjékkel együtt génátírást közvetlenül serkentő illetve gátló komplexeket hoznak létre (Ceriani és mtsai. 1999; Griffin és mtsai. 1999; Kume és mtsai. 1999). Ezek lehetnek fényfüggők, mint a *Drosophila* dCRY-TIM/PER komplexe (Peschel és mtsai. 2009), vagy akár fénytől függetlenek, mint például az egér mCRY-PER komplexe (van der Horst és mtsai. 1999).

1.2.4.2. Fotoliázok

A DNS fotoliázok olyan flavoenzimek, amelyek elektronátviteli reakciók segítségével fényfüggő javítást katalizálnak az UV sugárzás által károsított DNS molekulán. Az elektronátviteli reakciókhoz szükséges energiát a kék és az UV-A tartomány fotonjai biztosítják (Sancar 2008). Hatása, vagyis a fényreaktiváció, már régről ismert: megfigyelték, hogy az UV sugárzásnak kitett *Streptomyces griseus* ATC3326 telepek túlélését jelentős mértékben növeli a az UV stressz utáni napfény (Kelner 1949). E hatás alapján sikerült Rupert és munkatársainak először leírni az enzimet (Rupert és mtsai. 1958).

Szubsztrátjuk alapján két fő fotoliáz csoportról beszélhetünk: a ciklobután pirimidin dimereket (CPD) kijavító CPD-fotoliázokról valamint a (6-4)-típusú dimereket eltávolító (6-4)-fotoliázokról (Kanai és mtsai. 1997). Szerkezetileg a két fotoliáz típus nagy hasonlóságot mutat, esetenként szekvencia alapján sem lehet megkülönböztetni őket.

1.2.4.2.1. A fotoliázok szubsztrátja

A DNS fényelnyelése az UV tartományban a legintenzívebb (Markovitsi és mtsai. 2010; Ravanat és mtsai. 2001). UV-B hatására többféle káros képlet is kialakulhat a DNS molekulán, amelyek közül a leggyakoribbak a szomszédos pirimidinekből keletkező CPD és a (6-4) típusú dimer illetve ennek Dewar-izomerje (Sancar 2008). Gyakoriságuknál fogva ehhez a két képlethez, és ezen belül is főleg a CPD-hez (70-80% -a az összes UV sugárzás által létrehozott károsodásnak) lehet jelentős biológiai hatást hozzárendelni (Sancar 2008; Weber 2005; You és mtsai. 2001). Annak ellenére, hogy ez egy széleskörben elfogadott adat, a CPD-ek mutagenitásának dominanciáját *in vitro* kísérletek kérdőjelezzik meg (Taylor és O'Day 1990), míg más tanulmányok arra engednek következtetni, hogy a (6-4) típusú dimerek hatékonyabban gátolják a DNS polimerázt, mint a CPD-ek (Horsfall és Lawrence 1994). Az UV-indukált pirimidin dimerek káros hatása abban nyilvánul meg, hogy szerkezetüknél fogva akadályozzák a DNS és RNS polimerázok működését. Ily módon átírás és replikáció során, nem megfelelő nukleotidok is beépülhetnek a keletkező szekvenciába, ezzel mutációkat okozva (Donahue és mtsai. 1994; Otsushi és mtsai. 2000). E mellett a pirimidin dimerek akár teljesen le is állíthatják a replikációt, ami sejthalálhoz vezethet (Sancar 2008).

Annak ellenére, hogy nem sokkal a CPD fotoliáz leírása után izolálták a szubsztrátumát is (Beukers és Berends 1960), a pirimidin dimerek kialakulásának kinetikája a mai napig nem teljesen tisztázott (Markovitsi és mtsai. 2010). Eddigi tanulmányok szerint az UV-indukált dimerizáció, vagyis a cikloaddíciós fényreakció, pikoszekundumos időtartományban zajlik, a pirimidin monomerek szingulett és/vagy triplet gerjesztett állapotának közbenjárásával (Kwok és mtsai. 2008; Schreier és mtsai. 2009). A folyamat hatékonyságát pedig, többek között a DNS kettős hélix szerkezete is befolyásolja (Schreier és mtsai. 2009).

Az UV sugárzás okozta károsodások kijavítására eukariótákban (Kunz és mtsai. 2005) és prokariótákban, többek között *Synechocystis sp* PCC 6308-ban (O'Brien és Houghton 1982) is jelen van a DNS excíziós javítási mechanizmus. Ez a legelterjedtebb és számos fajnál az egyetlen DNS javítási mechanizmus, viszont általában egy több tényezős bonyolult folyamatsort takar. Ezzel ellenben a fényreaktivációhoz csak egyetlen fehérjére, a fotoliázra van szükség és e mellett energetikailag is előnyösebb az excíziós javításnál. A CPD fotoliázok szekvenciájuk alapján további két alcsoportba sorolhatók. Az I-es típusú CPD fotoliáz prokariótákra, mint amilyen a *Synechocystis* és az *E. coli* (Hitomi és mtsai. 2000; Johnson és mtsai. 1988), valamint egysejtű eukariótákra, mint például a *S. cerevisiae* (Sancar 1985) jellemző. A II-es típusú fotoliázok néhány kivétellel főleg magasabbrendű eukariótákban

fordulnak elő. Ilyen enzim található például *Arabidopsis*-ban (Ahmad és mtsai. 1997), és *Drosophila*-ban (Todo és mtsai. 1994). E kategóriában kivételt képez például az archeobaktérium *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Yasui és mtsai. 1994) és a *Chlamydomonas* (Petersen és mtsai. 1999). A 6-4 típusú fotoliáz, mely szekvencia hasonlóságot mutat az állati kriptokrómmal, jelen van többek között *Arabidopsis*-ban (Nakajima és mtsai. 1998), *Drosophila*-ban (Todo és mtsai. 1996) és *Xenopus laevis*-ben (Todo és mtsai. 1997).

A fotoliázok és kriptokróмок jelenléte faji sajátosság. Míg például a *Drosophila*-ban megtaláljuk a CPD fotoliázt, a 6-4 típusú fotoliázt és a kriptokrómot is, a *Bacillus subtilis* egyik fajta molekulát sem képes előállítani.

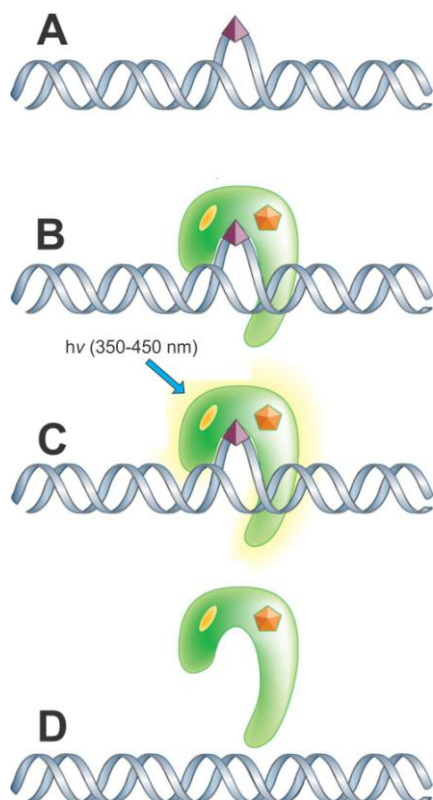
1.2.4.2.2. A fotoliázok szerkezete

A fotoliázok, szubsztrát preferenciától függetlenül, 55-65 kDa nagyságú, többnyire globuláris, monomer fehérjék. Mindegyik fotoliáz nemkovalensen köti a funkciójukhoz elengedhetetlen FAD kofaktort, mint elsődleges kromofórt (Sancar 2008). Az enzim, a kriptokróмокhoz hasonló N-terminális α/β és C-terminális α -helikális szerkezeti részekkel rendelkezik. A FAD a C-terminális tartomány mélyén, egy szerkezeti zsebben helyezkedik el, ahol 14 aminosavval áll kapcsolatban (Park és mtsai. 1995). Ez az árok, a FAD kofaktoral együtt, a fotoliáz enzim aktív hatóhelye. Az aktív hatóhelyen a FAD szokatlan U alakban van jelen, amely szerkezetben az adenin az izoalloxazin gyűrű közelébe (~ 5 Å) kerül, és amely feltehetőleg a szubsztrát irányába történő elektronátadás stabilizálásában előnyös (Sancar 2008). Az elsődleges kofaktor három redox állapotban lehet jelen az enzimen belül: oxidáltan (FAD_{ox}), egy elektron által félig redukáltan ($\text{FADH}^\bullet$, $\text{FAD}^{\bullet-}$) és két elektron által redukáltan (FADH^- , FADH_2). Aktív formája a két elektron által redukált és részlegesen deprotonált FADH^- (Payne és mtsai. 1987). Az elsődleges kromofór mellett a legtöbb fotoliázhoz egy másodlagos kofaktor is csatlakozik, amely eddigi ismeretek szerint legtöbb esetben (pl. *E. coli*, feltehetően a *Synechocystis* is) egy pterin (MTHF), vagy ritkábban (pl. *Synechococcus*) egy flavin (8-HDF, 7,8-didemetil-8-hidroxi-5-deazariboflavin) típusú kromofór. A másodlagos kofaktor szerepe a fotoliáz fényelnyelési spektrumának kibővítése, ami egy hatékonyabb enzimet eredményez. Fotoliázhoz kapcsolódva a pterin és a flavin típusú molekulák abszorpciója egyaránt eltolódik a vörös felé (Johnson és mtsai. 1988; Sancar 2003). A másodlagos kofaktorok a FAD közelében, *E. coli*-ban attól 16.8 Å (Park és mtsai. 1995), *Synechococcus*-ban 17.5 Å (Tamada és mtsai. 1997) távolságra helyezkednek el. FAD-

hoz való közelségük és orientációjuk nagyban befolyásolja az energiaátadás gyorsaságát (~200 ps és ~50 ps) és hatékonyságát (62% és 98%) (Sancar 2003).

1.2.4.2.3. A fotoliázok működési mechanizmusa

A fotoliázok fénytől függetlenül, specifikusan kötődnek a szubsztrátjukhoz (3. ábra). A szomszédos pirimidinek dimerizációja következtében a DNS molekula kettős szála megközelítőleg 30°-os szögben a DNS nagy árka felé hajlik, miközben 9°-kal ki is csavarodik a hélixből (Park és mtsai. 2002). A szekvenszspecifikus DNS-kötő fehérjével szemben



3. ábra: A fotoliáz működésének lépései.
(Friedberg 2003)

- A: A DNS kettős hélixéből kihajló pirimidin dimer.
- B: A fotoliáz specifikusan, fénytől függetlenül kötődik a pirimidin dimerhez.
- C: A fotoliáz UV-A és kék tartományban abszorbeál.
- D: A pirimidin dimer felbontása után a fotoliáz szabadon engedi a DNS molekulát.

a fotoliázok ezt a szerkezeti változást ismerik fel és kötődnek hozzá (Husain és mtsai. 1987). Az enzim pozitívan töltött aktív hatóhelye ionos kötésekkel kapcsolatot hoz létre az érintett és kisebb mértékben a komplementáris DNS szálak foszfát csoportjaival, így stabilizálva a szubsztrát-enzim komplexet (Heelis és mtsai. 1987).

E kötések eredményeként a DNS H-kötései fellazulnak és a pirimidin dimer kifordul a DNS kettős hélixéből, egyenesen a fotoliáz aktív árkába (Park és mtsai. 1995). A kifordult CPD, az aktív zsebben, mindössze 3.1 Å távolságra van a FAD kofaktortól (Mees és mtsai. 2004). A (6-4) fotoliáz szubsztrátja még ennél is közelebb, 2.7 Å-nyire van a FAD-tól (Maul és mtsai. 2008). Az aktív árok belső felületét poláris és nempoláris aminosavak alkotják, amelyek képesek stabilizálni a hidrofób és poláris részekkel egyaránt rendelkező pirimidin

dimert (Heelis és mtsai. 1995). A Trp277 különösen fontos szerepet játszik az aktív hatóhely kialakításában. E aminosav nélkül az *E. coli* fotoliáza elveszti a specifikus kötődési képességét (Li és Sancar 1990).

A CPD javítás működési mechanizmusának feltérképezésében a 265 nm-es átmeneti abszorpciós spektroszkópiának van szerepe, de az irodalomban fellelhető következtetések jelentős része többnyire számítógépes modellekre épül. Jelenlegi ismeretek szerint, amelyről több részletes beszámoló is található (Brettel és Byrdin 2010; Müller és Carell 2009; Sancar 2003), a fotoliázok a következő modell szerint működnek: a pirimidin dimerhez való kötődés után a FAD-nál magasabb extinkciós együtthatójú pterin vagy flavin kromofór, mint elsődleges fényelnyelő, elnyel egy fotont a kék/UV-A tartományból (350-450 nm). A gerjesztési energia Förster-féle rezonanciás energiátadás útján jut el a FADH^- -hoz. A másodlagos kromofórok nem esszenciálisak a fotoliáz működéséhez (Heelis és mtsai. 1987), a FADH^- közvetlen módon is elnyelhet egy fotont de mindkét esetben egy gerjesztett FADH^{-*} jön létre. Ennek életideje megközelítőleg 1 ns. A FADH^{-*} átad ($\sim 0,2$ ns) egy elektront a CPD-nek. Ezáltal a flavin adenin dinukleotid kofaktor ideiglenesen $\text{FADH}^{\bullet}$ -vá oxidálódik (Kao és mtsai. 2005). Az elektronátadás következtében a ciklobután gyűrű kötése feltehetőleg egymás után bomlanak fel, előbb a C5-C5', majd ezt követően a C6-C6' (Chatgililoglu és mtsai. 2007). A kötések felbomlásának kinetikájáról élénk vita folyik, amely keretén belül főképp *in silico* modellek (Masson és mtsai. 2009) és laboratóriumi kísérletek (MacFarlane és Stanley 2003; Thiagarajan és mtsai. 2011) adatai állnak egymással szemben. A kísérleti adatok lassúbb, nano- illetve pikoszekundumos tartományú kötésbomlást támasztanak alá (Thiagarajan és mtsai. 2011) a virtuális modellek által javasolt femtoszekundumos tartománnyal szemben. Kao és munkatársai kísérletei azt mutatják, hogy az elektronleadást követően 560 ps-on belül a FAD kofaktor ismét redukált állapotba kerül, ami arra enged következtetni, hogy a kötések felbomlása maximum ennyi idő alatt történik (Kao és mtsai. 2005). A kötések felbomlása előtti töltésrekombináció ($(\text{T}=\text{T})^{\bullet-} \rightarrow \text{FADH}^{\bullet}$) megakadályozása fontos része a CPD javítási kinetikájának, tehát a $\text{FADH}^{\bullet}$ állapot stabilizációja kulcsfontosságú. Ez utóbbi folyamatban, és ezáltal a DNS javításban, kiemelt szerepe van a fotoliáz Asn378 aminosav komponensének (Xu és mtsai. 2008a). Feltehetőleg a kötésfelbomlás és a töltésrekombináció kompetíciójának kedvezőtlen egyensúlya miatt javítódnak feltűnően alacsonyabb hatékonysággal a C=C dimerek ($\sim 5\%$) a T=T dimerekkel ($\sim 90\%$) szemben (Murphy és mtsai. 2008). A gyűrű felbomlása egy érintetlen timint és egy negatív töltéssel rendelkező timin gyököt eredményez. Az anion timin gyök átadja az elektronját a $\text{FADH}^{\bullet}$ -nak, ami így visszaredukálódik FADH^- -vá, ezzel bezárva a javítási kört

(Sancar 2003). Az újból monomerré vált timineket 50 μ s-on belül engedi szabadjára az enzim aktív zsebe (Espagne és mtsai. 2009).

Fotoliáz aktivitáshoz előzetes feltétel a FAD redukált állapota. A FADH[•] átmeneti állapot helyett bizonyos körülmények között hosszabb ideig stabilizálódhat az enzimben. Ennek redukálásához szükséges elektronokat 3 triptofán aminosav szolgáltatja, amelyek a kofaktor közvetlen közelében helyezkednek el (Aubert és mtsai. 2000). A triptofán általi redukció csak gerjesztett FADH^{*} esetében működik. Ezek az aminosavak erősen konzerváltak, az összes ismert fotoliáz és kriptokróm molekulában jelen vannak (Müller és Carell 2009). Funkciójukat *Synechococcus*-ban egy tirozin is segíti (Aubert és mtsai. 1999). Ugyanakkor, a látszólag fontos szerepük ellenére a triptofán elemek pontmutációja nem gátolja jelentősen az *E. coli* fotoliáz *in vivo* aktivitását (Kavakli és Sancar 2004).

1.2.4.3. Cry-DASH kriptokrómok

A fotoliázok és a növényi valamint az állati kriptokrómok mellé Brudler és munkatársai tanulmánya (Brudler és mtsai. 2003) által egy harmadik kriptokróm csoport is bekerült a köztudatba, amely a DASH-kriptokróm (Cry-DASH) nevet kapta és amely prokariótákban is előfordul. A DASH betűszó a különböző szervezetekben azonosított kriptokrómok és a Cry-DASH szekvencia közötti hasonlóságot hivatott hangsúlyozni (*Drosophila*, *Arabidopsis*, *Synechocystis*, *Homo*). Az elnevezés ellenére muslicában és emberben nincs jelen a Cry-DASH fehérje (Brudler és mtsai. 2003). A DASH-kriptokrómot elsőként *Synechocystis*-ben (Syn-CRY, PhrB) írták le, mint bakteriális kriptokrómot (Brudler és mtsai. 2003; Hitomi és mtsai. 2000). A PhrB genetikai törzsfája azt mutatja, hogy ugyan közel áll az állati kriptokrómokhoz, viszont még közelebbi rokonságban van a fotoliázokkal, és aminosav-szekvenciája alapján, a (6-4)-fotoliázok közelébe rajzolható (Hitomi és mtsai. 2000).

1.2.4.3.1. A DASH-kriptokrómok elterjedése és szerepe

Több mint egy évtizeddel ezelőtti leírásuk óta a Cry-DASH fehérjék nem rendelkeznek egységes szerepkörrel. A kutatások főleg az egyszálú nukleinsavakra kifejtett javító hatásukra fektetik a hangsúlyt, amelyet eddig csak *in vitro* körülmények között sikerült kimutatni.

Néhány tanulmány a növényi kriptokrómokhoz hasonló, cirkadián órát szabályzó szerepet rendel a Cry-DASH fehérjékhez (Brunelle és mtsai. 2007; Facella és mtsai. 2006),

mások az állati kriptokrómok génátírás-szabályzó funkciójához hasonló szerepüket hangsúlyozzák (Heijde és mtsai. 2010). Azonban a szekvencia-hasonlóság ellenére a Cry-DASH molekulák nem követik egyöntetűen sem az állati kriptokrómok jelátviteli vagy átírást szabályzó szerepüket, sem a (6-4)-fotoliázok DNS-javítását. Az *Arabidopsis* Cry-DASH (At-cry3) fehérjéje, amely szekvenciája 50%-ban megegyezik a PhrB fehérjéjével, képes nem specifikusan kötődni a DNS molekulához, viszont nem fejt ki DNS-javító hatást (Kleine és mtsai. 2003). A *Vibrio cholera* Cry-DASH molekulája valamivel alacsonyabb, 38%-os szekvenciális azonosságot mutat a PhrB-al. Specifikusan kötődik az egyszálú poli(dU) és poli(rU) DNS CPD képleteihez és képes kijavítani azokat. Ezt a képességét viszont kizárólag csak egyszálú DNS molekulán fejt ki (Selby és Sancar 2006). Néhány, állatokban előforduló Cry-DASH fehérje is mutat gyenge DNS-javító hatást, így például a *Danio rerio* és *Xenopus laevis* esetében is, viszont a DNS molekulához való specifikus vagy nem specifikus kötődésüket nem sikerült kimutatni (Daiyasu és mtsai. 2004). Egy másik szervezet, a *Ostreococcus tauri* zöldalga OtCPF2 nevű Cry-DASH ortológ fehérjéje specifikusan viszont gyengén kötődik a DNS molekula CPD helyeihez, és a gyenge kötődésnek megfelelően alacsony hatékonysággal javítja is azokat (Heijde és mtsai. 2010).

Jelenleg a *Synechocystis* Cry-DASH fehérjéjét taglaló tanulmányok többsége gyenge fotoliáz aktivitást tulajdonít a fehérjének. A PhrB enzim nem specifikusan és gyengén ugyan, de képes a DNS molekulához kapcsolódni (Brudler és mtsai. 2003). Emellett kimutatták azt is, hogy fotoliáz enzim nélküli *Synechocystis* sejtekben a PhrB jelenléte enyhe, fényindukált kármentesítéssel asszociálható. Ez a jelenség viszont csak *in vivo* volt mérhető *in vitro* nem volt kimutatható (Hitomi és mtsai. 2000). Továbbá a *Synechocystis* *phrA* génjének átírása, amely a fényindukált DNS-javítás jelentős részét végző fotoliáz enzimet kódolja (Ng és mtsai. 2000; Ng és Pakrasi 2001), szignifikánsan megnövekszik ahogy a sejtek exponenciális növekedési szakaszukból átkerülnek a lineáris növekedésbe. Mindeközben a *phrB* gén átírása, amely a PhrB fehérjét kódolja és amely a *phrA* homológja nem mutat szignifikáns változást (Foster és mtsai. 2007). Ez utóbbi adat is azt sugallja, hogy abban az esetben ha a PhrB rendelkezik egy gyenge DNS-javító hatással, az nagymértékben elmarad a PhrA jelentőségétől. Rendes nevelési körülmények között a PhrB hiánya befolyással van 8 gén átírására, ami génátírást szabályzó szerepre utal (Brudler és mtsai. 2003). Ugyanakkor az adatok szórása ebben a tanulmányban elég jelentős ahhoz, hogy PhrB génátírást szabályzó szerepét meg lehessen kérdőjelezni. Kriptokrómokhoz hasonló szerkezetéből adódóan megvizsgálták a *Synechocystis* sejtek fototaxisában betöltött szerepét is. Azt találták, hogy bizonyos sejtvonalakban kék és fehér fényben a PhrB nem játszik szerepet a sejtek fototaxisában (Fiedler és mtsai. 2005). Ezzel ellentétben egy közelmúltban készült tanulmány

alapján a PhrB fontos szereppel bír a *Synechocystis* sejtek UV-A sugárzás hatására fellépő negatív fototaxisában (Moon és mtsai. 2010b).

1.2.4.3.2. A PhrB szerkezete

Szerkezetileg a PhrB egy 58 kDa tömegű fehérje, amely egy α/β és az ehhez kapcsolódó helikális tartományra osztható (Brudler és mtsai. 2003). Az α/β -tartomány az, amely köti a többek között kriptokróm/fotoliáz családra jellemző FAD kofaktort (Hitomi és mtsai. 2000). Ez utóbbi elengedhetetlen a fotoliáz enzimek számára ahhoz, hogy specifikusan a DNS molekula CPD képleteihez kötődhessenek (Öztürk és mtsai. 2008). Szerkezetében, az utóbbi képleten kívül jelen vannak azok az arginin elemek is, amelyek biztosítják a DNS molekula felismerésének feltételeit, viszont az energetikailag hatékony kötődéshez szükséges aminosavak nem konzerváltak. Mindemellett az a szerkezeti és funkcionális árok, amely a fotoliázok esetében pirimidin dimert hivatott befogadni, szélesebb és sekélyebb a DASH kriptokrómoknál, ami kedvezőtlen feltételeket nyújt a DNS javításhoz. A FAD redukálásához szükséges redox kofaktorok ugyan nem hiányoznak, viszont a FAD és a feltételezett CPD szubsztrát közti energiaátadás, más szerkezeti elemeknek köszönhetően, feltehetően kevésbé hatékony a fotoliázhoz képest (Brudler és mtsai. 2003). Aminosav szekvenciája (Brudler és mtsai. 2003; Park és mtsai. 1995; Tamada és mtsai. 1997), valamint abszorpciós spektruma (Hitomi és mtsai. 2000) alapján a PhrB valószínűleg nem képes a fotoliázokra jellemző másodlagos kromofór megkötésére (Sancar 2008). A másodlagos kromofór hiánya ugyanakkor még nem zárja ki a DNS-javítás képességét (Heelis és mtsai. 1987).

Néhány, a közelmúltban megjelent tanulmány a DASH kriptokrómok fényreceptor szerepét hangsúlyozva egy másodlagos kriptokróm jelenlétének bizonyításához szolgáltat adatokat (Huang és mtsai. 2006a; Klar és mtsai. 2007; Moon és mtsai. 2010a; Moon és mtsai. 2010b). E tanulmányok az *Arabidopsis* (At-cry3) és a *Synechocystis* (PhrB) DASH kriptokrómokra összpontosítanak. Kimutatták, hogy a *Synechocystis* pterin kromofórai, a TaxD1-el megegyező fontos szerepet töltenek be a sejtek negatív fototaxisának gátlásában. E hatás a Cph2 funkciójával ellentétes és pterin hiányában a *Synechocystis* sejtek kisebb mértékben reagálnak a vörös fényre ami a vörös fény receptoraival való kapcsolatot is feltételez (Moon és mtsai. 2010a). Ugyanakkor a pterin kromofórok a kék fény mellett feltehetően az UV-receptorok szerepét is betöltik a *Synechocystis* sejtekben (Moon és mtsai. 2010b). Arra is fény derült, hogy a pterinek és hordozó fehérjék UV/kék fény akciós spektruma megegyezik az *E. coli*-ból izolált DASH-kriptokróm abszorpciós spektrumával (Hitomi és mtsai. 2000; Moon és mtsai. 2010b). Mindent egybevetve nem zárható ki, hogy a

PhrB mégis köt egy pterin típusú kromofórt, amit alátámaszt az *Arabidopsis* DASH-kriptokrómja az At-cry3 is, amely spektroszkópiás adatok szerint MTHF-t köt másodlagos kromofórként (Klar és mtsai. 2007). További támaszt nyújt az elméletnek az, hogy a PhrB szerkezetileg képes lenne kötőhelyet biztosítani mind az MTHF, mind a 8-HDF kromofóroknak (Brudler és mtsai. 2003). Ez utóbbit megingatja viszont az, hogy az *E.coli* és a *Synechococcus* fotoliázában megtalálható, az említett kromofórok kötésében fontos szerepet játszó aminosavak többsége nincs jelen a *Synechocystis*-ben (Park és mtsai. 1995; Tamada és mtsai. 1997). A pterin típusú kromofórok fototaxisban betöltött fontos szerepével kapcsolatban megjegyzendő, hogy vannak *Synechocystis* sejtvonalak, amelyek vad típusai egyáltalán nem mutatnak fototaxist kék és/vagy fehér fény alatt (Fiedler és mtsai. 2005)). Egyik tanulmány keretében sem mérték meg az egyes sejtvonalak pterin tartalmát. Annak az elméletnek, miszerint a PhrB másodlagos kromofórként egy pterint köt és a kék fény receptoraként játszik szerepet részben ellentmond az, hogy PhrB hiányában a *Synechocystis* sejtek nem mutattak változást a kék fény alatti fototaxisukban a vad típushoz képest (Fiedler és mtsai. 2005). Ugyanakkor UV-A sugárzás alatt a PhrB feltehetőleg igenis fontos szerepet játszik a *Synechocystis* fototaxisában (Moon és mtsai. 2010a).

Mint a Cry-DASH többi tagjánál, a PhrB esetében is a kutatások során a feltételezett fotoliáz-aktivitása kapta a nagyobb hangsúlyt. Ezzel együtt ezen kutatások mentén más szerepkör is körvonalazódni látszik. Ng és Pakrasi tanulmányában kimutatta, hogy azok a *Synechocystis* sejtek, amelyekben nem volt jelen sem PhrA fotoliáz, sem PhrB érzékenyebbek voltak az UV sugárzásra, mint azok a sejtek, amelyekben jelen volt a PhrB és csak a fotoliáz hiányzott (Ng és Pakrasi 2001). Arra alapozva, hogy a sejtek UV érzékenysége hosszú távon a D1 fehérjeszintézis hatékonyságától függ, feltételezhető, hogy a PhrB fontos szerepet játszik a D1 fehérje génjének átírásában, a hRNS transzlációjában vagy/és a pD1 komplexbe való beépülésében.

2. Célkitűzések

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

- 1, Milyen hatása van a PSII helyreállítási ciklusának működésére a DNS javító enzim fotoliáz (PhrA) hiánya a *Synechocystis sp.* PCC 6803 cianobaktériumban?
- 2, Milyen szerepe van a fotoliázzal homológ PhrB fehérjének az UV-indukált DNS károsítás kijavításában, valamint a PSII helyreállítási ciklusának működésében a *Synechocystis sp.* PCC 6803 cianobaktériumban?

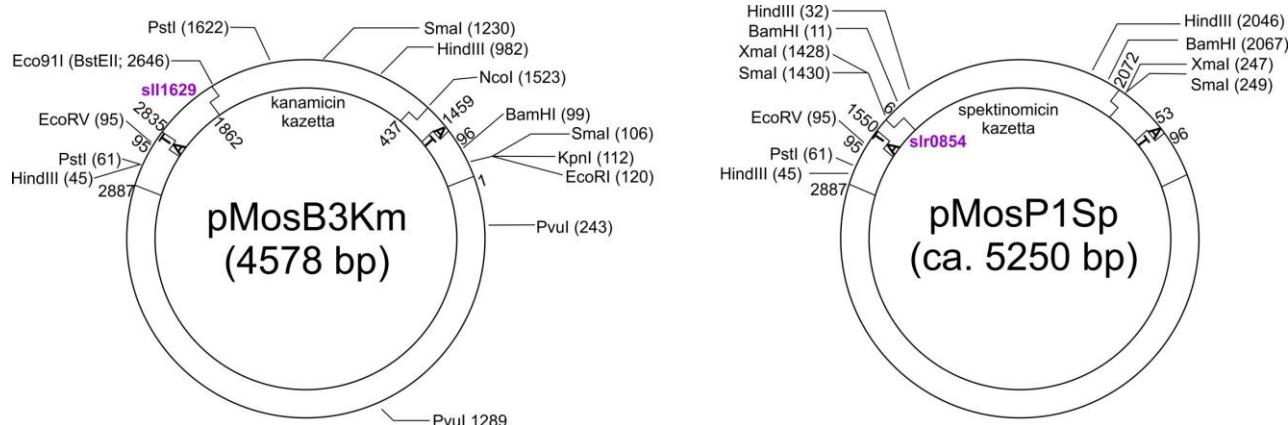
3. Anyagok és módszerek

3.1. Sejtenyészetek

A kísérletekhez a *Synechocystis* sp. PCC6803 cianobaktérium vad típusát valamint ennek a fotoliáz (*phrA*⁻, *slr0854*⁻) és a bakteriális kriptokróm (*phrB*⁻, *sll1629*⁻) mutánsait használtuk. A sejteket folyamatos rázatás mellett (120 rpm) BG-11-es tápoldatban neveltük. Az inkubátorban való nevelés 3%-os CO₂ koncentrációt, állandó 30 °C-os hőmérsékletet és 40 μmol m⁻²s⁻¹ fehér fényű (FF) megvilágítást biztosított.

3.2. A *phrA*⁻ és *phrB*⁻ mutánsok

A *phrA*⁻ és *phrB*⁻ mutánsok létrehozásához a *Synechocystis* vad típusú sejtek pMosBlue plazmid konstrukciókkal lettek transzformálva. A plazmidokban a *slr0854* (*phrA*) és *sll1629* (*phrB*) nyitott leolvasási keretek rendre spektinomicin (pMosP1Sp) és kanamicin (pMosB3Km) kazettákkal lettek megszakítva (4. ábra).



4. ábra: A *phrA*⁻ és *phrB*⁻ mutánsok létrehozásához használt konstrukciók. pMosB3Km a *phrB*⁻ és pMosP1Sp a *phrA*⁻ mutánsához.

