

**A FÉNY SZEREPE A FOTOSZINTETIKUS
MEMBRÁNSZERKEZETET REGULÁLÓ
FOLYAMATOKBAN**

PhD értekezés

Zsíros Ottó

Témavezető: Dr. Gombos Zoltán
a MTA doktora

Magyar Tudományos Akadémia
Szegedi Biológiai Központ
Növénybiológiai Intézet

Szeged
2000

*A Föld puszta volt és üres,
sötétség borította a mélységeket
és Isten lelke lebegett a vizek
fölött. Isten szólt: "Legyen vilá-
gosság!" és világos lett. Isten
látta, hogy a világosság jó...*

(A Teremtés könyve I .2-4.)

Tartalom

<u>1. Rövidítések jegyzéke</u>	1. oldal
<u>2. Bevezetés</u>	4. oldal
<u>3. Célkitűzések</u>	6. oldal
<u>4. Irodalmi áttekintés</u>	9. oldal
I. Lipid, zsírsav szintézis	9. oldal
I/1. A glicerolipidek	9. oldal
I/2. A zsírsavak	13. oldal
I/3. Az acil-lipid deszaturázok	16. oldal
I/4. Az acil-lipid deszaturázok expressziója	18. oldal
II/1. A cianobaktériumok membránszerkezete	19. oldal
II/1.1. Membránfluiditás	19. oldal
II/1.2. A telített zsírsavak hatása a membránszerkezetre	20. oldal
II/1.3. A telítetlen zsírsavak hatása a membránszerkezetre	21. oldal
II/2. A membránszerkezet megváltoztatásának lehetőségei	22. oldal
II/2.1. A külső környezet hatása a membránszerkezet kialakítására	22. oldal
II/2.2. A zsírsavtelítetlenség megváltoztatása homogén katalitikus hidrogénezéssel	23. oldal
II/2.3. Génmanipuláció	24. oldal
III. Membránszerkezet vizsgáló módszerek	29. oldal
III/1. Elektronmikroszkópia	29. oldal
III/2. Fourier transzformációs infravörös spektroszkópia (FTIR)	30. oldal
III/3. Egyéb szerkezetvizsgáló módszerek	33. Oldal

<u>5. Anyag és módszer</u>	35. oldal
I. Felhasznált anyagok	35. oldal
II. A kísérletek során használt cianobaktérium és nevelési körülményei	35. oldal
III. Spektroszkópiai mérések	36. oldal
III/1. Sejtnövekedés mérés	36. oldal
III/2. Abszorpciós spektrumok felvétele	36. oldal
IV. Fotoszintetikus aktivitás mérések	36. oldal
V. Transzmissziós (átnézeti) elektronmikroszkópia	37. oldal
VI. Lipid extrakció és zsírsav-analízis	38. oldal
VI/1. Lipid extrakció	38. oldal
VI/2. Zsírsav-analízis	38. oldal
VII. A citoplazmás és tilakoid sejtmembránok izolálása cianobaktériumokból	39. oldal
VIII. RNS izolálás és Northern Blot analízis	40. oldal
IX. Fourier transzformációs infravörös spektroszkópia	41. oldal
<u>6. Eredmények és megvitatásuk</u>	42. oldal
I. Sejtnövekedés	42. oldal
II. Fotoszintetikus aktivitás	44. oldal
III. A <i>Synechocystis</i> PCC 6803 sejtek elektronmikroszkópos finomszerkezete	47. oldal
IV. Spektrális analízis	51. oldal
V/1. A különböző nevelési körülmények között nőtt sejtek zsírsavösszetétele	54. oldal
V/2. A különböző nevelési körülmények között nőtt sejtekből izolált membránok zsírsavösszetétele	57. oldal

V/3. A fény indukálta zsírsavösszetétel változás	59. oldal
VI. A deszaturáz enzimeket meghatározó mRNS-szint változás	61. oldal
VII. A jelátviteli mechanizmus tanulmányozása	68. oldal
VIII. Az FTIR spektrumok C-H régiójának analízise	73. oldal
<u>7. Összefoglalás</u>	79. oldal
<u>8. Summary</u>	82. oldal
<u>9. Irodalom</u>	87. Oldal
<u>10. Publikációs lista</u>	94. oldal

Rövidítések jegyzéke

Lipidek

DG	diacil-glicerol
DGDG	digalaktozil-diacilglicerol
GlcDG	monoglükozil-diacilglicerol
MGDG	monogalaktozil-diacilglicerol
PA	foszfatidsav
PC	foszfatidil-kolin
PG	foszfatidil-diacilglicerol
SQDG	szulfoquinovozil-diacilglicerol

Zsírsavak

16:0	palmitinsav
16:1	palmitoleilsav
16:2	hexadekadiénsav
18:0	sztearinsav
18:1	olajsav
18:2	linolsav
18:3	linolénsav
18:4	oktadekatetraénsav

Elektron akceptorok

DCMU 3-(3,4-diklórfenil)-1,1'-dimetilurea

PBQ p-benzokinon

Egyéb rövidítések

ACP acil szállító fehérje

[α -³²P]dCTP deoxicitidin 5'-(α -³²P)trifoszfát

CaF₂ kalcium-fluorid

Cm kloramfenikol

CoA koenzim-A

DNA, DNA dezoxi- ribonukleinsav

DN-áz dezoxiribonukleáz

DSC differenciál szkennig kalometria

DTA differenciál termikus analízis

D₂O nehézvíz

Fad6 Fad6-nak nevezett mutáns

Fad12 Fad12-nek nevezett mutáns

HEPES [N-(2-hidroxietil)piperazin-N'-[2-etánszulfonsav]]

kB kilobázis

mRNS messzendzser ribonukleinsav

PCR polimeráz láncreakció

PMSF fenilmetil-szulfonil fluorid

Rif rifampicin

RNS	ribonukleinsav
rRNS	ribosomális ribonukleinsav
<u>sn-1</u>	a glicerinváz 1-es pozíciója
<u>sn-2</u>	a glicerinváz 2-es pozíciója
TES	N-tris(hidroximetil)metil-2-aminoetánszulfonsav
UV	ultraviola fény

Bevezetés

Az élet sok milliárd évvel ezelőtt kezdődött, és ma is tartó története során a fotoszintetizáló szervezetek váltak azon kulcsfontosságú élőlényekké, amelyek nélkül elképzelhetetlenné vált minden földi élet. A fotoszintézis az a folyamat, amely során ezen élőlények a fényenergiát a széndioxidnak szerves vegyületekké való redukciójára használják fel. Ezáltal biztosítják az egész élővilág számára a táplálékot, miközben fenntartják az oxigéndús légkört.

Egy élőlény fennmaradásához elengedhetetlen az a képesség, hogy alkalmazkodni tudjon a környezet állandó változásaihoz. A fotoszintetikus prokarióta szervezetek, köztük a cianobaktériumok, több, mint 3 milliárd éves történetük során sokszor kerültek szembe azzal a ténnyel, hogy környezetük hőmérséklete megváltozott. Egyed- és fajsinten az életben maradáshoz elengedhetetlen volt az alkalmazkodóképesség kifejlesztése, azaz az új és megváltozott környezetben való továbbélés és szaporodás. Azon egyedek és fajok, amelyek erre nem voltak képesek, eltűntek az élőlények sorából.

Az elmúlt évtizedekben a kutatók figyelme a különböző környezeti stresszekre és az ezekre adott válaszokra terelődött. A hőmérsékleti stresszek során a cianobaktériumok sejtmembránjainak fizikai állapota, mikroviszkozitása és molekuláris szerveződése az optimálistól eltérővé válik. A stresszhez való alkalmazkodás pedig az új funkcionális állapot létrehozása és fenntartása, mely során a membránok lipid-, fehérje- és pigmentösszetétele megváltozik. Az élő szervezet így képes a sejtmembránok fizikai és szerkezeti tulajdonságait optimális szinten tartani az ehhez rendelhető élettani funkciókkal együtt, elsősorban a fotoszintézis folyamatával, amely az energiát szolgáltatja minden további életfolyamathoz. E regulációs mechanizmusok megértéséhez

nyújtanak lehetőséget a magasabbrendű növények kloroplasztiszi modelljének tekinthető cianobaktériumok, elsősorban a *Synechocystis* PCC 6803 törzs, amely kedvelt objektuma számos laboratóriumnak.

Célkitűzések

A magasabbrendű növények hőmérsékleti stresszekhez történő alkalmazkodásának tanulmányozása során ismertté vált, hogy az adaptáció és a membránfluiditás között szoros kapcsolat van. A hetvenes évektől számos más reguláló tényező mellett az is tudottá vált, hogy a membránfluiditást a telített és telítetlen zsírsavak aránya befolyásolja. A magasabbrendű növények esetében a zsírsav- és lipid-bioszintézis különböző organelumokhoz kötött. A növényi glicerolipid bioszintézis első lépése a foszfatidsav (PA) keletkezése. A növényi szövetekben megtalálható PA szintézise az endoplazmatikus retikulumban "eukarióta úton" (Moore, 1984, Sauer és Robinson, 1985) és a kloroplasztisz envelop membránjához kötődve "prokarióta úton" történik (Andrews és mtsai, 1985, Block és mtsai, 1983, Dorne és mtsai, 1982). A zsírsavak citoplazmás és kloroplasztiszos úton keletkezhetnek. A termékek mozgása nem gátolt az organelumok között, ami az adaptációs válaszok értelmezését nehezítette.

Korábbi eredmények alapján ismert, hogy a növekedési hőmérséklet jelentősen befolyásolja a cianobaktérium sejtek membrán szerkezetét. A hőmérsékleti adaptációban a membránszerkezetet (elsősorban a tilakoid membrán szerkezetét, amelyben a fotoszintetikus elektrontranszport-lánc található) befolyásoló tényezők közül a zsírsavak deszaturáz enzimek által katalizált telítetlenség-változása bizonyult a legjelentősebb tényezőnek.

A cianobaktériumok használatát az adaptív válaszok tanulmányozására több gyakorlati előny támasztja alá. 1996 óta a *Synechocystis* PCC 6803 törzs teljes génszekvenciája ismert. Egyszerű membránrendszerrel rendelkeznek, ami könnyen izolálható, és ez lehetővé teszi a membránszintű adaptáció tanulmányozását. A hetvenes

évektől léteznek jól használható cianobakteriális transzformációs rendszerek, amelyek segítségével célzottan megváltoztatható a membránban található lipidek zsírsavainak telítetlensége. Murata és munkatársai olyan mutánsokat hoztak létre, melyekben a zsírsavdeszaturáció egyes, jól definiált lépései gátoltak, és ezek segítségével fényt derítettek lipid- és zsírsavszintézisük folyamatára. A *Synechocystis* PCC 6803 törzs használatának egy másik előnye az, hogy ez a törzs képes heterotróf módon élni, ebben az esetben anyagcsere folyamatainak fenntartásához nem a fotoszintetikus apparátus szolgáltatja az energiát, hanem az oxidatív elektrontranszport, szénforrásként kívülről adott glükózt használ.

A fenti ismeretek birtokában a következő kérdésekre kerestünk választ:

I/1. A sejtek két, egymástól eltérő életformában (autotróf és heterotróf) képesek nőni. Az eltérő életformákhoz eltérő elektrontranszportok szolgáltatják az energiát. A magasabbrendű növényeknél ezek az elektrontranszport-láncok különböző sejtorganellumban lokalizáltak, az oxidatív elektrontranszport a mitokondriumban, míg a redukzív lánc komponensei a kloroplasztisban. A cianobaktériumoknál az oxidatív elektrontranszport-lánc komponenseinek egy része is a tilakoid membránban lokalizálódik, más részük a citoplazmás membránban. Arra szeretnénk volna választ kapni, hogy milyen előnyt jelent az élőlény számára az egyik vagy a másik életforma. Ennek eldöntésére a sejtek osztódási sebességének mérése jól használható. Kíváncsiak voltunk a különböző hőmérsékleteken, sötétben és fényen nevelt kultúrák osztódási sebességére is.

I/2. A hőmérsékletfüggő fotoszintetikus aktivitást a tilakoid membrán szerkezete, elsősorban a lipidösszetétel határozza meg. Ha az azonos hőmérsékleten, autotróf és

heterotróf módon nevelt sejtek hőmérsékletfüggő oxigén termelése eltérő, valószínűsíthető, hogy eltérő lipidtartalommal rendelkeznek.

II/1. A fotoszintetikus organizmusokra jellemző a tilakoid membránrendszer, amelyben a fotoszintetikus apparátus található. Ez az apparátus funkcióját fényen képes betölteni, ha a sejtek sötétben nőnek, a jól szervezett, de bonyolult tilakoid membránrendszer teljes felépítése energetikailag hátrányos lenne. Ezért elektronmikroszkópos képeket készítettünk, hogy tanulmányozzuk, milyen membránszerkezeti változások következnek be a sötétben nőtt sejteknél.

II/2. A sejtek pigmentációja függ a tápanyag összetételétől, az alkalmazott fény hullámhosszától. Arra voltunk kíváncsiak, hogy fény hiányában, amikor nincs fénybegyűjtő funkciója a pigmenteknek, milyen változások következnek be a pigmentrendszerben.

III/1. A *Synechocystis* PCC 6803 törzs deszaturáz enzimeket kódoló génjeinek expressziója autotróf módon nevelt sejtek esetében hőmérsékletfüggő, ebben az esetben a fény és a hőmérséklet együttes hatásának eredményét lehet nyomon követni. Az általunk használt rendszerrel egymástól függetlenül lehet vizsgálni, hogy milyen hatása van a hőmérsékletnek és a fénynek a deszaturáció folyamatára.

III/2. A zsírsavdeszaturáció energia- és elektronigényes folyamat, amit a fotoszintézis biztosít. Kíváncsiak voltunk, hogy a sötétben nevelt sejteknél, amikor nem működik a fotoszintézis, milyen a zsírsavszintű adaptáció, és milyen az alkalmazkodó képességük a különböző hőmérsékletekhez.