A mutánsok szelekciója 20 μg/ml spektinomicin (pMosP1Sp) és 25 μg/ml kanamicin (pMosB3Km) jelenlétében történt.

3.3. Kísérleti és mintavételi beállítások

A kísérletekhez exponenciális növekedési szakaszukban levő sejtenyészeteket használtunk. Sejtvonalanként ez rendszerint 200 ml tenyészetet jelentett. Miután a sejteket ülepítettük (4000 g, 10 min, 24 °C) és friss BG-11 tápoldatba felvettük, 6.5 μg/ml klorofill koncentrációig hígítottuk a tenyészeteket, majd a centrifugálás által okozott mechanikai

stresszből való felépülés érdekében 1 órára visszahelyeztük őket az inkubátorba. Az ultraibolya B (UV-B) és nagy intenzitású FF ($500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) alatt végzett kísérletek 30°C -on zajlottak. A sejtenyészetek négyzet alakú üvegcádákban voltak kitéve a beérkező sugárzásnak, miközben állandó keverés mellett 2.5 centiméteres réteget képeztek. Az ultraibolya C (UV-C) sugárzás kiszűrése érdekében az UV-B lámpát, valamint az üvegcádákat egyaránt 0.1 mm-es Clarfoil cellulóz acetát membránnal (Courtalouds Chemicals, UK) vontuk be, amely nem enged át 290 nm-nél alacsonyabb hullámhosszú sugárzást. Az UV-B sugárzást egy kétcsöves Vilber Lourmat VL-215M lámpa biztosította, míg a magas ($500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) és alacsony ($50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) fotonsűrűségű FF forrása 6 darab 50 W-os Osram Halopar halogén égő volt. Az UV-B sugárzás intenzitását egy 312 nm-es érzékelővel ellátott Cole Parmer Radiometer (97503-00-es modell), míg a FF-ét egy LiCor Photometer (DMP Ltd.) segítségével állítottuk be. A sejtenyészetek felületén mért UV-B sugárzás intenzitása 3.0 W m^{-2} ($\approx 8.0 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) volt, ami a viszonylag magas optikai sűrűségű (Rontó és mtsai. 1989), 2.5 cm vastag szuszpenzió belsejében átlagosan 0.3 W m^{-2} -nek ($\approx 0.8 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) felelt meg.

A friss BG-11-ben felvett sejtek egy óra inkubálás után átkerültek az üvegcádákba, amelyek 30°C -os vízfürdőben ültek. Jellemzően két üvegcádat használtunk egyszerre, egyikben vad típusú sejteket, a másikban pedig az egyik mutáns vonal sejteit tettük ki különböző sugárzásoknak. A kísérleti körülményekhez való alkalmazkodás (állandó keverés, 30°C , légköri CO_2 koncentráció) érdekében a sejtek 60 percig alacsony ($50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) fotonsűrűségű fehér fény alatt keveredtek. Ezek után a sejteket UV-B ($8 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) vagy nagy intenzitású FF ($500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) kezeléseknak tettük ki a fehérjeszintézist gátló linkomicin jelenlétében ($300 \mu\text{g/ml}$), illetve annak hiányában. Az UV-B kezelések fehér háttérfény ($50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) jelenlétében történtek, amely megegyezett a kezelést megelőző adaptációs fényvel. A fehér háttérfény elősegíti a fénykárosodást szenvedett fehérje alegységek szintézisét (Sicora 2003).

Az UV-B és FF jelenlétében zajló kísérletek első szakasza 270 percig tartott. A kísérlet következő szakaszában lekapcsoltuk az UV-B sugárzást és 120 (PhrA kísérletek) illetve 90 percen (PhrB kísérletek) keresztül a sejtek az adaptációs FF-ben ($50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) regenerálódhattak. Az utolsó, 60 percig tartó szakaszban, a fehér fényforrásokat kikapcsolva, csak UV-B sugárzás ($8 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) érte a tenyészeteket.

A magas fotonsűrűségű FF-t ($500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) alkalmazó kezelések, a kísérleti körülményekhez való alkalmazkodási szakaszt követően 90 percig tartottak. Ezután a sejtek újabb 90 percig adaptációs FF-ben ($50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) regenerálódhattak.

A kísérletek során meghatározott időpontokban mintákat vettünk oxigéntermelés meghatározásához, változó klorofill fluoreszcencia méréséhez, hRNS izolálásához, D1 fehérjét tartalmazó TM-ok izolálásához, DNS károsodás megállapításához és genomi DNS tisztításához.

3.4. Fotoszintetikus aktivitás meghatározása

Fotoszintetikus aktivitásra fényimpulzus által indukált fluoreszcenciás mérésekből és oxigéntermelési képességből következtettünk, amely jelenségek betekintést engednek a PSII komplexek elektrontranszport-aktivitásába.

A fényimpulzus által indukált fluoreszcencia mérésekhez alkalmanként 1 ml mintát vettünk. A méréseket, 3 perces sötétadaptálás után, szobahőmérsékleten végeztük 3-(3,4-diklorofenil)-1,1-dimetilurea (DCMU, 10 μ M / 23,3 μ g/ml) jelenlétében illetve ennek hiányában. Telítő fényvillanás után egy FL 3000 Fluorometerrel (Photon Systems Instruments Ltd.) követtük a fluoreszcencia lecsengés paramétereit. A mért paraméterek közül a fluoreszcencia relatív amplitudóját ($F_m - F_0$, $t=0$ -hoz viszonyítva) használtuk a működőképes PSII komplexek mennyiségének becsléséhez. Az adatokat a Fluorwin program 3.6.3.11 verziójával regisztráltuk, a kiértékelésüket Origin-ben (OriginLab) végeztük.

Az oxigéntermelési mérések 30 °C-on zajlottak és a fluoreszcenciás mérésekkel megegyezően alkalmanként 1 ml sejtenyészetet igényeltek. A mintákhoz 2,6-dimetoxi-1,4-benzokinon (DMBQ) elektron akzeptort (0,5 mM) adtunk, majd másfél perces sötétadaptáció után, folyamatos telítő fény ($1500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) mellett mértük az oxigéntermelést. A méréseket egy Clark-elektrod köré épített Hansatech DW2 műszerrel végeztük. A mért értékek megjelenítését és kiértékelését egy házilag készített program vezérelte.

3.5. D1 fehérje stressz-dinamikájának elemzése

TM izolálásához 10 ml sejtenyészetet használtunk. Közvetlenül mintavétel után a sejteket centrifugáltuk (4000 g, 4 °C, 10 min) és 1 ml GM pufferben felvettük. Rendszerint ez az elegy -20 °C-on fagyasztásra került. Az izolálás napján, jégen való felolvasztást és centrifugálást (4000 g, 4 °C, 10 min) követően, a felülúszót eltávolítottuk, a sejteket pedig 0.5 ml GM pufferben felvéve hozzáadtuk a szintén 0.5 ml GM pufferrel átitatott üveggyöngyökhöz (1,65 g, Ø 100 μ m). A mintákat 4 °C-on háromszor 1.5 percig magas frekvencián ráztuk és a rázatások között 1.5 percig jégen tartottuk. Ezek után eltávolítottuk a felülúszót, majd még kétszer átmostuk az üveggyöngyöket, alkalmanként 0.5 ml GM

pufferrel. E folyamat végén mintánként 1.5 ml, sejttörmelékben gazdag GM puffert kaptunk. Eltávolítottuk az elegyből a mosás során átkerült üveggyöngyöket és a nagyméretű sejttörmeléket (4000 g, 4 °C, 2 min), majd a felülúszót új csövekbe helyezve hosszan centrifugáltuk (15.500 g, 4 °C, 20 min). Az így kapott csapadékot 100 µl PM pufferben vettük fel és metanolos kivonással meghatároztuk a klorofill-a koncentrációját ($c_{Chl} = (16.5 \cdot A_{665} - 8.3 \cdot A_{650})$).

A mintákat 6%-os dúsítógélre vittük fel, majd 12 %-os denaturáló akrilamid gélen választottuk el (Barbato és mtsai. 1992). A géltre felvitt minták, hígítástól függően, 50 vagy 20 ng klorofillt tartalmaztak.

Elválasztás után a gél 30 percig Dunn-oldatban ázott, majd elektroblot segítségével a benne vándorolt fehérjéket PVDF (Polyvinylidene fluoride) membránra (Millipore, Immobilon-P) vittük át. A PVDF membránt, az elektroblot-szendvics összeállítása előtt 5 mp-ig metanolban, ezt követően 2 percig MilliQ vízben, majd 5 percig Dunn-oldatban áztattuk. A membrán szabad területeit zsírszegény tejpor és TTBS puffer 10 %-os (w/v) oldatával blokkoltuk 1 órán keresztül. A blokkolás után 2*5 percig, egyenként 50 ml TTBS pufferrel mostuk majd inkubáltuk az elsődleges, nyúlban termelt poliklonális PsbA C-terminális antitesttel (AS05 084, Agrisera), amelyet 1:8000 arányban tartalmazott a folyamatban használt TTBS puffer. Az inkubálás szobahőmérsékleten 2 órát, 4 °C-on 12-14 órát tartott. Az elsődleges antitesttel való inkubálást újabb TTBS pufferes mosások követték, 5x 5percig, egyenként 50 ml TTBS pufferrel. A mosások után a membránt 37 °C-on, 1 órán keresztül inkubáltuk kecskében termelt anti-nyúl IgG, alkalikus foszfatáz aktivitású másodlagos antitesttel (1:5000, A3687, Sigma). Az inkubálás végén a membránt 50 ml APB pufferrel mostuk 5 percig, majd 15 ml APB-ben oldott 100 µl NBT és 50 µl BCIP oldat segítségével előhívtuk. A membránokat beszkeneltük, a fehérje sávokat pedig ImageJ segítségével számszerűsítettük (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

GM, Grinding Medium: 50 mM MES, 5 mM Na₂EDTA, 1 mM benzamidin, 2 mM aminokapronsav, 1 mM Fenil-metilszulfonil-fluorid (PMSF, etanolban oldva).

PM, Preparation Medium: 50 mM Tris, 1 M szacharóz, pH 7.5.

Katód puffer: 0.02 Tris, 0.2 M glicin, 0.1% (w/v) SDS, pH 8.3.

Anód puffer: 0.02 Tris, 0.2 M glicin, pH 8.3.

Dunn-oldat: 3 mM Na₂CO₃, 10 mM NaHCO₃, 10% (v/v) metanol.

TBS (Tris-Saline Buffer) oldat: 10 mM Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.6, Tween.

APB (Alcaline Phosphate Buffer) oldat: 0.1 M Tris, 0.15 M NaCl, 0.5 M MgCl₂, pH 9.8.

NBT (Nitro Blue Tetrazolium) oldat: 50 mg/ml 70 % dimetilformamidban.

BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate) oldat: 50 mg/ml 100 % dimetilformamidban.

3.6. Fehérjék radioaktív jelölése és elválasztása 2D gél módszerrel

A fehérjék radioaktív jelölése [35S]Met és [35S]Cys (Trans-label, MP Biochemicals, Irvine, USA) keverékével történt a (Komenda és mtsai. 2008) által leírt módszer szerint. A sejtek (75 µg Chl) ezek után 20 perces magas intenzitású FF (500 µmol m⁻²s⁻¹) kezelésnek voltak kitéve, 29 °C -on. A kezelés után a kísérleti elegyből vett minták folyékony nitrogénnel lettek fagyasztva. TM izolálásához a felolvasztott sejtek tilakoid puffer oldattal lettek mosva és üveggyöngyökkel feltörve. A feltört sejtek centrifugálás után (20.000 g, 15 min, 4 °C) újra tilakoid pufferbe lettek felvéve.

A membránfehérjék natív körülmények közti elválasztása (CN)-PAGE-el történt a (Wittig és Schagger 2008) által leírtakkal megegyezően. Az izolált TM minták 1% *n*-dodecil-β-maltozidban lettek felvéve és 4-14%-os poliakrilamid gélen elválasztva. Az elválasztott fehérjékről gélkép készült és meg lett határozva a klorofill fluoreszcenciájuk (Fuji LAS 3000 szkennel), majd a mintasávok alapján a gél fel lett szeletelve. A szeletek ezután 30 percen keresztül Tris oldatban lettek inkubálva és ennek végén mindegyik szelet egy 12–20%-os lineárisan gradiens poliakrilamid gélre (7M urea) (Sobotka és mtsai. 2008) lett helyezve. Így a TM elemei a második dimenzióban is elválasztódtak. Szkennelés után (Fuji LAS 3000 szkennel) a gél ki lett szárítva és Phosphorimager lapon elő lett hívva. Az előhívott felvétel is be lett szkennelve (Storm, GE Healthcare, Vienna, Austria). A fehérjék azonosításához az illető sávok ki lettek vágva a gélből és tömegspektrometriás analízisnek lettek alávetve (APEX-Qe 9.4T FT-MS, Bruker Daltonics, Billerica, MA) (Komenda és mtsai. 2012).

Tilakoid puffer: 25 mM MES/NaOH, pH 6.5, 5 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂ és 20% glicerol.
Tris oldat: 25 mM Tris/HCl, pH 7.5, 1% SDS (w/v), 1% ditiotritol.

3.7. Génexpresszió vizsgálatok

A *psbA2* és *psbA3* transzkriptek vizsgálatához össz-RNS-t tisztítottunk a kezelés alatt levő sejtenyészetekből, majd ezt mintaként használva reverz transzkripció reakcióban komplementer DNS-t (cDNS) szintetizáltunk. Az így kapott cDNS-t Q-PCR reakcióban használtuk templátként és a felszaporodó amplikonok C_T értékét az RNáz B alegységét kódoló *rnpB* C_T értékeihez viszonyítottuk. Ez utóbbit, konstitutív kifejeződése révén, kontroll génként használtuk. Ezen felül az ábrákon látható transzkript szintek értékei a kezeletlen minták C_T értékeire vannak normálva. Az értékek 3, egymástól független kísérlet adataiból származnak. Mindegyik adatpont legalább 3 ismétlés eredménye.

RNS izolálásához mintánként 10 ml sejtenyírást használtunk. A mintákat azonos térfogatú, 5% fenolt (v/v) tartalmazó etanolban fixáltuk és centrifugáltuk (10000 g, 10 min, 4 °C). Az így ülepített sejteket 500 µl reszuszenziós pufferben mostuk, amit újabb centrifugálás (13000 g, 5 min, 4 °C) és a felülúszó eltávolítása után 250 µl reszuszenziós puffer hozzáadása követett. Ehhez az elegyhez 37,5 µl EDTA-t (0.5 M) adtunk és 3 fagyasztás-felolvasztásnak (-20/+4 °C) vetettük alá. A felnyílt sejtek elegyéhez 375 µl lízis puffert adunk és ebből forró-fenol módszerrel tisztítottunk össz-RNS-s (Mohamed és Jansson 1989). Ehhez 65 °C-ra melegített vízfürdőben kevertük óvatosan a mintákat, a szintén 65 °C-ra hevített, 700 µl vízzel telített fenollal. Ezt 3x3 percig ismételtük, minden alkalom végén, 2 perces jegelés után, lecentrifugálva (13000 g, 5 min, 4 °C) a mintákat, a felülúszókat pedig új csövekben, újabb adag fenollal keverve. Egy utolsó lépésben a felülúszóhoz 700 µl kloroformot adtunk, óvatosan kevertük és centrifugáltuk (13000 g, 5 min, 4 °C). Az így kapott felülúszóhoz LiCl-ot (2.5 M) adagoltunk és legalább 30 percig inkubáltuk -20 °C-on. Inkubálás után a jégen felolvasztott mintákat centrifugáltuk (20000 g, 60 min, 4 °C), az ülepített nukleinsavakat pedig 400 µl 70%-os etanollal mostuk, majd újból centrifugáltuk (20000 g, 15 min, 4 °C). A felülúszótól megszabadulva a mintát szobahőmérsékleten szárítottuk és MilliQ vízben vettük fel.

A mintát, RNS koncentrációjának meghatározása után (ND-1000, Nanodrop Technologies) DNáz reakciónak vetettük alá (Turbo DNA-Free Kit, Ambion), jellemzően a következő kísérleti felállásban: 43.9 µl minta, 5 µl DNáz puffer, 1 µl DNáz, 0.1 µl RNáz gátló enzim (Applied Biosystems). Az így összeállított elegyet 1 órán keresztül, 37 °C-on inkubáltuk, majd 5 µl inaktivációs reagenssel keverve (10 min, 25°C) leállítottuk a reakciót. A mintát centrifugáltuk (10000 g, 10 min, 4 °C), a felülúszóból pedig újból RNS koncentrációt mértünk. Ennek alapján állítottuk össze a reverz transzkripció elegyet, amely reakcióterfoga 20 µl volt: 13.2 µl minta (500 ng RNS), 2 µl 10x reverz transzkripció puffer, 0.8 µl 25x dNTP (100 mM) keverék, 2 µl 10x random primer, 1 µl Multiscribe reverz transzkriptáz, 1 µl RNáz gátló enzim (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems).

A qPCR reakciókhoz a cDNS minta 50-es hígítását alkalmaztuk. A reakciók térfoga 25 µl volt, amit 12.5 µl Maxima SYBR Green PCR Master Mix (2x), 1.5 µl cDNS minta, 10.6 µl MilliQ víz, 0.4 µl génspecifikus primer vegyület (5 pmol/µl) alkotott. A kapott C_T értékeket az Applied Biosystems 7000 Sequence Detection Software 1.2.3 segítségével nyertük ki.

Reszuszenziós puffer: 0.3 M szacharóz, 10 mM NaOAc, pH 4.5.

Lízis puffer: 2% (w/v) nátrium-dodecil-szulfát (SDS), 10 mM NaOAc, pH 4.5.

3.8. UV-B által indukált DNS károsodás vizsgálata qPCR segítségével

A módszer azon az elven alapul, miszerint a DNS szálon kialakult károsodások gátolják a DNS-polimeráz működését. Ezáltal a qPCR reakció során csak a károsodásoktól mentes DNS molekula sokszorozódik hatékonyan, így a DNS-polimerázt gátló képletek száma kiszámolható a reakció végén létrejött, a kontroll mintához képest kisebb mennyiségű DNS-ből. A CPD-ek a leggyakoribb UV-B által indukált, a DNS molekulán megjelenő károsodások (Sancar 2008). Ennek tekintetében olyan primer-párt választottunk a Q-PCR reakcióhoz, hogy az a *Synechocystis* genomjának azt az 1 kilóbázisnyi szakaszát határolja, amely a legtöbb szomszédos pirimidin bázist tartalmazza (F: TGATGAAAGGATCTCCCCCA, R: AACCTCGGTAGAAGAGCAGG). Ezáltal feltérképezhetjük egy adott genomi egység károsodásának maximális mértékét, UV-B sugárzás alatt. Egy másik, 50 bázisnyi genomi szakaszt behatároló primerpárt is használtunk, amely szakaszon a szomszédos pirimidin bázisok száma a lehető legkisebb volt (F: GCATTACCATGGCTATGTGTACAAC, R: GCATGGCACACACCAACAGT). Így, mivel ezen a szakaszon a CPD-ek kialakulásának csak minimális esélye volt, belső kontrollként működött. Az 1 kb nukleinsav felszaporodásából származó C_T értékeket az 50 bázisnyi szakasz C_T értékeihez normáltuk, majd az összes adatpontot a kezeltetlen minták ($t=0$) C_T értékeinek függvényében ábrázoltuk. A primerpárokat egy házilag, PERL nyelvben írt programmal választottuk ki.

A qPCR reakciókhoz meghatározott időpontokban 600 μ l mintát vettünk a kezelés alatt lévő sejtenyészetekből. Ezt 10x-en besűrítve (6000 g, 10 min, 4 °C, +60 μ l MilliQ) 3x fagyasztottuk/ olvasztottuk (-80/+4 °C), majd az így felnyílt sejtsuszpenziót 100x-an kihígítva használtuk templátként. A reakciók térfogata 25 μ l volt és a következőket tartalmazták: 12.5 μ l Maxima SYBR Green PCR Master Mix (2x), 3.2 μ l 10x-en hígított templát, 8.9 μ l MilliQ víz, 0.4 μ l szekvenciaspecifikus primer vegyület (5 pmol/ μ l).

Megjegyzendő, hogy a fenti módszer minden olyan károsodásra érzékeny, ami akadályozza a DNS-polimeráz működését, így nem specifikus a CPD-re. Annak érdekében, hogy az összes károsodáson belül meg tudjuk határozni a CPD-k mennyiségét ezt a módszert az alkalikus gél módszerrel együttesen alkalmaztuk.

3.9. UV-B-indukált DNS károsodás kimutatása alkalikus gél módszerrel

3.9.1. Genomi DNS izolálása

A genomi DNS (gDNS) izolálás minden lépésénél figyelmet fordítottunk arra, hogy ne okozzunk töréseket a DNS szálakban. A kísérletek során mintánként 15 ml sejtenyészetet

centrifugáltunk (6500 g, 10 min, 4 °C). A felülúszót eltávolítva a sejteket 200 µl telített NaI oldatba vettük fel. Ezt 10 percen keresztül 37 °C-on inkubáltuk, majd 1 ml MilliQ vízzel kiegészítve lecentrifugáltuk (9000 g, 10 min, 4 °C). A halványkék színű felülúszót eltávolítottuk, a sejteket pedig 400 µl Tris I pufferben vettük fel, majd 100 µl lizozim (50 mg/ml) oldatot adtunk az elegyhez és 10 percen keresztül, 37 °C-on inkubáltuk. Inkubálás után, a kék színű felülúszótól megszabadulva (5500 g, 4 °C, 5 min), a sejteket újabb 400 µl Tris I pufferben mostuk. Az így kapott sejteket 500 µl Tris I pufferben vettük fel és 100 µl N-lauril-szarkozin nátrium só oldatot (10% w/v), valamint 4 µl RNázA enzimet (10 mg/ml) adtunk hozzá (20 min, 37 °C). Ettől a lépéstől kezdve kizárólag széles nyílású, vágott hegyű pipettákat használtunk. A 20 percig inkubálódott sejtekhez 25 µl Proteináz K-t (20mg/ml) adagoltunk (60 min, 60 °C). Az 1 órás inkubálást követően üleptítettük a mintákat (17500 g, 4 °C, 20 min) és az így keletkezett áttetsző, zöld felülúszót új eppendorf csőbe helyeztük. DNS tisztításhoz a mintát azonos térfogatú, TE oldattal telített fenollal kevertük (15 min, 25 °C). Centrifugálás után (15000 g, 4 °C, 5 min) a felülúszót új csőbe vittük át, majd a fenol-TE oldattal való keverést még kétszer megismételtük. Egy utolsó lépésben a felülúszót azonos térfogatú kloroformmal kevertük és centrifugáltuk (15000 g, 4 °C, 5 min). A DNS kicsapásához NaOAc-ot (1/9-ed térfogatnyi) és i-Propanolt (0.7 térfogat résznyi) adtunk a felülúszóhoz és -20 °C-on inkubáltuk legalább 30 percen keresztül. Ezt követően centrifugáltuk (20000 g, 4 °C, 60 min) és 400 µl 70%-os etanollal mostuk a mintát. A keletkezett csapadékot szobahőmérsékleten szárítottuk, majd 20-30 µl MilliQ vízben újrahidratáltuk (4 °C, 12-14 h) a DNS-t.

3.9.2. Specifikus DNS károsodások meghatározása

A CPD-k felderítéséhez a rehidratált genomi DNS-t T4 endonukleáz V pirimidin dimer glikoziláz (Epicentre, Applied Biosystems) enzimmel emésztettük, amihez legalább 500 ng DNS-t használtunk. A T4 enzim a pirimidin dimereknél hasítja DNS szál glikozil-kötéseit és hatására felbomlanak az itt található foszfodiészter kötések (Higgins és Lloyd 1987). Egy emésztés jellemzően a következőképpen állt össze: 20 µl rehidratált gDNS, 2.3 µl T4 Puffer (10x), 0.7 µl T4 endonukleáz V.

A 7,8-dihidro-8-oxoguanin (8-oxoG) oxidatív károsodások (Bjelland és Seeberg 2003) mennyiségének meghatározása érdekében Formamidopirimidin-DNS gliokozilázal (FPG) emésztettük az izolált genomi DNS-t. Az FPG egy DNS –javító enzim, amely az oxidált purin bázisokat távolítja el a károsodott DNS szakaszról és jellemzően a 8-oxoG helyeken hasít (Zharkov és mtsai. 2003).

Az emésztett genomi DNS fragmentumokat 0.6%-os agaróz ($\geq 1,200$ g/cm² gélerősségű SeaKem) gélen választottuk el. A gél, feltöltése előtt, 1 órán keresztül 500 ml Bázikus elektroforézis pufferben ázott. Feltöltés előtt az emésztett mintákat térfogatuk felének megfelelő bázikus mintapufferrel 10 percig, szobahőmérsékleten inkubáltuk. A DNS vándorlása rendszerint 12-14 órán keresztül, alacsony, 20 V-os feszültségen, 40 mA-nél alacsonyabb áramerősség mellett, 4 °C-on zajlott, amihez a futtató közeg a Bázikus elektroforézis puffer volt. Az elektroforézis után a bázikus gél 500 ml Semlegesítő oldatban áztattuk szobahőmérsékleten, 30 percen keresztül. Ezt követően etidium bromidos oldatban festettük, majd UV fény alatt lefényképeztük és elemeztük a gél. Minél több helyen találtak az említett enzimek UV-B által indukált, vagy oxidatív károsodásokat, annál kisebb fragmentumokra szakadt a DNS és a gélképen ez egy elhúzódó foltként jelenik meg, amit különböző méretű fragmentumok alkotnak. Egy házilag, MATLAB-ban készített számítógépes program segítségével meghatároztuk a keletkezett fragmentumok átlaghosszát. Ezt összehasonlítva a kontroll mintából származó genomi DNS átlaghosszával megállapítottuk, hogy átlagban hány károsodás található egy kilóbázisnyi szakaszon, UV-B kezelés után (Sutherland és mtsai. 2003).

Tris I Puffer: 50 mM Tris, pH 8, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl.

TE (Tris-EDTA) puffer: 10 mM Tris-HCl pH: 1mM EDTA 8.

Bázikus elektroforézis puffer: 50M NaOH, 1mM EDTA.

Bázikus mintapuffer (6x): 300 mM NaOH, 6 mM EDTA, 18 (w/v) Ficoll, 0.15% w/v brómkrezolzöld.

Semlegesítő oldat: 125 ml Tris 2M pH:8, 375 ml H₂O.

Etídium bromidos oldat: 50 µl etídium bromid (10 mg/ml), 500 ml MilliQ víz.

3.10. Szignifikancia-teszt

Az adataink variabilitását One Way Anova tesztel határoztuk meg. A “prob” érték annak a valószínűségét jelöli, hogy a nullhipotézis, miszerint a tesztelt adatok között nincs jelentős különbség, igaz. A prob értékeket 0.05-ös szignifikancia szintnél értelmeztük.

4. Eredmények és kiértékelésük

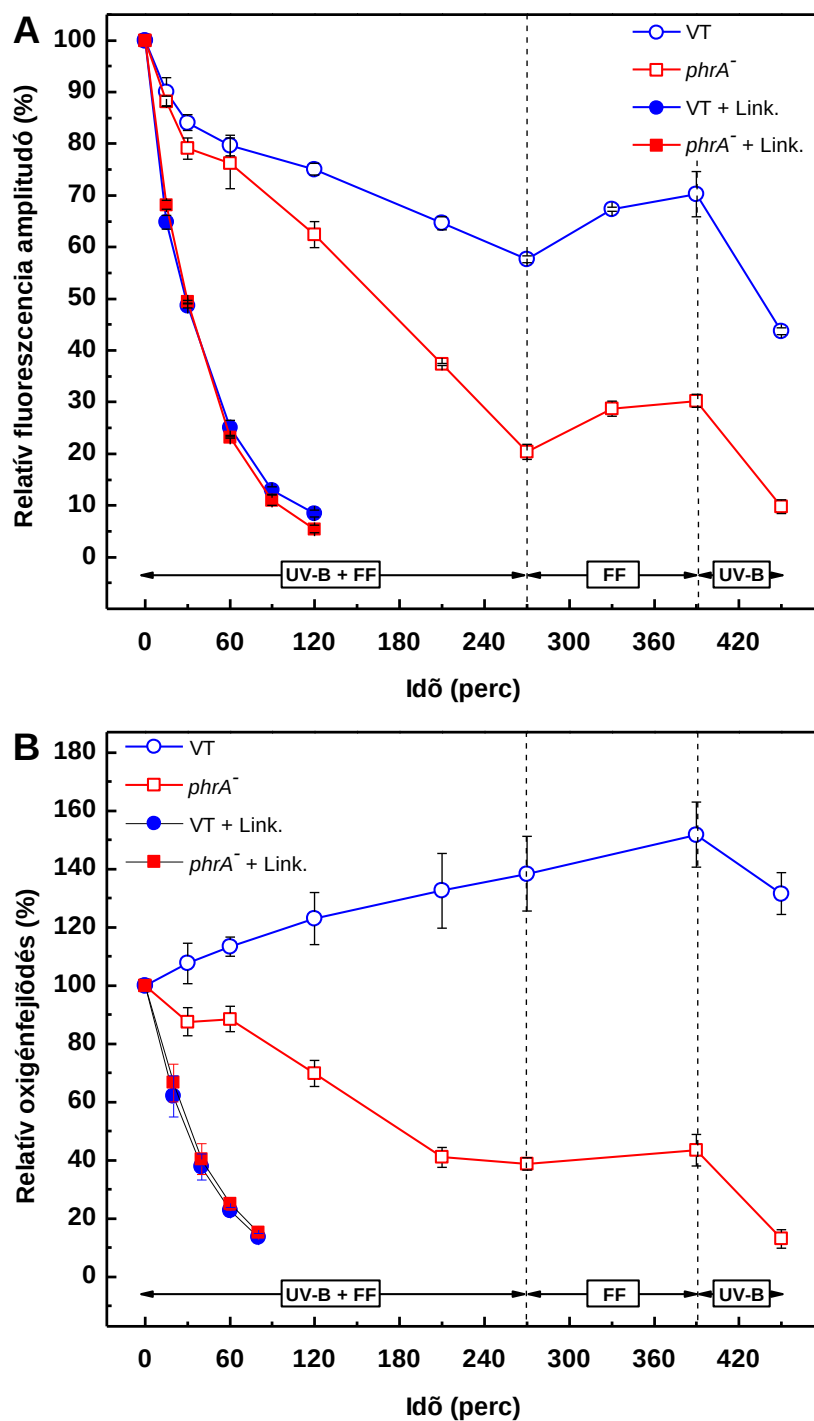
4.1. A fotoliáz hatásának vizsgálata

4.1.1. A PhrA hiányának hatása a PSII komplexek aktivitására

Nagy energiájú UV-B sugárzás hatására károsodik a fotoszintetikus apparátus PSII komplexe és a DNS szerkezete. Az illető szervezet mindkét esetben hatékony javítási mechanizmussal éri el azt, hogy a keletkezett károk ne lehessenek maradandóak. A DNS javítási mechanizmus hatását vizsgáltuk a *Synechocystis sp.* PCC6803 (*Synechocystis*) sejtek PSII javítási mechanizmusára vad típusban (VT) és fotoliáz nélküli mutánsban (*phrA*⁻). Ez utóbbi sejt vonal képtelen az UV-B által indukált termékek, jellemzően CPD-k, specifikus kijavítására, tehát hiányzik a DNS-t javító mechanizmusa. A vizsgálataink első lépésében a *Synechocystis* sejtek PSII komplexeinek aktivitására terjedtek ki, amely jelenséget fényimpulzus által indukált klorofill-a fluoreszcencia és a sejtek által termelt oxigén mérésével vizsgáltuk.