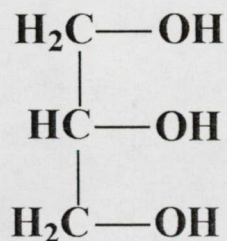
Kísérleteinket annak reményében kezdtük el, hogy eredményeink alapján választ tudunk adni arra a kérdésre, hogy a fény milyen szerepet tölt be a hőmérsékleti stresszekhez való alkalmazkodásban.

Irodalmi áttekintés

I. Lipid, zsírsav szintézis

I/1. A glicerolipidek

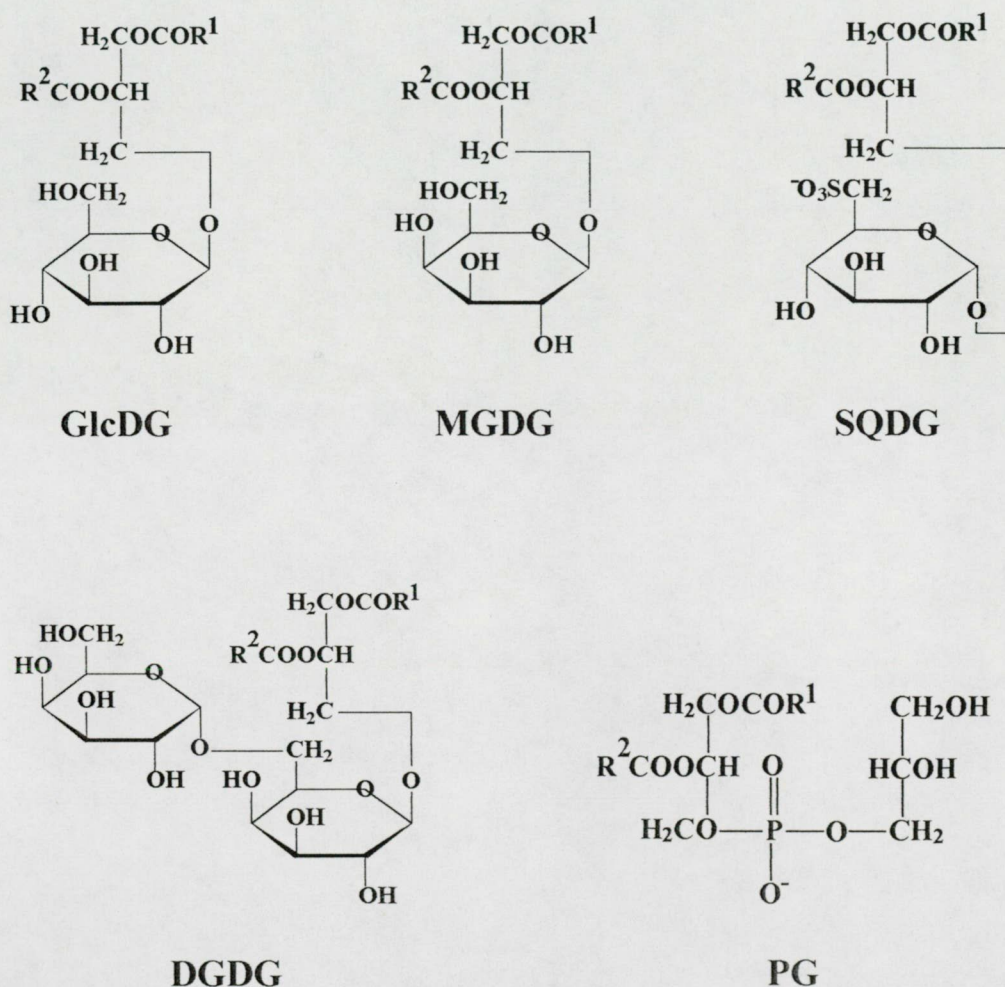
A glicerolipidek a lipidek egy csoportját alkotják. Aszerint, hogy a glicerinnak egy, kettő vagy három alkoholos hidroxilcsoportjához kapcsolódik észterkötéssel valamilyen zsírsav, mono-, di- és triacil-glicerolokat lehet megkülönböztetni (1. ábra). A cukortartalmú lipidekben a glicerinhez zsírsavmaradékokon kívül valamilyen cukor is kapcsolódik (galaktóz, glükóz), növényekben a glikolipidek közül a galaktolipidek jelentősek.



1. ábra A glicerolipidek vázát alkotó glicerin képlete

A cianobaktériumok glicerolipid tartalma a négy fő komponens mellett egy ritkábban meglévő és igen kis mennyiségben található tevődik össze, amelyek a magasabbrendű növények kloroplasztisz membránjainak is fő alkotó elemei. Ezek a lipidek a következők: a monogalaktozil-diacilglicerol (MGDG), a digalaktozil-diacilglicerol (DGDG), a szulfoquinovozil-diacilglicerol (SQDG) és a foszfatidil-diacilglicerol (PG), míg a minor komponens a monoglikozil-diacilglicerol (GlcDG),

amely csak egyes cianobaktériumokban található meg, egyébként pedig a galaktolipidek szintézisének intermediere. A fő komponensek között is döntő szerepet játszik az MGDG, amely az összlipid tartalom 50-60 %-át teszik ki, míg a DGDG, SQDG és a PG kb. 10-20 %-át adják a glicerolipideknek. A GlcDG mennyisége sosem haladja meg az 1-2 %-ot, ha egyáltalán megtalálható (Sato és Murata, 1982).



2. ábra A cianobaktériumok glicerolipidjeinek szerkezeti képlete

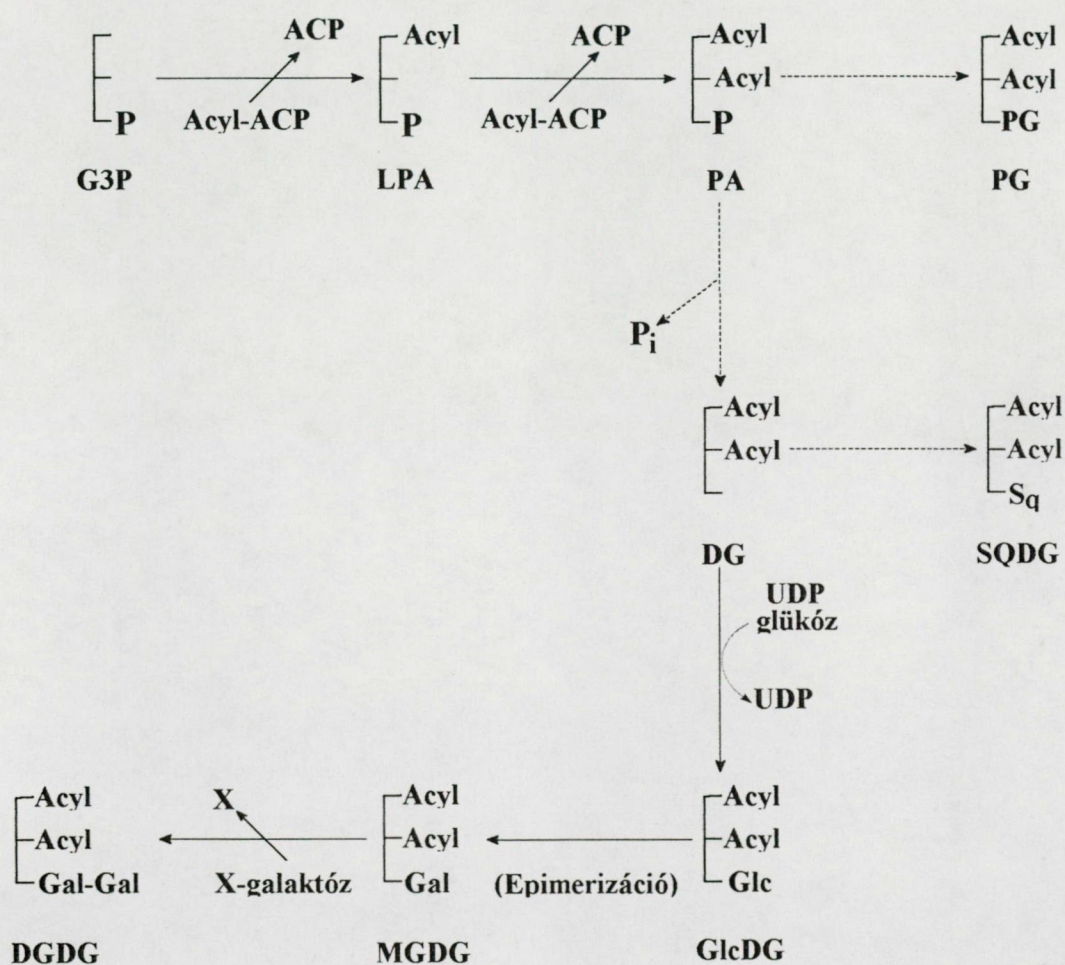
Az *Anacystis nidulans* cianobaktériumon végzett kísérletek alapján az egyes membránok lipidtartalma a szárazsúlyra vonatkoztatva jelentős különbséget mutat. A legtöbb lipidet a citoplazmás membrán tartalmazza (szárazsúlyra vonatkoztatva 57 %-

ot), a tilakoid membrán 19%-ot, míg a külső vagy envelope membrán csak 3%-ot. Az eltérő mennyiségek ellenére az egyes lipidfajták relatív százaléka az össz-lipidtartalmon belül nem mutatott jelentős különbséget (Omata és Murata, 1983).

Cianobaktériumokban (*Anacystis nidulans* és *Anabaena variabilis*) először Nichols és munkatársai (1965) tanulmányozták a lipid bioszintézist. Radioaktív acetátot ($[^{14}\text{C}]$ -acetát) használva megállapították, hogy mind a négy fő komponensben kimutatható volt a jelölt acetát, továbbá ha endogén, radioaktív zsírsavakat {16:0, 18:0 és 18:1(9)} adtak *Anabaena variabilis* sejteknek, ezek 16:1(9), 18:1(9) és 18:2 (9,12) sorrendben deszaturálódtak. További 30 másik cianobaktérium törzsön H^{14}CO_3 -al végzett kísérletek azt bizonyították, hogy a radioaktív jelölés a GlcDG-ban jelenik meg először, majd ezt követte az MGDG jelölődése. Az eredmények alapján feltételezhető volt, hogy az MGDG prekursora a GlcDG volt. Sato és Murata (1982b) *Anabaena variabilis*-en végzett kísérletben radioaktív izotópot használva megállapították, hogy a GlcDG-MGDG átalakulás egy epimerizációs folyamat eredménye és nem egy glükóz-galaktóz csere, továbbá a DGDG szintézise során az MGDG-re egy galaktóz kerül, így az MGDG a DGDG előanyagának tekinthető (Sato és Murata 1982a). A SQDG és a PG gyorsan jelölődött az MGDG-hez viszonyítva, ez arra utal, hogy ezek a lipidek egy GlcDG-től független szintézisúton keletkeznek (Sato és Murata, 1982a). Az *Anabaena variabilis*-ben kimutattak egy membránhoz kötött 5'-difoszfát-glükóz:diacil-glicerol glükoziltranszferáz enzim jelenlétét, amely katalizálja a GlcDG szintézisét, a glükóz az uridin 5'-difoszfát-glükózzal a DG-re történő átkerülését (Sato és Murata, 1982c). Omata és Murata (1986) az *Anacystis nidulans*-ban kimutatták, hogy a GlcDG szintézise mind a tilakoid mind a citoplazmás membránhoz kötődve végbemegy.

A glicerolipid-szintézis első lépéseit katalizáló enzimeket, a glicerol-3-foszfát aciltranszferázt és az 1-acilglicerol-3-foszfát aciltranszferázt sikerült kimutatni az

Anabaena variabilis fajban (Lem és Stumpf, 1984b). Továbbá azt is megfigyelték, hogy ezek az enzimek szubsztrátként nem acil-szállító fehérjét (ACP), hanem Acil-CoA-t használnak. Ezek az eredmények azt az elképzelést erősítik, hogy a glicerolipidek prekursora a PA, ami a cianobaktériumokban gliko-, -szulfo- és foszfolipidekké alakul át. A 3. ábra a valószínűsíthető bioszintézis út egyes lépéseit foglalja össze.



3. ábra A cianobaktériumok glicerolipidjeinek szintézis útja. G3P: glicerol-3-foszfát, LPA: lizofoszfátidsav, Pg: foszfoglicerol, Sq: szulfoquinovoz, Glc: glükóz, Gal: galaktóz, x: meg nem határozott galaktózszállító.

I/2. A zsírsavak

A különböző cianobaktérium fajokból eddig a következő zsírsavakat mutatták ki: 16:0, 16:1(9), 16:2(9,12), 18:0, 18:1(9), 18:2(9,12), 18:3(6,9,12), 18:3(9,12,15), 18:4(6,9,12,15). A zárójelben lévő számok a kettőskötések pozícióját jelölik. Ezen zsírsavakon kívül még előfordulhatnak egyéb zsírsavak is, pl. a 18:1(11), amelyet az *Anacystis nidulans* sejtekben mutatta ki (Sato és mtsai, 1979). Ez a zsírsav az ún. "anaerob" szintézis út során keletkezik a 16:1(9) zsírsav lánchosszabodásával (Kates, 1966, Johns és mtsai, 1981).

A cianobaktériumokat zsírsavtartalmuk és a zsírsavak bioszintézisének útja alapján Kenyon négy nagy csoportra osztotta. (Kenyon, 1972, Kenyon és mtsai, 1972). Az általa felállított rendszer első csoportjába azok a fajok sorolhatók, amelyekben a telített zsírsavak mellett kizárólag csak az egy kettőskötést tartalmazó zsírsavak találhatók, míg a másik három csoportban megjelennek a többszörösen telítetlen zsírsavak is. A második csoportra a 18:3(9,12,15) a jellemző, a harmadik csoportba sorolásra a 18:3(6,9,12) zsírsav jelenléte adott lehetőséget, míg a negyedik csoportban az előbb említett zsírsavakon kívül még a 18:4(6,9,12,15) zsírsav szintézisére is lehetőség van. Az egysejtes cianobaktériumok általában az első és a harmadik csoportba tartoznak, az általunk használt *Synechocystis* PCC 6803 törzs - amely szintén egysejtes - a negyedik csoportba tartozik, míg a fonalas fajok mind a négy csoportban megtalálhatók (Kenyon és mtsai, 1972, Oren és mtsai, 1985, Murata és mtsai, 1992).

Több cianobaktérium faj egyes lipidjeinek zsírsav-analízise alapján kiderült (Nichols és mtsai, 1965, Sato és mtsai, 1979), hogy a négy fő komponenst két csoportra lehet osztani. Az első csoportba az MGDG és a DGDG tartozik, míg a másikba az SQDG és a PG. Az *Anacystis nidulans*-ban csak az egy kettőskötést tartalmazó

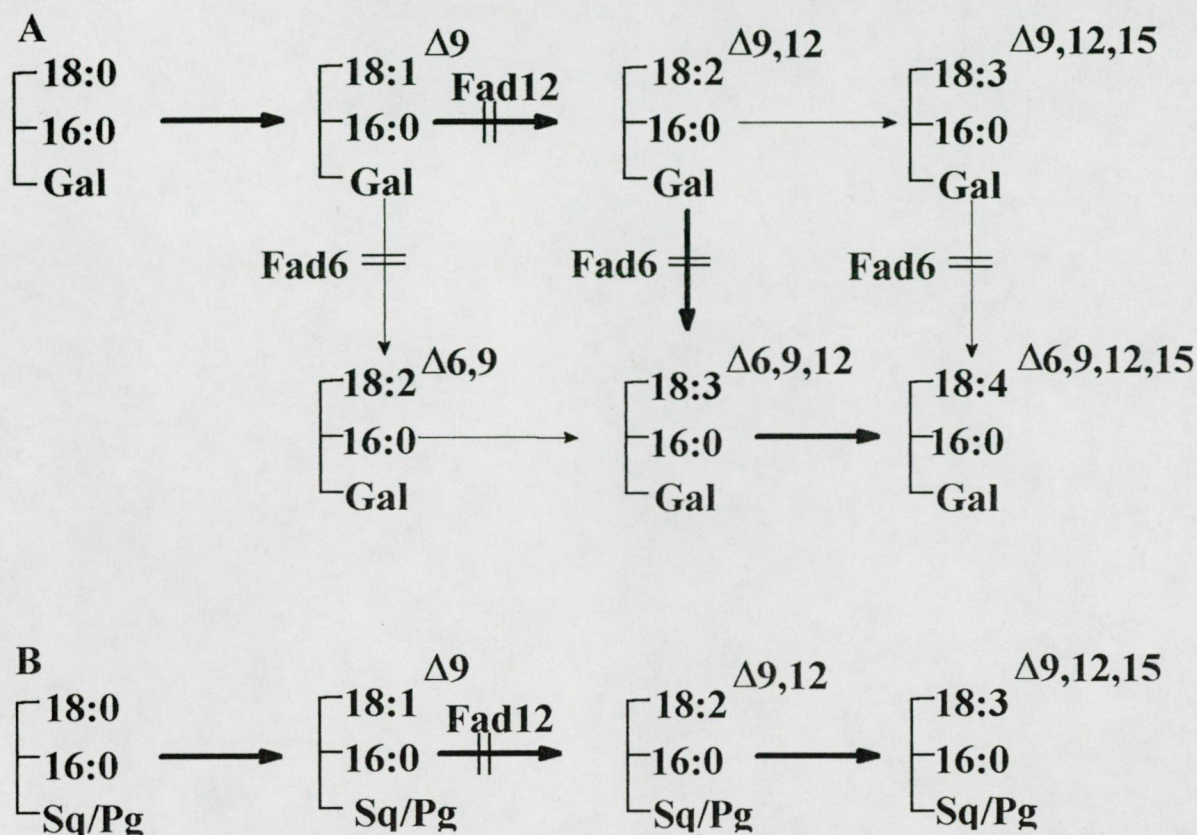
zsírsavak találhatók, és ezek aránya a telített zsírsavakhoz képest nagyobb az MGDG és a DGDG lipidekben, mint az SQDG-és a PG-ben (Nichols és mtsai 1965, Hirayama, 1967, Sato és mtsai, 1979). Az *Anabaena variabilis* fajban (ebben a cianobaktériumban már többszörösen telített zsírsavak is találhatók) is hasonló a telített és telítetlen zsírsavak megoszlási aránya a különböző lipidekben; a telítetlen zsírsavak aránya magasabb az MGDG és a DGDG csoportban a másik kettőhöz képest. Ezeket a vizsgálatokat több más fajon is elvégezték, és hasonló eredményeket kaptak az *Anabaena cylindrica*, a *Nostoc calcicola*, a *Tolypothrix tenuis* (Zepke és mtsai, 1978), az *Oscillatoria splendida* és a *Spirulina platensis* fajok esetében is (Nichols és Wood, 1968).

A zsírsavak pozicionális meghatározását a *Rhizopus delemar* fajból nyert lipáz enzim segítségével lehet elvégezni, amely specifikusan az *sn*-1 pozícióban lévő észterkötést hidrolizálja (Fischer és mtsai, 1973). A fenti módszer alkalmazásával több törzsben meghatározták a zsírsavak pozicionális megoszlását és ezek alapján a cianobaktériumokat két csoportra lehet osztani. Az *Anacystis nidulans*-ban az egy kettőskötést tartalmazó zsírsavak az *sn*-1 pozíciót, míg a az *sn*-2 helyzetet kizárólag a 16:0 zsírsavak foglalják el. A fonalas cianobaktériumokban (*Anabaena variabilis*, *Anabaena cylindrica*, *Nostoc calcicola*, *Oscillatoria chalybea*) a 18 szénatomos zsírsavak az *sn*-1 helyen találhatók. Az *sn*-2 helyzetben vannak a 16 szénatomos számú zsírsavak, minden lipidosztályban (Murata és mtsai, 1992).

Az *Anabaena variabilis* tanulmányozása során (Sato és Murata, 1982b) megállapítást nyert, hogy a lipid-szintézis első lépéseiben kizárólagosan csak a telített zsírsavak észtereződnek a glicerín vázhoz, és a már kötött zsírsavak külön lépésenként deszaturálódnak, egyszeresen, kétszeresen, többszörösen telítetlen zsírsavakká. Ezen megállapításokat *in vitro* kísérletekkel is alátámasztották (Lem és Stumpf, 1984a,

Stapleton és Jaworski, 1984), melyek során bizonyították, hogy telített zsírsavak csak acetátból szintetizálódnak. Radioaktív acetátot használva követték nyomon az acetát beépülését, az így kapott zsírsavak deszaturálódtak, minden esetben a glicerín vázhoz kötve. Sem az endogén eredetű sztearil-ACP, sem pedig az sztearil-CoA nem deszaturálódott telítetlen zsírsavakká.

Az elmúlt tíz évben több sikeres kísérletet végeztek a zsírsav-deszaturáció lépéseinek feltérképezése érdekében. A *Synechocystis* PCC 6803 törzsből mutációval sikerült olyan vonalakat izolálni, amelyekben a zsírsavdeszaturáció egyes, meghatározott lépései gátoltak. (Wada és Murata, 1989). A $\Delta 6$ -os, $\Delta 9$ -es és a $\Delta 12$ -es pozíciót deszaturáló enzimek hatóhelyének számolása a karboxil végtől történik, amit nem befolyásol a zsírsavlánc hosszúsága (Higashi és Murata, 1993). Az $\omega 3$ deszaturáz enzim a metilvégtől ismeri fel a deszaturálandó pozíciót. A Fad6-nak nevezett mutánsban a $\Delta 6$ -os helyzetű, a Fad12-ben a $\Delta 12$ -es helyzetű deszaturáció gátolt. A különböző hőmérsékleten nevelt vad típusú és mutáns sejtek zsírsav- és lipidösszetételének analízise során lehetővé vált a zsírsav-deszaturáció lehetséges útjának leírása. A kísérletek alapján megállapítható volt, hogy míg a $\Delta 12$ -es helyzetű deszaturációt létrehozó enzim mind a négy fő lipidet elfogadja szubsztrátként, addig a $\Delta 6$ -os pozíciót deszaturáló enzim kizárólag az MGDG-t és a DGDG-t fogadja el szubsztrátként. A zsírsav-deszaturáció útjának lehetséges sémáját a 4. ábra mutatja (Wada és Murata, 1989).



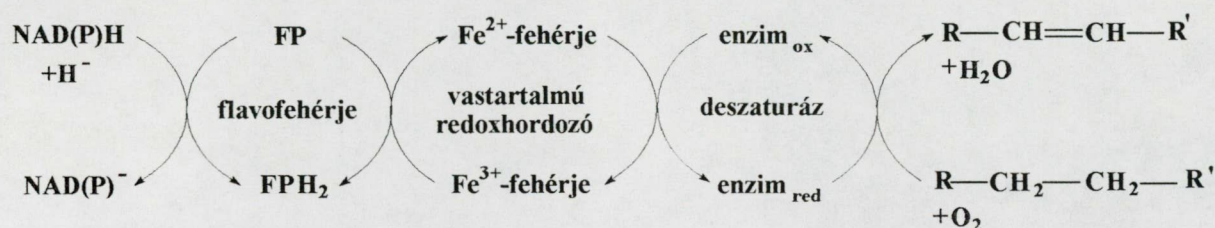
4. A vad típusú és a zsírsav deszaturációban mutáns *Synechocystis* PCC 6803 törzs zsírsav-szintézisének javasolt sémája. A vastag nyilak a szintézis fő-, míg a vékony nyilak a szintézis mellékútjait jelzik. A mutánsokban lévő gátolt szintézislépést a nyilak megtörése jelzi. Fad6 és Fad12 mutáns törzsek.

1/3. Az acil-lipid deszaturázok

A zsírsav-deszaturázok azok az enzimek, amelyek a zsírsavakban található C-C kötések C=C kötéseké alakítja át. Szubsztrát-specifitásuk alapján ezen enzimeket három csoportba szokás osztani (Murata és Wada, 1995):

- i, acil-lipid deszaturázok,
- ii, acil-CoA deszaturázok,
- iii, acil-ACP deszaturázok

A cianobaktériumokban csak az acil-lipid deszaturázok találhatók meg, amelyek a glicerinvázat észteresítő zsírsavakon hoznak létre kettőskötéseket. A zsírsav-deszaturáció elektronigényes folyamat, amely a szükséges elektronokat a ferredoxintól kapja (5. ábra), mint elektrondonortól a cianobaktériumokban és a magasabbrendű növényekben egyaránt (Wada és mtsai, 1993, Smith és Heinz, 1990a,b).



5. ábra Az elektrontanszport kapcsolódása a zsírsav-deszaturációhoz. (ox:oxidált, red:redukált, R, R':alkil láncok)

Az acil-lipid deszaturáz enzimek hely-specifitását a *Synechocystis* PCC 6803 törzsben tanulmányozták (Wada és Murata, 1990). A törzs négy acil-lipid deszaturáz enzimet tartalmaz. Elnevezésükben az általuk létrehozott kettős kötés helye alapján megkülönböztetünk Δ6, Δ9, Δ12 és ω3 deszaturázokat. Az acil-lipid deszaturáz enzimeket kódoló gének közül először a Δ12 deszaturázt kódoló *desA* gént közölték (Wada és mtsai, 1990), majd a Δ6 deszaturázt kódoló *desD* gént (Reddy és mtsai, 1993). Ezt követte az ω3 deszaturáz enzimet kódoló *desB* gén leírása, és legvégül a Δ9 deszaturázt kódoló *desC* gén izolálása történt (Sakamoto és mtsai, 1994a,b,c).

1/4. Az acil-lipid deszaturázok expressziója

A zsírsav-deszaturáz enzimek fontos szerepet játszanak a hideghez való alkalmazkodásban azáltal, hogy megváltoztatják a lipidek telítettségét és ezáltal a biomembránok fizikai állapotát. A membránt alkotó lipidek zsírsavainak telítettségének regulációjára különböző mechanizmusokat feltételeztek:

i, alacsony hőmérsékleten a zsírsav-deszaturázok aktivitása magasabb, mint magas hőmérsékleten (Horváth és mtsai, 1991);

ii, a telített zsírsavak *de novo* szintézise alacsony hőmérsékleten csökken, miközben a deszaturáció folyamata nem áll le, így megnő a telítetlen zsírsavak aránya a membránban;

iii, a reguláció meghatározó lépése az enzimek *de novo* szintézise, melyet az alacsony hőmérséklet indukál (Wada és Murata, 1990, Sato és Murata, 1981, Los és mtsai, 1993).

iiii, a *Synechocystis* PCC 6803 cianobaktérium membránlipidjeinek katalitikus hidrogénezése serkentette a *desA* gén expresszióját. A membránok hideg hatásra bekövetkező fluiditás csökkenése hatással van a zsírsav-deszaturáz gének expresszióra (Vigh és mtsai, 1993).

A zsírsav-deszaturázokat kódoló gének klónozása után lehetőség nyílt a gének hideg hatásra történő expressziójának vizsgálatára. A *desA*, a *desB* és a *desD* gének mRNS szintje megnövekedett, ha a sejteket 36°C-ról 22°C-ra helyezték (Sakamoto és mtsai, 1993). A *desC* gén mRNS szintje nem változott hideg hatásra a *Synechococcus* PCC 7002 törzsben (Sakamoto és Bryant, 1997). *Synechocystis* PCC 6803 sejteket 34°C-ról 22°C-ra helyezve a *desC* gén által kódolt nagyobb (3.5 kB) transzkriptum felhalmozódása figyelhető meg, míg a kisebb (1.1kB) transzkriptum mennyisége csökken. A reguláció egy másik lehetséges formája az acil-lipid deszaturáz enzimeket kódoló gének transzkriptumainak stabilitása. A *desC* transzkriptumának féléletideje 34°C-on és 22°C-on is 10 perc, míg a *desA* és a *desD* transzkriptumok féléletideje ezeken a hőmérsékleteken 2, illetve 20 perc. A *desB* transzkriptumánál ezek az értékek 1 perc és 10 perc (Los és mtsai, 1997).