A kísérletek első részében, amelynek során a sejtek fehér háttérfény mellett ($50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) viszonylag erős UV-B sugárzásnak ($8 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) voltak kitéve, a *phrA*⁻ sejtek lényegesen gyorsabban veszítettek PSII komplexeik aktivitásából mint a vad típusúak. Két óra UV-B-stressz jelentős PSII aktivitásbeli különbséget eredményezett a mutáns és a VT sejtek között (prob: 0.009, p: 0.05), mely utóbbiakban a fehérjeszintézis alapú PSII javítás biztosan működőképes volt (5A. ábra). A kezelés első részének végére, 270 perc UV-B sugárzás után a VT sejtek PSII aktivitása a kiindulási értékük 60%-ára csökkent, míg a *phrA*⁻ sejtek esetében ez jóval alacsonyabbra, a kiindulási érték 20%-ra esett. A kísérlet második szakasza során, az UV-B sugárzást lekapcsolva, mindkét sejt vonal stresszmentes, $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ -as fehér fénynek volt kitéve. Ennek során, 120 perc alatt úgy a VT, mint a mutáns sejtek részben regenerálódtak és rendre elérték a kiindulási aktivitási értékük 70 illetve 30%-át (5A. ábra). A regenerálódást követően, a kísérlet harmadik szakaszában a sejteket fehér háttérfény mellőzésével UV-B sugárzásnak tettük ki, aminek következtében, 60 perc elmúltával a *phrA*⁻ sejtek PSII aktivitása a kiindulási értékük 10%-ára esett. A VT sejtek, ugyanezen kezelés végére, megőrizték PSII aktivitásuk közel felét, ez a kiindulási érték mindössze 45%-ára csökkent.

Az alapkísérlet első szakaszát megismételve a sejtenyészetekhez fehérjeszintézist gátló linkomicint adagoltunk. Ennek következtében mindkét sejt vonal PSII aktivitása



5. ábra: PSII komplexek aktivitása UV-B sugárzás alatt és után, a VT és *phrA*⁻ sejtvonalakban. Mind a VT (körök), mind a *phrA*⁻ (négyzetek) sejteket 3 kezelési szakasznak tettük ki: 270' UV-B+FF (8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 120' FF (50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 60' UV-B (8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). A sejtek klorofill-a fluoreszcenciájának kezdeti amplitúdója ($F_m - F_0$) **(A)** valamint a telített fény mellett zajló oxigéntermelési rátája **(B)** a működőképes PSII központok mennyiségét tükrözi. A méréseket a fehérjeszintézist gátló linkomicin hiányában (üres szimbólumok) és jelenlétében (teli szimbólumok) is elvégeztük. Mindkét táblán szereplő adatpontok 3, egymástól független kísérlet adatainak átlagát képviselik és a kezeletlen minták értékeihez ($t=0$) vannak viszonyítva.

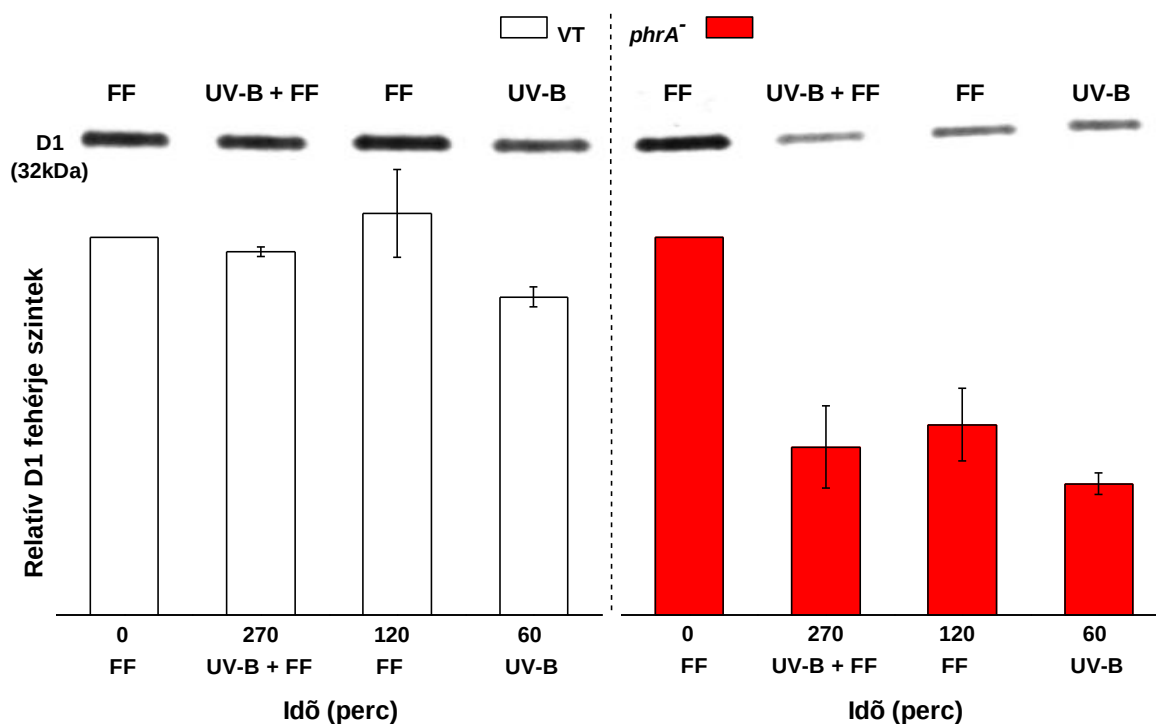
rohamos csökkenést mutatott és 120 perc UV-B és fehér háttérfény mellett a kiindulási érték 10%-ára esett. Linkomicin jelenlétében a két sejtvonal PSII komplexeinek aktivitása közel azonos mértékben, párhuzamosan zajlott (5. ábra). Mivel a linkomicin gátolja a D1 fehérjék szintézisét a PSII komplexek működőképességének csökkenése a fehérjeszintézis alapú javítási folyamatok kikapcsolásával csak a kezelésben használt sugárzás káros hatását tükrözi. Ugyanakkor, a két sejtvonal PSII komplexei működésének közel azonos arányú gátlása azt is mutatja, hogy a *Synechocystis* sejtekben a specifikus DNS javítási út hiánya önmagában nem befolyásolja a PSII komplexek UV-B érzékenységét.

A fehérjeszintézis alapú PSII javítás hatékonyságát tükrözi azonban az egyes sejtvonalak, linkomicin hiányában illetve jelenlétében ábrázolt PSII aktivitásgörbéi közti különbség. A linkomicin jelenlétében illetve hiányában mért aktivitásbeli különbség, 120 perc UV-B kezelés után jelentősen (prob: 0.012, p: 0.05) kisebb a *phrA*⁻ sejtek esetében, mint a VT-ban (5A. ábra). Az UV-B kezelés során, a linkomicintól mentes sejtek közti különbség tovább növekszik (210', 270'), még inkább hangsúlyozva a mutáns sejtek kevésbé hatékony fehérjeszintézisét. A PSII aktivitásbeli változásából nyert adatok azt mutatják, hogy az UV-B kezelés alatt károsodott PSII komplexek javítása jelentősen hatékonyabb a vad típusú sejtekben, amelyek rendelkeznek működőképes fotoliáz enzimmel, mint a *phrA*⁻ sejtekben, amelyek nem rendelkeznek fotoliáz aktivitással. A két károsodási görbe hasonló lefutása linkomicin jelenlétében tehát azt mutatja, hogy a különbség, amit linkomicin nélkül látunk, a fehérjeszintézis alapú javítás elégtelen voltának következménye.

A fényimpulzus által indukált klorofill-a fluoreszcenciás méréseinket a sejtek oxigéntermelési képességének mérésével is alátámasztottuk. A fehérjeszintézis kiiktatásával a sejtvonalak oxigéntermelése azonos mértékben csökken, hiszen hiányoznak a *de novo* szintetizált alegységek, amelyekhez az oxigénfejlesztő komplex kapcsolódhatna (Hakala és mtsai. 2005; Vass és mtsai. 1996). Viszont a *phrA*⁻ sejtek oxigéntermelési rátája, a maradandóan kijavíthatlan PSII komplexek számának növekedésével linkomicin nélkül is látványosan csökken az UV-B stressz előrehaladtával míg a VT, amely képes regenerálni a károsított alegységeit a fotoszintetikus komplexeinek fokozott működésével kezeli a stresszhelyzetet (5B. ábra). Ez többek között arra is rámutat, hogy az általunk választott 8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ intenzitású UV-B sugárzás nem egy környezet idegen, eltúlzott kísérleti beállítás, hanem egy olyan érték, amely mellett a *Synechocystis* képes hatékony fotoszintézisre.

4.1.2. A D1 fehérjemennyiség változása UV-B hatására

UV-B stressz hatására a PSII komplexek elsősorban a D1 alegységeik károsodása miatt működésképtelenné válnak (Aro és mtsai. 1993; Sass és mtsai. 1997). Az alacsony intenzitású fehér háttérfény ($50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) használata az UV-B kezelés közben enyhíti a nagy energiájú sugárzás által okozott PSII aktivitáscsökkenésen, azáltal, hogy elősegíti a fehérjeszintézis alapú javítást (Sicora 2003).



6. ábra: Az UV-B stressz hatása a D1 fehérje mennyiségének változására a VT és *phrA*⁻ sejtekben. A sejtenyészetek (VT: fehér, *phrA*⁻: piros) 3 kezelési szakaszon estek át: 270' UV-B+FF ($8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 120' FF ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 60' UV-B ($8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Az ábrán szereplő oszlopok 3 egymástól független kísérlet számszerűsített adatait képviselik, amelyek a kezeletlen (t=0) mintákhoz viszonyulnak.

Az UV-B kezelések során használt sejtenyészetekből vett minták D1 fehérje mennyiségei alátámasztják a sejtek oxigéntermeléséből illetve a fényimpulzus által indukált klorofill-a fluoreszcenciájából származó adatokat. A fotoliáz alapú DNS javításra képtelen *phrA*⁻ sejtek az össz-D1 fehérjemennyiségük figyelemre méltó részét elvesztették az UV-B kezelés végére, amelyet az ezután következő regenerációs és UV-B mentes szakaszban sem voltak képesek újratermelni, így a kezelések végére szignifikánsan alacsonyabb szinten maradt, mint a VT-ban (prob: 0.006, p: 0.05) (6. ábra). Ezzel szemben a vad típusú sejtek D1 fehérje mennyiségére alig volt hatással az UV-B sugárzás. A kísérletek első szakaszának

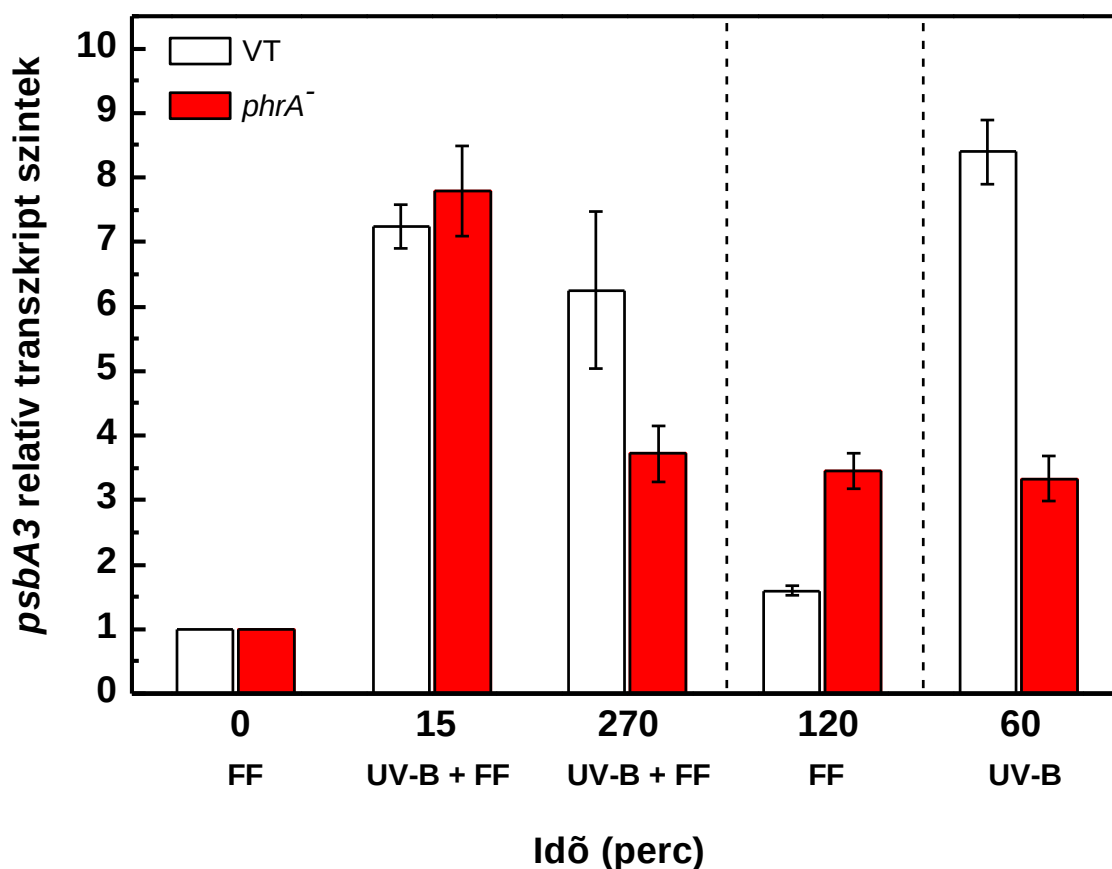
végére, 270 percnél, jelentősen (prob: 0.0419, p: 0.05) magasabb D1 fehérje állomány volt kimutatható a VT-ban, mint a mutáns sejtekben.

4.1.3. UV-B által indukált *psbA* hRNS állomány változása a VT és a *phrA*⁻ sejtekben

A károsodott PSII komplexek hatékony javításának előfeltétele, hogy a fehérjeszintézis folyamatához szükséges hRNS molekulák kellő mennyiségben jelen legyenek a sejtekben. Ezek közül a legfontosabb a leggyorsabban cserélődő D1 fehérje szintéziséhez szükséges *psbA* géncsaládról készült hRNS állomány (Máté és mtsai. 1998; Mattoo és mtsai. 1984). Ugyanakkor a hatékony javítási folyamatokhoz számos más hRNS jelenléte is elengedhetetlen. Ilyenek például a D2 fehérje, FtsH proteáz, stb. hRNS állományok (Cadoret és mtsai. 2005; Cheregi és mtsai. 2007a; Sass és mtsai. 1997; Viczián és mtsai. 2000). *Synechocystis* sejtekben a *psbA* géncsalád *psbA3*-as tagjának átírása UV-stressz hatására felfokozódik. Ennek következtében a megnövekedett *psbA3* mRNS mennyiség hozzájárulásával az össz-*psbA* mRNS állomány jelentősen megnövekszik (Máté és mtsai. 1998). Kísérleteink során a *psbA3* mRNS mennyiségét, a PSII javításához elengedhetetlen gének képviselőjeként, markerként használtuk annak érdekében, hogy hRNS állomány szintjén vizsgálhassuk az UV-B sugárzás hatását a fotoliáz enzim, tehát DNS javítás jelenlétében (VT), illetve annak hiányában (*phrA*⁻). A kísérleteink első szakaszában, az UV-B hatására a *psbA3* mRNS állománya mindkét sejtvonalban megnövekedett, majd a 270 perces UV-B kezelést követő 120 perces regenerációs szakasz végére a VT sejtek *psbA3* állománya, UV-B sugárzás hiányában, visszaesett a kezdeti, kezeltetlen szintre (7. ábra). A VT-ban, a kísérlet harmadik szakaszában, 60 perc UV-B sugárzás újra, a kezelés első szakaszához hasonló mértékben indukálta a *psbA3* átírását.

A kezelés második, regenerációs szakaszában a *phrA*⁻ sejtvonal *psbA3* mRNS állománya semmilyen válaszreakciót nem mutatott az UV-B sugárzás megszűnésére. Az UV-B kezelés végén mért relatív mRNS értékek, a *phrA*⁻ sejtvonalban nem mutattak jelentős (prob: 0.744, p: 0.05) eltérést a regenerációs szakasz végén mért értékektől (7. ábra). Ezzel együtt az újabb, 60 perces UV-B inger sem indukálta a *psbA3* átírását. E válaszreakció hiánya a *phrA*⁻ sejtekben arra engedett következtetni, hogy az UV-B által indukált DNS károsodások specifikus javító enzimének hiányában a mutáns sejtek genomjában annyi pirimidin dimer halmozódik fel, amennyi már akadályozza a *psbA3* átírását. E károsodások gátló hatása nem szorítkozik specifikusan a *psbA* géncsalád elemeire, hanem akadályozzák azon gének átírását is, amelyek fehérje-termékei nélkülözhetetlenek a már meglévő mRNS molekulák

lebontásához. Így maradhatott változatlan a mutáns sejtek *psbA3* állománya, az első szakasz UV-B sugárzását követően, a kísérletek végéig (7. ábra).

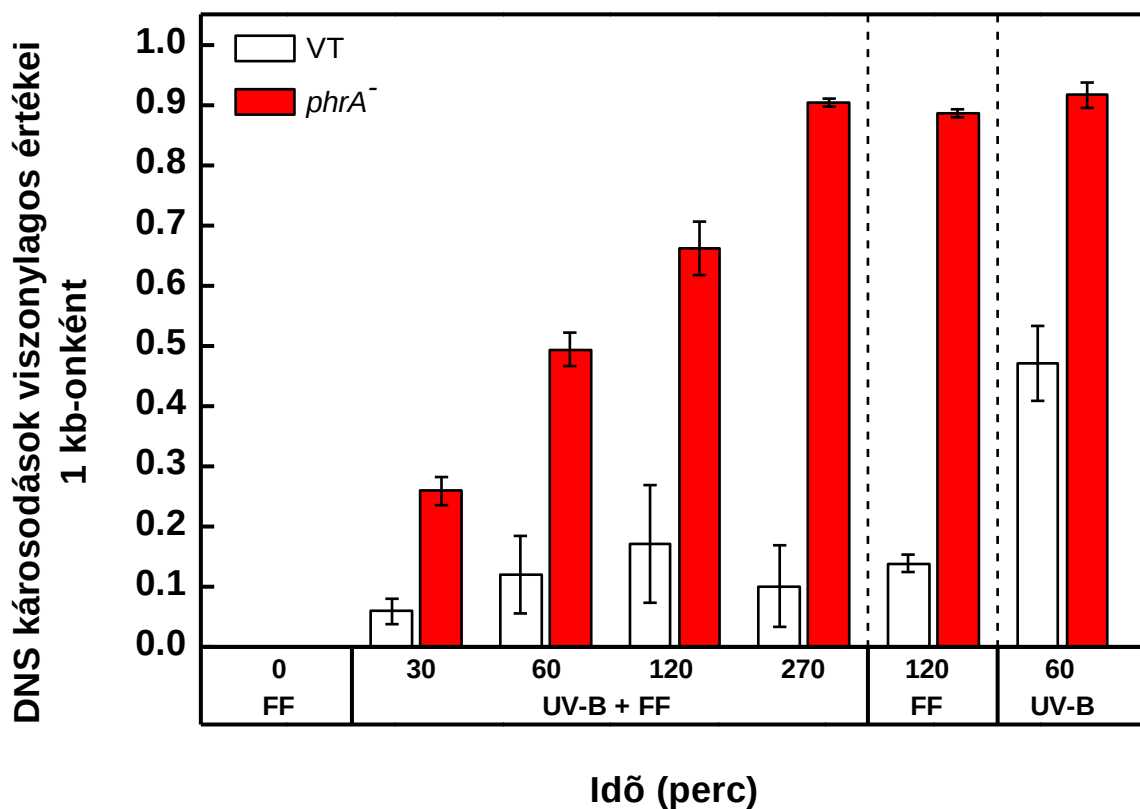


7. ábra: A *psbA3* transzkript szintjeinek változása UV-B stressz hatására a VT és a *phrA⁻* sejtekben. Mindkét sejtvonal (VT: fehér, *phrA⁻*: piros) 3 kezelési szakaszon estek át: 270' UV-B+FF ($8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 120' FF ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 60' UV-B ($8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Az ábrán szereplő oszlopok 3 egymástól független kísérletből származó *psbA3* transzkript szintjeinek számszerűsített értékeit képviselik, amelyeket az *rnpB* (az RnázP B alegységét kódoló *slr1311*) transzkript szintjeihez, valamint a kezeletlen ($t=0$) minta értékeihez viszonyítottunk.

4.1.4. UV-B által indukált DNS károsodások számszerűsítése qPCR-el

Az UV-B sugárzás által indukált DNS károsodás számszerűsítéséhez kétféle módszert alkalmaztunk. A kvantitatív PCR módszer lehetővé teszi az összes olyan DNS károsodás mennyiségének becslését, amely gátolja a DNS polimerázok működését. Ezzel a módszerrel nem áll módunkban különbséget tenni a különböző károsodások között. Ennek eredményeképpen azt találtuk, hogy a vad típusú sejtekben nem halmozódott fel jelentős (prob: 0.724. p: 0.05) mennyiségű DNS károsodás az UV-B kezelés és a regenerációs szakasz együttes időtartama alatt (8. ábra). UV-B kezelés alatt és után, 1 kb hosszú DNS szakaszonként, átlagosan mindössze 0.1-0.2 károsodást mutattunk ki a VT genomjában.

Ezzel ellenben a *phrA*⁻ sejtek DNS-ében, a kezelés során fokozatosan felhalmozódtak a DNS polimerázt gátló módosulások, olyannyira, hogy a 270 perces UV-B stressz végére 1 kb DNS szakasz megközelítőleg 1 károsodást tartalmazott (8. ábra). E károsodások mennyisége a regenerációs szakaszban sem csökkent. Ez egyrészt arra enged következtetni, hogy a fotoliáz enzim hiányában a DNS javítás teljes mértékben és visszafordíthatatlanul leállt a *phrA*⁻ sejtekben. Másrészt, mivel az említett károsodások kijavítása a fotoliáz működésképtelensége mellett nem valósult meg, ezek feltehetőleg UV-B által indukált specifikus módosulások. Megemlítendő, hogy *Synechocystis*-ben megtalálható a DNS excíziós javítási mechanizmus is, amely a fotoliáz aktivitásához szükséges 320-500 nm (Weber 2005) tartományba eső fény hiányában is képes eltávolítani a CPD-ket (O'Brien és Houghton 1982). E folyamat azonban a fotoreaktivációhoz képest, igen lassúnak bizonyult, valamint a fotoliáz enzim hiányában feltehetőleg jelentősen akadályozott is (O'Brien és Houghton 1982; Sancar és Smith 1989).



8. ábra: UV-B stressz során keletkezett, polimeráz-gátló DNS károsodások becslése qPCR-es módszerrel, VT és *phrA*⁻ sejtekben. A VT (fehér) és a *phrA*⁻ (piros) sejtek 3 kezelési szakaszon estek át: 270' UV-B+FF ($8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 120' FF ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 60' UV-B ($8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Az ábrán szereplő oszlopok értékei két, egymástól független kísérlet adataiból származnak és az átlagosan 1 kb-nyi DNS szakaszon felhalmozódó, DNS polimeráz-gátló képletek mennyiségét képviselik, a kezeletlen ($t=0$) állapot értékeihez viszonyítva.

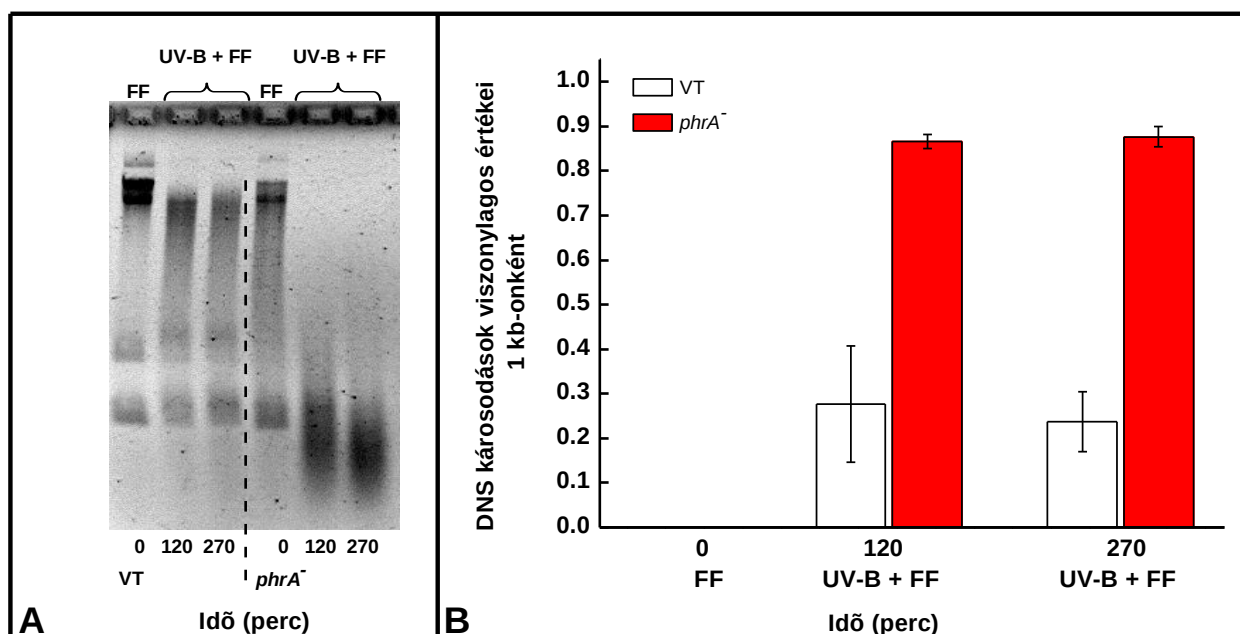
A regenerációs szakaszt követő, fehér háttérfény nélküli UV-B megvilágítás mellett a VT sejtekben is nagyobb számban jelentkeztek DNS polimerázt gátló károsodások. Ez feltehetőleg a kék fény hiányának tulajdonítható ugyanis ez az a hullámhossz-tartomány (430-450 nm) ahol a *Synechocystis* CPD fotoliáz másodlagos kromofórja (7,8-didemetil-8-hidroxi-5-deazariboflavin, 8-HDF) abszorbeál (Yasui és mtsai. 1994). Ha a spektrum kék tartományába eső fény nincs jelen, a fotoliáz szűkebb spektrumból kénytelen energiát továbbítani a pirimidin dimerek felé, ezáltal csökken a hatékonysága illetve megnövekszik a ki nem javított károsodások mennyisége.

A *Synechocystis* genomjában a gének átlagos hossza 1 kb. Ennek alapján a kísérleti adataink azt mutatják, hogy az UV-B kezelés végére a *phrA*⁻ mutáns sejtek, átlagosan, minden génje tartalmazhatott 1 DNS polimerázt gátló károsodást. Ez alátámasztotta a *psbA3* szintjének meghatározásánál tett feltételezésünket, miszerint a kezelés végére jórészt leáll a fehérjeszintézis a sejtekben. Ezt tükrözi a PSII aktivitás hanyatlása is, melynek mértéke a kezelés végére a linkomicinnel kezelt sejtenyészetek aktivitásához közelített.

4.1.5. UV-B-indukált DNS károsodások számszerűsítése alkalikus gélen

Annak ellenére, hogy a CPD fotoliáz hiánya mellett látjuk a DNS károsodások felhalmozódását a *phrA*⁻ sejtekben a qPCR-es módszer nem teszi lehetővé e károsodások jellegének meghatározását. A módszer által szolgáltatott adatok számszerűsítésében minden olyan károsodás benne van, amely akadályozza a génátírást. Így, annak érdekében, hogy biztosak lehessünk a DNS károsodások eredetében, egy másik módszert is alkalmaztunk, amellyel specifikusan kimutatható az UV-B sugárzás által leggyakrabban indukált CPD jelenléte. UV-B kezelést elszenvedett sejtekből izoláltunk gDNS-t, amelyet ezt követően T4 endonukleáz V enzimmel emésztettünk. Az említett enzim egyes szálú hasadást okoz a DNS molekulában, a CPD-nél. Az emésztett gDNS-t agaróz gélen, alkalikus futtató közegben választottuk el, amely hatására a kettős szálú DNS egyes szálúvá disszociálódik. Így, minél több CPD-t ismert fel a T4 enzim a gDNS annál kisebb fragmentumokként választódik el a gélen. Mivel ezek a károsodások véletlenszerűen helyezkednek el a genomon, ezért egymás közötti távolságuk is és a keletkező fragmentumok hossza is véletlenszerű, így a különböző méretű fragmentumok, etídium bromidos festés után nem körülhatárolható sávként, hanem elmosódott foltként válnak láthatóvá a gélen (9A. ábra). Az UV-B-kezelt és kezeletlen minták fragmentumainak átlaghosszából, vagyis a T4 endonukleáz V szubsztrát mennyiségéből következtettünk a kezelés során kialakult CPD-k számára. Az elválasztott DNS szálak átlaghosszát egy Matlab-ban írt program segítségével határoztuk meg.

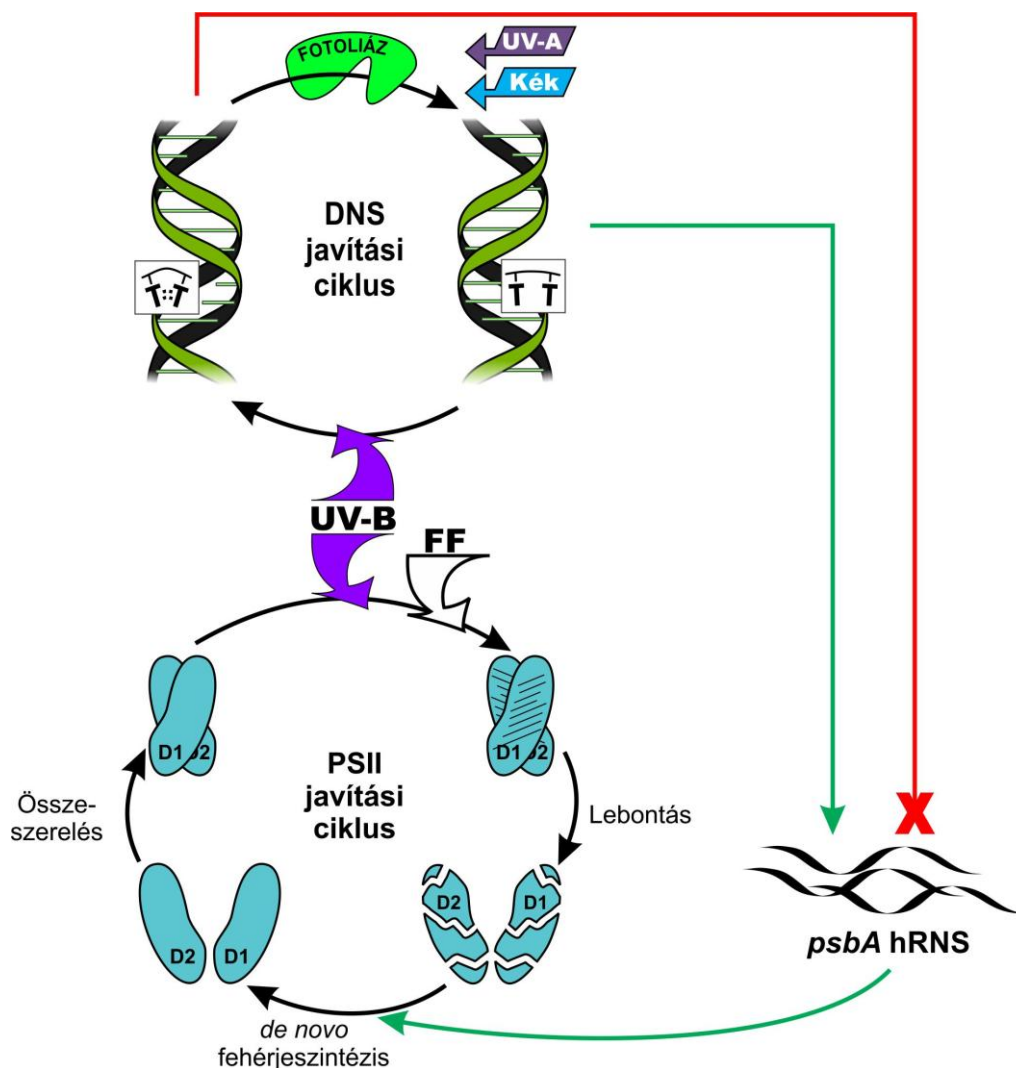
Azt találtuk, hogy az alkalikus gél módszerével kapott értékek nagymértékben hasonlítanak a qPCR módszerével kapott értékekhez. E nagymértékű átfedés a két módszer eredményei között arra enged következtetni, hogy az UV-B stressz során, a *Synechocystis* genomjában felhalmozódott, DNS polimerázt gátló módosulások túlnyomó többsége CPD volt (9B ábra, 8. ábra).



9. ábra: UV-B stressz során keletkezett CPD mennyiségének meghatározása alkalikus gél módszerrel, VT és *phrA*⁻ sejtekben. Fehér háttérfénnyel (FF, 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) együtt adott UV-B sugárzásnak (8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) kitett VT (fehér) és *phrA*⁻ (piros) sejtekből vett mintákból genomi DNS-t (gDNS) tisztítottunk. **A tábla:** Endonukleáz V PDG-el emésztett és alkalikus gélen elválasztott, VT és *phrA*⁻ sejtekből származó gDNS. A mutáns sejtek UV-B-vel kezelt gDNS-éből származó apró fragmentumok elmosódott foltként jelennek meg az alkalikus gélen. **B tábla:** Az etídium bromiddal láthatóvá tett DNS sávok és foltok számszerűsítése. Az ábrán szereplő oszlopok 3, egymástól független kísérletből származó adatok alapján készültek.

4.1.6. PhrA modell

Adatainkat és az azokból levont következtetéseket a következő grafikus modellbe foglaltuk össze:



10. ábra: A DNS javítási ciklus és a PSII javítási ciklus kapcsolatának ábrázolása. Az UV-B sugárzás specifikus CPD-et alakít ki a DNS molekulán, amelyek gátolják a polimerázok aktivitását, így akadályozva, illetve leállítva a hRNS átírását. A fotoliáz enzim egy fényreaktivációnak nevezett folyamat során képes megszüntetni ezeket a DNS károsodásokat visszaállítva a pirimidin dimerek monomer formáját, amely lehetővé teszi a polimerázok működését. UV-B hatására, a DNS-el párhuzamosan a PSII reakcióközpont fehérjei is károsodnak, aminek következtében a D1 és D2 fehérjék lebontásra kerülnek. Ezek újrászintéziséhez elegendő hRNS-re van szükség, amely csak abban az esetben elérhető, ha a fotoliáz enzim kellő hatékonysággal eltünteti a DNS molekuláról a polimeráz-gátló módosulásokat. Ha ez megtörtént, akkor a fehérjeszintézis folytatódhat: a hRNS-ek alapján D1 és D2 fehérje szintetizálódik, amelyek összeszerelés és aktiváció után újból elláthatják a reakcióközpont elektrontranszport szerepét.

4.2. A PhrB hatásának vizsgálata

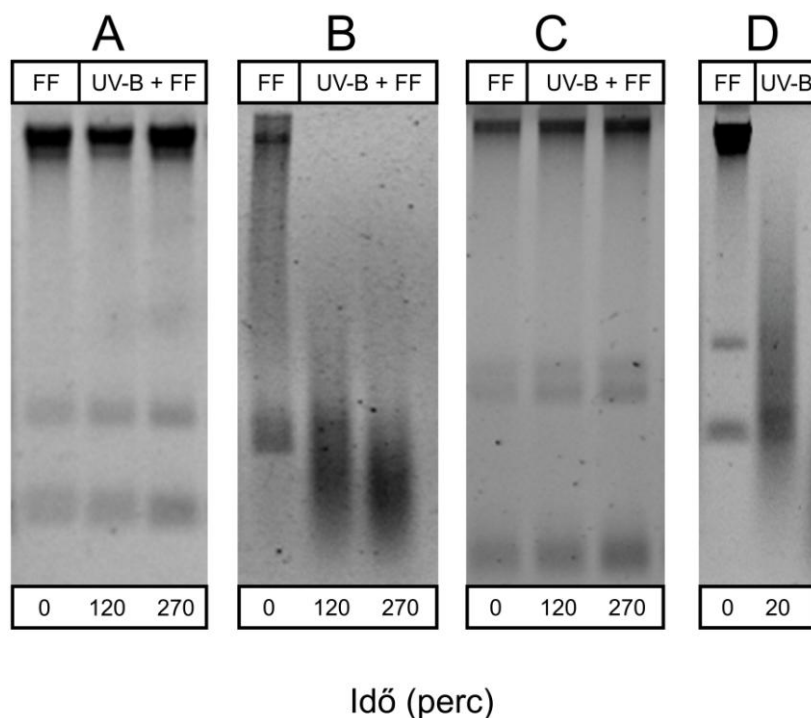
4.2.1. A *phrB*⁻ sejtek DNS javítási kapacitása

A Cry-DASH csoport egyes tagjaira vonatkozó irodalmi adatok alapján (Daiyasu és mtsai. 2004; Heijde és mtsai. 2010; Selby és Sancar 2006) nem kizárható hogy a PhrB fehérje is szerepet játszik az UV-B által károsított DNS javításában. Ennek kivizsgálásához genomi DNS-t izoláltunk UV-B sugárzásnak kitett ($270'$, $8 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ UV-B és $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ FF) vad típusú és *phrB*⁻ sejtekből.

Az izolált gDNS mintákat, az UV-B hatására feltételezhetően megjelenő és felhalmozódó pirimidin dimerek kimutatása érdekében, T4 PDG enzimmal emésztettük. Az emésztett fregmentumokat, az előző kísérletekkel megegyező módszerrel, alkalikus gélen választottuk el, majd a gélképet kielemeztük. Azt találtuk, hogy 270 perc UV-B sugárzás után a vad típusú sejtekhez hasonlóan a *phrB*⁻ sejtekben nem halmozódott fel kimutatható mennyiségű CPD (11. ábra). Ezzel szemben, ugyanilyen stressz körülmények között, a PhrB-vel homológ fotoliáz fehérjét nélkülöző mutáns sejt vonal (*phrA*⁻) jelentős mennyiségű CPD-t halmoz fel (9A. ábra). Ezeket az eredményeket alátámasztották a qPCR módszerrel kapott eredményeink, amellyel szintén nem volt kimutatható jelentős mennyiségű javítatlan, DNS polimerázt gátló károsodás a *phrB*⁻ sejtek gDNS-ében.

Ahhoz, hogy pontosabb képet kapjunk a *phrB*⁻ sejtek DNS javítási képességéről egy másik jellegzetes és különböző stressz körülmények között gyakran fellépő DNS károsodás felhalmozódását is leellenőriztük. A legtöbb stressztényező jelenlétében oxidatív stressz is kialakul, ami a DNS szerkezetében jelentős károkat okozhat. Ennek egyik leggyakoribb formája az, amikor a purinbázisok oxidatív károsodást szenvednek és létrejön a 7,8-dihidro-8-oxoguanin (8-oxoG) termék (Bjelland és Seeberg 2003). Annak érdekében, hogy megállapítsuk vajon PhrB fehérje részt vesz-e a károsodások eltávolításában, illetve, hogy a *phrB*⁻ sejtek DNS javítása a vad típuséhoz hasonlóan hatékony-e, a már említett módon izolált gDNS mintákat FPG enzimmal emésztettük.

Mivel az FPG jellemzően a 8-oxoG helyeken hasít (Zharkov és mtsai. 2003), a potenciálisan kialakult és alkalikus gélen szétválasztott fragmentumok pontos képet adnak a genomi DNS-ben felhalmozódott 8-oxoG károsodások mennyiségéről. Az általunk vizsgált, 270 perc UV-B stressznek alávetett *phrB*⁻ sejtekből tisztított genomi DNS-ben nem lehetett kijavítatlan, illetve felhalmozódott 8-oxoG termékeket kimutatni (11. ábra).



11. ábra: UV-B stressz során keletkezett specifikus károsodások kimutatása *phrB*⁻ sejtek gDNS-ében, alkalikus gél módszerrel. UV-B-vel ($8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) és fehér háttérfénnyel (FF, $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) *phrA*⁻ és *phrB*⁻ sejtek gDNS-ét emésztettük T4 PDG vagy FPG enzimekkel, majd a keletkező fragmentumokat alkalikus gélen elválasztottuk. **A tábla:** *phrB*⁻ sejtek gDNS-e UV-B-vel és FF-el kezelve, T4 PDG-vel enzimmal emésztve. **B tábla:** *phrA*⁻ sejtek gDNS-e UV-B-vel és FF-el kezelve, T4 PDG-vel enzimmal emésztve. **C tábla:** *phrB*⁻ sejtek gDNS-e UV-B-vel és FF-nyel kezelve, FPG-vel emésztve. **D tábla:** *phrA*⁻ sejtek gDNS-e UV-B-vel ($20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) kezelve, FPG-vel emésztve.

Ezek alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a PhrB fehérjét nélkülöző sejtek DNS javítása a vad típuséhoz hasonló hatékonysággal működik. Ugyanakkor megállapítottuk, hogy a PhrB nem vesz részt kimutatható mértékben a különböző DNS károsodások eltávolításában és valószínűleg, legalábbis a *Synechocystis* Cry-DASH fehérje esetében, más szerepet lát el.

4.2.2. PSII aktivitás VT és *phrB*⁻ sejtekben, UV-B és magas intenzitású látható fény jelenlétében

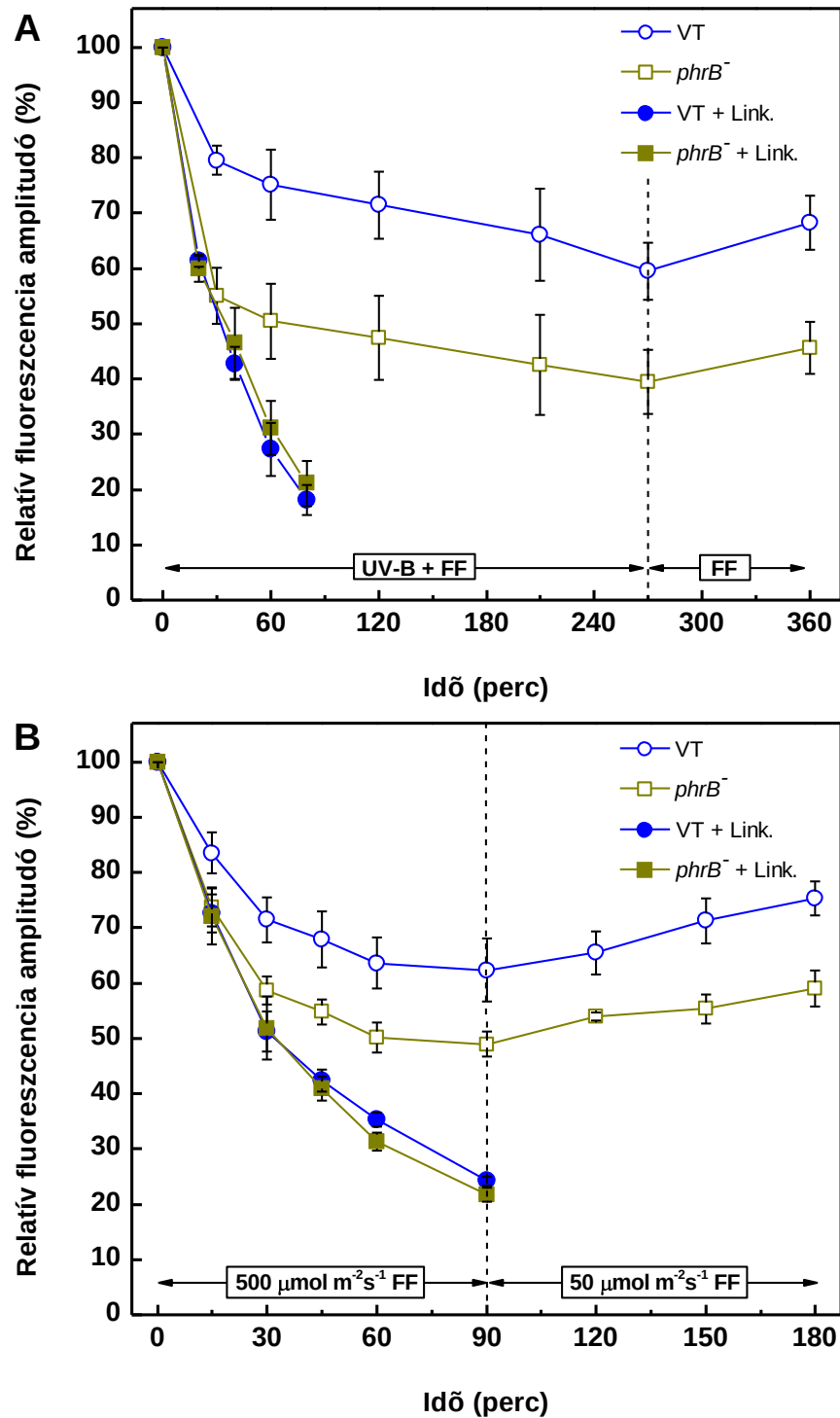
Mivel a PhrB homológjáról, a *Synechocystis* CPD fotoliáz enziméről bebizonyítottuk, hogy közvetetten befolyással van a fénystressz által károsított PSII aktivitásának visszaállításában, az volt a célunk, hogy kivizsgáljuk, hogy az említett folyamatban szerepet játszik-e a PhrB. Ennek érdekében összehasonlítottuk a VT és a *phrB*⁻ sejtek PSII

aktivitásának változásait UV-B, valamint magas intenzitású látható fény alatt. Ehhez fényimpulzus által indukált fluoreszcenciás valamint oxigéntermelési mérések adatait használtuk.

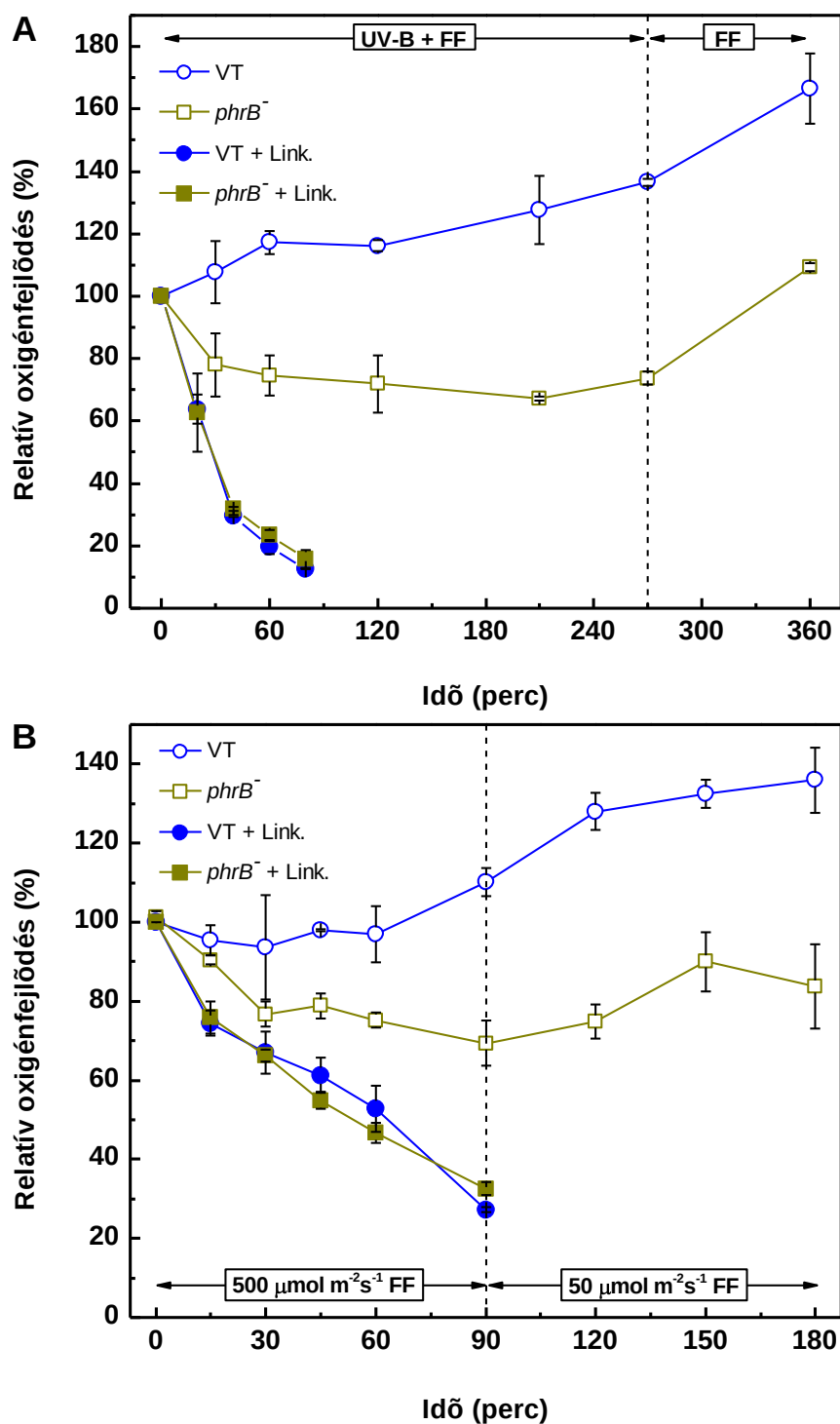
Az UV-B kezelések 360 percig tartottak és két szakaszból álltak (12. ábra). Az első szakasz 270 percet ölelt fel, ami alatt mindkét sejtvonalat $8 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ UV-B és $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ háttér FF-nek tettük ki. E szakasz folyamán a *PhrB*-t nélkülöző sejtek PSII aktivitása jelentősen nagyobb százalékban csökkent, mint a VT sejteké. 30 perccel az UV-B stressz megkezdése után a *phrB*⁻ sejtek PSII aktivitása a kiindulási érték 50%-ára esett, míg a VT sejtek ugyanaddig az időpontig csak 20%-ot veszítettek (12A. ábra). Ez a kezdeti jelentős PSII aktivitásbeli különbség (prob: 0.013, p: 0.05) jellemezte az UV-B kezelés első szakaszát. A kezelés második szakaszában lehetőséget nyújtottunk a sejteknek az UV-B által okozott károsodások kijavítására. Az UV-B sugárzás lekapcsolása után, 90 percen keresztül csak az $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ -os háttérfény érte a sejteket. Ennek köszönhetően mindkét sejtvonalt képes volt részben regenerálódni. A VT sejtek a stresszkezelést megelőző PSII aktivitásuk 70 százalékát érték el, míg a mutáns sejtvonalt a kezdeti aktivitásának mindössze 45%-át volt képes visszaállítani. A két sejtvonalt közötti kezdeti aktivitásbeli különbség jellemzően mindkét szakaszon keresztül fennmaradt (12A. ábra).

A PSII aktivitás fenntartása, stressz körülmények között gyors és hatékony fehérjeszintézist igényel. A fehérjeszintézist gátló linkomicin jelenlétében a VT és a *phrB*⁻ sejtek ugyanabban az ütemben és ugyanolyan gyorsan veszítettek PSII aktivitásukból. Fehérjeszintézis hiányában UV-B ($8 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) + FF ($50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) kezelés során mindössze 80 perc alatt mindkét sejtvonalt PSII aktivitása 20%-ig csökkent. Mivel ebben az esetben a fehérjeszintézis regeneráló hatása teljes mértékben kizárható, a látványos aktivitásbeli csökkenés kizárólag a PSII fénykárosodásának hatékonyságát tükrözi. Mindez arra utal, hogy a linkomicin nélküli kísérletekben, a VT és a *PhrB* hiányos sejtek között jelentkező különbségeket a csökkent hatékonyságú fehérjeszintézis és ezen keresztül az alacsonyabb PSII javítási kapacitás hozza létre.

A linkomicinnel kezelt sejtek adatai és a linkomicin hiányában mért adatok közti különbség a fehérjeszintézis hatékonyságát mutatja, ami a kísérletek 60-adik percében már szignifikáns különbséget mutat a VT és *phrB*⁻ sejtvonaltak között (prob: 0.043, p: 0.05) (12A. ábra).



12. ábra: Magas intenzitású FF vagy UV-B sugárzás által előidézett PSII aktivitásbeli különbségek a VT és *phrB*⁻ sejtekben. **A tábla:** A VT (kék) és *phrB*⁻ (sárga) sejtek 2 kezelési szakasznak voltak kitéve: 270' UV-B+FF (8 μmol m⁻² s⁻¹, 50 μmol m⁻² s⁻¹), 90' FF (50 μmol m⁻² s⁻¹). **B: tábla** A VT és *phrB*⁻ sejtek 2 kezelési szakaszon mentek át: 90' magas intenzitású FF (500 μmol m⁻² s⁻¹), 90' FF (50 μmol m⁻² s⁻¹). A kezeléseket a fehérjeszintézist gátló linkomicin jelenlétében (telt szimbólumok) illetve hiányában (üres szimbólumok) zajlottak. Az ábrákon szereplő adatok 3, egymástól független kísérlet eredményeinek átlagát képezik.



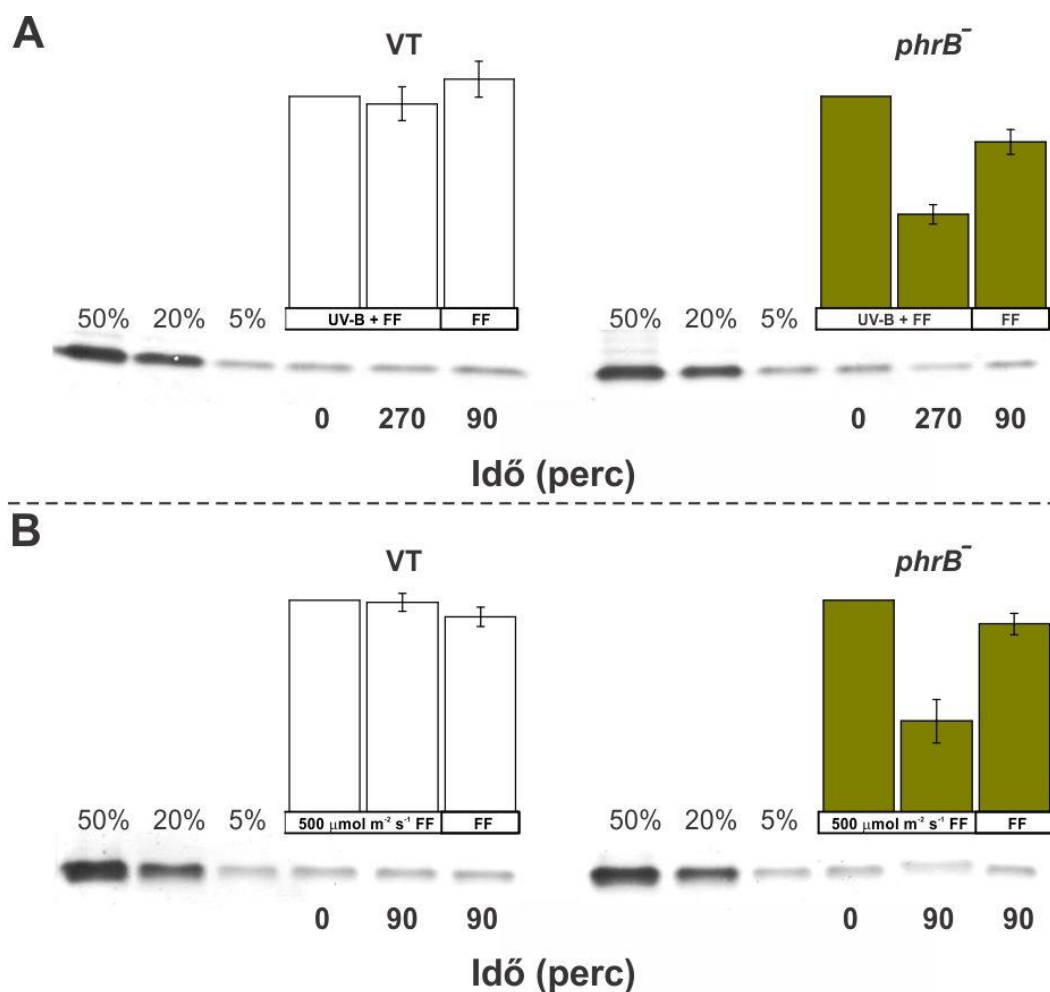
13. ábra: A VT és $phrB^-$ sejtek oxigéntermelésének változása UV-B sugárzás vagy magas intenzitású FF hatására. **A tábla:** A VT (kék) és $phrB^-$ (sárga) sejtek 2 kezelési szakasznak voltak kitéve: 270' UV-B+FF ($8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 90' FF ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). **B tábla:** A VT és $phrB^-$ sejtek 2 kezelési szakaszon mentek át: 90' magas intenzitású FF ($500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 90' FF ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). A kezelések a fehérjeszintézist gátló linkomicin jelenlétében (teli szimbólumok) illetve hiányában (üres szimbólumok) zajlottak. Az ábrákon szereplő adatok 3, egymástól független kísérlet eredményeinek átlagát jelentik.

Ahhoz, hogy megállapíthassuk, hogy a PhrB hiányában jelentkező csökkent fehérjeszintézis kizárólag csak UV stressz alatt észlelhető-e, magas intenzitású fehér fényben is megvizsgáltuk a PhrB hatását. A VT és a *phrB*⁻ sejtvonalakot 500 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ -os sugárzásnak tettük ki 90 percen keresztül, amit egy szintén 90 perces regenerálódás követett, 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ FF jelenlétében. Linkomicin jelenlétében a sejtek PSII aktivitási görbéje párhuzamosan haladva csökkent, míg linkomicin hiányában az aktivitás csökkenése 30 perc kezelés következtében már szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult a *phrB*⁻ sejtekben, a VT-hoz képest (prob: 0.045, p: 0.05) (12B. ábra). Ugyanez a különbség jellemezte a regenerációs szakaszt is.

A sejtvonalak stressz alatti oxigéntermelési rátái alátámasztják a fényimpulzus által indukált fluoreszcenciájukból leszűrt adatokat. UV-B sugárzás hatására a VT sejtek oxigéntermelése fokozódik, ami feltételezhetően a nagy mennyiségű fényenergia befogadását tükrözi, amely folyamatot a VT-ban egy hatékonyan működő fehérjeszintézis támogat. A mutáns sejtek oxigéntermelése ezzel szemben több mint 20 százaléknyi csökken az UV-B stressz első 30 percében. A nagy intenzitású FF közel azonos hatással van a *phrB*⁻ sejtvonagra, mint az UV-B sugárzás és 30 perc alatt 80 százalék alá csökkenti a mutáns sejtek oxigéntermelését a kiindulási értékhez képest. Az UV-B megvilágítás utáni regenerációs szakaszban a mutáns sejtek 90 perc alatt visszanyerték a stressz előtti oxigéntermelési kapacitásukat, míg a nagy intenzitású FF utáni regenerációs 90 perces szakasz végén mért oxigéntermelésük elmaradt a kiindulási értéktől (13. ábra).

4.2.3. D1 fehérjemennyiség változása UV-B és intenzív FF jelenlétében a VT és *phrB*⁻ sejtekben

Az UV-B sugárzás egyik elsődleges célpontja a PSII komplex javításának legfontosabb eleme a D1 fehérje (Cheregi és mtsai. 2007; Greenberg és mtsai. 1989; Sass és mtsai. 1997). A D1 fehérje lebontása és az ezt követő *de novo* szintézise nagy intenzitású látható fény okozta stressz alatt is kulcsfontosságú folyamat (Aro és mtsai. 1993; Nixon és mtsai. 2010). Kísérleteink során a VT-ban fellelhető D1 fehérje mennyisége nem mutatott nagy változást UV-B sugárzás (8 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) és fehér háttérfény (50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) hatására. Ellenben az UV-B kezelés végére a *phrB*⁻sejtek szabad szemmel is látható, szignifikáns mértékben veszítettek D1 mennyiségükből (prob: 0.001, p: 0.05) (14A. ábra). Ez a veszteség részben pótlódott a kezelést követő regenerációs szakasz végére, elérve azt a szintet, amely nem tért el szignifikánsan a VT regenerációs szakasza végén mért átlagos D1 szinttől (prob: 0.165, p: 0.05) (14A. ábra).



14. ábra: D1 fehérje szintek változása a VT és *phrB⁻* sejtek TM-jaiban, UV-B vagy nagy intenzitású FF hatására. A tábla: A VT (fehér) és *phrB⁻* (sárga) sejtek 2 kezelési szakasznak voltak kitéve: 270' UV-B+FF ($8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 90' FF ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). **B tábla:** A VT és *phrB⁻* sejtek 2 kezelési szakaszon mentek át: 90' magas intenzitású FF ($500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 90' FF ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Az ábrán szereplő oszlopok 3 egymástól független kísérlet számszerűsített adatait képviselik, amelyek a kezeletlen ($t=0$) mintákhoz viszonyulnak. A hígítási sorrend az 1 μg Chl-ra normált ($t=0$) fehérjeminta 2x-es (50%), 5x-es (20%) és 20x-os (5%) hígításait mutatja.