II/1. A cianobaktériumok membránszerkezete

II/1.1. Membránfluiditás

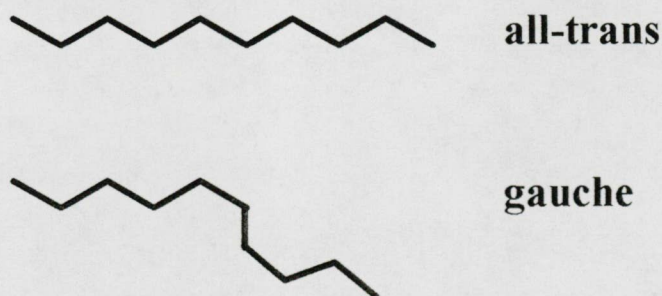
A biomembránok tulajdonságait legkiemelkedőbben a Singer és Nicholson (1972) által leírt folyadék-mozzaikkristály modellel lehet jellemezni. E modell alapján a membránok általános tulajdonságai a következők: a membránok vázát foszfo- és galaktolipidek kettősrétege alkotja, amelybe integráns membránfehérjék vannak beágyazva. A membránokat alkotó különböző típusú molekulák olyan komplexet hoznak létre, amelyet nem-kovalens kötések tartanak össze, ezért mind a lipid-, mind a fehérjemolekulák számára lehetőség van az oldalirányú szabad mozgásra és a rotációs diffúzióra. A membrán síkjára merőleges irányban történő "flip-flop" mozgás bár előfordul, nem túl gyakori, és ezzel a transzport folyamatok nem magyarázhatók. A fluiditás a viszkozitás inverz fogalmaként való megközelítése Brenner (1984) nevéhez kapcsolódik. A biomembránoknál nem szerencsés a fluiditást átlagértékként kezelni, mivel ezen membránokban jól elkülöníthető fluid- és rigidrétegekkel kell számolnunk (Wolf és Voglmayer, 1984). A membránoknál tapasztalható inhomogenitás nemcsak a membránok fősíkjában fordulhat elő, hanem arra merőlegesen is, ami asszimmetrikus elrendeződést okoz a membrán lipidkettősrétege között, és így a fluiditás a rétegek között is eltérő lehet (Quinn, 1981, Devaux és Seigneuret, 1985).

A membrán annál rendezettebb, minél magasabb benne a telített zsírsavak aránya a telítetlenekéhez képest, és minél hosszabbak a zsírsavláncok. A telítetlenség következtében az alakjuk hajlott pálcára hasonlít, ami nehezíti a zsírsavláncok szoros egymás mellé rendeződését, azaz a rendezettséget. A lánchosszúság pedig a

zsírsavláncok között kialakuló lipofil kölcsönhatásokon keresztül hat a rendezettségre. Minél hosszabb a lánc, annál erősebb a kialakuló kölcsönhatás.

II/1.2. A telített zsírsavak hatása a membránszerkezetre

Azok a lipidek, melyekben a glicerín vázhoz az *sn*-1 és *sn*-2 pozícióban telített zsírsavak kötődnek eltérő térszerkezetűek, bár alkilláncaik kémiaiilag megegyeznek. Az *sn*-1 pozícióban lévő zsírsavlánc teljesen nyújtott és a membrán síkjára merőlegesen helyezkedik el, míg az *sn*-2 helyen található első CH₂ szegmens a membrán fősíkjával párhuzamosan helyezkedik el, és csak a második láncrésztől merőleges a fősíkra. A membrán gélállapotában a telített zsírsavak a számukra energetikailag legkedvezőbb térszerkezetet veszik fel, teljesen kinyújtott állapotban ún. “all-trans” állapotban vannak. A folyadék-kristály fázisban különféle térállású rotációs izomerek fordulnak elő, amelyeket “gauche” konfigurációknak nevezünk (6. ábra). Az alkilláncban 8-10 szénatom után egyre nő szegmensek rendezettsége a metilvég irányában.



6. ábra Trans és gauche szegmensek

II/1.3. A telítetlen zsírsavak hatása a membránszerkezetre

A cianobaktériumok és a magasabbrendű növények kloroplasztiszainak membránjaiban található telítetlen zsírsavak eddigi ismereteink szerint cisz kettőskötéseket tartalmaznak, ettől eltér a 16:1(3) transz zsírsav, amely mind a cianobaktériumokban, mind pedig a magasabbrendű növények kloroplasztiszainak foszfátidilgliceroljában megtalálható (Quinn és Williams, 1978). A cisz kettőskötések száma hatással van a zsírsavak mozgására, ami pedig a membrán rendezettségét befolyásolja. A cisz kettőskötés két alapvető tulajdonsággal rendelkezik:

1., a kettőskötést tartalmazó szegmens, az előtte és utána álló láncszakaszokkal azonos térrészt foglal el, ami a kettőskötések azon tulajdonságából fakad, hogy a π kötés körüli forgás gátolt. A forgás gátoltsága rigiditásnövelő tényező.

2., a telített zsírsavakra jellemző az egyenes lefutás, míg a kettőskötést tartalmazók megtörnek, így ez a lánc nagyobb térigényű, ezáltal fokozza a szomszédságában lévő zsírsavak rotamerjeinek képződési esélyét, ami fluidabb membránrészt eredményez, miközben a membrán felszíne vékonyodik. A cisz kettőskötések fluidizáló szerepét különböző rendszerekben, különböző mérési technikákkal bizonyították (Brenner, 1984, Chen és Ho, 1985, Laskay és Lehoczki, 1986). Azt is megállapították, hogy a kettőskötések számának növelése nem egyenesen arányosan növeli fluiditást. Az első kettőskötés bevitele okozza a legnagyobb változást, minden további kettőskötés bevitele már arányaiban kisebb hatást eredményez (Coolbear és mtsai, 1983).

II/2. A membránszerkezet megváltoztatásának lehetőségei

II/2.1. A külső környezet hatása a membránszerkezet kialakítására

Az 1970-es évek elején azt feltételezték, hogy a membránlipidek fázisátmenetének - folyadékkristályos állapotból gélállapotba - meghatározó szerepe van az élő szervezetek hidegérzékenységében (Raison, 1973, Lyons, 1973). A legkülönbözőbb szervezetek membránjainak hideg által előidézett folyadékkristály-gél fázisátmenete végső soron az élő szervezet halálához vezet, mert a fázisátmenet hőmérsékletén a membrán átjárhatóvá válik ionok és más molekulák számára (Wada és mtsai, 1984). Ez a fázisátmeneti hőmérséklet jóval a fiziológiás hőmérséklet alatt van, és egy hirtelen, de rövid ideig tartó lehűlés esetében nem vezet a szervezet irreverzibilis károsodásához (Farkas és mtsai, 1982). Az *Escherichia coli* baktériumban a membránok fázistranzíciós pontja a nevelési hőmérsékletnél 15-16°C-al alacsonyabban van (Simensky, 1974). A citoplazmás membrán és tilakoid membrán fázistranzíciós hőmérsékletét két cianobaktériumon, az *Anacystis nidulans*-on és az *Anabaena variabilis*-en különböző módszerekkel vizsgálva azt kapták, hogy a citoplazmás membrán fázisátmenete 10°C-al alacsonyabban van, mint a tilakoid membráné (Murata és mtsai, 1984). A citoplazmás membránok fázisátmeneti hőmérséklete a nevelési körülményektől függ (Murata, 1989), amit a növekedési hőmérséklet által meghatározott zsírsavtelítetlenséggel magyaráztak (Sato és mtsai, 1979). A tilakoid membrán fázistranzíciója a sejtek fotoszintetikus aktivitását befolyásolta, és nem volt hatással a túlélési képességre.

A membránfluiditás regulációját a *Tetrahymena pyriformis* vizsgálata alapján két, időben elválasztható szakaszra osztották (Thompson, 1980, Ramesha és Thompson,

1982, 1983). Az első, gyors szakaszban a glicerinvázra kötött zsírsavak de- majd reacilációjával a meglévő zsírsavkészlet felhasználásával a szervezet új molekulafajtákat alakít ki, melyek fázisátalakulási hőmérséklete elégséges ahhoz, hogy az organizmus károsodás nélkül túlélje a stresszhatást. A lassú szakaszra a teljes zsírsavkészlet és a membránlipidek arányának megváltozása jellemző (Ramesha és Thompson, 1984).

A fázisátmeneti hőmérsékletet, a zsírsavtelítetlenség vagy a zsírsavlánc rövidülése egyaránt képes az alacsonyabb hőmérséklet irányába eltolni (Chapman, 1975). A különböző nevelési hőmérsékleten a biomembránokban megjelenő eltérő zsírsavösszetétel az a regulációs folyamat, amely lehetővé teszi az organizmus számára külső a környezethez való adaptációt azáltal, hogy a membránjainak fluiditását optimális körülmények között tartja fenn (Ono és Murata, 1982, Murata és mtsai, 1984).

II/2.2. A zsírsavtelítetlenség megváltoztatása homogén katalitikus hidrogénezéssel

A biomembránok zsírsav kettős kötéseinek katalitikus hidrogénezésével az 1970-es években próbálkoztak először (Chapman és Quinn, 1976). Mivel az általuk használt katalizátor vízdoldhatatlan volt, számos nehézségbe ütköztek használata során. A módszer jelentősége abban állt, hogy képesek voltak a cisz kettőskötések telítésére.

A következő lépést a vízdékony katalizátorok megtalálása és alkalmazhatóságuk bizonyítása jelentette. Joó és társai szulfonált trifenilfoszfin (m-szulfofenil-difenil-foszfin, $mSPO_2$) ligandum felhasználásával számos platinafém foszfin komplexét állították elő (Joó és Beck, 1973, Joó és Tóth, 1981). A katalizátorok közül a $RuCl_2(mSPO_2)$ összetételű ruténium komplex alacsony hőmérsékleten is aktívnak bizonyult. Ezek a katalizátorok a vízben és biológiai minták puffereiben homogén oldatot adnak, és eltávolításuk a membránokból nem vezet a minta sérüléséhez.

A vízoldható hidrogénező katalizátorokat membránokon vagy élő sejteken először Vigh és munkatársai alkalmaztak (Vigh és Joó, 1983, és Vigh és mtsai, 1985a, 1985b.).

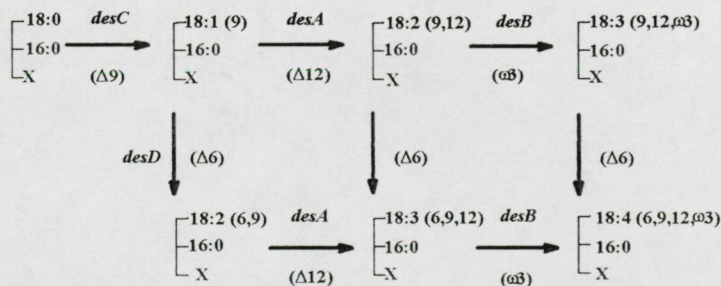
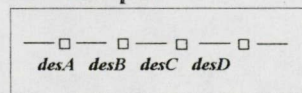
II/2.3. Génmanipuláció

A *desA*, *desB*, *desC* géneket Murata és munkatársai izolálták a fent említett törzsből (Murata és Wada, 1995). Miután a *Synechocystis* PCC 6803 törzs teljes genetikai állománya ismert (Kaneko és mtsai, 1996), megállapítható volt, hogy más gén nem mutat homológiát az ismert zsírsav deszaturáz gének szekvenciájával. Az a tény, hogy a *Synechocystis* PCC 6803 törzs autotranszformálható (saját szekvenciát tartalmazó DNS darabok az *E. coli*hoz hasonlóan homológ rekombinációval beépülnek a genomba) (Williams, 1988, Williams és Szalay, 1983), lehetőséget kínált a zsírsav-deszaturázokat kódoló gének célzott genetikai manipulációjára.

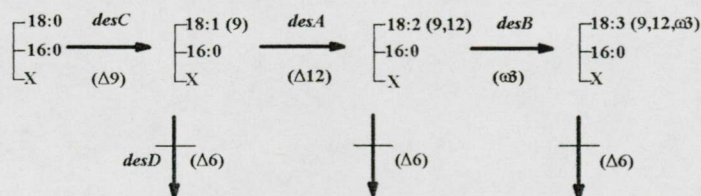
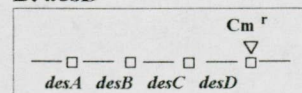
A korábbi kémiai mutagenezissel, etil-metán-szulfonáttal létrehozott sejtvonalak (a Fad6 és a Fad12) a kémiai mutáció tisztázatlansága miatt nem voltak alkalmasak a zsírsav-telítetlenség szerepének tisztázására a különböző hőmérsékleti stresszekhez történő alkalmazkodásban, illetve a stresszekkel szembeni védekezésben. A membránlipidek zsírsavainak kettőskötéseit meghatározó *desA*, *desB*, *desC* és *desD* gének szabályozott megváltoztatása érdekében a géneket inszerciós mutagenezissel inaktiválták (Tasaka és mtsai, 1996, Wada és mtsai, 1990, 1992). Az így létrehozott kísérleti rendszerben a *desA* és *desB* géneket egy-egy kanamicin rezisztenciát kódoló gén inszerciójával, míg a *desD* gént egy kloramfenikol rezisztenciát kódoló gén beépítésével inaktiválták.

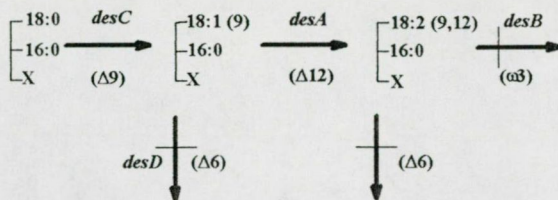
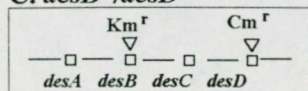
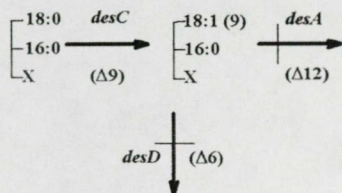
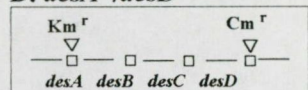
A *desD* gén inaktiválása azt eredményezte az újonnan kapott sejtvonalonban, amit *desD::Cm^r* (*desD⁻*) törzsnek nevezték el, hogy a gén által kódolt zsírsav deszaturáz enzim inaktív lett és a törzsből teljesen hiányoztak a négyszeresen telített zsírsavak. Továbbá a *desA::Km^r* (*desA⁻*) és a *desB::Km^r* (*desB⁻*) nevezett mutáns törzsekben egy kanamicin rezisztenciát kódoló gén közbeiktatásával inaktiválták a *desA* és *desB* géneket, ami a háromszoros és négyszeres telítetlen zsírsavak hiányát okozta a törzsekben. A *desA⁻* mutáns törzset inaktivált *desD* génnel transzformálták, és az így kapott törzsből (*desA⁻/desD⁻*) teljesen hiányoztak a többszörösen telítetlen zsírsavak. A zsírsav-analízisek során e törzsben telítetlen zsírsavként csak olaj - és palmitoleil savak voltak detektálhatók. A *desC* gén inaktiválása nem járt sikerrel, mert abban a sejtvonalonban, amelyben a gént inaktiválták a mutáció letálisnak bizonyult. A génmanipuláció eredményét a 7. ábra mutatja.

A. Vad típus



B. *desD⁻*



C. *desB*⁻/*desD*⁻**D. *desA*⁻/*desD*⁻**

7. ábra A zsírsav deszaturázok inszerciós inaktiválása a *Synechocystis* PCC 6803 törzsben és az eredményként kapott mutánsok lipid-deszaturációja. X:a lipidek fejcsoportját jelenti. Km^r:kanamicin rezisztenciát kódoló gén, Cm^r:kloramfenikol rezisztenciát kódoló gén. A megtört nyíl a szintézis gátlását jelzi.

Mivel ezekben a mutáns törzsekben a mutációk mindig csak a zsírsav deszaturáz enzimeket kódoló géneket érintették, lehetőség nyílt az új sejtvonalak fiziológias vizsgálatára. Meghatározták, hogy a fotoszintetizáló membránok lipidtartalmának telítetlensége miként befolyásolja a fotoszintetikus aktivitást, milyen hatással van a növekedésre, hogyan képesek azok a sejtek ellenállni az alacsony hőmérsékleten történő fotoinhibíciónak. A fotoszintézis fény általi gátlását nevezzük fotoinhibíciónak vagy fénygátlásnak, amikor a nagy fényintenzitás hatására a fotoszintetikus apparátus inaktiválódik (Powles, 1984). A fotoinhibíció közepes fényintenzitáson is bekövetkezhet,

ha ez egyéb stresszekkel pl. alacsony hőmérséklet, társul (Berényi és Krause, 1985, Boese és Huner, 1990, Falk és mtsai, 1990, Somersalo és Krause, 1990, Moon és mtsai, 1995, Gombos és mtsai, 1997).

Korábban, amikor különböző nevelési hőmérsékleten nőtt cianobaktérium sejtek fotoszintetikus aktivitását mérték azonos hőmérsékleten, azt tapasztalták, hogy az alacsonyabb hőmérsékleten nőtt sejtek több oxigént fejlesztenek, amit az alacsony növekedési hőmérsékleten bekövetkező nagyobb membránlipid telítetlenséggel magyaráztak (Ono és Murata, 1979). Pearcy (1978) szintén az alacsony hőmérsékleten megnövekedett telítetlen zsírsavak mennyiségével magyarázta a megnövekedett aktivitást. Azonban a tervezett genetikai manipulációval létrehozott törzseknél, ahol a zsírsav-telítetlenséget irányítottan megváltoztatták, azt tapasztalták, hogy sem a nettó fotoszintetikus aktivitás - azaz a teljes elektrontranszport lánc aktivitása - sem a kettes fotoszisztéma aktivitása (PSII) - ahol az elektrontranszport lánc egy rövid szakaszának aktivitását mérték a víztől a p-benzokinonig (pBQ) - nem változott. A pBQ-t mesterséges elektronakceptorként használták (Tasaka és mtsai, 1996). A vad típusú és a *desA⁻/desD⁻* sejtek növekedési görbéjét összehasonlítva azt tapasztalták, hogy míg magas hőmérsékleten (30°C felett) nincs különbség a növekedési sebességben, addig alacsonyabb hőmérsékleten a mutáns sejtek lassabban nőttek a vad típusú sejtekhez képest. A mutáns sejtek növekedése 25°C alatt leállt, míg a vad típusú sejtek 15°C-on is képesek voltak osztódásra. Azokban a törzsekben, ahol nemcsak egyszeresen telítetlen és telített zsírsavak voltak, nem különböztek a vad típusúhoz képest, ami azt bizonyítja, hogy alacsony hőmérsékleten a telítetlen lipidek szükségesek a fotoszintetizáló szervezetek számára, míg magas hőmérsékleten nincs hatásuk (Tasaka és mtsai, 1996). Az alacsony hőmérsékleti fotoinhibícióval szemben a mutáns sejtek érzékenyebbek bizonyultak a vad típusú sejtekkel szemben (Gombos és mtsai, 1992, 1994, Tasaka és

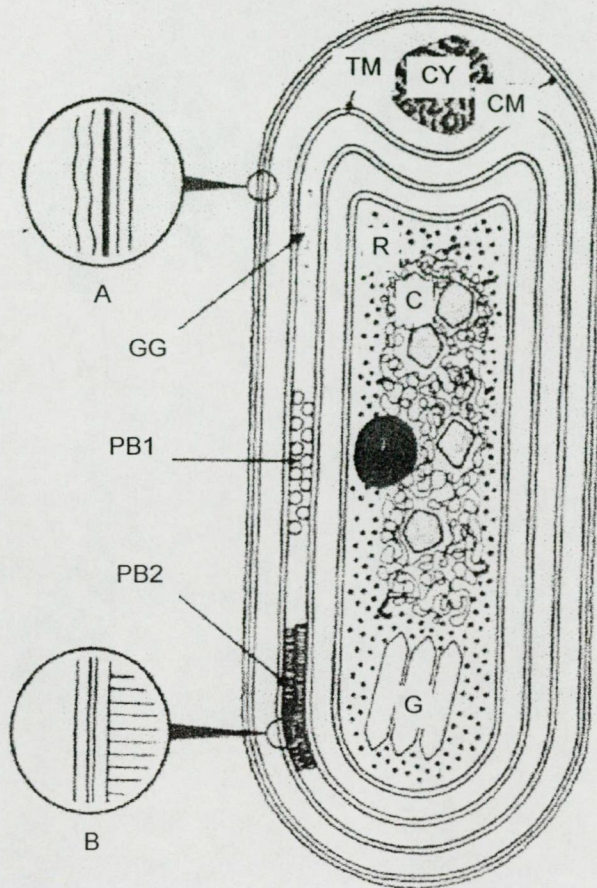
mtsai, 1996). Megállapították, hogy az alacsony hőmérsékleten bekövetkező fotoinhibíció során, amikor a PS II centrumában található D1 protein inaktiválódik és működésképtelenné válik a fotoszintézis folyamata sérül, a helyreállítás folyamata azokban a sejtekben is megkezdődik, amelyek tilakoid membránjaiban csak telített és egyszeresen telítetlen zsírsavak találhatók. A helyreállítás folyamata a D1 protein *de novo* szintézisét jelenti, mely során pre-D1 protein szintetizálódik és felhalmozódik a tilakoid membránban. Az éretlen fehérje nem tud processzálódni és inaktív formában marad, hacsak telítetlen és egyszeresen telített zsírsavakat tartalmaz a membrán, míg azok a sejtek amelyekben többszörösen telített zsírsavak is vannak, az érési folyamat megtörténik (Kanervo és mtsai, 1997). Azt, hogy a fénygátlást követő helyreállítási folyamatban a többszörösen telítetlen zsírsavak fontos szerepet játszanak, és így ellenállóbbak az alacsony hőmérsékleti stresszel szemben, a *Synechococcus sp.* PCC 7942 törzsen végzett kísérletek is alátámasztották (Gombos és mtsai, 1997). Ebben a munkában *desA* génnel transzformálták a vad típusú sejteket, amelyek membránjában csak telített és egyszeresen telítetlen zsírsavak alkotják a kettősrétegét. Az így kapott sejtek lipidösszetétele megváltozott, megjelentek a kétszeresen telítetlen zsírsavak, és ez az alacsony hőmérsékleti stresszel szembeni toleranciát növelte.

III. Membránszerkezet vizsgáló módszerek

III/1. Elektronmikroszkópia

Az első elektronmikroszkópos felvételeket az 1950-es évek végén és az 1960-as évek elején készítették. A mikroszkópos és fixálási technika fejlődésével ma már ismerjük a cianobaktériumok elektronmikroszkópos szerkezetét (Stainer és Cohen-Bazire, 1977). A legtöbb vegetatív sejt jól megkülönböztethető struktúrával rendelkezik. A sejt protoplazmája több rétegű sejtfallal van körülvéve, mint a legtöbb gram-negatív baktérium, ami egy külső membránból és egy 5-10 nm változó vastagságú peptidoglükán rétegből áll. A külvilág felé a citoplazmás membrán, más néven a plazmamembrán határolja a plazmát. A nukleoplazma legszembetűnőbb eleme a tilakoidmembrán rendszer, melynek rétegei egy keresztmetszeti képen koncentrikus körökben futnak, és közöttük kb. 60-70 nm membránközti tér van. A membránba ágyazva találhatók a klorofil- a protein komplexek, karotinoidok, a fotoszintetikus reakciócentrumok és az elektrontranszport-lánc elemei, továbbá a membránok felszínéhez kötve helyezkednek el a fénybegyűjtő komplexek, a fikobiliszómák, melyek a fikobiliproteineket tartalmazzák. A cianobaktériumok vázlatos keresztmetszeti képét az elektronmikroszkópos felvételek alapján a 8. ábra mutatja.

Az elektronmikroszkópiában használt jelölési technika az ún. immunogold technika alkalmazásával a közelmúltban lehetőség nyílt például arra is, hogy a zsírsav-deszaturációt végző enzimek helyét pontosan meghatározzák. (Mustárdy és mtsai, 1996).



8. ábra Cianobatóriumok vázlatos keresztmetszeti képe az elektronmikroszkópos felvételek alapján. TM: tilakoid membrán, CM: citoplazmás membrán, PB1 és PB2 a tilakoid membránhoz kapcsolódó fikobiliszómák szemből és oldalról nézve, CY: cianoficin szemcse, R: riboszóma, C: nukleoplazmával körülvett karboxiszóma, P: polifoszfát szemcse, G: gáz vezikula, GG: glikogén szemcse,

III/2. Fourier transzformációs infravörös spektroszkópia (FTIR)

A Fourier transzformációs infravörös spektroszkópiát ma már egyre gyakrabban használják lipid modellrendszerek mellett (Mantsch és McElhaney, 1991, Mendelsohn és Senak, 1993) biológiai membránok szerkezetének tanulmányozására (Moore és Mendelsohn, 1994, Moore és mtsai, 1995). Az FTIR spektroszkópia előnye, hogy

nagyon kis anyagmennyiséget kíván a vizsgálatokhoz, illetve nincsen szükség jelölő molekula bevitelére. Az infravörös fény elnyelése rendkívül gyors folyamat (10^{-14} sec), így egy "pillanatfelvételt" látunk az egész rendszerről, a kapott adatok valamennyi molekula átlagát tükrözik.

A lipidekben található zsírsavláncok konformációjában tükröződik az az állapot, amit rigid vagy fluid állapotnak nevezünk. A rendezettség mértéke követhető a CH_2 -csoport vegyértékrezgése alapján, mivel a rezgés frekvenciája ($\nu_{\text{as}} \approx 2920 \text{ cm}^{-1}$ és $\nu_{\text{sym}} \approx 2850 \text{ cm}^{-1}$) növekszik a konformációs rendezetlenség növekedésével (Siebert, 1995). A frekvencia-eltolódás mértéke 2-5 hullámszám (cm^{-1}) a lipidek gél-folyadékkristályos fázisok átmenete között (Mantsch és McElhaney, 1991). Ez a változás kicsinek tűnhet, de megfelelő kiértékelési módszerekkel a sávok helyzete kb. 0.05 cm^{-1} hibával meghatározható, így minden esetleges változás a lipidek szerkezetében nagy pontossággal nyomon követhető. Ennek alapján a fázisátalakulás is megfigyelhető, mely a modellmembránokban rendkívül éles, az átmenet hőmérséklete pedig az adott lipidmolekulára jellemző. A valódi membránokban a helyzet sokkal bonyolultabb, szélesebb átmeneteket kapunk, mert többféle lipidmolekula van jelen, és a fehérjék is befolyásolják a membránok szerkezetét.

Az FTIR spektroszkópia membránok esetében is lehetővé teszi a fehérjék szerkezetének vizsgálatát, ami csak kevés szerkezetvizsgáló módszerről mondható el. A fehérjék másodlagos szerkezetét peptidcsoportjaik egymáshoz viszonyított helyzete alakítja ki, ezért a peptidcsoportokra jellemző amid rezgések tükrözik a fehérje szerkezetét. Az Amid I sáv frekvenciája, mely elsősorban a karbonil csoport ($\text{C}=\text{O}$) vegyértékrezgéséből származik (az irodalmi adatok alapján kb. 80%-ban), igen érzékeny a másodlagos szerkezetre, így az 1700 és 1620 cm^{-1} közötti tartomány rendkívül informatív lehet. A hidrogénkötések megváltozása, denaturáció vagy akár fémionok

asszociációja miatt a sáv alakja megváltozhat a különböző szerkezetekhez rendelhető komponensek intenzitásváltozásából adódóan. Néhány frekvenciát és a hozzá tartozó szerkezetet a következő táblázat mutatja (Haris és Chapman, 1992, Stokkum és mtsai, 1995, Arrondo és mtsai, 1993).