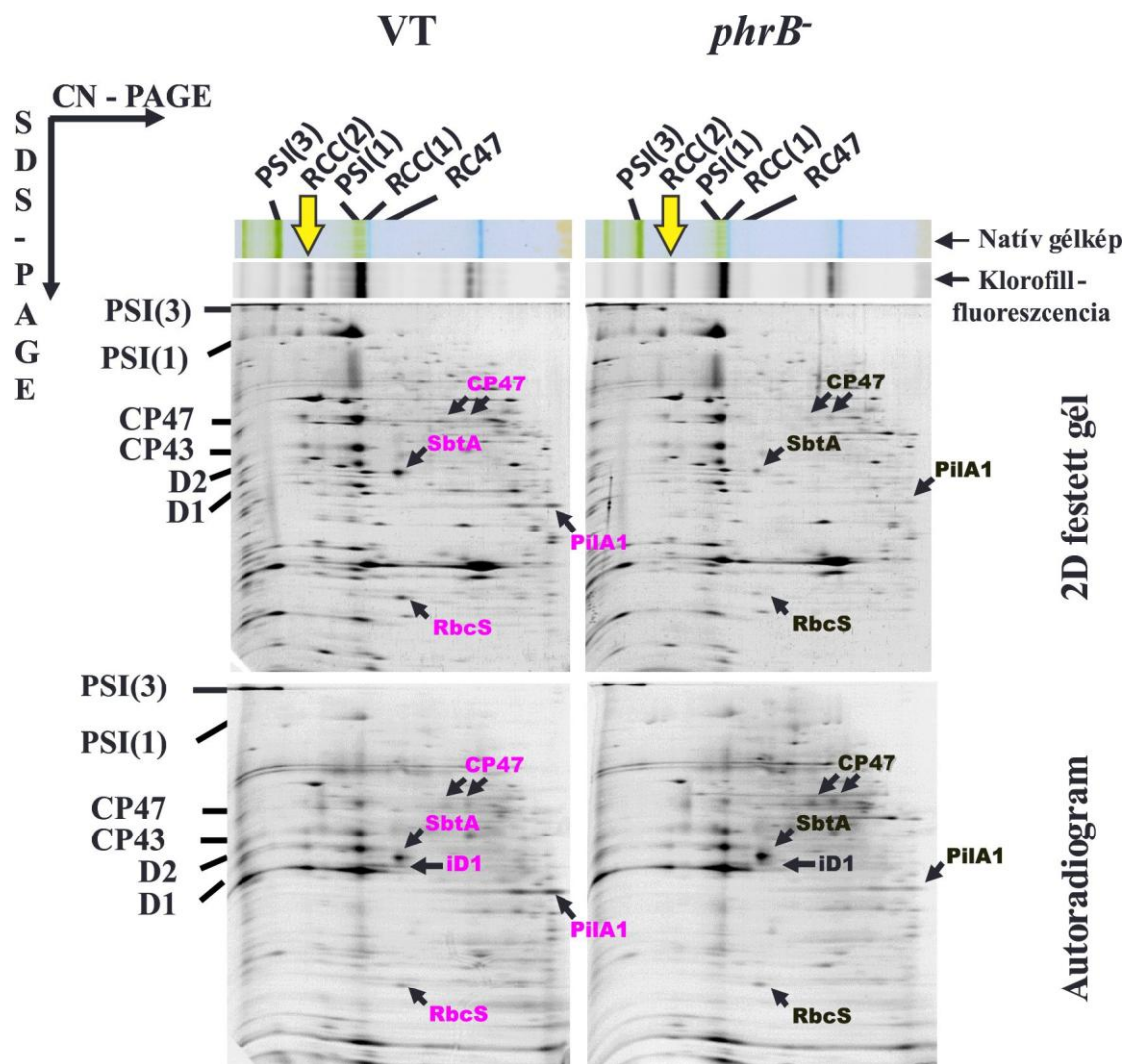
Hasonló eredményeket kaptunk akkor is, amikor $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ -os fehér fényel kezelt sejtekben ellenőriztük a D1 szintjének változását. A *PhrB* hiányos sejtek, a VT-hoz képest, kisebb hatékonysággal voltak csak képesek pótolni az erős fényben károsodott fehérjéket, és a kezelés végére a *phrB⁻* sejtek TM-jai szignifikánsan kevesebb D1 fehérjét tartalmaztak (prob: 0.014, p : 0.05) (14B. ábra). A regenerációs szakasz, az UV-B kísérlethez hasonlóan, csak részben segítette a mutáns sejt vonal tilakoidjainak D1 ellátását, viszont ez ebben az esetben is elég volt ahhoz, hogy ne térjen el szignifikánsan a VT regenerációja végén mért értékektől (prob: 0.911, p : 0.05) (14B. ábra).

A mutáns sejtek UV-B, valamint nagy intenzitású FF alatt tapasztalt csökkent D1 termelő képessége alátámasztja a fényimpulzus által indukált fluoreszcencia, valamint az oxigéntermelési mérésekből származó adatokat. Ezzel együtt megerősíti azt a hipotézist, miszerint UV-B és nagy intenzitású FF alatt a PhrB hiánya jelentős mértékben hátráltatja a PSII komplex javítását.

4.2.4. A PSII komplex összeszerelése PhrB hiányában

A PhrB hiánya befolyással van a stresszhatás után fellelhető D1 fehérje mennyiségére. Ahhoz, hogy kiderítsük, hogy ez a hatás csak a D1 fehérjére szorítkozik-e, a *phrB*⁻ sejtek membránfehérjéinek elválasztását és elemzését tűztük ki célul, amely folyamat, fehérje szinten, lehetővé teszi a PhrB hiánya hatásának vizsgálatát. A fehérjék elválasztása kétdimenziós autoradiográfiás képalkotással egybekötött natív SDS elektroforézissel történt (2D CN/SDS-PAGE). A PSII komplex oligomer formái mennyiségének meghatározásához a natív gél klorofill fluoreszcenciáját is lemértük (15. ábra). Ez utóbbi mérések eredményei azt mutatták, hogy a VT dimer állapotban lévő PSII reakciócentrum-tartalmához (RCC2) képest a *phrB*⁻ sejtek kisebb mennyiségű RCC2-vel rendelkeztek. A PSII komplex nagy alegységeinek (CP47, CP43, D1, D2) viszonylagos mennyisége, alátámasztotta az RCC2 mennyiségéről alkotott képet, miszerint a mutáns sejtekben kevesebb az összeszerelődött reakciócentrum. Ahogy az a festett és az autoradiográfiás gélen is látszik, a PhrB mutáns, a VT-hoz képest, nagyobb mennyiségű szabad CP47 alegységet tartalmazott (15. ábra). A VT-ban viszont a D1 fehérje köztes formája (intermediate D1, iD1) volt jelen feltűnő mennyiségben, amely a komplex összeszerelése során rendszerint a CP43-as és CP47-es antenna alegységekkel még nem rendelkező PSII reakcióközpontban van jelen (Komenda és mtsai. 2008). Ez az iD1 állapot nem volt jelentős mennyiségben azonosítható a *phrB*⁻ sejtek TM-jában, ami arra enged következtetni, hogy a mutáns sejtekben a PSII komplex *de novo* összeszerelése nem működik megfelelően. Feltételezhetően azért, mert a mutáció következtében nem képesek hatékonyan ellensúlyozni az UV-B illetve az intenzív FF káros hatásait.

A kétdimenziós gél felbontása rávilágított más, a PSII komplex felépítésében nem résztvevő fehérjék mennyiségének változására is. Ezek legtöbbje a PM-el asszociálható. A VT-hoz képest kisebb mennyiségben jelen lévő fehérjék közt volt a SbtA bikarbonát transzporter (Slr1512, 3-as sáv), az UrtA urea transzporter (Slr0447, 4-es sáv), a PilA1 pilus fehérje (Slr1694) és az RbcS fehérje (Slr0012, 6-os sáv), ami a ribulóz-1-5-bifoszfát karboxiláz/oxigenáz (RuBisCO) enzimkomplex kis alegységét alkotja, ami látszólag



15. ábra: A VT és a *phrB*⁻ sejtek radioaktívan jelölt membránfehérjéinek 2D géles (2D-CN/SDS-PAGE) elemzése. A VT és *phrB*⁻ sejtek pigment fehérje komplexeinek natív és 2D festett gélképe, klorofill-fluoreszcenciája és autoradiogramja 20 perc magas intenzitású FF ($500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) után. Az ábrán feltüntetett alegységek: PSII kettes fotokémiai rendszer, PSI egyes fotokémiai rendszer, RCC fotokémiai rendszer alapkompex, RC47 reakcióközpont CP47 antennafehérjével, CP43 antennafehérje, D1 és D2 PSII alegységek, SbtA bikarbonát transzporter, PiiA1 motilitás és feltételezett klorofill kötő fehérje, RbcS RuBisCO kis alegység, iD1 átmeneti D1 alegység. A zárójelekben feltüntetett értékek az illető fehérje komplex monomer (1), dimer (2) illetve trimer (3) állapotát jelölik. Minden egyes, gélre felvitt minta $5 \mu\text{g}$ klorofillt tartalmazott.

komplexet képez az SbtA fehérjével. Mindemellett egy a citoplazmával asszociálható foszfát-kötő transzporter fehérjét (*sll0680*) is találtunk, amelyből több volt jelen a mutáns sejtekben mint a VT-ban.

Összességükben a 2D gél adatok arra utalnak, hogy a PhrB hiánya befolyással van egyes a PM-hez köthető és legalább egy citoplazmafehérje szintézisére, az előbbieket közé sorolva a D1 fehérjét is, ami irodalmi adatok szerint a PM közelében szintetizálódik (Nickelsen és Rengstl 2013).

4.2.5. A *psbA* gén indukciója UV-B vagy magas intenzitású FF által, PhrB hiányában illetve jelenlétében

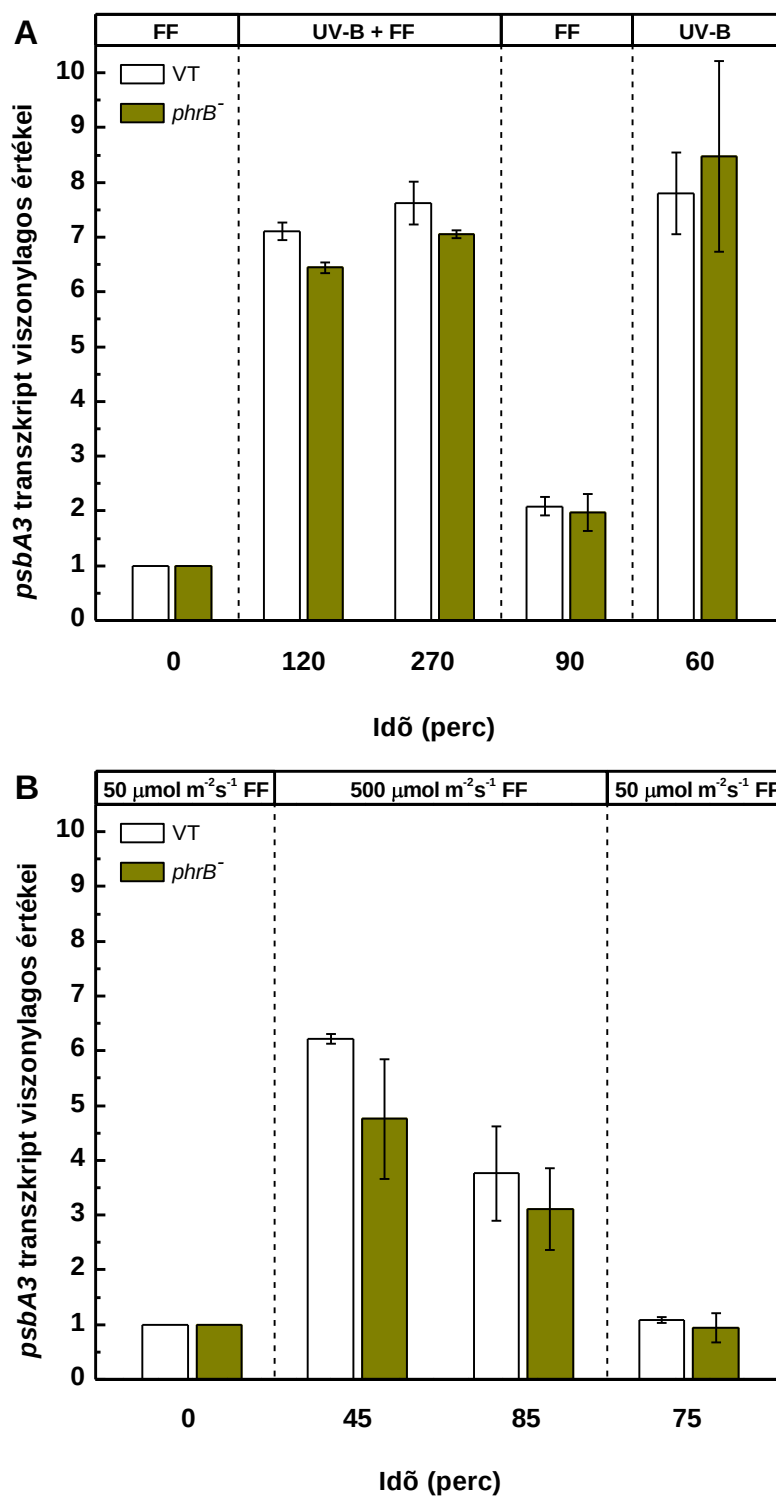
Fénystressz alatt a *psbA* gén transzkripciójának gyakorisága jelentősen megemelkedik, ami alapfeltétele annak, hogy mind UV-B (Huang és mtsai. 2002; Máté és mtsai. 1998), mind pedig magas intenzitású FF alatt (Hihara és mtsai. 2001; Huang és mtsai. 2002) elegendő mennyiségű D1 fehérje állhasson a PSII javítási ciklus rendelkezésére.

Synechocystis-ben a D1 fehérjét 3 *psbA* gén kódolja, amelyek közül UV-B (Máté és mtsai. 1998) valamint magas intenzitású FF hatására (Mohamed és mtsai. 1993) a *psbA3* indukálódik a legmarkánsabban. Kihasnálva e gén stressz-marker jellegét, segítségével megpróbáltuk meghatározni, hogy a PhrB, PSII javítási ciklusban kifejtett hatása a *de novo* szintetizálódó fehérjék transzkripciója előtt vagy után mutatkozik-e meg.

Azt találtuk, hogy az UV-B sugárzásnak kitett *phrB*⁻ sejtekben, a *psbA3* gén a VT-hoz hasonló mértékben indukálódik és a transzkript szintek nem térnek el szignifikánsan sem 120 percnél (prob: 0.247, p: 0.05), sem a kezelés végén, 270 perc után (prob: 0.925, at p: 0.05) (16A. ábra). Az indukáló tényező, UV-B hiányában, 90 perc alatt és 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ -os regenerációs fény mellett, a *psbA3* transzkript szintek mindkét sejtvonalban a stresszt megelőző szintre estek vissza. Szignifikáns eltérést ezen adatok között sem fedeztünk fel (prob: 0.996, p: 0.05).

Ezek után, amikor újabb adag UV-B sugárzásnak tettük ki a sejteket, a *psbA3* gén mind a VT-ban, mind a mutáns sejtekben határozott indukciót mutatott, ami szignifikáns eltérés nélküli, hasonló szintre emelte mindkét sejtvonal transzkript szintjeit (prob: 0.994, p: 0.05) (16A. ábra).

A nagy intenzitású fehér fénynél végzett kísérletek is hasonló eredményeket hoztak. Az 500 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ -os FF hasonló szintre emeli a VT és a *phrB*⁻ sejtek *psbA3* transzkript szintjeit amelyek nem térnek el szignifikánsan sem 45 perc (prob: 1.775, p: 0.05), sem 85 perc (prob: 0.332, p: 0.05) kezelés után (16B. ábra). A stresszkezelést követő 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ -os fény hatására a hRNS indukció megszűnik és a transzkript szintek a fénystressz előtti állapot körüli szintre állnak be mindkét sejtvonalban, nem mutatva szignifikáns eltérést egymástól (prob: 0.311, p: 0.05).



16. ábra: A *psbA3* transzkript szintjének relatív változása UV-B sugárzás és nagy intenzitású FF hatására VT és *phrB*⁻ sejtekben. **A tábla:** A VT (fehér) és *phrB*⁻ (sárga) sejtek 2 kezelési szakasznak voltak kitéve: 270' UV-B+FF ($8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 90' FF ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). **B tábla:** A VT és *phrB*⁻ sejtek 2 kezelési szakaszon estek át: 90' magas intenzitású FF ($500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 90' FF ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Az oszlopok a *psbA3* gén indukciójának mértékét ábrázolják, a *Synechocystis* RNáz P enzimének B alegységét kódoló *rnpB* (*slr1311*) háztartási gén RNS szintjéhez viszonyítva. Az ábrákon szereplő adatok 3 egymástól független kísérlet eredményeinek átlagát mutatják.

Mindez arra enged következtetni, hogy a PhrB jelenléte nem befolyásolja a *Synechocystis* sejtek azon képességét, hogy megfelelő mennyiségű *psbA3* hRNS-t szintetizáljanak a PSII komplex javítási ciklusának ellátásához. Következésképpen a PhrB fehérje transzkripció után fejt ki hatását.

4.2.6. A PhrB szerepe a DNS javításban

A DNS igen érzékeny az UV-B sugárzásra, aminek hatására jellegzetes, DNS és RNS polimerázokat gátló módosulások alakulnak ki a molekulán. Ezek többsége CPD (Weber 2005), amelyeket a fotoliáz enzim kellő hatékonysággal eltávolít a genomból (Sancar 2008). E hatékonyság mértékét jól szemlélteti annak a két adatsornak a nagymértékű átfedése, amelyek közül az egyik az összes olyan UV-B által létrehozott károsodást ábrázolja, amely gátolja a DNS polimeráz működését, a másik pedig kizárólag csak azokat a károsodásokat jeleníti meg, amelyeket a fotoliáz képes kijavítani (8., 9. ábrák). Ezek alapján nem túlzás azt állítani, hogy *Synechocystis*-ben a fotoliáz enzim képes kijavítani a legtöbb olyan DNS károsodást, ami az UV-B sugárzás következtében jön létre. Ez a nagymértékű hatékonyság elméletben energetikailag nem teszi kifizetődővé egy másik, azonos szerepű enzim jelenlétét. Ennek megfelelően azt találtuk, hogy a PhrB hiánya nem volt negatív hatással a DNS károsodások kijavítására, hiányában nem volt jelentős mennyiségű káros DNS képlet kimutatható a genomban (11. ábra). Ezek az adatok megegyeznek az irodalomban fellelhető információkkal, amelyek értelmében a PhrB ugyan *in vitro* körülmények között képes egyszálú DNS molekulához kötődni, viszont ez, a fotoliázzal ellentétben, nem specifikus (Brudler és mtsai. 2003), és valószínűleg nincs fotoreaktiváló szerepe (Hitomi és mtsai. 2000). Ugyanakkor elképzelhető, hogy a DNS-hez való kötődési képessége által, a PhrB más fajta DNS károsodás kijavításában játszik szerepet, amelyhez nem szükséges a specifikus fotoreaktiváció. Ennek kiderítése érdekében leellenőriztük az egyik leggyakoribb, oxidatív károsodás következtében létrejövő termék felhalmozódásának mértékét a PhrB hiányos sejtekben. Azt találtuk, hogy a 8-oxoG termék nem halmozódik fel kimutatható mennyiségben a sejtek genomjában (11. ábra).

Ezek az adatok arra engedtek következtetni, hogy a PhrB fehérje nem vesz részt az UV-B stressz során keletkező specifikus illetve gyakori DNS károsodások kijavításában.

4.2.7. A PhrB hatása az UV-B és magas intenzitású FF által gátolt PSII aktivitásra

Szerepénél fogva a fotoszintetikus apparátus leginkább UV-B-érzékeny eleme a PSII pigment-fehérje komplex. UV-B sugárzás hatására leáll a PSII elektrontranszportja és a sugárzás által károsított D1 és D2 fehérjék lebontásra kerülnek (Aro és mtsai. 1993; Nixon és mtsai. 2005). A károsodás mértéke minden esetben attól függ, hogy a stressz folyamán a *Synechocystis* sejt javító mechanizmusai milyen hatékonysággal képesek ellensúlyozni a sugárzás negatív hatásait. A PSII szempontjából ez főleg a D1 fehérje pótlásának kapacitását jelenti. Stressz körülmények között a D1 fehérje akár 20 percenként is lecserélődhet (Mattoo és mtsai. 1984).

Kísérleti eredményeink szerint fehérjeszintézist gátló linkomicin jelenlétében a VT és a PhrB fehérjét nélkülöző *phrB⁻* sejtekben azonos mértékben csökken a PSII aktivitás, mind UV-B, mind pedig magas intenzitású FF alatt. Ebből az következik, hogy a PhrB jelenléte nem befolyásolja a fénystressz, PSII-re gyakorolt káros hatását. Ugyanakkor, linkomicin hiányában, amikor a fehérjeszintézis működőképes, azonos fénystressz hatása alatt a *phrB⁻* sejtek PSII javítása kevésbé hatékony mint a VT sejteké. Ezt a jelenséget a fentiek mellett az is alátámasztja, hogy a *phrB⁻* sejtekben a D1 fehérje mennyisége alacsonyabb, mint a VT-ban (14. ábra). Vagyis a PhrB fehérje hiányában a PSII javítási folyamat nem működik kellőképpen hatékonyan, és ez érzékenyebbé teszi a *Synechocystis* sejteket a fénystresszre. Az a tény, hogy ez a jelenség nem csak UV-B sugárzás, hanem nagy intenzitású látható fény alatt is megfigyelhető, arra utal, hogy a PhrB hatása nem hullámhossz tartomány-specifikus.

4.2.8. A PhrB hatása a PSII pigment-fehérje komplex javítási ciklusára

A PSII javítási ciklus első fő lépése a D1 és D2 fehérjék lebontása és a fehérje komplexből való eltávolítása. E folyamat legfontosabb katalizátora mind UV-B (Cheregi és mtsai. 2007), mind pedig nagy intenzitású FF (Komenda és mtsai. 2006) esetében az FtsH proteáz. Mivel tapasztalataink szerint a *phrB⁻* sejtek TM-jából is eltávolítódik a D1 fehérje (14. ábra), eléggé valószínűtlen, hogy a PhrB fehérje ezt a folyamatot katalizálná. A javítási ciklus következő fontos lépése a *psbA* gének indukciója. Eredményeink azt mutatták, hogy a PhrB fehérje ebben a szakaszban sem játszik szerepet, mivel mind a jelenlétében (VT), mind a hiányában (*phrB⁻*) a *psbA2* és *psbA3* gének következetes transzkripciós indukciója volt megfigyelhető (16. ábra). A D1 fehérje *de novo* szintézisét követően a PSII alegységeinek összeszerelése a következő lépés. Ebbe a folyamatba kaptunk betekintést a kétdimenziós fehérje elválasztás által. Ennek alapján a PhrB hiányának hatása a PSII komplex dimer

formájának kialakulásában és PSII alegységek mennyiségének befolyásolásában jelentkezik (15. ábra). E két adatot összevetve arra következtettünk, hogy a PhrB szerepe vagy a *psbA* transzkriptumok átírásában vagy a már szintetizált alegységek összeszerelésénél keresendő. A PSII-vel asszociálható fehérjék mellett PhrB hiányában, más, PSII-höz nem kötődő fehérjék mennyisége is megváltozott. Fénystressz és az azt követő hatások szempontjából ezek közül a legfontosabbak az SbtA, RbcS és a PilA1 fehérjék. Az SbtA a bikarbonát transzportban játszik szerepet, míg az RbcS a ribulóz-1-5-bifoszfát karboxiláz/oxigenáz (RuBisCO) kis alegységét képezi, tehát fontos szerepet látnak el a CO₂ transzportjának és megkötésének folyamatában (Furbank és mtsai. 1996; Shibata és mtsai. 2002; Wang és mtsai. 2004). Az is említésre méltó, hogy 2D géles eredmények alapján e két fehérje látszólag komplexet képez egymással (15. ábra). Mindemellett, a szemmel láthatóan csökkent mennyiségük arra enged következtetni, hogy a *phrB* sejtekben alacsonyabb hatékonysággal zajlik a CO₂ megkötése, mint a VT-ban. Ez alátámasztja a stressz körülmények alatt mért PSII aktivitásbeli különbségeket a VT és a mutáns között, mivel a CO₂ megkötésének gátlásával növekszik a sejtek ROS tartalma, ami viszont gátolja a PSII komplex fehérjéinek szintézisét, különösen a D1-et (Murata és mtsai. 2007; Nishiyama és mtsai. 2001; Takahashi és Murata 2005; Takahashi és Murata 2006).

4.2.8.1. A PhrB hatása a CO₂ háztartásra

Alacsony szerves széntartalom (Ci) mellett a *Synechocystis* sejtekben, más génekkel együtt, indukálódik az *slr2006-2013* géncsoport is, amely sejtmembránt átszelő ionszállítással hozható összefüggésbe (Wang és mtsai. 2004). Az *slr2006-2013* géncsoport átírását más szénanyagcseréhez köthető génekkel (*ndhF3/ndhD3/cupA*, *sbtA/sbtB*) és a NADP(H) dehidrogenázt kódoló génnel együtt, az NdHR szabályozza (Figge és mtsai. 2001; Wang és mtsai. 2004). A felsorolt és szénanyagcseréhez köthető elemek közül kettőt viszont a PhrB is szabályoz. A PhrB-t kódoló *slr1629* gén hiánya közvetlenül ugyan nincs befolyással az *sbtA* és *rbcS* gének kifejeződésére (Brudler és mtsai. 2003), viszont a 2D géles adataink szerint befolyásolja az SbtA és RbcS fehérjék mennyiségét (15. ábra), valamint génkifejeződés szintjén, 7 másik génnel együtt, szabályozása alatt tartja a *slr2013*-at (Brudler és mtsai. 2003). Ezáltal a PhrB közvetetten kapcsolódik a *Synechocystis*-ben zajló CO₂ szállítási és/vagy Ci felhalmozási (CCM) folyamatnak. Ezt alátámasztja az az irodalmi adat, miszerint a CCM-hez szükséges gének inaktiválása érzékenyvé teszi a sejteket a magas intenzitású FF-el szemben (Xu és mtsai. 2008b), csakúgy, mint a PhrB hiánya (12., 13. ábrák). Ezt kiegészítve, a CO₂

megkötés folyamatának megszakítása a Calvin-Benson cikluson keresztül gátolja a D1 fehérjék szintézisét (Takahashi és Murata 2005; Takahashi és Murata 2006).

Ezt a két jelenséget, a magas intenzitású FF-re, valamint az UV-B-re való érzékenységet és a csökkent mennyiségű D1 fehérjét, látjuk akkor is, amikor inaktiváljuk a PhrB-t kódoló *sll1629*-es gént.

4.2.8.2. A PilA1-el társítható funkciók

A PilA1-et, ami a pilin fehérjecsalád kiemelkedő tagja, a *Synechocystis* felszínére kiválasztódó fehérjeként írták le (Sergeyenko és Los 2000), amelynek legfontosabb szerepe a sejt motilitásában van (Bhaya és mtsai. 2000; Bhaya és mtsai. 2001).

Ezen kívül, irodalmi adatokból az is ismert, hogy a PilA1 klorofill molekulák kötésével illetve szállításával is asszociálható (He és Vermaas 1999). A PilA1-et kódoló *sll1694* transzkript szintje megnövekszik ha a sejtben nincs jelen az *isiA* gén (Singh és mtsai. 2005). Ez utóbbi egy klorofill kötő fehérjét kódol, amely hasonlít a CP43 alegységhez, és szintézise vas megvonással könnyedén indukálható (Laudenbach és Straus 1988). Fő szerepe abban áll, hogy klorofillt kötve alternatív fénybegyűjtő antennaként működjön akkor, amikor a sejt alacsony vas-tartalma következtében a fikobiliszómák lebontásra kerülnek. Ugyanakkor ha az *isiA* gén nincs jelen a sejtben, akkor a *sll1694* transzkript szintje megnövekszik ami arra utalhat, hogy a PilA1 fehérje alternatív megoldásként átveheti az IsiA klorofill molekulát kötő illetve tároló szerepét (Singh és mtsai. 2005). Az elegendő klorofill molekula jelenléte szabályzó szerepet tölt be a PSII javítási ciklusának összeszerelési szakaszában (Hernandez-Prieto és mtsai. 2011; Kopečná és mtsai. 2013; Nixon és mtsai. 2010; Wu és Vermaas 1995). Így feltételezhető, hogy a PilA1 fehérje részt vesz a PSII javítási ciklusban, mint klorofillt kötő/tároló/szállító fehérje.

4.2.8.3. A PhrB hatása a PilA1-re

Az egysejtű cianobaktériumok mozgásához elengedhetetlen a IV-es típusú pilusok jelenléte. Ezek közül a legkiemelkedőbb szerepe a PilA1-nek (*sll1694*) van (Bhaya és mtsai. 2000; Bhaya és mtsai. 2001). PilA1 fehérjében hiányos ($\Delta sll1694$) *Synechocystis* sejtekkel végzett kísérletek alapján a PhrB fehérje fényreceptorként szolgálhat a sejtek mozgásához mivel különböző hullámhosszúságú fény alatt kivitelezett kísérletek azt mutatták, hogy képes befolyásolni a sejtek fototaxisát (Moon és mtsai. 2010b). Ebből kifolyólag feltételezhető, hogy a PhrB fehérje olyan jelátviteli utakra van hatással, amelyek a PilA1 fehérje szintézisét

szabályozzák. A fentiekkel összhangban a *phrB*⁻ mutánsban a PilA1 fehérje kisebb mennyiségben van jelen, mint a VT-ban (15. ábra).

A *Synechocystis* sejtek mozgása a cAMP által közvetített jelátviteli út szabályozása alatt áll. Az egyik lehetséges út, amelyen keresztül a PhrB kifejti a PilA1-et szabályzó hatását a cAMP jelátviteli rendszer. A cAMP molekula szintéziséhez adenilát cikláz nevű enzim szükséges, amelyet a *cya1* gén kódol. E gén hiányában a sejtek mozgásképtelenné válnak, viszont extracelluláris cAMP segítségével ez az állapot visszafordítható (Terauchi és Ohmori 1999). Emellett az is ismert, hogy a *Synechocystis* sejtek, a cAMP receptor fehérjéjük, a SYCRP1 fehérje hiányában is mozgásképtelenek, valamint az is, hogy a cAMP-SYCRP1 komplex szabályozza a pilusok szintézisét (Yoshimura 2000; Yoshimura és mtsai. 2002). A PhrB szerepét kutatva az egyik legfontosabb támpont a génexpresszióban betöltött szerepe. Stresszmentes környezetben a PhrB 8 gén transzkripció gátlásában játszik szerepet (Brudler és mtsai. 2003). E 8 gén közül az acetolaktát szintáz kódoló *ilvN* promótere, szekvencia adatok alapján, kötőhelyet biztosít az SYCRP1-nek (Ochoa de Alda és Houmard 2000). Ezek alapján feltételezhető, hogy a PhrB és az SYCRP1 legalább egy gén szabályzó régióján közös kötőhellyel rendelkezik. Ezáltal a PhrB serkentheti a pilusok szintézisét úgy, hogy elfoglalja a SYCRP1 kötőhelyét az *ilvN* promóterén, ami következtében több SYCRP1 fehérje marad szabadon a pilusok szintézisének serkentéséhez.

A PhrB fehérje nagy valószínűséggel nem a kék fényre adott és cAMP által közvetített jelátviteli út szabályzásában vesz részt (Ohmori és Okamoto 2004; Terauchi és Ohmori 2004). Kimutatták viszont, hogy UV-A megvilágítás alatt a hiánya befolyásolja a sejtek mozgását (Moon és mtsai. 2010b). Az UV-A sugárzás, a kék és vörös fény mellett az egyik legfontosabb fototaxist kiváltó tényező (Moon és mtsai. 2012), amit alátámaszt az is, hogy az UV-A befolyással van a cAMP molekulák szintézisére (Terauchi és Ohmori 2004), amelyek a sejt motilitásával társíthatók (Terauchi és Ohmori 1999). Mivel a PhrB feltehetően egy pterin jellegű másodlagos kromofórt köt, az elsődleges és másodlagos kromofórjának együttes abszorpciós spektruma a 377-410 nm-es tartományba esne (Huang és mtsai. 2006b; Klar és mtsai. 2007; Moon és mtsai. 2010a), ami átfed az UV-A tartománnyal, így megerősítva a PhrB fényreceptor szerepét.

Abszorpciós tulajdonságait és a sejtek mozgására gyakorolt hatását egybevetve joggal feltételezhető, hogy a PhrB egy UV-A-t illetve kék fényt érzékelő fehérje, amely e szerepe által képes befolyásolni a sejt cAMP tartalmát és ezáltal a pilusok bioszintézisét.