1. táblázat A különböző hullámszámokhoz rendelhető másodlagos fehérjeszerkezetek

Konformáció	Amid I (cm^{-1})
α -hélix	1648-1658
intermolekuláris β -lemez	1616-1620
intramolekuláris β -lemez	1632-1639
rendezetlen	1640-1650

Az Amid II sáv ($\approx 1550 \text{ cm}^{-1}$), mely komplexebb rezgési mód, kevésbé használatos a szerkezet meghatározásra. Deuterálva az amid nitrogént kb. 100 hullámszámmal eltolódik a sáv az alacsonyabb hullámszám felé. Így az Amid II sáv intenzitását vizsgálva nehézvízben (D_2O), az amid N hidrogén $\rightarrow$ deutérium cseréjének sebessége meghatározható, amiből információkat nyerhetünk a peptidcsoportok hozzáférhetőségéről, szerkezetéről, nagyobb szerkezeti változásairól. Magasabb hőmérsékleten, ahol a membránfehérjék kitekerednek, és ezáltal peptidkötéseiknek nagy része könnyen elérhetővé válik az oldószer (esetünkben D_2O) számára, az NH csoportok gyorsan deuterálódnak, és ennek megfelelően az Amid II sáv 1550 cm^{-1} körül hirtelen eltűnik.

III/3. Egyéb szerkezetvizsgáló módszerek

A membránfluiditásról szerzett információkat az alkalmazott mérési módszerek felbontóképessége szerint csoportosíthatjuk (Shinitzky és Yuli, 1982). A makroszkópikus szint a lipideket, mint izotróp termodinamikai rendszert közelíti meg mechanikai vagy kalometriás eszközökkel (DSC, DTA), (röntgen-sugár diffrakció). A nyert információ a rendszerben bekövetkező változásokra utal mint pl. a gél-folyadékkristályos fázisátmeneti hőmérséklet. A szubmakroszkópikus szint molekuláris mélységű felbontását nyújtja a lipidek fluiditásának. Erre a célra főleg a külső molekulaszondákat alkalmazó spektroszkópai módszerek, a fluoreszcencia anizotrópia és az elektronspin rezonancia spektroszkópia (ESR) használatosak. A molekulaszonda többnyire valamilyen membránalkotóhoz hasonló molekula, fehérje, lipid vagy zsírsavhordozóra kötött fluorofór ill. szabadgyök, melyet be kell építeni a vizsgálandó kettősrétegbe. Ezekben az esetekben az alkalmazott szonda fizikai és kémiai tulajdonságaitól függő mikrokörnyezetről kapunk információkat, a fluiditás jellemzésére használt paraméter pedig egy meghatározott időállandóval jellemezhető mozgáshoz lesz rendelhető. Fluoreszcens technikával eredményesen vizsgálhatók a 10^{-9} - 10^{-6} s, ESR technikával pedig 10^{-11} - 10^{-7} s időtartományban lejátszódó molekuláris mozgások. Mivel eljárásonként és szondánként más fizikai tartalmat hordozó fluiditás paraméterrel kell számolnunk, az eredmények összehasonlításakor nagy körültekintésre van szükség (Brenner, 1984). A mikroszkópikus szint információt nyújt az egyes atomokcsoportokról ill. molekularészekről a lipidréteg különböző mélységeiben. Ilyen vizsgálati módszerek a magmágneses rezonancia spektroszkópia (NMR) és a már részletesen tárgyalt FTIR. Mindkét módszer előnye, hogy nem használ külső szondamolekulát, így a kapott fluiditásparaméter közvetlenül jellemzi a membrán állapotát.

Mivel a mérési módszerek mindegyike sajátos időablakkal rendelkezik, és így más-más paramétert mér, a fluiditás fogalmát különbözőképpen definiálja. Ez az oka annak, hogy összehasonlítva egyazon rendszer különböző módszerekkel mért “fluiditását” gyakran ellentmondásos eredményeket kaphatunk (McElhaney, 1994).

Anyag és módszer

I. Felhasznált anyagok

A pufferekhez szükséges HEPES, TES és a fotoszintetikus aktivitás mérések során használt p-benzokinon (pBQ), 3-(3,4-diklórfenil)-1,1-dimetilurea (DCMU), rifampicin, kloramfenikol, a proteázgátló fenilmetil-szulfonil fluorid (PMSF) és kapronsav, valamint a dezoxiribonukleáz (Dn-áz) a Sigma Chemical Co. termékei voltak.

A membrán-izolálás során felhasznált lizozim, és az elektronmikroszkópos beágyazásnál használt durkupán a Fluka gyár terméke volt.

Az RNS izolálás során használt vegyszerek, anyagok (Hybond-N Nylon membrán, Megaprime DNA system) az Amersham cég termékei voltak. A molekulasúly marker I Boehringer Mannheimtól származtak.

Minden egyéb felhasznált vegyszer a Reanal terméke volt.

II. A kísérletek során használt cianobaktérium és nevelési körülményei

A vad típusu *Synechocystis* PCC 6803 sejteket a Wada és mtsai által leírtak szerint neveltük (1989). A sejteket BG 11 médiumban növesztettük (Stainer és mtsai, 1971) fotoautotróf körülmények között. A buborékoltatott kultúrájánál alkalmazott fényintenzitás $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ volt, a steril levegő 1 % CO_2 -ot tartalmazott (Ono és Murata, 1981). A fotoheterotróf módon nőtt sejteket BG 11 médiumban növesztettük, amelyhez 5 mM előzőleg sterilizált glükózt adtunk. A nevelés során a sejtek termosztált rázóban, sötétben nőttek úgy, hogy napi 10 perces normál fényintenzitású ($40 \mu\text{mol m}^{-2}$

s⁻¹) megvilágítást kaptak (Anderson és McIntosh 1991). A kísérletek során az alkalmazott fény intenzitása mindig 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ volt.

III. Spektroszkópiai mérések

III/1. Sejtnövekedés mérés

A sejtek növekedését spektrofotometriás méréssel követtük nyomon. 750 nm-nél mértük az optikai denzitás változását, amihez Shimadzu UV-3000 Dual-Wavelength/Double-Beam Recording Spectrophotometert használtunk. A méréseket 1 cm úthosszú kvarc küvettával végeztük. Az eredmények és megvitatásuk című fejezetben 3 egymástól független kísérlet eredményének átlagát adtam meg.

III/2. Abszorpciós spektrumok felvétele

Az intakt sejtek abszorpciós spektrumait szintén a fent említett Shimadzu fotométerrel vettük fel nm-enként.

IV. Fotoszintetikus aktivitás mérések

Az intakt sejtek fotoszintetikus oxigén fejlődésének mérését ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2$) BG 11 pufferban végeztük el, amihez elektrondonort vagy akceptort nem adtunk. A méréseket Clark-típusú oxigén elektróddal végeztük el, ami a Hansatech gyár terméke. A mintatartó elé egy vörös optikai szűrőt szereltünk – a szűrőn áthaladó fényt képesek a cianobaktériumok elnyelni - (VR620, Hoya Glass Co., Tokyo). A megvilágítás

fényintenzitása $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ volt. A megvilágítás utáni oxigénfejlődést mindig termosztált körülmények között mértük az adatokat a klorofill mennyiségére vonatkoztatva adtam meg. Az oxigén fejlődés abszolút értékei a sötétben nevelt sejteknél nem tértek el azoktól az értékektől (az eltérés kisebb volt, mint 10 %) amit a fényen nevelt sejteknél kaptunk.

V. Transzmissziós (átnézeti) elektronmikroszkópia

A sejteket centrifugálás után 2%-os glutártaldehiddel 4 órán át 4°C -on fixáltuk, majd 18 órán át 0.1 M foszfátpufferrel (pH 7.2) történt mosás után Millonig oldattal hígított 1%-os OsO_4 -al 1 órán keresztül utófixáltuk (Millonig, 1961). A fixálást követő Millonig-oldatos mosás után a mintákat növekvő koncentrációjú alkoholsorozatban víztelenítettük (30, 50, 70, 90, 96, 100%), majd kapszulákban durkupánba ágyaztuk. A kapszulákat 2 napig (a gyanta teljes megkeményedéséig) 56°C -os termosztátba helyeztük. A metszést Tesla BS 278 ultramikrotómon üveggéssel végeztük. Az ezüst interferencia színű (kb. $60 \mu\text{m}$ vastag) metszeteket mesh-es rostélyra vettük fel, majd 1 óráig cseppen úsztatva tömény uranilacetáttal, majd ólomcitráttal (Reynolds, 1963) festettük. A metszeteket Zeiss (HBA-1) típusú vákuumgőzölőben szénhártyával stabilizáltuk. Az így előkészített mintákat OPTON 902 elektronmikroszkóppal tanulmányoztuk.

VI. Lipid extrakció és zsírsav-analízis

VI/1. Lipid extrakció

A lipideket Bligh és Dyer (1959) által leírt módon nyertük ki a sejtekből. A sejteket kloroform és metanol 1:2 arányú elegyével extraháltuk.

VI/2. Zsírsav-analízis

A lipidkivonatokat 5%-os metanolban 2 óráig észteresítettük, és az így kapott zsírsav-metilésztereket gázkromatográffal azonosítottuk (Shimadzu, GC-4A vagy GC-14A), és mennyiségi meghatározásukat elvégeztük. A zsírsav-metilésztereket üveg-oszlopon (2.0 m x 4.0 mm) választottuk el egymástól, ami 15% dietilén-glicerol szukcináttal volt töltve, hordozóként Chromsorb W-t használtunk. Az elválasztáshoz kapillárisoszlopot is alkalmaztunk (Quadrex, CPS-1, 50 m x 0.25 mm) amihez 0.25 µm cianopropilmetil szilikon volt kötve. Az oszlop és a láng-ionizációs detektor hőmérséklete 180°C ill. 260°C volt. A zsírsavak egymáshoz viszonyított mennyiségét a kromatográfiás csúcsok területeinek integrálásával (Shimadzu, C-R3A) számítottuk ki. A zsírsavak azonosítását gázkromatográf-tömegspektrométeren (JEOL, JMS-DX-300) végeztük, amihez az adatok kiértékeléséhez egy JEOL BJM-3100 adatkiértékelő egység csatlakozott, belső standardként 15:0 zsírsavat használtuk.

VII. A citoplazmás és tilakoid sejtmembránok izolálása cianobaktériumokból

A sejteket 4000 g-s, 10 perces centrifugálással összegyűjtöttük, és 60 ml 5 mM-os TES-NaOH pufferral (pH 7.0) történő mosás és ismételt centrifugálás után felszuszpendáltuk 30 ml 10 mM-os TES-NaOH pufferba (pH 7.0), ami 600 mM szacharózt és 5 mM EDTA-t tartalmazott. Az így kapott sejtuszpenzióhoz 0.2% lizozimot adtunk, majd a szuszpenziót enyhe rázogatózás közben, sötétben 2 óráig 37°C-on tartottuk. A lizozimmal kezelt sejteket 5000 g-s, 10 perces centrifugálással gyűjtöttük össze, majd a lizozim eltávolítása érdekében kétszer mostuk 20 mM-os TES-NaOH pufferral (pH 7.0), ami 600 mM szacharózt tartalmazott. Az ezt követő lépések 4°C-on történtek. A sejteket felvettük 30 ml 20 mM-os TES-NaOH pufferba (pH 7.0), ami 600 mM szacharózt tartalmazott, és "French pressure cell" segítségével feltörtük 2×10^7 Pa nyomáson. A homogenizátumhoz 0.05 ml 0.1%-os DN-áz I-et adtunk, ami 1 mM $MgCl_2$ -ot tartalmazó Na-acetát pufferban (pH 5.6) volt oldva. Proteázgátlóként 0.1 ml 3%-os, metanolban oldott PMSF-et adtunk. 15 perces inkubáció után a fel nem tárt sejtektől és a sejtörmelékektől 10 perces 5000 g-s centrifugálással szabadultunk meg. A vörös színű, fluoreszkáló felülúszó tartalmazta a membránokat. A felülúszóhoz annyi 90%-os szacharóz tartalmú 24 mM TES-NaOH puffert (pH 7.0) adtunk, ami 12 mM EDTA-t, 24 mM NaCl-t, hogy a minta 50 tömeg %-os lett. Ebből 17 ml-t pipettáztunk a centrifugacső aljára, majd 8 ml 39%-os, 3 ml 30%-os és 7 ml 10%-os szacharóz tartalmú TES-NaOH puffereket (pH 7.0) rétegeztünk egymásra. Ezek a pufferek még tartalmaztak 5 mM EDTA-t, 10 mM NaCl-t és 1 mM PMSF-t. Az így kapott cukorgrádiensen választottunk el egymástól centrifugálással (16 óráig 130000 g) a membránokat. A tilakoid membrán a 39%-os és 50%-os cukorréteg határán, a narancssárga színű plazma membrán a 30%-os rétegben volt található. A mintákat

háromszoros mennyiségű 10 mM TES-NaOH pufferral (pH 7.0) mostuk, ami 10 mM NaCl-t tartalmazott. Ezután 2 órán keresztül centrifugáltuk 300000 g-vel majd, a cső alján kiült membránokat 10 mM TES-NaOH pufferben (pH 7.0) vettük fel további analízis céljából (Murata és Ono, 1988).

VIII. RNS izolálás és Northern Blot analízis

A totál RNS izolálás Nagy és mtsai (1988) leírása alapján történt a következő módosítással. Mielőtt a sejteket feltörtük volna, az RNS degradálódásának megakadályozása érdekében a feldolgozandó kultúrákat azonos mennyiségű 0°C-os etanollal kevertük össze, ami 5% fenolt tartalmazott, majd Sato (1995) által leírtak szerint összegyűjtöttük a sejteket. A különböző deszaturáz gének expressziós szintjét a következőkben leírt Northern blot analízissel határoztuk meg. 5 µg totál RNS tartalmú mintákat elektroforézissel válsztottuk el 1.2%-os agaróz gélen, ami formaldehidet tartalmazott, majd Hybond-N nylon membránra blottoltuk, és UV fénnel rögzítettük a gyártó cég útmutatása alapján. A filtereket előhibridizáltuk 3 órán át, majd Church pufferben (1984) hibridizáltuk radioaktív próbákkal 65°C-on 16 óráig. Mosás után a hibridizáló RNS mintákat autoradiogramos módszerrel vizsgáltuk. A négy deszaturáz gén kódoló régióját és a 16S rRNS fragmentjét PCR reakcióval felerősítettük specifikus, szintetikus oligonukleotid primereket használva. Az izolált DNS fragmenteket [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP-kezeltük Megaprime DNA labelling system segítségével. A hibridizáló sávok méretét RNS molekulasúly marker I-gyel határoztuk meg. A Northern blotról a radioaktív próbákat (a gyártó útmutatása szerint) lemostuk és azokat hibridizáláshoz új próbákkal újra felhasználtuk. A deszaturáz gének expressziós szintjét mindig a 16S RNS

génre normalizáltuk. A mennyiségi meghatározást PhosphImager (type445SI:software, Image Quant 4.1) segítségével határoztuk meg.