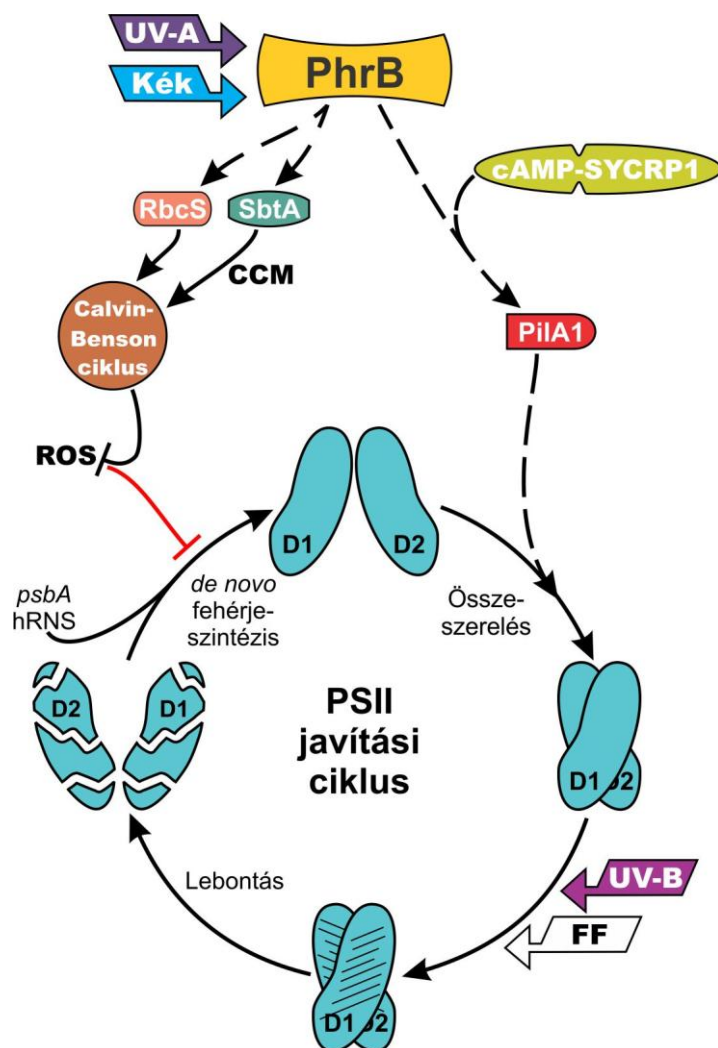
Kísérleteink során kimutattuk, hogy PhrB hiányában a *Synechocystis* sejtek érzékenyebben reagáltak az UV-B illetve a magas intenzitású FF stresszekre. A különböző időtartamú, intenzitású és hullámhossz- tartományba tartozó fény kezelések számos gén

transzkripcióját befolyásolják. Ezek között található olyanok is, amelyek rendkívül fontosak a *Synechocystis* pilusai szintézisében és működésében. A *pilT1* (*sll1533*), *pilT2* (*slr0161*), *pilC1* (*slr0162*) és *pilC2* (*slr0163*) gének kifejeződése, 15 perc magas intenzitású FF hatása következtében, lecsökkent (Hihara és mtsai. 2001). A PilT fehérje ATP-t kötésben játszik szerepet és más fajokban fellelhető ortológjai elengedhetetlenek a sejtmozgáshoz, míg a PilC fehérje szükséges a pilusok összeszereléséhez (Bhaya és mtsai. 2000; Huang és mtsai. 2002). Ezen kívül azt is kimutatták, hogy 1 órányi nagy intenzitású FF a *pilA1* kifejeződését is negatívan befolyásolja (Hihara és mtsai. 2001). UV-B stressz következtében jelentősen lecsökken a pilusok összeszereléséhez szükséges PilM-et kódoló *pilM* (*slr1274*) kifejeződése. A *pilT1* (*sll1533*) kifejeződése pedig nemcsak FF stressz, hanem UV-B hatására is veszít hatékonyságából (Huang és mtsai. 2002). Mivel a *Synechocystis* sejtek PhrB hiányában különösen érzékenyek és mozgásukban is korlátozottak (Moon és mtsai. 2010b), feltételezhető, hogy a PhrB fehérje fénystressz alatt részt vesz a pilusok összeszereléséhez elengedhetetlen fehérjék stabilizálásában illetve a pilusok mozgásának energiaellátását végző fehérjék segítésében.

A PhrB hatását, amint az a felsoroltakból is látszik, számos tanulmány adatai köthetik potenciálisan a PilA1 fehérje szintéziséhez. Ugyanakkor nem kizárt, hogy a PhrB a CO₂ fixálás folyamatában is szerepet játszik.

4.2.9. PhrB modell

Irodalmi adatok és saját eredményeink összevetésével a következő modell alapján magyarázzuk a PhrB hiányában észlelt jelenségeket:



17. ábra: A PhrB hatása a *Synechocystis* sejtek PSII javítási ciklusára. UV-B vagy/és nagy intenzitású fehér fény hatására a PSII reakcióközpont fehérjéi károsodást szenvednek, aminek következtében a D1 és D2 fehérjék lebontásra kerülnek. A PSII reakcióközpont aktivitását csak úgy nyerheti vissza, ha a hiányzó D1 és D2 fehérjék *de novo* szintetizálódnak, illetve szintézis után sikeresen összeszerelődnek. A PhrB a hRNS szintézise után fejt ki hatását. Egyrészt befolyásolhatja a *psbA* hRNS-ek átírását azáltal, hogy szabályozza az RbcS és SbtA fehérjék mennyiségét, így potenciálisan akadályozva a Calvin-Benson ciklus CO₂-kötő aktivitását, ami reaktív oxigéngyökök (ROS) kialakulásához vezethet. A ROS molekulák jelenléte gátolja a D1 fehérje szintézisét. Másrészt a fehérje alegységek PSII reakcióközponttá való összeszerelésénél fejtheti ki hatását, azáltal, hogy szabályozza a PilA1 fehérje mennyiségét, ami viszont a klorofill molekulák raktározásához illetve szállításához köthető, így befolyásolhatja az összeszerelési folyamatot.

5. Összefoglaló

5.1. A PhrA és PhrB hatása hatása a PSII javítási ciklusra

A PSII javítási ciklus egy rendkívül fontos folyamat, amely biztosítja a fotoszintézis hatékony működését. A folyamatot számos tényező befolyásolja (Murata és mtsai. 2007; Nishiyama és mtsai. 2011), jelen eredményeink szerint a PhrA fotoliáz és a PhrB Cry-DASH kriptokróm jelenléte is. Szerkezeti homológiájuk ellenére a két fehérje különböző utakon keresztül hat a PSII javítási ciklusára, hiányuk mégis azonos hatást eredményez: a D1 alegység pótlásának és feltehetően beépülésének hatékonysága csökken (18. ábra).

Kimutattuk, hogy UV-B sugárzás alatt, a PhrA hiányában felhalmozódó DNS károsodások befolyással vannak a fotoszintetikus folyamatokra. Továbbá azt is ismertettük, hogy a fotoliáz enzim hiánya súlyosbítja az UV-B stressz során keletkező károsodásokat a *Synechocystis* sejtek PSII komplexében. Ez utóbbi a DNS javítás hiánya következtében felhalmozódó DNS károsodások miatt jelentkezik, amelyek jelentősen csökkentik a PSII komplex működéséhez elengedhetetlen *psbA* géncsalád elemeinek hatékony kifejeződését. Ezáltal a D1 fehérje pótlása lelassul, ami által jelentősen csökken a sejtek fotoszintetikus aktivitása (5. ábra). Kijelenthetjük tehát, hogy az UV-B által indukált károsodások enyhítésében fontos szerepet játszó két javító mechanizmus, a DNS javítási folyamata és a PSII komplex javítási folyamata közvetlen kapcsolatban áll egymással (10. ábra).

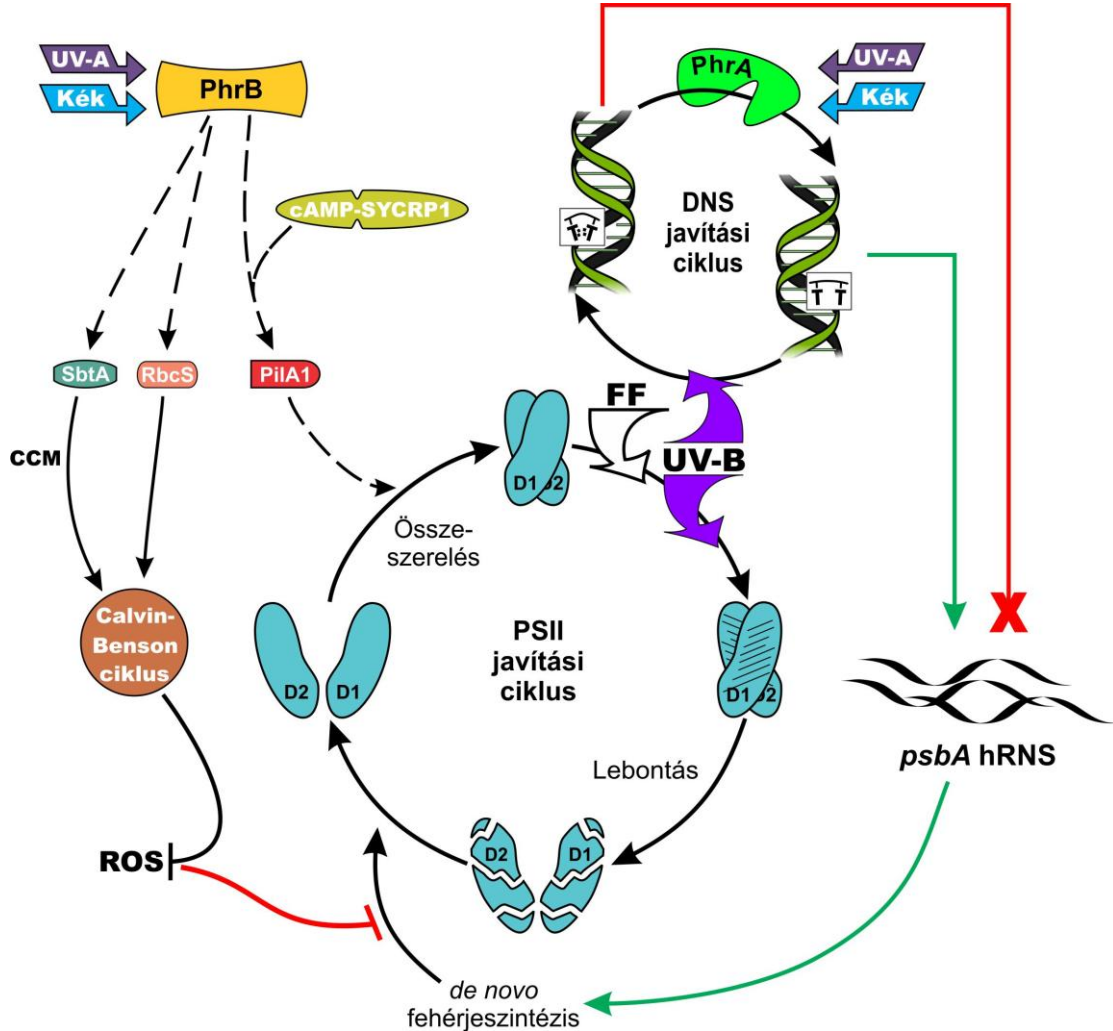
A fotoszintetizáló élőlények PSII komplexének D1 alegysége az illető szervezetek leggyorsabban cserélődő fehérjéje. Emiatt érthető, hogy a DNS polimeráz és ezzel együtt az általános génkifejeződést gátló DNS károsodások felhalmozódása, gyorsan jelentkező, gátló hatással van a fehérjecserére szoruló PSII komplex javítási ciklusára. Adataink arra is rámutatnak, hogy ha az UV-B stressz fehér háttérfény és a *Synechocystis* sejtek számára ideális hőmérséklet mellett zajlik, akkor a PhrA hatékony működése, az általunk alkalmazott dózisok mellett elegendő ahhoz, hogy a DNS károsodások szintje kellően alacsonyan maradjon, így nincs befolyással a PSII javítási ciklusára. A DNS károsodások negatív hatása akkor válik jelentőssé, amikor a PhrA gátolva van. Mivel a fotoliáz enzim és általában a pirimidin dimerek javítási folyamatának hatékonysága hőmérsékletfüggő az említett gátló hatás természetes körülmények között is felléphet. Sarkvidéki és havasi növények esetében például a magas UV-B sugárzás és alacsony hőmérséklet következtében felléphet a DNS e specifikus javítási folyamatának gátlása, ami az egyedek genomjának károsodása mellett magas mutagén potenciált hordoz magában (Lamare és mtsai. 2006).

A fotoliáz enzim mellett és azzal akár párhuzamosan a PhrB is szerepet játszik a *Synechocystis* PSII aktivitásának regenerálásában. Hiánya gátolja azon károsodások kijavítását, amelyeket a sejtek UV-B sugárzás valamint magas intenzitású FF következtében szereznek. Adataink rávilágítanak arra, hogy a fotoliázzal homológ PhrB nem vesz részt a specifikus UV-B termékek eltávolításában, sem pedig ROS-ok által létrehozott 8-oxoG kijavításában. A DNS-javítási szerepét kizárva, arra következtettünk, hogy a PhrB a PSII javítási ciklus egy vagy több lépésénél, a fehérje komplex kijavításánál vagy összeszerelésénél szerepet játszó fehérjék szabályzásában fejt ki hatását. Ezek közül, funkcióik alapján, különösen fontosnak tűnnek a CO₂ fixálással asszociálható SbtA és RbcS fehérjék, valamint a PilA1 fehérje, amelynek főleg a sejtek motilitásában tulajdonítanak szerepet (17. ábra). Az utóbbi fehérje a klorofill molekulák szállításához illetve tárolásához is köthető, ami egy rendkívül fontos folyamat a PSII javítási ciklusban (He és Vermaas 1999; Singh és mtsai. 2005).

A PhrB egyik szerepe a kék fény hatásának közvetítése a *Synechocystis* jelátviteli útjaihoz. Mivel az UV-A/kék spektrum fotonjai viszonylag könnyen okoznak károsodást a PSII komplexben, joggal feltételezhető, hogy hasonló hatékonysággal indukálják a károsodások kijavításának folyamatát elindító fényreceptorokat is. Az általunk feltárt adatok arra utalnak, hogy a PhrB feltételezhetően a szénanyagcserén vagy/és a PilA1 fehérjén keresztül a PSII javítási ciklusát szabályozza.

5.2. Összefoglaló modell

A vizsgálataink során felhalmozott adatok grafikus formában a következőképpen festenek:



18. ábra: A PhrA és PhrB hatása a *Synechocystis* PSII javítási ciklusára. A PhrB jelenléte befolyásolja többek között az SbtA és RbcS fehérjék mennyiségét. Mindkét fehérje a Calvin-Benson ciklus aktivitásához köthető, amelynek hatékony működése megelőzi a ROS-ok túlzott képződését. A magas ROS szintek közvetlenül képesek akadályozni a D1 alegység *de novo* szintézisét. Ezzel párhuzamosan a PhrB a PilA1 fehérje mennyiségére is hatással van. Ez utóbbi a klorofill molekulák kötésével és szállításával társítható, ami egy rendkívül fontos eleme a PSII komplex javításának. A javítás közben felszabaduló klorofill molekulák, mindamelllett, hogy megkötésük hiánya lassítja a komplex összeszerelését, oxidatív károsodás forrásai lehetnek. A PhrA jelenléte feltétlenül szükséges az UV-B sugárzás alatt keletkezett DNS károsítások kijavításához. Hiányában a DNS molekulán pirimidin dimerek halmozódnak fel, amelyek akadályozzák a polimerázok működését. Ezáltal leáll a D1 alegység *de novo* szintéziséhez elengedhetetlen hRNS-ek termelése és leáll a PSII javítási folyamat.

5.3. Következtetések

- Az UV-B sugárzásból származó DNS károsodások befolyással vannak a fotoszintetikus folyamatokra.
- A fotoliáz (PhrA) enzim hiánya súlyosbítja az UV-B stressz során keletkező károsodásokat a *Synechocystis* sejtek PSII komplexében.
- Az emelkedett UV-B érzékenység a DNS javítás hiánya következtében felhalmozódó DNS károsodások miatt jelentkezik, amelyek jelentősen csökkentik a PSII komplex működéséhez elengedhetetlen *psbA* géncsalád elemeinek hatékony kifejeződését.
- Az UV-B által indukált károsodások enyhítésében fontos szerepet játszó két javító mechanizmus, a DNS javítási folyamata és a PSII komplex javítási folyamata, közvetlenül kapcsolatban áll egymással.
- A PhrB hiánya akadályozza a sejtek UV-B sugárzás valamint a magas intenzitású FF következtében szerzett károsodásainak kijavítását.
- A hatását, a PhrA-val ellentétben, nem a specifikus UV-B-károsodások visszafordítása és nem a ROS-ok által létrehozott 8-oxoG kijavítása útján fejt ki.
- A PhrB feltehetőleg a PSII javítási ciklusban fellelhető, a javításban vagy a fehérje komplex összeszerelésében szerepet játszó fehérjéken keresztül fejt ki hatását.
- Ezek közül, funkcióik alapján, kitűnnek a CO₂ fixálással asszociálható SbtA és RbcS fehérjék, valamint a PilA1 fehérje, amelynek főleg a sejtek motilitásában tulajdonítanak szerepet, viszont jelenlétük a klorofill molekulák szállításához, illetve tárolásához is köthető.

6. Idézett irodalom

- Adir, N., H. Zer, S. Shochat, and I. Ohad. 2003. Photoinhibition - a historical perspective. *Photosynthesis research* 76:343-370.
- Agrawal, G. K., M. Asayama, and M. Shirai. 1999. Light-dependent and rhythmic psbA transcripts in homologous/heterologous cyanobacterial cells. *Biochemical and biophysical research communications* 255:47-53.
- Agrawal, G. K., H. Kato, M. Asayama, and M. Shirai. 2001. An AU-box motif upstream of the SD sequence of light-dependent psbA transcripts confers mRNA instability in darkness in cyanobacteria. *Nucleic acids research* 29:1835-1843.
- Ahmad, M., J. Jarillo, L. J. Klimczak, L. G. Landry, T. Peng, R. L. Last, and a. R. Cashmore. 1997. An enzyme similar to animal type II photolyases mediates photoreactivation in Arabidopsis. *The Plant cell* 9:199-207.
- Ahmad, M., J. Jarillo, O. Smirnova, and a. R. Cashmore. 1998. The CRY1 blue light photoreceptor of Arabidopsis interacts with phytochrome A in vitro. *Molecular cell* 1:939-948.
- Ahmad, M. and A. R. Cashmore. 1993. HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* 366:162-166.
- Alfonso, M., I. Perewoska, and D. Kirilovsky. 2000. Redox control of psbA gene expression in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. Involvement of the cytochrome b(6)/f complex. *Plant physiology* 122:505-516.
- Allakhverdiev, S. I. and N. Murata. 2004. Environmental stress inhibits the synthesis de novo of proteins involved in the photodamage-repair cycle of Photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochimica et biophysica acta* 1657:23-32.
- Anbudurai, P. R. and H. B. Pakrasi. 1993. Mutational analysis of the PsbL protein of photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Zeitschrift fur Naturforschung.C, Journal of biosciences* 48:267-274.
- Aro, E. M., M. Suorsa, a. Rokka, Y. Allahverdiyeva, V. Paakkarinen, a. Saleem, N. Battchikova, and E. Rintamoki. 2005. Dynamics of photosystem II: a proteomic approach to thylakoid protein complexes. *Journal of experimental botany* 56:347-356.
- Aro, E. M., I. Virgin, and B. Andersson. 1993. Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochimica et biophysica acta* 1143:113-134.
- Asada, K. 1999. THE WATER-WATER CYCLE IN CHLOROPLASTS: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50:601-639.

- Asayama, M., Y. Hayasaka, M. Kabasawa, M. Shirai, and T. Ohyama. 1999. An Intrinsic DNA Curvature Found in the Cyanobacterium *aeruginosa* K-81 Affects the Promoter Activity of *rpoD1* Principal Sigma Factor1 Microcystis Encoding a. *Biochem, J* 125:460-468.
- Aubert, C., P. Mathis, a. P. Eker, and K. Brettel. 1999. Intraprotein electron transfer between tyrosine and tryptophan in DNA photolyase from *Anacystis nidulans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:5423-5427.
- Aubert, C., M. H. Vos, P. Mathis, a. P. Eker, and K. Brettel. 2000. Intraprotein radical transfer during photoactivation of DNA photolyase. *Nature* 405:586-590.
- Banerjee, R., E. Schleicher, S. Meier, R. M. o. Viana, R. Pokorny, M. Ahmad, R. Bittl, and A. Batschauer. 2007. The signaling state of Arabidopsis cryptochrome 2 contains flavin semiquinone. *The Journal of biological chemistry* 282:14916-14922.
- Barbato, R., G. Friso, F. Rigoni, F. D. Vecchia, and G. M. Giacometti. 1992. Structural changes and lateral redistribution of photosystem II during donor side photoinhibition of thylakoids. *The Journal of cell biology* 119:325-335.
- Barber, J. 2012. Photosystem II: the water-splitting enzyme of photosynthesis. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 77:295-307.
- Barker, M., R. de Vries, J. Nield, J. Komenda, and P. J. Nixon. 2006. The deg proteases protect *Synechocystis* sp. PCC 6803 during heat and light stresses but are not essential for removal of damaged D1 protein during the photosystem two repair cycle. *The Journal of biological chemistry* 281:30347-30355.
- Bentley, F. K., H. Luo, P. Dilbeck, R. L. Burnap, and J. J. Eaton-rye. 2008. Effects of Inactivating *psbM* and *psbT* on Photodamage and Assembly of Photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemistry* 47:11637-11646.
- Beukers, R. and W. Berends. 1960. The effect of paramagnetic substances on the conversion of some pyrimidines by ultraviolet radiation. *Biochimica et biophysica acta* 38:573-575.
- Bhaya, D., N. R. Bianco, D. Bryant, and a. Grossman. 2000. Type IV pilus biogenesis and motility in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Molecular microbiology* 37:941-951.
- Bhaya, D., A. Takahashi, P. Shahi, and A. R. Grossman. 2001. Novel Motility Mutants of *Synechocystis* Strain PCC 6803 Generated by In Vitro Transposon Mutagenesis. *Journal of Bacteriology* 183:6140-6143.
- Bjelland, S. and E. Seeberg. 2003. Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 531:37-80.
- Boehm, M., J. Yu, V. Krynicka, M. Barker, M. Tichy, J. Komenda, P. J. Nixon, and J. Nield. 2012. Subunit organization of a *synechocystis* hetero-oligomeric thylakoid FtsH complex involved in photosystem II repair. *The Plant cell* 24:3669-3683.

- Bouly, J. P., E. Schleicher, M. Dionisio-Sese, F. Vandenbussche, D. Van Der Straeten, N. Bakrim, S. Meier, A. Batschauer, P. Galland, R. Bittl, and M. Ahmad. 2007. Cryptochrome blue light photoreceptors are activated through interconversion of flavin redox states. *The Journal of biological chemistry* 282:9383-9391.
- Brettel, K. and M. Byrdin. 2010. Reaction mechanisms of DNA photolyase. *Current opinion in structural biology* 20:693-701.
- Bricker, T. M., J. L. Roose, R. D. Fagerlund, L. K. Frankel, and J. J. Eaton-rye. 2012. The extrinsic proteins of Photosystem II. *Biochimica et biophysica acta* 1817:121-142.
- Briggs, W. R. and M. Olney. 2001. Photoreceptors in plant photomorphogenesis to date. Five phytochromes, two cryptochromes, one phototropin, and one superchrome. *Plant physiology* 125:85-88.
- Briggs, W. R. and J. M. Christie. 2002. Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends in plant science* 7:204-210.
- Brudler, R., K. Hitomi, H. Daiyasu, H. Toh, K. i. Kucho, M. Ishiura, M. Kanehisa, V. Roberts, T. Todo, J. Tainer, and E. D. Getzoff. 2003. Identification of a new cryptochrome class. Structure, function, and evolution. *Molecular cell* 11:59-67.
- Brunelle, S., E. S. Hazard, E. E. Sotka, and F. M. V. Dolah. 2007. Characterization of a Dinoflagellate Cryptochrome Blue-Light Receptor With a Possible Role in Circadian Control of the Cell Cycle. *Journal of Phycology* 43:509-518.
- Campbell, D., V. Hurry, a. K. Clarke, P. Gustafsson, and G. Oquist. 1998. Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 62:667-683.
- Ceriani, M. F., T. K. Darlington, D. Staknis, P. Más, a. a. Petti, C. J. Weitz, and S. Kay. 1999. Light-dependent sequestration of TIMELESS by CRYPTOCHROME. *Science (New York, N.Y.)* 285:553-556.
- Chatgililoglu, C., M. Guerra, P. Kaloudis, C. Houée-Lévin, J. L. Marignier, V. N. Swaminathan, and T. Carell. 2007. Ring opening of the cyclobutane in a thymine dimer radical anion. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 13:8979-8984.
- Chaves, I., R. Pokorny, M. Byrdin, N. Hoang, T. Ritz, K. Brettel, L. O. Essen, G. T. J. van der Horst, A. Batschauer, and M. Ahmad. 2011. The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals. *Annual review of plant biology* 62:335-364.
- Chaves, I., K. Yagita, S. Barnhoorn, H. Okamura, G. T. J. V. Horst, and F. Tamanini. 2006. Functional Evolution of the Photolyase / Cryptochrome Protein Family : Importance of the C Terminus of Mammalian CRY1 for Circadian Core Oscillator Performance *Molecular and Cellular Biology*. 26:1743-1753.
- Cheregi, O., C. Sicora, P. B. Kós, M. Barker, P. J. Nixon, and I. Vass. 2007. The role of the FtsH and Deg proteases in the repair of UV-B radiation-damaged Photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Biochimica et biophysica acta* 1767:820-828.

- Chiba, S., Y. Akiyama, and K. Ito. 2002. Membrane Protein Degradation by FtsH Can Be Initiated from Either End Membrane Protein Degradation by FtsH Can Be Initiated from Either End. 184.
- Christie, J. M., M. Salomon, K. Nozue, M. Wada, and W. R. Briggs. 1999. LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (nph1): binding sites for the chromophore flavin mononucleotide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:8779-8783.
- Constant, S., I. Perewoska, M. Alfonso, and D. Kirilovsky. 1997. Expression of the psbA gene during photoinhibition and recovery in *Synechocystis* PCC 6714: inhibition and damage of transcriptional and translational machinery prevent the restoration of photosystem II activity. *Plant molecular biology* 34:1-13.
- Cullen, J. J., P. J. Neale, and M. P. Lesser. 1992. Biological weighting function for the inhibition of phytoplankton photosynthesis by ultraviolet radiation. *Science (New York, N.Y.)* 258:646-650.
- Daiyasu, H., T. Ishikawa, K. i. Kuma, S. Iwai, T. Todo, and H. Toh. 2004. Identification of cryptochrome DASH from vertebrates. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 9:479-495.
- De Las Rivas, J. and J. Barber. 2004. Analysis of the Structure of the PsbO Protein and its Implications. *Photosynthesis research* 81:329-343.
- De Las Rivas, J., P. Heredia, and A. Roman. 2007. Oxygen-evolving extrinsic proteins (PsbO,P,Q,R): bioinformatic and functional analysis. *Biochimica et biophysica acta* 1767:575-582.
- Debrieux, D., M. Trevisan, and C. Fankhauser. 2013. Conditional involvement of constitutive photomorphogenic1 in the degradation of phytochrome A. *Plant physiology* 161:2136-2145.
- Donahue, B., S. Yin, J. S. Taylor, D. Reines, and P. C. Hanawalt. 1994. Transcript cleavage by RNA polymerase II arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the DNA template. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:8502-8506.
- Drath, M., N. Kloft, A. Batschauer, K. Marin, J. Novak, and K. Forchhammer. 2008. Ammonia triggers photodamage of photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Plant physiology* 147:206-215.
- El Bissati, K. and D. Kirilovsky. 2001. Regulation of psbA and psaE expression by light quality in *Synechocystis* species PCC 6803. A redox control mechanism. *Plant physiology* 125:1988-2000.
- Ellis, R. J. 2001. Macromolecular crowding: an important but neglected aspect of the intracellular environment. *Current opinion in structural biology* 11:114-119.
- Emery, P., W. V. So, M. Kaneko, J. C. Hall, and M. Rosbash. 1998. CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell* 95:669-679.

- Espagne, A., M. Byrdin, A. P. M. Eker, and K. Brettel. 2009. Very fast product release and catalytic turnover of DNA photolyase. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 10:1777-1780.
- Facella, P., L. Lopez, A. Chiappetta, M. B. Bitonti, G. Giuliano, and G. Perrotta. 2006. CRY-DASH gene expression is under the control of the circadian clock machinery in tomato. *FEBS letters* 580:4618-4624.
- Favory, J. J., A. Stec, H. Gruber, L. Rizzini, A. Oravecz, M. Funk, A. Albert, C. Cloix, G. I. Jenkins, E. J. Oakeley, H. K. Seidlitz, F. Nagy, and R. Ulm. 2009. Interaction of COP1 and UVR8 regulates UV-B-induced photomorphogenesis and stress acclimation in *Arabidopsis*. *The EMBO journal* 28:591-601.
- Ferreira, K. N., T. M. Iverson, K. Maghlaoui, J. Barber, and S. Iwata. 2004. Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science (New York, N.Y.)* 303:1831-1838.
- Fiedler, B., T. Börner, and A. Wilde. 2005. Phototaxis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: role of different photoreceptors. *Photochemistry and photobiology* 81:1481-1488.
- Figge, R. M., C. Cassier-Chauvat, F. Chauvat, and R. Cerff. 2001. Characterization and analysis of an NAD(P)H dehydrogenase transcriptional regulator critical for the survival of cyanobacteria facing inorganic carbon starvation and osmotic stress. *Molecular microbiology* 39:455-468.
- Foster, J. S., A. K. Singh, L. J. Rothschild, and L. Sherman. 2007. Growth-phase dependent differential gene expression in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 and regulation by a group 2 sigma factor. *Archives of microbiology* 187:265-279.
- Friedberg, E. C. 2003. DNA damage and repair. *Nature* 421:436-440.
- Furbank, R. T., J. A. Chitty, S. V. Caemmerer, and D. Jenkins. 1996. Antisense RNA Inhibition of RbcS Gene Expression Reduces Rubisco Level and Photosynthesis in the C₃ Plant *Flaveria bideni*. 725-734.
- Gaber, A., M. Tamoi, T. Takeda, Y. Nakano, and S. Shigeru. 2001. reduce unsaturated fatty acid hydroperoxides in *Synechocystis* PCC 6803. 499:32-36.
- Golden, S. S. 1995. MINIREVIEW Light-Responsive Gene Expression in Cyanobacteria. 177:1651-1654.
- Greenberg, B. M., V. Gaba, O. Canaani, S. Malkin, a. K. Mattoo, and M. Edelman. 1989. Separate photosensitizers mediate degradation of the 32-kDa photosystem II reaction center protein in the visible and UV spectral regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86:6617-6620.
- Gressel, J. 1979. Blue light photoreception. *Photochemistry and photobiology* 30:749-754.
- Griffin, E., D. Staknis, and C. J. Weitz. 1999. Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock. *Science (New York, N.Y.)* 286:768-771.