IX. Fourier transzformációs infravörös spektroszkópia

A spektroszkópai vizsgálatok előtt a membránokat centrifugáltuk, és az izolálási procedura során alkalmazott 10 mM TES-NaOH (pH 7.0) használtunk, de H₂O helyett D₂O-t tartalmazott és ismételten centrifugáltuk a mintákat. A membrán szuszpenziót 25 µm átmérőjű CaF₂ ablakok közé helyeztük és az éleit szilikon zsírral kentük be, hogy megakadályozzuk a víz párolgását a mérés során, amely 2-3°C-ként történt 5-65°C között. Az FTIR spektrumok felvétele Philips PU9800 és Bruker IFS66 spekrométeren 2 cm⁻¹ felbontással történt 128 interforgram hozzáadásával. A hőmérsékletet 10 perces várakozási idővel emeltük 2-3°C-al. Az egész mérési ciklust számítógép vezérelte. Az adatokat SPSERV software alapján értékeltük (Bagyinka, Cs. Szeged).

Eredmények és megvitatásuk

I. Sejtnövekedés

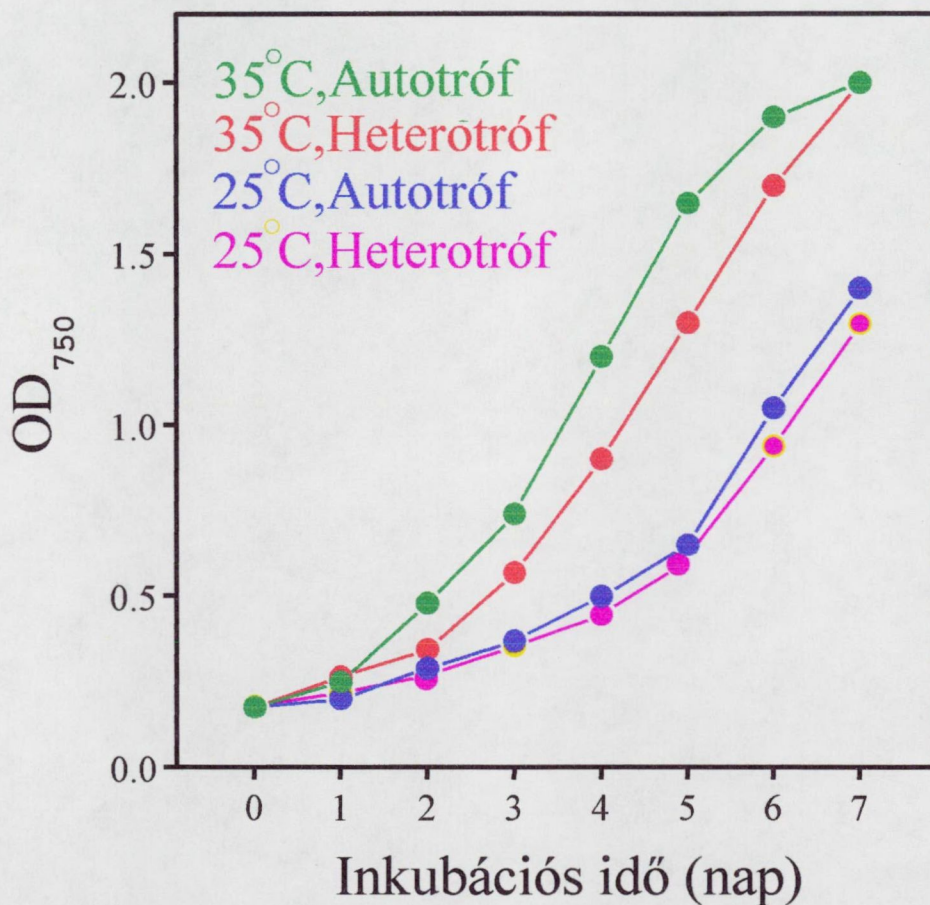
A cianobaktériumok fiziológiás állapotáról jól használható információt ad az adott hőmérsékleten megfigyelhető sejtosztódás. A mezoterm csoportba tartozó *Synechocystis* PCC 6803 növekedési tartománya 18°C és 39°C közé esik, ez alatt a sejtek gyakorlatilag nem osztódnak, vagy csak nagyon lassan, e felett pedig szintén megáll a sejtosztódás, és 40°C felett a sejtek a magas hőmérséklet miatt elpusztulnak.

Kísérletünk során arra voltunk kíváncsiak, hogy az autotróf (fényen és CO₂, mint szénforrás) és fényaktivált fotoheterotróf módon nőtt sejtek (sötétben, 5 mM glükóz hozzáadásával) hogyan nőnek a növekedési optimum alatti hőmérsékleten (25°C) és egy a növekedési optimumhoz közeli (35°C) hőmérsékleten. A kísérletek során a kiindulási optikai denzitás OD₇₅₀-nél 0.2 volt (8. ábra).

Azt tapasztaltuk az irodalomnak megfelelően, hogy a sejtek mind sötétben, mind pedig fényen képesek élni, osztódni (Anderson és McIntosh, 1991). 25°C-on mind CO₂, mind pedig glükóz jelenlétében hosszabb lag periódus után kezdtek osztódni, de az osztódás ütemében nem találtunk jelentős különbséget, közel azonos sebességgel osztódtak. 35°C-on a lag periódus rövidebb, mint 25°C-on, az osztódás gyorsabb volt a 25°C-on nőtt sejtekhez képest. 35°C-on, fényen a lag periódus rövidebb, mint ugyanezen a hőmérsékleten sötétben. Az osztódás ütemében ezen a hőmérsékleten sem tapasztaltunk jelentős különbséget ha sejtek fényen, vagy sötétben nőttek.

A hét napig tartó kísérletek után azt a következtetést tudtuk levonni, hogy 35°C-on gyorsabban nőnek a sejtek, mint 25°C-on, de a fény nem befolyásolja a növekedés

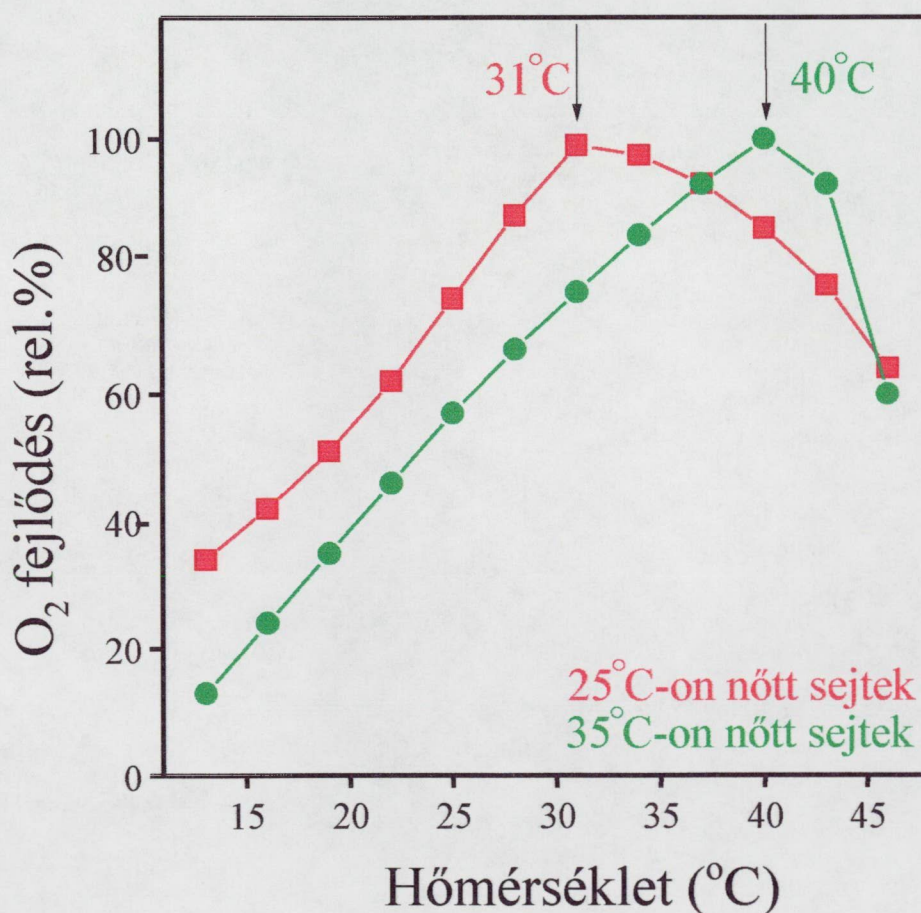
ütemét. A sejtek akkor is hasonló ütemben voltak képesek szaporodni, ha nem a fotoszintézis által termelt energiát használták fel az osztódásukhoz, hanem az oxidatív elektrontranszport működése során előállított ATP-t. A hőmérséklet volt az a tényező, amely meghatározta sejtek osztódási sebességét függetlenül attól, hogy a sejtek fotoautotróf módon, vagy fényaktivált heterotróf módon nőttek.



8. ábra A *Synechocystis* PCC 6803 sejtek növekedési görbéje különböző nevelési körülmények között. A sejtnövekedést az abszorpció változásával követtük nyomon OD₇₅₀ nm-nél. A sejtek 40 μmol m⁻² s⁻¹ intenzitású fényen nőttek. (A minden további kísérlet során ez volt az alkalmazott fényintenzitás.)

II. Fotoszintetikus aktivitás

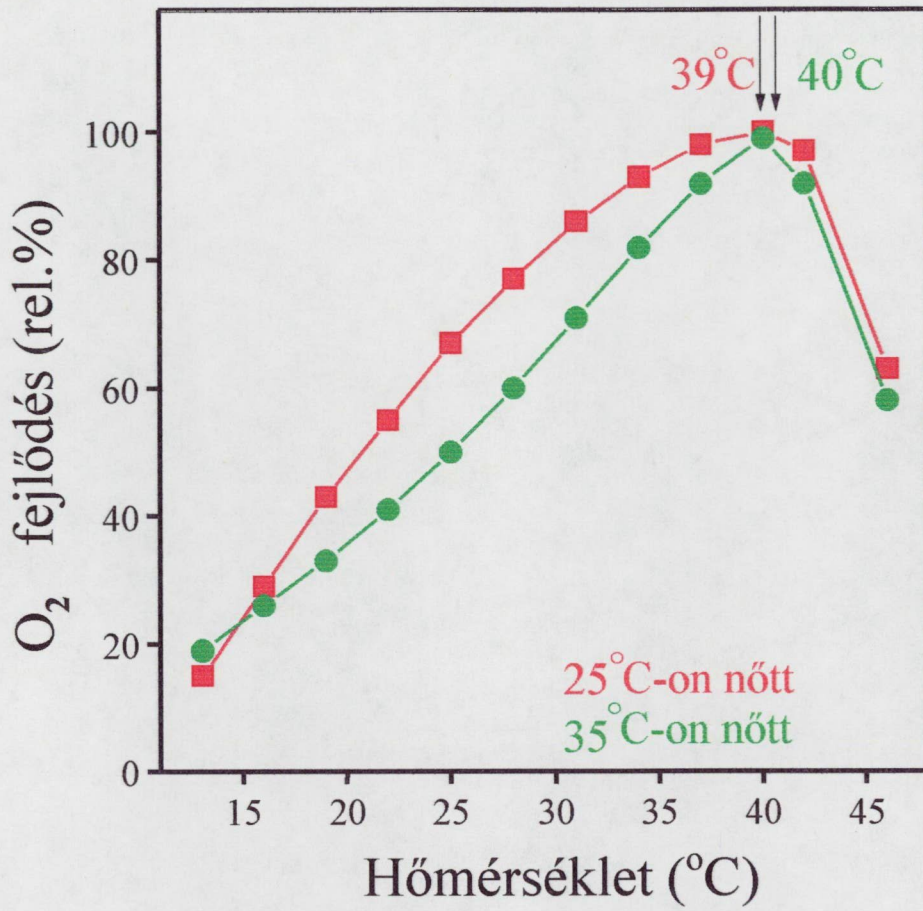
Megmértük a különböző nevelési körülmények között nőtt cianobaktérium sejt kultúrák hőmérsékletfüggő fotoszintetikus aktivitását H_2O -tól CO_2 -ig. A kísérlet során 3°C -onként emeltük a hőmérsékletet a mérőcellában. Az eredményeket a 9/a és 9/b. ábrák mutatják.



9/a. ábra A fotoautotróf módon nőtt *Synechocystis* PCC 6803 sejtek hőmérsékletfüggő fotoszintetikus aktivitásának ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2$) görbéi. Az ábrán a hőmérsékletfüggő fotoszintetikus aktivitás maximumainak értékei vannak feltüntetve.