- Guskov, A., J. Kern, A. Gabdulkhakov, M. Broser, A. Zouni, and W. Saenger. 2009. Cyanobacterial photosystem II at 2.9-Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride. *Nature structural & molecular biology* 16:334-342.
- Hakala, M., I. Tuominen, M. Keranen, T. Tyystjarvi, and E. Tyystjarvi. 2005. Evidence for the role of the oxygen-evolving manganese complex in photoinhibition of Photosystem II. *Biochimica et biophysica acta* 1706:68-80.
- Harmer, S. L. 2009. The circadian system in higher plants. *Annual review of plant biology* 60:357-377.
- Hausuhl, K., B. Andersson, and I. Adamska. 2001. A chloroplast DegP2 protease performs the primary cleavage of the photodamaged D1 protein in plant photosystem II. *The EMBO journal* 20:713-722.
- He, Q. and W. Vermaas. 1998. Chlorophyll a availability affects psbA translation and D1 precursor processing in vivo in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:5830-5835.
- He, Q. and W. Vermaas. 1999. Genetic deletion of proteins resembling Type IV pilins in *Synechocystis* sp. PCC 6803 : their role in binding or transfer of newly synthesized chlorophyll. 1175-1188.
- Heelis, P. F., G. Payne, and a. Sancar. 1987. Photochemical properties of *Escherichia coli* DNA photolyase: selective photodecomposition of the second chromophore. *Biochemistry* 26:4634-4640.
- Heelis, P. F., R. F. Hartman, and S. D. Rose. 1995. Photoenzymic repair of UV-damaged DNA: a chemist's perspective. *Chemical Society Reviews* 24:289-297.
- Heijde, M. and R. Ulm. 2013. Reversion of the Arabidopsis UV-B photoreceptor UVR8 to the homodimeric ground state. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110:1113-1118.
- Heijde, M., G. Ā. Zabulon, F. Corellou, T. Ishikawa, J. Brazard, A. Usman, F. d. r. Sanchez, P. Plaza, M. Martin, A. Falciatore, T. Todo, F. o. Y. Bouget, and C. Bowler. 2010. Characterization of two members of the cryptochrome/photolyase family from *Ostreococcus tauri* provides insights into the origin and evolution of cryptochromes. *Plant, cell & environment* 33:1614-1626.
- Hernandez-Prieto, M., T. Tibiletti, L. Abasova, D. Kirilovsky, I. Vass, and C. Funk. 2011. The small CAB-like proteins of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: their involvement in chlorophyll biogenesis for Photosystem II. *Biochimica et biophysica acta* 1807:1143-1151.
- Herranen, M., E. M. Aro, and T. Tyystjarvi. 2001. Two distinct mechanisms regulate the transcription of photosystem II genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Physiologia plantarum* 112:531-539.
- Herrin, D. and A. Michaels. 1985. In vitro synthesis and assembly of the peripheral subunits of coupling factor CF1 (alpha and beta) by thylakoid-bound ribosomes. *Arch Biochem Biophys* 237:224-236.

- Higgins, K. M. and R. S. Lloyd. 1987. Purification of the T4 endonuclease V. Mutation research 183:117-121.
- Hihara, Y., A. Kamei, M. Kanehisa, A. Kaplan, and M. Ikeuchi. 2001. DNA Microarray Analysis of Cyanobacterial Gene Expression during Acclimation to High Light. 13:793-806.
- Hinterstoisser, B., M. Cichna, O. Kuntner, and G. n. A. Peschek. 1993. Cooperation of plasma and thylakoid membranes for the biosynthesis of chlorophyll in cyanobacteria: the role of the thylakoid centers. Journal of Plant Physiology 142:407-413.
- Hirose, Y., T. Shimada, R. Narikawa, M. Katayama, and M. Ikeuchi. 2008. Cyanobacteriochrome CcaS is the green light receptor that induces the expression of phycobilisome linker protein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105:9528-9533.
- Hitomi, K., K. Okamoto, H. Daiyasu, H. Miyashita, S. Iwai, H. Toh, M. Ishiura, and T. Todo. 2000. Bacterial cryptochrome and photolyase: characterization of two photolyase-like genes of *Synechocystis* sp. PCC6803. Nucleic acids research 28:2353-2362.
- Horsfall, M. J. and C. W. Lawrence. 1994. Accuracy of replication past the TC (6-4) adduct. Journal of molecular biology 235:465-471.
- Huala, E., P. W. Oeller, E. Liscum, I. S. Han, E. Larsen, and W. R. Briggs. 1997. Arabidopsis NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain. Science (New York, N.Y.) 278:2120-2123.
- Huang, F., S. Fulda, M. Hagemann, and B. Norling. 2006a. Proteomic screening of salt-stress-induced changes in plasma membranes of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. Proteomics 6:910-920.
- Huang, L., M. P. McCluskey, H. Ni, and R. A. Larossa. 2002. Global Gene Expression Profiles of the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 in Response to Irradiation with UV-B and White Light. J. Bacteriol. 184:6845-6858.
- Huang, Y., R. Baxter, B. S. Smith, C. L. Partch, C. L. Colbert, and J. Deisenhofer. 2006b. Crystal structure of cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana* and its implications for photolyase activity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103:17701-17706.
- Huesgen, P. F., H. Schuhmann, and I. Adamska. 2009. Deg/HtrA proteases as components of a network for photosystem II quality control in chloroplasts and cyanobacteria. Research in microbiology 160:726-732.
- Hughes, J. 2010. Phytochrome three-dimensional structures and functions. Biochemical Society transactions 38:710-716.
- Husain, I., G. B. Sancar, S. R. Holbrook, and a. Sancar. 1987. Mechanism of damage recognition by *Escherichia coli* DNA photolyase. The Journal of biological chemistry 262:13188-13197.

- Imaizumi, T., T. Kanegae, and M. Wada. 2000. Cryptochrome nucleocytoplasmic distribution and gene expression are regulated by light quality in the fern *Adiantum capillus-veneris*. *The Plant cell* 12:81-96.
- Imaizumi, T., A. Kadota, M. Hasebe, and M. Wada. 2002. Cryptochrome light signals control development to suppress auxin sensitivity in the moss *Physcomitrella patens*. *The Plant cell* 14:373-386.
- Imamura, S. and M. Asayama. 2009. Sigma factors for cyanobacterial transcription. *Gene regulation and systems biology* 3:65-87.
- Ito, K. and Y. Akiyama. 2005. Cellular functions, mechanism of action, and regulation of FtsH protease. *Annual review of microbiology* 59:211-231.
- Jansen, M., a. K. Mattoo, and M. Edelman. 1999. D1-D2 protein degradation in the chloroplast. Complex light saturation kinetics. *European journal of biochemistry / FEBS* 260:527-532.
- Jansen, M. A. K., V. Gaba, B. M. Greenberg, A. K. Mattoo, M. Edelman, and B. Dagan. 1996. Low threshold levels of ultraviolet-B in a background of photosynthetically active radiation trigger rapid degradation of the D2 protein of photosystem-II. 9:693-699.
- Johnson, J. L., S. Hamm-Alvarez, G. Payne, G. B. Sancar, K. V. Rajagopalan, and a. Sancar. 1988. Identification of the second chromophore of *Escherichia coli* and yeast DNA photolyases as 5,10-methenyltetrahydrofolate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85:2046-2050.
- Kagawa, T. 2003. The phototropin family as photoreceptors for blue light-induced chloroplast relocation. *Journal of plant research* 116:77-82.
- Kamata, T., H. Hiramoto, N. Morita, J. R. Shen, N. H. Mann, and Y. Yamamoto. 2005. Quality control of Photosystem II: an FtsH protease plays an essential role in the turnover of the reaction center D1 protein in *Synechocystis* PCC 6803 under heat stress as well as light stress conditions. *Photochemical & Photobiological Sciences* 4:983-990.
- Kanai, S., R. Kikuno, H. Toh, H. Ryo, and T. Todo. 1997. Molecular Evolution of the Photolyase Blue-Light Photoreceptor Family. 535-548.
- Kao, Y. T., C. Saxena, L. Wang, A. Sancar, and D. Zhong. 2005. Direct observation of thymine dimer repair in DNA by photolyase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:16128-16132.
- Kato, Y. and W. Sakamoto. 2009. Protein Quality Control in Chloroplasts: A Current Model of D1 Protein Degradation in the Photosystem II Repair Cycle. *Journal of Biochemistry* 146:463-469.
- Kavakli, I. H. and A. Sancar. 2004. Analysis of the role of intraprotein electron transfer in photoreactivation by DNA photolyase in vivo. *Biochemistry* 43.

- Kehoe, D. M. and A. Gutu. 2006. Responding to color: the regulation of complementary chromatic adaptation. *Annual review of plant biology* 57:127-150.
- Kelner, B. A. 1949. EFFECT OF VISIBLE LIGHT ON THE RECOVERY OF. 35.
- Keren, N., M. Liberton, and H. B. Pakrasi. 2005. Photochemical competence of assembled photosystem II core complex in cyanobacterial plasma membrane. *The Journal of biological chemistry* 280:6548-6553.
- Kirchhoff, H., U. Mukherjee, and H. J. Galla. 2002. Molecular architecture of the thylakoid membrane: lipid diffusion space for plastoquinone. *Biochemistry* 41:4872-4882.
- Klar, T., R. Pokorny, J. Moldt, A. Batschauer, and L. O. Essen. 2007. Cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana*: structural and functional analysis of its complex with a folate light antenna. *Journal of molecular biology* 366:954-964.
- Kleine, T., P. Lockhart, and A. Batschauer. 2003. An *Arabidopsis* protein closely related to *Synechocystis* cryptochrome is targeted to organelles.
- Kliebenstein, D. J., J. E. Lim, L. G. Landry, and R. L. Last. 2002. *Arabidopsis* UVR8 regulates ultraviolet-B signal transduction and tolerance and contains sequence similarity to human regulator of chromatin condensation 1. *Plant physiology* 130:234-243.
- Klinkert, B., F. Ossenbühl, M. Sikorski, S. Berry, L. Eichacker, and J. Å. Nickelsen. 2004. PrtA, a periplasmic tetratricopeptide repeat protein involved in biogenesis of photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *The Journal of biological chemistry* 279:44639-44644.
- Kobayashi, Y., T. Ishikawa, J. Hirayama, H. Daiyasu, S. Kanai, H. Toh, I. Fukuda, T. Tsujimura, N. Terada, Y. Kamei, S. Yuba, S. Iwai, and T. Todo. 2000. Molecular analysis of zebra fish photolyase / cryptochrome family : two types of cryptochromes present in zebrafish. *Genes to Cells*.725-738.
- Komenda, J. and J. Barber. 1995. Comparison of psbO and psbH deletion mutants of *Synechocystis* PCC 6803 indicates that degradation of D1 protein is regulated by the QB site and dependent on protein synthesis. *Biochemistry* 34:9625-9631.
- Komenda, J., M. Barker, S. Kuvikova, R. de Vries, C. W. Mullineaux, M. Tichy, and P. J. Nixon. 2006. The FtsH protease slr0228 is important for quality control of photosystem II in the thylakoid membrane of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *The Journal of biological chemistry* 281:1145-1151.
- Komenda, J., H. A. G. Hassan, B. A. Diner, R. J. Debus, J. Barber, and P. J. Nixon. 2000. Degradation of the Photosystem II D1 and D2 proteins in different strains of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 varying with respect to the type and level of psbA transcript.635-645.
- Komenda, J., J. Knoppová, V. Krynicky, P. J. Nixon, and M. Tichy. 2010. Role of FtsH2 in the repair of Photosystem II in mutants of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 with impaired assembly or stability of the CaMn(4) cluster. *Biochimica et biophysica acta* 1797:566-575.

- Komenda, J., J. Å. Nickelsen, M. Tichy, O. Prasil, L. Eichacker, and P. J. Nixon. 2008. The cyanobacterial homologue of HCF136/YCF48 is a component of an early photosystem II assembly complex and is important for both the efficient assembly and repair of photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *The Journal of biological chemistry* 283:22390-22399.
- Komenda, J., V. Reisinger, B. C. Müller, M. Dobakova, B. Granvogl, and L. A. Eichacker. 2004. Accumulation of the D2 protein is a key regulatory step for assembly of the photosystem II reaction center complex in *Synechocystis* PCC 6803. *The Journal of biological chemistry* 279:48620-48629.
- Komenda, J., R. Sobotka, and P. J. Nixon. 2012. Assembling and maintaining the Photosystem II complex in chloroplasts and cyanobacteria. *Current opinion in plant biology* 15:245-251.
- Komenda, J., M. Tichy, and L. Eichacker. 2005. The PsbH protein is associated with the inner antenna CP47 and facilitates D1 processing and incorporation into PSII in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Plant & cell physiology* 46:1477-1483.
- Komenda, J., M. Tichy, O. Prasil, J. Knoppová, S. Kuvikova, R. de Vries, and P. J. Nixon. 2007. The exposed N-terminal tail of the D1 subunit is required for rapid D1 degradation during photosystem II repair in *Synechocystis* sp PCC 6803. *The Plant cell* 19:2839-2854.
- Kopečná, J., R. Sobotka, and J. Komenda. 2013. Inhibition of chlorophyll biosynthesis at the protochlorophyllide reduction step results in the parallel depletion of Photosystem I and Photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Planta* 237:497-508.
- Krieger-Liszkay, A., C. Fufezan, and A. Trebst. 2008. Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanism. *Photosynthesis research* 98:551-564.
- Krzywda, S., A. M. Brzozowski, C. Verma, K. Karata, T. Ogura, and A. J. Wilkinson. 2002. The Crystal Structure of the AAA Domain of the ATP-Dependent Protease FtsH Ř Resolution of *Escherichia coli* at 1 . 5 Å. 10:1073-1083.
- Kume, K., M. J. Zylka, S. Sriram, L. P. Shearman, D. R. Weaver, X. Jin, E. S. Maywood, M. H. Hastings, and S. M. Reppert. 1999. mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* 98:193-205.
- Kunkel, D. 1982. Thylakoid centers: Structures associated with the cyanobacterial photosynthetic membrane system. *Archives of microbiology* 133:97-99.
- Kunz, B., H. J. Anderson, M. J. Osmond, and E. J. Vonarx. 2005. Components of nucleotide excision repair and DNA damage tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Environmental and molecular mutagenesis* 45:115-127.
- Kwok, W. M., C. Ma, and D. L. Phillips. 2008. A Doorway State Leads to Photostability or Triplet Photodamage in Thymine DNA. *Journal of the American Chemical Society* 130:5131-5139.

- Lamare, M. D., M. F. Barker, M. P. Lesser, and C. Marshall. 2006. DNA photorepair in echinoid embryos: effects of temperature on repair rate in Antarctic and non-Antarctic species. *The Journal of experimental biology* 209:5017-5028.
- Laudenbach, D. E. and N. Straus. 1988. Characterization of a cyanobacterial iron stress-induced gene similar to psbC. *Journal of Bacteriology* 170:5018-5026.
- Li, H. and L. Sherman. 2000. A redox-responsive regulator of photosynthesis gene expression in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology* 182:4268-4277.
- Li, Q. H. and H. Q. Yang. 2007. Cryptochrome signaling in plants. *Photochemistry and photobiology* 83:94-101.
- Li, Y. F. and A. Sancar. 1990. Active site of *Escherichia coli* DNA photolyase: mutations at Trp277 alter the selectivity of the enzyme without affecting the quantum yield of photorepair. *Biochemistry* 29:5698-5706.
- Lin, C., H. Yang, and H. Guo. 1998. Enhancement of blue-light sensitivity of *Arabidopsis* seedlings by a blue light receptor cryptochrome 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:2686-2690.
- Lin, C. and T. Todo. 2005. The cryptochromes. *Genome biology* 6:220.
- Liscum, E. and W. R. Briggs. 1995. Mutations in the NPH1 locus of *Arabidopsis* disrupt the perception of phototropic stimuli. *The Plant cell* 7:473-485.
- Liu, L. J., Y. C. Zhang, Q. H. Li, Y. Sang, J. Mao, H. L. Lian, L. Wang, and H. Q. Yang. 2008. COP1-mediated ubiquitination of CONSTANS is implicated in cryptochrome regulation of flowering in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 20:292-306.
- Loll, B., J. Kern, W. Saenger, A. Zouni, and J. Biesiadka. 2005. Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II. *Nature* 438:1040-1044.
- Loll, B., J. Kern, W. Saenger, A. Zouni, and J. Biesiadka. 2007. Lipids in photosystem II: interactions with protein and cofactors. *Biochimica et biophysica acta* 1767:509-519.
- MacFarlane, A. W. and R. J. Stanley. 2003. Cis-syn thymidine dimer repair by DNA photolyase in real time. *Biochemistry* 42:8558-8568.
- Mann, N. H., N. Novac, C. W. Mullineaux, J. Newman, S. Bailey, and C. Robinson. 2000. Involvement of an FtsH homologue in the assembly of functional photosystem I in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS letters* 479:72-77.
- Markovitsi, D., T. Gustavsson, and A. Banyasz. 2010. Absorption of UV radiation by DNA: spatial and temporal features. *Mutation research* 704:21-28.
- Masson, F., T. Laino, U. Rothlisberger, and J. Å. Hutter. 2009. A QM/MM investigation of thymine dimer radical anion splitting catalyzed by DNA photolyase. *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry* 10:400-410.

- Máté, Z., L. Sass, M. Szekeres, I. Vass, and F. Nagy. 1998. UV-B-induced differential transcription of *psbA* genes encoding the D1 protein of photosystem II in the Cyanobacterium *synechocystis* 6803. *The Journal of biological chemistry* 273:17439-17444.
- Mathews, S. 2006. Phytochrome-mediated development in land plants: red light sensing evolves to meet the challenges of changing light environments. *Molecular Ecology* 15:3483-3503.
- Mattoo, a. K., H. Hoffman-Falk, J. B. Marder, and M. Edelman. 1984. Regulation of protein metabolism: Coupling of photosynthetic electron transport to in vivo degradation of the rapidly metabolized 32-kilodalton protein of the chloroplast membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81:1380-1384.
- Maul, M. J., T. R. M. Barends, A. F. Glas, M. J. Cryle, T. Domratcheva, S. Schneider, I. Schlichting, and T. Carell. 2008. Crystal structure and mechanism of a DNA (6-4) photolyase. *Angewandte Chemie (International ed.in English)* 47:10076-10080.
- Mees, A., T. Klar, P. Gnau, U. Hennecke, A. P. M. Eker, T. Carell, and L. O. Essen. 2004. Crystal structure of a photolyase bound to a CPD-like DNA lesion after in situ repair. *Science (New York, N.Y.)* 306:1789-1793.
- Melis, A., J. A. Nemson, and M. A. Harrison. 1992. Damage to functional components and partial degradation of Photosystem II reaction center proteins upon chloroplast exposure to ultraviolet-B radiation. *1100:312-320.*
- Minai, L., K. Wostrikoff, F. A. Wollman, and Y. Choquet. 2006. Chloroplast biogenesis of photosystem II cores involves a series of assembly-controlled steps that regulate translation. *The Plant Cell* 18:159-175.
- Mohamed, a. and C. Jansson. 1991. Photosynthetic electron transport controls degradation but not production of *psbA* transcripts in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Plant molecular biology* 16:891-897.
- Mohamed, A., J. Eriksson, H. Osiewacz, and C. Jansson. 1993. Differential expression of the *psbA* genes in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Molecular and General Genetics MGG* 238:161-168.
- Mohamed, A. and C. Jansson. 1989. Influence of light on accumulation of photosynthesis-specific transcripts in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Plant molecular biology* 13:693-700.
- Montgomery, B. L. and J. C. Lagarias. 2002. Phytochrome ancestry: sensors of bilins and light. *Trends in plant science* 7:357-366.
- Moon, Y. J., S. I. Kim, and Y. H. Chung. 2012. Sensing and Responding to UV-A in Cyanobacteria. *International journal of molecular sciences* 13:16303-16332.
- Moon, Y. J., S. J. Kim, Y. M. Park, and Y. H. Chung. 2010a. Sensing UV/blue: Pterin as a UV-A absorbing chromophore of cryptochrome. *Plant Signaling & Behavior* 5:1127-1130.

- Moon, Y. J., E. M. Lee, Y. S. M. Park, W. I. Chung, and Y. H. Chung. 2010b. The role of cyanopterin in UV/blue light signal transduction of cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 phototaxis. *Plant & cell physiology* 51:969-980.
- Müller, M. and T. Carell. 2009. Structural biology of DNA photolyases and cryptochromes. *Current opinion in structural biology* 19:277-285.
- Mullineaux, C. W. 1999. *A USTRALIAN JOURNAL OF The thylakoid membranes of cyanobacteria : structure , dynamics and function.* 26.
- Mulo, P., C. Sicora, and E. M. Aro. 2009. Cyanobacterial psbA gene family: optimization of oxygenic photosynthesis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 66:3697-3710.
- Murata, N., S. Takahashi, Y. Nishiyama, and S. I. Allakhverdiev. 2007. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochimica et biophysica acta* 1767:414-421.
- Murphy, A. K., M. Tammara, F. Cortazar, Y. M. Gindt, and J. P. M. Schelvis. 2008. Effect of the cyclobutane cytidine dimer on the properties of *Escherichia coli* DNA photolyase. *The journal of physical chemistry.B* 112:15217-15226.
- Nakajima, S., M. Sugiyama, S. Iwai, K. Hitomi, E. Otsoshi, S. T. Kim, C. Z. Jiang, T. Todo, a. B. Britt, and K. Yamamoto. 1998. Cloning and characterization of a gene (UVR3) required for photorepair of 6-4 photoproducts in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic acids research* 26:638-644.
- Nakao, M., S. Okamoto, M. Kohara, T. Fujishiro, T. Fujisawa, S. Sato, S. Tabata, T. Kaneko, and Y. Nakamura. 2010. CyanoBase: the cyanobacteria genome database update 2010. *Nucleic acids research* 38:D379-D381.
- Narikawa, R., Y. Fukushima, T. Ishizuka, S. Itoh, and M. Ikeuchi. 2008. A novel photoactive GAF domain of cyanobacteriochrome AnPixJ that shows reversible green/red photoconversion. *Journal of molecular biology* 380:844-855.
- Ng, W. O. and H. B. Pakrasi. 2001. DNA photolyase homologs are the major UV resistance factors in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Molecular and General Genetics MGG* 264:924-930.
- Ng, W. O., R. Zentella, Y. Wang, J. S. Taylor, and H. B. Pakrasi. 2000. PhrA, the major photoreactivating factor in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 codes for a cyclobutane-pyrimidine-dimer-specific DNA photolyase. *Archives of microbiology* 173:412-417.
- Nickelsen, J. Å. and B. Rengstl. 2013. Photosystem II assembly: from cyanobacteria to plants. *Annual review of plant biology* 64:609-635.
- Ninu, L., M. Ahmad, C. Miarelli, A. Cashmore, and G. Giuliano. 1999. Cryptochrome 1 controls tomato development in response to blue light. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 18:551-556.

- Nishiyama, Y., H. Yamamoto, S. I. Allakhverdiev, M. Inaba, a. Yokota, and N. Murata. 2001. Oxidative stress inhibits the repair of photodamage to the photosynthetic machinery. *The EMBO journal* 20:5587-5594.
- Nishiyama, Y., S. I. Allakhverdiev, and N. Murata. 2006. A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Biochimica et biophysica acta* 1757:742-749.
- Nishiyama, Y., S. I. Allakhverdiev, and N. Murata. 2011. Protein synthesis is the primary target of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Physiologia plantarum* 142:35-46.
- Nishiyama, Y., S. I. Allakhverdiev, H. Yamamoto, H. Hayashi, and N. Murata. 2004. Singlet oxygen inhibits the repair of photosystem II by suppressing the translation elongation of the D1 protein in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemistry* 43:11321-11330.
- Nixon, P. J., M. Barker, M. Boehm, R. de Vries, and J. Komenda. 2005. FtsH-mediated repair of the photosystem II complex in response to light stress. *Journal of experimental botany* 56:357-363.
- Nixon, P. J., F. Michoux, J. Yu, M. Boehm, and J. Komenda. 2010. Recent advances in understanding the assembly and repair of photosystem II. *Annals of botany* 106:1-16.
- Noguchi, T. 2002. Dual role of triplet localization on the accessory chlorophyll in the photosystem II reaction center: photoprotection and photodamage of the D1 protein. *Plant & cell physiology* 43:1112-1116.
- Nowaczyk, M. M., R. Hebel, E. Schlodder, H. E. Meyer, B. Warscheid, and M. Rögner. 2006. Psb27, a cyanobacterial lipoprotein, is involved in the repair cycle of photosystem II. *The Plant cell* 18:3121-3131.
- O'Brien, P. A. and J. A. Houghton. 1982. PHOTOREACTIVATION and EXCISION REPAIR OF UV INDUCED PYRIMIDINE DIMERS IN THE UNICELLULAR CYANOBACTERIUM *GLOEOCAPSA ALPICOLA* (*SYNECHOCYSTIS* PCC 6308). *Photochemistry and photobiology* 35:359-364.
- Ochoa de Alda, J. and J. Houmard. 2000. Genomic survey of cAMP and cGMP signalling components in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Microbiology (Reading, England)* 146 Pt 12:3183-3194.
- Ohmori, M. and S. Okamoto. 2004. Photoresponsive cAMP signal transduction in cyanobacteria. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 3:503-511.
- Ohnishi, N., S. I. Allakhverdiev, S. Takahashi, S. Higashi, M. Watanabe, Y. Nishiyama, and N. Murata. 2005. Two-step mechanism of photodamage to photosystem II: step 1 occurs at the oxygen-evolving complex and step 2 occurs at the photochemical reaction center. *Biochemistry* 44:8494-8499.

- Ohnishi, N. and Y. Takahashi. 2008. Chloroplast-encoded PsbT is required for efficient biogenesis of photosystem II complex in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynthesis research* 98:315-322.
- Otoshi, E., T. Yagi, T. Mori, T. Matsunaga, O. Nikaido, S. T. Kim, K. Hitomi, M. Ikenaga, and T. Todo. 2000. Respective roles of cyclobutane pyrimidine dimers, (6-4)photoproducts, and minor photoproducts in ultraviolet mutagenesis of repair-deficient xeroderma pigmentosum A cells. *Cancer research* 60:1729-1735.
- Öztürk, N., Y. T. Kao, and C. P. Selby. 2008. Purification and Characterization of a Type III Photolyase from *Caulobacter crescentus*. *Biochemistry* 47:10255-10261.
- Pagliano, C., G. Saracco, and J. Barber. 2013. Structural, functional and auxiliary proteins of photosystem II. *Photosynthesis research* 116:167-188.
- Park, H., K. Zhang, Y. Ren, S. Nadji, N. Sinha, J. s. Taylor, and C. Kang. 2002. Crystal structure of a DNA decamer containing a cis-syn thymine dimer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:15965-15970.
- Park, H. w., S. t. Kim, and A. Sancar. 1995. Crystal Structure of DNA Photolyase from *Escherichia coli*. 268.
- Partch, C. L., M. W. Clarkson, S. Ozgür, A. L. Lee, and A. Sancar. 2005. Role of structural plasticity in signal transduction by the cryptochrome blue-light photoreceptor. *Biochemistry* 44:3795-3805.
- Payne, G., P. F. Heelis, B. R. Rohrs, and A. Sancar. 1987. The active form of *Escherichia coli* DNA photolyase contains a fully reduced flavin and not a flavin radical, both in vivo and in vitro. *Biochemistry* 26:7121-7127.
- Perrotta, G., L. Ninu, F. Flamma, J. L. Weller, R. E. Kendrick, E. Nebuloso, and G. Giuliano. 2000. Tomato contains homologues of *Arabidopsis* cryptochromes 1 and 2. *Plant molecular biology* 42:765-773.
- Perrotta, G., G. Yahoubyan, E. Nebuloso, L. Renzi, and G. Giuliano. 2001. Tomato and barley contain duplicated copies of cryptochrome 1. *Plant, Cell, and Environment* 24:991-994.
- Peschel, N., K. F. Chen, G. Szabo, and R. Stanewsky. 2009. Light-Dependent Interactions between the *Drosophila* Circadian Clock Factors Cryptochrome, Jetlag, and Timeless. *Current Biology* 19:241-247.
- Petersen, J. L., D. W. Lang, and G. D. Small. 1999. Cloning and characterization of a class II DNA photolyase from *Chlamydomonas*. *Plant molecular biology* 40:1063-1071.
- Philbrick, J. B., B. Diner, and B. Zilinskas. 1991. Construction and characterization of cyanobacterial mutants lacking the manganese-stabilizing polypeptide of photosystem II. *The Journal of biological chemistry* 266:13370-13376.
- Pokorny, R., T. Klar, U. Hennecke, T. Carell, A. Batschauer, and L. O. Essen. 2008. Recognition and repair of UV lesions in loop structures of duplex DNA by DASH-

- type cryptochrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:21023-21027.
- Pollari, M., V. Ruotsalainen, S. Rantamaki, E. Tyystjarvi, and T. Tyystjarvi. 2009. Simultaneous inactivation of sigma factors B and D interferes with light acclimation of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology* 191:3992-4001.
- Ravanat, J. L., T. Douki, and J. Cadet. 2001. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *Journal of photochemistry and photobiology.B, Biology* 63:88-102.
- Rengstl, B., U. Oster, A. Stengel, and J. Å. Nickelsen. 2011. An intermediate membrane subfraction in cyanobacteria is involved in an assembly network for Photosystem II biogenesis. *The Journal of biological chemistry* 286:21944-21951.
- Rizzini, L., J. J. Favory, C. Cloix, D. Faggionato, A. O'Hara, E. Kaiserli, R. Baumeister, E. Schafer, F. Nagy, G. I. Jenkins, and R. Ulm. 2011. Perception of UV-B by the *Arabidopsis* UVR8 protein. *Science (New York, N.Y.)* 332:103-106.
- Rockwell, N. C. and J. C. Lagarias. 2011. A brief history of phytochromes. 11:1172-1180.
- Rontó, G., A. Fekete, S. Gáspár, and K. Módos. 1989. Action spectra for photoinduced inactivation of bacteriophage T7 sensitized by 8-methoxypsoralen and angelicin. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 3:497-507.
- Roose, J. L. and H. B. Pakrasi. 2008. The Psb27 protein facilitates manganese cluster assembly in photosystem II. *The Journal of biological chemistry* 283:4044-4050.
- Rupert, B. Y. C., S. O. L. H. Goodgal, and R. M. Herriott. 1958. Photoreactivation in vitro of ultraviolet-inactivated *Hemophilus influenzae* transforming factor. *J Gen Physiol* 41.
- Sancar, A. 2003. Structure and Function of DNA Photolyase and Cryptochrome Blue-Light.
- Sancar, A. 2008. Structure and function of photolyase and in vivo enzymology: 50th anniversary. *The Journal of biological chemistry* 283:32153-32157.
- Sancar, G. B. 1985. Sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* PHRI gene and homology of the PHRI photolyase to *E. coli* photolyase. *Nucleic acids research* 13:8231-8246.
- Sancar, G. B. and F. W. Smith. 1989. Interactions between yeast photolyase and nucleotide excision repair proteins in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. *Molecular and cellular biology* 9:4767-4776.
- Sang, Y., Q. H. Li, V. Rubio, Y. C. Zhang, J. Mao, X. W. Deng, and H. Q. Yang. 2005. N-terminal domain-mediated homodimerization is required for photoreceptor activity of *Arabidopsis* CRYPTOCHROME 1. *The Plant cell* 17:1569-1584.
- Sarcina, M., N. Bouzovitis, and C. W. Mullineaux. 2006. Mobilization of Photosystem II Induced by Intense Red Light in the Cyanobacterium *Synechococcus* sp PCC7942. 18:457-464.

- Sarcina, M. and C. W. Mullineaux. 2004. Mobility of the IsiA chlorophyll-binding protein in cyanobacterial thylakoid membranes. *The Journal of biological chemistry* 279:36514-36518.
- Sass, L., C. Spetea, Z. Máté, F. Nagy, and I. Vass. 1997. Repair of UV-B induced damage of Photosystem II via de novo synthesis of the D1 and D2 reaction centre subunits in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photosynthesis research* 54(1):55-62.
- Schottkowski, M., S. Gkalymoudis, N. Tzekova, C. Stelljes, D. SchÄ¼nemann, E. Ankele, and J. Å. Nickelsen. 2009. Interaction of the periplasmic PrtA factor and the PsbA (D1) protein during biogenesis of photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *The Journal of biological chemistry* 284:1813-1819.
- Schreier, W. J., J. Kubon, N. Regner, K. Haiser, T. E. Schrader, W. Zinth, P. Clivio, and P. Gilch. 2009. Thymine Dimerization in DNA Model Systems: Cyclobutane Photolesion Is Predominantly Formed via the Singlet Channel. *Journal of the American Chemical Society* 131:5038-5039.
- Selby, C. P. and A. Sancar. 2006. A cryptochrome photolyase class of enzymes with single-stranded DNA-specific photolyase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 103(47).
- Sergeyenko, T. V. and D. A. Los. 2000. Identification of secreted proteins of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *FEMS microbiology letters* 193:213-216.
- Shalitin, D., X. Yu, M. Maymon, T. Mockler, and C. Lin. 2003. Blue Light-Dependent in Vivo and in Vitro Phosphorylation of Arabidopsis Cryptochrome 1. *The Plant cell* 15:2421-2429.
- Sharrock, R. 2008. The phytochrome red/far-red photoreceptor superfamily. *Genome biology* 9:230.
- Shen, J. R., R. L. Burnap, and Y. Inoue. 1995. An Independent Role of Cytochrome c-550 in Cyanobacterial Photosystem II As Revealed by Double-Deletion Mutagenesis of the *psbO* and *psbV* Genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemistry* 34:12661-12668.
- Shi, L. X., M. Hall, C. Funk, and W. P. Schröder. 2012. Photosystem II, a growing complex: updates on newly discovered components and low molecular mass proteins. *Biochimica et biophysica acta* 1817:13-25.
- Shi, L. X. and W. P. Schröder. 2004. The low molecular mass subunits of the photosynthetic supracomplex, photosystem II. *Biochimica et biophysica acta* 1608:75-96.
- Shibata, M., H. Katoh, M. Sonoda, H. Ohkawa, M. Shimoyama, H. Fukuzawa, A. Kaplan, and T. Ogawa. 2002. Genes essential to sodium-dependent bicarbonate transport in cyanobacteria: function and phylogenetic analysis. *The Journal of biological chemistry* 277:18658-18664.
- Sicora, C. 2003. The interaction of visible and UV-B light during photodamage and repair of Photosystem II. 127-137.

- Sicora, C. I., F. M. Ho, T. Salminen, S. r. Styring, and E. M. Aro. 2009. Transcription of a "silent" cyanobacterial *psbA* gene is induced by microaerobic conditions. *Biochimica et biophysica acta* 1787:105-112.
- Silva, P., E. Thompson, S. Bailey, O. Kruse, C. W. Mullineaux, C. Robinson, N. H. Mann, and P. J. Nixon. 2003. FtsH Is Involved in the Early Stages of Repair of Photosystem II in *Synechocystis* sp PCC 6803. 15:2152-2164.
- Singh, A. K., H. Li, L. Bono, and L. Sherman. 2005. Novel adaptive responses revealed by transcription profiling of a *Synechocystis* sp. PCC 6803 Δ -*isiA* mutant in the presence and absence of hydrogen peroxide. *Photosynthesis research* 84:65-70.
- Sippola, K. and E. M. Aro. 1999. Thiol redox state regulates expression of *psbA* genes in *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Plant molecular biology* 41:425-433.
- Sippola, K. and E. M. Aro. 2000. Expression of *psbA* genes is regulated at multiple levels in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Photochemistry and photobiology* 71:706-714.
- Small, G. D., B. Min, and P. Lefebvre. 1995. Characterization of a *Chlamydomonas reinhardtii* gene encoding a protein of the DNA photolyase/blue light photoreceptor family. *Plant molecular biology* 28:443-454.
- Sobotka, R., U. Dühring, J. Komenda, E. Peter, Z. Gardian, M. Tichy, B. Grimm, and A. Wilde. 2008. Importance of the cyanobacterial Gun4 protein for chlorophyll metabolism and assembly of photosynthetic complexes. *The Journal of biological chemistry* 283:25794-25802.
- Stengel, A., I. L. Gügel, D. Hilger, B. Rengstl, H. Jung, and J. Å. Nickelsen. 2012. Initial steps of photosystem II de novo assembly and preloading with manganese take place in biogenesis centers in *Synechocystis*. *The Plant cell* 24:660-675.
- Stork, T., K. P. Michel, E. K. Pistorius, and K. J. Dietz. 2005. Bioinformatic analysis of the genomes of the cyanobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Synechococcus elongatus* PCC 7942 for the presence of peroxiredoxins and their transcript regulation under stress. *Journal of experimental botany* 56:3193-3206.
- Suetsugu, N. and M. Wada. 2003. Cryptogam blue-light photoreceptors. *Current opinion in plant biology* 6:91-96.
- Sun, X., L. Peng, J. Guo, W. Chi, J. Ma, C. Lu, and L. Zhang. 2007. Formation of DEG5 and DEG8 complexes and their involvement in the degradation of photodamaged photosystem II reaction center D1 protein in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 19:1347-1361.
- Sutherland, B. M., A. G. Georgakilas, P. V. Bennett, J. Laval, and J. C. Sutherland. 2003. Quantifying clustered DNA damage induction and repair by gel electrophoresis, electronic imaging and number average length analysis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 531:93-107.
- Swiatek, M., R. E. Regel, J. Meurer, G. Wanner, H. B. Pakrasi, I. Ohad, and R. G. Herrmann. 2003. Effects of selective inactivation of individual genes for low-molecular-mass

subunits on the assembly of photosystem II, as revealed by chloroplast transformation: the *psbEFLJ* operon in *Nicotiana tabacum*. *Molecular genetics and genomics* : MGG 268:699-710.

- Takahashi, S., S. E. Milward, W. Yamori, J. R. Evans, W. Hillier, and M. R. Badger. 2010. The solar action spectrum of photosystem II damage. *Plant physiology* 153:988-993.
- Takahashi, S. and N. Murata. 2005. Interruption of the Calvin cycle inhibits the repair of Photosystem II from photodamage. *Biochimica et biophysica acta* 1708:352-361.
- Takahashi, S. and N. Murata. 2006. Glycerate-3-phosphate, produced by CO₂ fixation in the Calvin cycle, is critical for the synthesis of the D1 protein of photosystem II. *Biochimica et biophysica acta* 1757:198-205.
- Takahashi, S. and N. Murata. 2008. How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends in plant science* 13:178-182.
- Tamada, T., K. Kitadokoro, and Y. Higuchi. 1997. Crystal structure of DNA photolyase from *Anacystis nidulans*. *Nature Struct Biol* 4:887-891.
- Taylor, J. S. and C. L. O'Day. 1990. cis-syn thymine dimers are not absolute blocks to replication by DNA polymerase I of *Escherichia coli* in vitro. *Biochemistry* 29:1624-1632.
- Terauchi, K. and M. Ohmori. 1999. An Adenylate Cyclase, CyaI, Regulates Cell Motility in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant and Cell Physiology* 40:248-251.
- Terauchi, K. and M. Ohmori. 2004. Blue light stimulates cyanobacterial motility via a cAMP signal transduction system. *Molecular microbiology* 52:303-309.
- Thiagarajan, V., M. Byrdin, A. P. M. Eker, P. Müller, and K. Brettel. 2011. Kinetics of cyclobutane thymine dimer splitting by DNA photolyase directly monitored in the UV. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:9402-9407.
- Thompson, C. L., C. Bowes Rickman, S. J. Shaw, J. N. Ebricht, U. Kelly, A. Sancar, and D. W. Rickman. 2003. Expression of the blue-light receptor cryptochrome in the human retina. *Investigative ophthalmology & visual science* 44:4515-4521.
- Tichy, M. and W. Vermaas. 1999. In Vivo Role of Catalase-Peroxidase in *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology* 181:1875-1882.
- Tilbrook, K., A. B. Arongaus, M. Binkert, M. Heijde, R. Yin, and R. Ulm. 2013. The UVR8 UV-B Photoreceptor: Perception, Signaling and Response. *The Arabidopsis book* / American Society of Plant Biologists 11:e0164.
- Todo, T., S. T. Kim, K. Hitomi, E. Otoshi, T. Inui, H. Morioka, H. Kobayashi, E. Ohtsuka, H. Toh, and M. Ikenaga. 1997. Flavine adenine dinucleotide as a chromophore of the *Xenopus* (6-4)photolyase. *Nucleic acids research* 25:764-768.

- Todo, T., H. Ryo, H. Takemori, H. Toh, T. Nomura, and S. Kondo. 1994. High-level expression of the photorepair gene in *Drosophila* ovary and its evolutionary implications. *Mutation research* 315:213-228.
- Todo, T., H. Ryo, K. Yamamoto, H. Toh, T. Inui, H. Ayaki, T. Nomura, and M. Ikenaga. 1996. Similarity among the *Drosophila* (6-4)photolyase, a human photolyase homolog, and the DNA photolyase-blue-light photoreceptor family. *Science (New York, N.Y.)* 272:109-112.
- Todo, T. 1999. Functional diversity of the DNA photolyase r blue light receptor family. 89-97.
- Tyystjarvi, T., M. Herranen, and E. M. Aro. 2001. Regulation of translation elongation in cyanobacteria: membrane targeting of the ribosome nascent-chain complexes controls the synthesis of D1 protein. *Molecular microbiology* 40:476-484.
- van de Meene, A. M. L., M. F. Hohmann-Marriott, W. F. J. Vermaas, and R. W. Roberson. 2006. The three-dimensional structure of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Archives of microbiology* 184:259-270.
- van der Horst, G. T., M. Muijtjens, K. Kobayashi, R. Takano, S. Kanno, M. Takao, J. de Wit, a. Verkerk, a. P. Eker, D. van Leenen, R. Buijs, D. Bootsma, J. H. Hoeijmakers, and a. Yasui. 1999. Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* 398:627-630.
- Vasilikiotis, C. and a. Melis. 1994. Photosystem II reaction center damage and repair cycle: chloroplast acclimation strategy to irradiance stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:7222-7226.
- Vass, I., D. Kirilovsky, and a. L. Etienne. 1999. UV-B radiation-induced donor- and acceptor-side modifications of photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemistry* 38:12786-12794.
- Vass, I., L. Sass, C. Spetea, a. Bakou, D. F. Ghanotakis, and V. Petrouleas. 1996. UV-B-induced inhibition of photosystem II electron transport studied by EPR and chlorophyll fluorescence. Impairment of donor and acceptor side components. *Biochemistry* 35:8964-8973.
- Vass, I., D. Kirilovsky, I. Perewoska, Z. Máté, F. Nagy, and A. L. Etienne. 2000. UV-B radiation induced exchange of the D1 reaction centre subunits produced from the psbA2 and psbA3 genes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *European Journal of Biochemistry* 267:2640-2648.
- Wang, H., L. G. Ma, J. M. Li, H. Y. Zhao, and X. W. Deng. 2001. Direct interaction of *Arabidopsis* cryptochromes with COP1 in light control development. *Science (New York, N.Y.)* 294:154-158.
- Wang, H. L., B. L. Postier, and R. L. Burnap. 2004. Alterations in global patterns of gene expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803 in response to inorganic carbon limitation and the inactivation of ndhR, a LysR family regulator. *The Journal of biological chemistry* 279:5739-5751.

- Weber, S. 2005. Light-driven enzymatic catalysis of DNA repair: a review of recent biophysical studies on photolyase. *Biochimica et biophysica acta* 1707:1-23.
- Wittig, I. and H. Schagger. 2008. Features and applications of blue-native and clear-native electrophoresis. *Proteomics* 8:3974-3990.
- Wu, Q. and W. Vermaas. 1995. Light-dependent chlorophyll a biosynthesis upon chlL deletion in wild-type and photosystem I-less strains of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant molecular biology* 29:933-945.
- Xu, L., W. Mu, Y. Ding, Z. Luo, Q. Han, F. Bi, Y. Wang, and Q. Song. 2008a. Active site of *Escherichia coli* DNA photolyase: Asn378 is crucial both for stabilizing the neutral flavin radical cofactor and for DNA repair. *Biochemistry* 47:8736-8743.
- Xu, M., G. Bernát, A. Singh, H. Mi, M. Rögner, H. B. Pakrasi, and T. Ogawa. 2008b. Properties of mutants of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 lacking inorganic carbon sequestration systems. *Plant & cell physiology* 49:1672-1677.
- Yang, H. Q., R. H. Tang, and A. R. Cashmore. 2001. The signaling mechanism of *Arabidopsis* CRY1 involves direct interaction with COP1. *The Plant Cell Online* 13:2573-2587.
- Yang, H. Q., Y. J. Wu, R. H. Tang, D. Liu, Y. Liu, and a. R. Cashmore. 2000. The C termini of *Arabidopsis* cryptochromes mediate a constitutive light response. *Cell* 103:815-827.
- Yasui, A., A. P. Eker, and S. Yasuhira. 1994. A new class of DNA photolyases present in various organisms including aplacental mammals. *The EMBO* 13:6143-6151.
- Yeh, K., S. H. Wu, J. T. Murphy, and J. C. Lagarias. 1997. A Cyanobacterial Phytochrome Two-Component Light Sensory System. *Science* 277:1505-1508.
- Yoshimura, H. 2000. Identification and Characterization of a Novel cAMP Receptor Protein in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Journal of Biological Chemistry* 275:6241-6245.
- Yoshimura, H., S. Yoshihara, S. Okamoto, M. Ikeuchi, and M. Ohmori. 2002. A cAMP Receptor Protein , SYCRP1 , is Responsible for the Cell Motility of. 43:460-463.
- You, Y. H., D. H. Lee, J. H. Yoon, S. Nakajima, a. Yasui, and G. P. Pfeifer. 2001. Cyclobutane pyrimidine dimers are responsible for the vast majority of mutations induced by UVB irradiation in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* 276:44688-44694.
- Yu, X., H. Liu, J. Klejnot, and C. Lin. 2010. The Cryptochrome Blue Light Receptors. *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists* 8:e0135.
- Yu, X., R. Sayegh, M. Maymon, K. Warpeha, J. Klejnot, H. Yang, J. Huang, J. Lee, L. Kaufman, and C. Lin. 2009. Formation of nuclear bodies of *Arabidopsis* CRY2 in response to blue light is associated with its blue light-dependent degradation. *The Plant cell* 21:118-130.

- Yu, X., D. Shalitin, X. Liu, M. Maymon, J. Klejnot, H. Yang, J. Lopez, X. Zhao, K. T. Bendehakkalu, and C. Lin. 2007. Derepression of the NC80 motif is critical for the photoactivation of Arabidopsis CRY2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:7289-7294.
- Yuan, Q., D. Metterville, A. D. Briscoe, and S. M. Reppert. 2007. Insect cryptochromes: gene duplication and loss define diverse ways to construct insect circadian clocks. *Molecular biology and evolution* 24:948-955.
- Zak, E., B. Norling, R. Maitra, F. Huang, B. Andersson, and H. B. Pakrasi. 2001. The initial steps of biogenesis of cyanobacterial photosystems occur in plasma membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:13443-13448.
- Zhang, L., Q. Wei, W. Wu, Y. Cheng, G. Hu, F. Hu, Y. Sun, Y. Zhu, W. Sakamoto, and J. Huang. 2009. Activation of the heterotrimeric G protein alpha-subunit GPA1 suppresses the ftsh-mediated inhibition of chloroplast development in Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 58:1041-1053.
- Zharkov, D. O., G. Shoham, and A. P. Grollman. 2003. Structural characterization of the Fpg family of DNA glycosylases. *DNA repair* 2:839-862.
- Zhu, H., I. Sauman, Q. Yuan, A. Casselman, M. Emery-Le, P. Emery, and S. M. Reppert. 2008. Cryptochromes define a novel circadian clock mechanism in monarch butterflies that may underlie sun compass navigation. *PLoS biology* 6:e4.
- Zhu, H., Q. Yuan, A. D. Briscoe, O. Froy, A. Casselman, and S. M. Reppert. 2005. The two CRYs of the butterfly. *Current biology : CB* 15:R953-R954.

7. A PhD. értekezés összefoglalója

A Földön élő fotoautotróf szervezetek olyan molekulakomplexekkel rendelkeznek, amelyek képesek együtt a napfény energiáját kémiai energiává alakítani (PSII, PSI, cyt b_6/f , ATP-szintetáz), míg más molekulák, bizonyos hullámhossztartományú sugárzás hatására specifikus folyamatokat szabályoznak (fitokrómok, kriptokrómok, fototropinok, UVR8) az illető szervezetben. Mindezek során, napfény hatására, az illető molekulák átmeneti módosításokon esnek át, viszont a sugárzás intenzitásának és minőségének függvényében az említett molekulák szerepükből kifolyólag maradandó károsodást is szenvedhetnek. E jelenség nemcsak a fény hatására specifikus folyamatokat ellátó molekulákra korlátozódik hanem gyakorlatilag minden fényérzékeny molekulát érint. Ez utóbbiak közül a legfontosabb a DNS, amelyen az ultraibolya-B (UV-B) sugárzás (280-315 nm) jellegzetes szerkezeti változásokat hozhat létre.

Természetes körülmények között, a napfény hatására módosítást illetve károsodást szenvedett molekulák vagy kijavítódnak és visszanyerik kiindulási formájukat, vagy helyettük új molekulák szintetizálódnak.

A fotoszintetikus apparátuson belül a kettes fotokémiai rendszer (PSII) D1 fehérje alegysége hordozza, vagy köti a PSII elektrontranszportjában aktívan szerepet játszó redox kofaktorok túlnyomó részét. Ugyanakkor a vízbontó komplex kofaktorainak is a D1 biztosít kötődési helyet. Szerepüknel fogva a PSII D1 és D2 fehérjéi rendszeresen és viszonylag gyakran károsodnak. Az oxigéntermelő komplexszel együtt az UV-B sugárzás és általában a fotoinhibíció elsődleges célpontjának számítanak. A fotoszintetikus szervezetek nagy energiát fektetnek a károsodott alegységek gyors és hatékony pótlásába hiszen a fénynek szükségszerűen kitett fotoszintetikus apparátus hatékonysága ezekről függ.

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

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

A PhrB fehérje a *Synechocystis* sp. PCC6803 fotoliázának (PhrA) szerkezeti homológja. Alig több mint egy évtizede azonosították és egy aminosav szekvencián alapuló molekulacsoportba, a DASH kriptokrómok (*Drosophila*, *Arabidopsis*, *Synechocystis*, *Homo*) közé sorolták. A PhrB pontos szerepét máig nem sikerült tisztázni. Az irodalomban szerepelt már gyenge fotoliázként, transzkripció szabályzóként és kék fényreceptorként is, ami arra utal, hogy a fehérjének több folyamatban fontos szerepe lehet.

Ezek ismeretében arra kerestük a választ, hogy:

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

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

Annak érdekében, hogy a DNS és a PSII javítási ciklusának kapcsolatát vizsgáljuk, olyan *Synechocystis* mutánszt használtunk, amelyben a fotoliáz hiányának következtében (*phrA*⁻) nem volt jelen az UV-B-re specifikus DNS javítási ciklus. Azt találtuk, hogy a vad típussal (VT) összehasonlítva, UV-B sugárzás alatt, a *phrA*⁻ sejtek gyorsabban veszítenek PSII aktivitásukból. Fehérjeszintézist gátló linkomicint adagolva a sejttényeszetekhez az is kiderült, hogy az ok, amiért a mutáns sejtek érzékenyebben reagálnak az UV-B sugárzásra, mint a VT, a PSII javítási ciklusának *de novo* fehérjeszintézisének lépésében keresendő.

A PSII aktivitást tükrözte az is, hogy míg a VT sejtek a stresszkezelések alatt és után is képesek voltak a stresszmentes állapotukra jellemző mennyiségű D1 fehérjét előállítani, addig a mutáns sejtek D1 mennyisége a kezelések végére jelentősen lecsökkent. Ez utóbbi hatás maradandónak volt, a *phrA*⁻ sejtek nem voltak képesek helyreállítani a D1 állományukat, az UV-B stressz megszűnte után sem.

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

A DNS károsodások számszerűsítéséhez és azonosításához kétféle módszert alkalmaztunk: qPCR és alkalikus gélelektroforézis. A qPCR-re alapozott eljárás segítségével azt derítettünk ki, hogy az UV-B kezelés végére, a *phrA*⁻ sejtekben, átlagosan majdnem 1 károsodás jut a genom minden 1kb szakaszára. Mivel a *Synechocystis* átlag génhossza 1kb körül van, ez egy igen szignifikáns jelenség. Ahhoz, hogy megállapíthassuk, hogy az ilyen mértékben felhalmozódott, DNS polimerázt gátló károsodások milyen arányban azonosak az UV-B által létrehozott CPD képletekkel, genomi DNS-t (gDNS) izoláltunk a sejtvonalakból és Endonukleáz V PDG enzimmel emésztettük. Ez utóbbi enzim specifikusan a CPD-nél hasítja a DNS molekulát, így minél több a károsodás annál kisebb fragmentumok jönnek létre az emésztés után. Alkalikus gélen a különböző méretű fragmentumok foltként jelennek meg és minél lennebb fut a folt, annál kisebb fragmentumok alkotják, tehát annál több szubsztrátumra lelt az enzim. A gélképeket kiértékelve és számszerűsítésével azt találtuk, hogy a DNS polimerázt gátló képletek jelentős része UV-B által indukált CPD volt.

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

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

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

Mivel a *phrB* sejtek genomjában nem halmozódott fel kimutatható mennyiségű DNS károsodás, nem szolgált meglepetésként, hogy a mutáns sejtek *psbA3* hRNS állománya a VT-hoz hasonló indukciót mutatott, mind UV-B, mind pedig FF hatására, illetve ezek hiányában egyaránt. Ez a jelenség arra utalt, hogy a PhrB nem a hRNS állományon keresztül fejt ki hatását a PSII javítási ciklusára illetve a D1 fehérje pótlására.

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

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

8. Summary of the Ph.D. thesis

Photoautotrophic organisms are unavoidably exposed to the Sun's radiation while harvesting its energy via pigment-protein complexes (PSII, PSI, cyt b6/f, ATP synthetase) and being regulated via specific light receptors (phytochromes, cryptochromes, phototropins, UVR8). Both of these processes require that the respective molecules and molecule complexes endure temporary structural and/or redox modifications.

Parallel to these phenomena, depending on the wavelength and intensity of the radiation, the aforementioned molecules may suffer permanent damages as well. This damaging effect is not necessarily restricted to molecules that have a functional role in being exposed to radiations, it is rather a general phenomenon, affecting every single molecule, which is capable to absorb in the respective wavelength range. The most important among these is DNA, which absorbs heavily in the UV range and UV-B (280-315 nm) specifically produces structural changes in the molecule.

Under normal circumstances the molecules modified via radiation from the Sun are repaired or replaced to ensure their functionality. These processes are of utmost importance as the efficiency and continuity of photosynthesis depends on them.

Within the photosynthetic apparatus the repair of PSII enjoys high priority, mostly because its D1 subunit holds or binds most of the redox cofactors, required for the initial charge separation in the light phase of photosynthesis. In addition to this D1 also provides several binding moieties for the oxygen evolving complex. Because of their role in processing and transferring radiational energy, the subunits of PSII D1 and D2 regularly suffer damages and are replaced at a relatively high rate. Photosynthetic organisms invest a great amount of energy in keeping these repair and replacement processes swift and efficient.

The most important steps of PSII repair are the replacement of the D1 and D2 subunits. The repair process itself consists of several steps: (1) Proteolytic removal of the damaged D1 and D2 protein subunits, (2) Transcription of mRNA from the *psbA* and *psbD* genes encoding the D1 and D2 subunits, respectively, (3) Production of new protein subunits from the respective mRNA pools, (4) Incorporation of the newly synthesized protein copies into the PSII complex, and finally (5) Religation of redox cofactors and reactivation of PSII. If this cycle becomes ineffective, photoinhibition will take over and photosynthesis will slow down and eventually stop.

Besides the photosynthetic apparatus DNA is another major target of UV-B. The energy of UV-B radiation forms dimers, mostly cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs), in the DNA's structure, which obstruct the function of RNA and DNA polymerases. This effect, depending on how fast the organism is able to rid itself from the dimers, may quickly turn lethal. Photolyase (PhrA) is an enzyme, which, using the energy of UV-A and/or blue photons is able to specifically catalyse the monomerization of CPDs, in a way that is quicker and more energy efficient than other, non specific processes that rely on the excision of the damaged sites. The process catalysed by photolyase is termed photoreactivation.

PhrB, the structural homologue of the *Synechocystis* sp. PCC6803 (*Synechocystis*) photolyase (PhrA) has been identified in 2003. Based on its amino acid sequence it has been assigned to a group of molecules called DASH cryptochromes (*Drosophila*, *Arabidopsis*, *Synechocystis*, *Homo*). However, despite the structural similarities to photolyases, the exact function or rather functions of PhrB have not been clearly established to this day. It has been proposed that it acts as a weak photolyase, a transcriptional repressor and/or a blue light receptor as well. All these data point towards a protein with diverse functions.

In the light of these information we intended to study the following:

1. What effect, if any, has the lack of the DNA repair photolyase (PhrA) enzyme on the PSII repair cycle in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803?
2. What role does PhrB, homologue protein of PhrA, play in the UV-B induced DNA repair and in the PSII repair cycle of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803?

In order for us to study the effect of DNA photoreactivation on PSII recovery we used a *Synechocystis* mutant which didn't have a functional photolyase enzyme (*phrA*⁻), hence its specific DNA repair process of UV-B-induced damages was greatly impaired. Comparing *phrA*⁻ cells to the wild type (WT) *Synechocystis* we found that under UV-B radiation the mutant cells lost a greater portion of their PSII activity and at a higher rate as well. The addition of protein synthesis inhibitor lincomycin to the cell lines made it clear that the extreme UV-B sensitivity of the *phrA*⁻ cells originated in the *de novo* protein synthesis step of the PSII repair cycle.

Since it is the protein with the fastest replacement rate within the thylakoid membrane, we concentrated on the *de novo* synthesis of D1. The D1 pool did not change significantly in the WT. In contrast the *phrA*⁻ cells lost a significant portion of their D1 pool, which proved to be permanent, as they were unable to recover it even in the absence of UV-B radiation.

In theory efficient *de novo* protein synthesis relies on an available and abundant mRNA pool. To test whether *phrA*⁻ cells had enough *psbA3* at their disposal, which is the stress-induced isoform of the *psbA* gene family coding for D1, we carried out transcript analysis on both cell lines. In concert with the previous data *psbA3* in WT showed a considerable induction upon exposure to UV-B and an expected decrease when the stress factor was eliminated. A repeated UV-B exposure proved that the *psbA3* stayed just as inducible in a second stress phase, as it was initially, thus the genome probably did not suffer permanent damage. Unlike in the WT, at the end of the UV-B treatment, the *psbA3* induction dropped significantly in *phrA*⁻ cells, compared to their initial rise, and mirroring the permanent effect on the D1 pool, this did not change even in the absence of UV-B radiation. Induction of *psbA3* in the *phrA*⁻ cells was also absent in the second UV-B treatment, pointing towards a greatly damaged genome. This assumption was underlined by the fact that besides the absence of the stress gene induction, the mutant cells were unable to degrade the already existing mRNA pool, giving rise to the hypothesis that UV-B radiational damage was not limited to the *psbA* genes, rather it affected the whole genome.

To quantify the UV-B-induced DNA damage, we applied two methods: a qPCR method and an alkaline gel electrophoresis method. The qPCR method does not distinguish between DNA damages as it takes every DNA polymerase blocking damage into account. Applying this we found that at the end of the UV-B treatments, in average every 1 kb DNA from *phrA*⁻ cells contained close to 1 DNA polymerase blocking damage. Since the average gene length of *Synechocystis* is 1 kb this is a significant amount of damages. In order to determine how much of these damages are UV-B-induced CPDs, we digested genomic DNA (gDNA), isolated from UV-B treated WT and *phrA*⁻ cells, with the T4 Endonuclease V PDG enzyme. This enzyme specifically cleaves DNA strands at CPD sites, hence the more substrate it finds on the molecule, the shorter fragments will result from the digestion. Separated on an alkaline gel, short fragments will form a smudge, and the farther this smudge runs on the gel, the shorter the fragments are, hence the more CPDs were on the DNA. Analysing the gel image we were able to approximate the amount of CPDs which significantly overlapped with our qPCR data, proving that most DNA polymerase blocking damages on the genome of *phrA*⁻ cells, causing the higher UV-B sensitivity, were in fact CPDs.

We studied the effect of PhrB by comparing WT and *phrB*⁻ cells. As a result we found that *phrB*⁻ cells lost a bigger portion of their PSII activity not only to UV-B, but also to high intensity photosynthetically active radiational (PAR) stress. This let us assume that the effect of PhrB is not restricted to UV-B alone rather it is a general event. With the help of lincomycin we once again arrived at the conclusion that, similar to *phrA*⁻ cells, the enhanced UV-B and PAR sensitivity of *phrB*⁻ cells is due to an inefficient *de novo* synthesis during PSII repair.

However, in the absence of PhrB, unlike in the case of the missing photolyase, CPDs did not accumulate in the gDNA nor did one of the most frequently occurring oxidative

damages, 7,8-dihydro-8-oxoguanin. Thus we found that despite the structural similarities to PhrA, PhrB does not exert its effect on the PSII repair process through the specific DNA repair.

Nevertheless PhrB does have a significant effect on PSII repair as its absence greatly influences the D1 pool of *phrB⁻* cells, which ended up to be significantly lower than that of the WT cells, both under UV-B and PAR. Since *phrB⁻* cells did not accumulate detectable amounts of DNA damages, it was of no surprise that their *psbA3* levels were similar to the WT's. This phenomenon indicated that PhrB acts either at the level of protein degradation, *psbA* transcription or PSII assembly. The effect on degradation could be excluded because the process occurs efficiently even in the absence of PhrB.

As the effect of PhrB firmly targeted protein synthesis, we intended to find out whether this includes other proteins besides D1. Applying 2D native gel analysis, we found that in *phrB⁻* cells the amount of several proteins decreased. The most notable ones were SbtA, a bicarbonate transporter, RbcS the small subunit of RuBisCO and PilA1, a motility protein of *Synechocystis* which is also assumed to be able to bind chlorophyll.

Both, the decrease of SbtA and the RbcS have the potential to lower the efficiency of *psbA* transcription because with their decrease the efficiency of the Calvin-Benson cycle will drop as well, which results in the generation of reactive oxygen species, that specifically hinder D1 synthesis. The PilA1 most probably has an important role in the assembly of PSII complexes, through its potential ability to bind and transfer chlorophyll molecules.

Publikációs lista

A dolgozatban felhasznált közlemények:

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

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

Egyéb közlemények:

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

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

Bírálat alatt: Csaba Nagy, Imre Vass, Gábor Rákhely, **István Zoltán Vass**, András Tóth, Ágnes Duzs, Loredana Peca, Jerzy Kruk, and Péter Kós “Co-regulated genes link sulfide:quinone oxidoreductase and arsenic metabolism in *Synechocystis* sp. PCC6803”

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

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Dr. Vass Imrének, hogy lehetőséget biztosított, hogy a Molekuláris Stressz- és Fotobiológiai Csoportban végezhessem a doktori kutatásaimat.

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőimnek Dr. Vass Imrének és Dr. Kós Péternek, hogy szakismeretükkel és tanácsaikkal segítették a munkámat.

Köszönet illeti Dr. Deák Zsuzsannát és Dr. Otilia Cheregi-t, akiktől rengeteg szakmai tudást és bátorítást kaptam.

Külön köszönet illeti Dr. Kós Pétert, akihez mindig bizalommal fordulhattam bármilyen kérdésben.

Köszönöm Fleit Gabriella lelkiismeretes munkáját, amivel nap mint nap megkönnyítette mindenki tevékenységét a laboratóriumban.

Köszönöm a Molekuláris Stressz- és Fotobiológiai Csoport összes tagjának a munkámban nyújtott segítségét.

Köszönöm a családom segítségét, akik mindvégig támogattak a tevékenységeimben. Köszönöm a barátnőm és barátaim segítségét, hallgató füleit és türelmét, nekik ígérem, hogy soha többet nem fogok doktorizni.