Ha a sejteket fotoautotróf módon neveltük 25°C-on, a sejtek 31°C körül mutatták a legnagyobb fotoszintetikus aktivitást, míg azon a sejtek esetében amelyeket 35°C-on neveltünk, 40°C-nál adódott a maximum. A sötétben nevelt sejteknél nem tapasztaltunk ilyen nagy különbséget a hőmérsékletfüggő fotoszintetikus aktivitásban, ha különböző hőmérsékleteken neveltük a kultúrákat. 25°C-on nevelt sejtek esetében az aktivitás maximuma 39°C-on volt, míg ha a sejtek 35°C-on nőttek ez a maximum 41°C-nál volt. Megmértük azoknak a sejteknek a fotoszintetikus aktivitását is, amelyek 5 mM glükóz tartalmú BG-11 pufferben CO₂-al buborékolatva 25°C-on, ill. 35°C-on nőttek (ezeket az eredményeket a 9/a. és 9/b. ábrák nem mutatják) és hasonló eredményeket kaptunk, mint abban az esetben, amikor a sejtek autotróf módon nőttek. Az eredmények azt bizonyítják, hogyha a sejtek autotróf módon nőttek glükóz jelenlétében vagy anélkül, a nevelési hőmérséklet volt az a tényező, ami meghatározta a hőmérsékletfüggő fotoszintézis maximumát, míg ha sejtek sötétben nőttek glükóz jelenlétében a nevelési hőmérséklet nem befolyásolta jelentősen a maximum hőmérsékletet. A sejtek mintha nem érzékelték volna a külső hőmérsékleti különbséget, és a 25°C-on nőtt sejtek úgy viselkedtek, mintha 35°C-on nőttek volna.

Kísérletesen bizonyított, hogy a 25°C-on nevelt sejtek 35°C-ra helyezése nem okozott gondot a sejt életében, míg fordított irányban a sejtek több órán keresztül adaptálódtak a megváltozott körülményhez. A hőmérsékletfüggő fotoszintetikus aktivitás maximumainak eltolódását a sejtek membránjainak zsírsavtartalmával magyarázhatjuk, alacsonyabb hőmérsékleten a sejtek membránjainak zsírsavtartalma telítetlenebb, ami nem jelent hátrányt ha a sejtek magas hőmérsékletre kerülnek. A telítettség viszont hátrányosan hat fordított irányban.



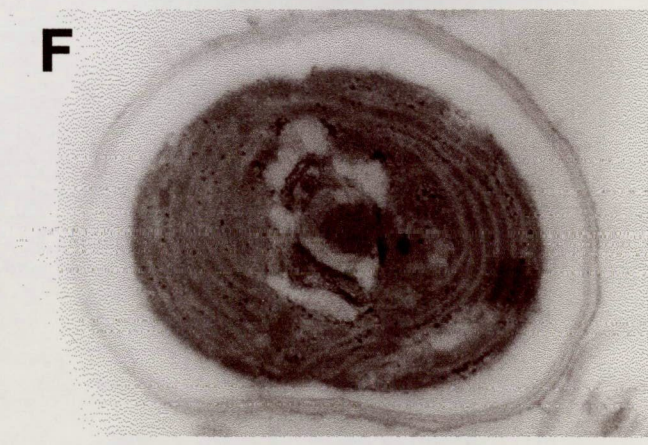
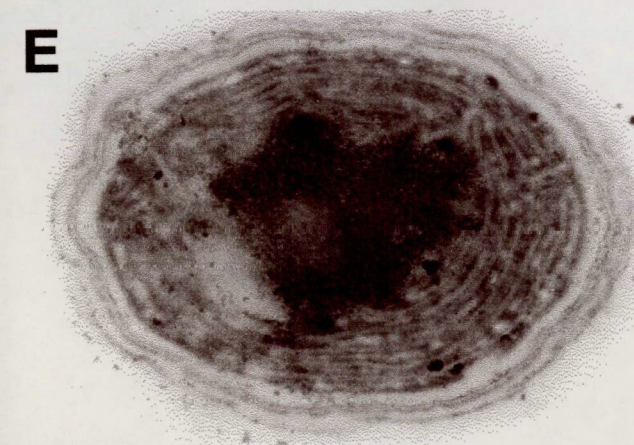
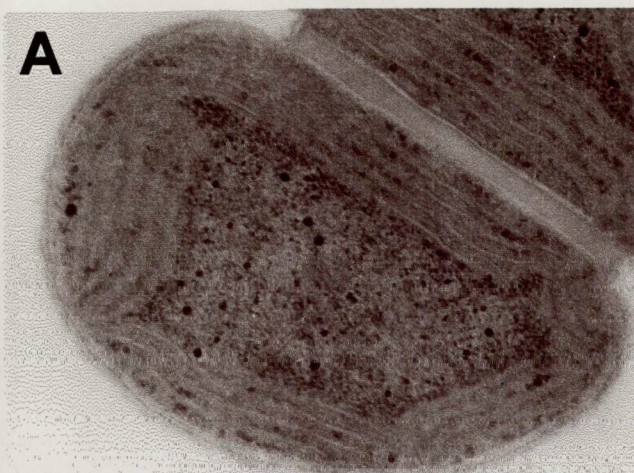
9/b. ábra A heterotróf módon nőtt *Synechocystis* PCC 6803 sejtek hőmérsékletfüggő fotoszintetikus aktivitásának ($H_2O \rightarrow CO_2$) görbéi. Az ábrán a hőmérsékletfüggő fotoszintetikus aktivitás maximumainak értékei vannak feltüntetve.

III. A *Synechocystis* PCC 6803 sejtek elektronmikroszkópos finomszerkezete

Annak eldöntésére, hogy hogyan változnak a sejtek subcelluláris struktúrái, ha az autotróf életmódról heterótróf életmódra állnak át, elektronmikroszkópos felvételeket készítettünk. A morfológia kísérletekhez logaritmikus fázisban lévő sejteket használtunk. Kísérleteinkben arra voltunk kíváncsiak, hogy milyen változásokon ment keresztül a cianobaktérium életének szempontjából nélkülözhetetlen tilakoid membránrendszer, ahol a fotoszintézis folyamata lejátsszódik.

A tilakoid membránok pontos szerkezete függ a sejtek élettani állapotától (Stevens és Nierzwicki-Bauer, 1991). A megváltozott külső körülmények megváltozott membránstruktúrát eredményeznek. Az irodalomban leírt elektronmikroszkópos szerkezetnek (Stainer és Cohen-Bazire, 1977) a 35°C-on autotróf módon nőtt sejtek felelnek meg a legjobban. 10/a. ábra mutatja a 35°C-os autotróf sejtek elektronmikroszkópos képét. Ezeknek a sejteknek szabályos a tilakoid membránrendszere, amely elengedhetetlen a jól működő fotoszintézishez. Az elektronmikroszkópos képeken jól látható az intakt, kettős plazmamembránrendszer. Ez alatt minden sejt 3-6 rétegű, koncentrikus körökben futó tilakoid membránrendszerrel rendelkezik. A rétegek között kb. 60 nm szélességű festett régió található, melyben a cianobaktériumok jellegzetes fénybegyűjtő komplexe, a fikobiliszóma lokalizálódik. Alacsonyabb hőmérsékleten, 25°C-on a sejtek a membránrétegeinek számában nem tapasztaltunk jelentős csökkenést (10/b. ábra). A jól festődő régióban, ahol a fikobiliszómák találhatóak, viszont csökkenést tapasztaltunk a 35°C-os mintákhoz képest. Hasonló elektronmikroszkópos képet kaptunk, ha a sejtek heterótróf módon 35°C-on nőttek (10/c. ábra). A felvételen jól látható, hogy a tilakoid membránrétegek száma csökken, rendezettségük nem mutatja a fényen nőtt sejtek rendezettségét. Ezzel

párhuzamosan a fikobiliszómatartalom csökkenése is megfigyelhető. 25°C-on, sötétben nőtt sejtek tilakoid membránrendszere nagymértékben redukált, a fényen nőtt sejtekhez képest csak 15-20% tilakoid membránnal rendelkeznek. A membránszerkezet véletlenszerű eloszlást mutat, megszűnik a jellegzetes koncentrikus lefutás, emellett a fikobiliszómák számának további csökkenése figyelhető meg. A sejtek kevesebb fénybegyűjtő komplexet tartalmaznak, mint a 35°C-on, sötétben nőtt sejtek (10/d. ábra). Ezeket a változásokat azzal magyarázhatjuk, hogy a sötétben nevelt sejtek esetében a fotoszintézis nem működik, ezért energetikailag nem lenne előnyös egy bonyolult membránrendszer kialakítása és fenntartása. A membránszintézisben csökkenés tapasztalható, de sohasem tűnik el teljesen a tilakoidmembrán. E jelenségnek az az oka, hogy a tilakoid membrán teljes elvesztése a sejt halálához vezetne, mivel az oxidatív elektrontranszport-lánc egyes komponensei is ebben a membránban lokalizáltak, másrészt a sejt fényre kerülése esetén a fotoszintézis fogja biztosítani a metabolikus folyamatokhoz az energiát. A sötétben nőtt sejteket fényre visszahelyezve azt tapasztaltuk, hogy a sejtek helyreállítják tilakoid membránjainak eredeti szerkezetét (10/e. és f. ábrák).



10. ábra. Autotróf és fotoheterotróf módon nőtt *Synechocystis* PCC 6803 sejtek elektronmikroszkópos képei

10/a. Fényen, 25°C-on nőtt sejt elektronmikroszkópos képe

10/b. Sötétben, 25°C-on nőtt sejt elektronmikroszkópos képe

10/c. Fényen, 35°C-on nőtt sejt elektronmikroszkópos képe

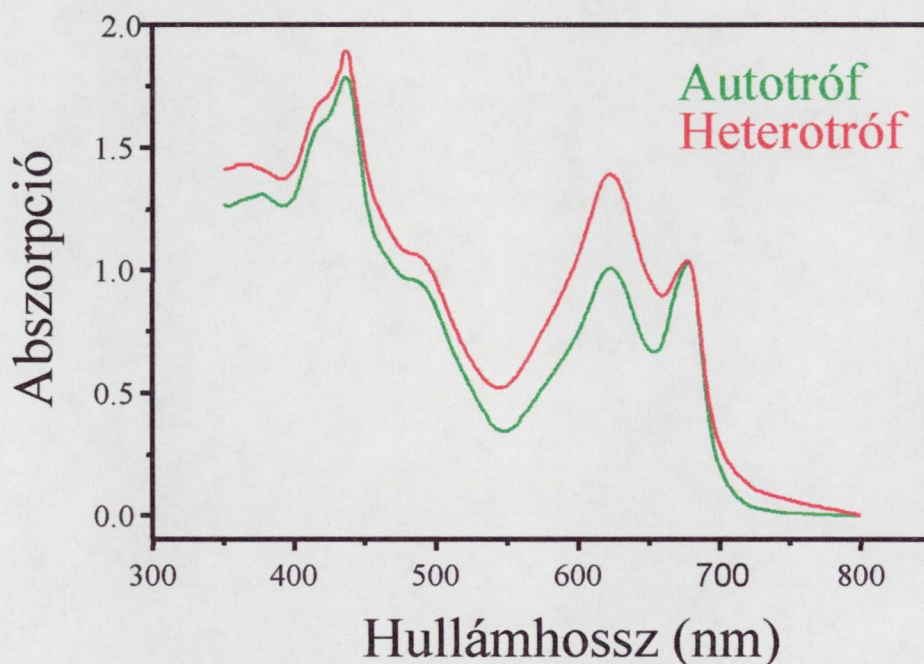
10/d. Sötétben, 35°C-on nőtt sejt elektronmikroszkópos képe

10/e. Sötétben, 25°C-on nőtt, majd fényre, 25°C-ra helyezett sejt elektronmikroszkópos képe

10/f. Sötétben, 35°C-on nőtt, majd fényre, 35°C-ra helyezett sejt elektronmikroszkópos képe

IV. Spektrális analízis

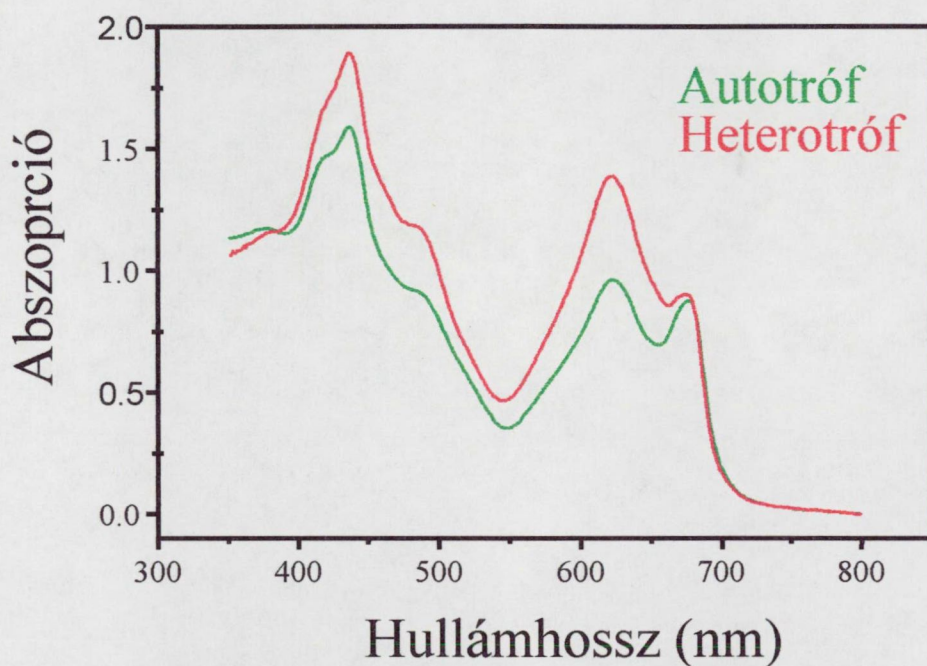
Felvettük a logaritmikus fázisban lévő sejtek abszorpciós spektrumait 350-800 nm között (11/a és 11/b ábra).



11/a ábra A 25°C-on, fényen és sötétben nőtt *Synechocystis* PCC 6803 sejtek abszorpciós spektrumai. A spektrumok normalizálása a klorofill-a csúcsra történt.

A spektrumok könnyebb értelmezése érdekében a sejtek klorofill csúcsára normáltuk az egyes spektrumokat. A 25°C-on és 35°C-on nőtt sejteknél egyaránt azt tapasztaltuk, hogy a sejtek klorofill mennyisége jelentősen csökkent (2. táblázat), melynek jellemző sávja 678 nm-nél van a 625 nm-nél abszorbeáló fikobiliproteinekhez képest. Ez a csökkenés hasonló mértékű volt a különböző hőmérsékleten nevelt sejteknél. A

klorofilltartalom csökkenését szintén a csökkent fotoszintetikus aktivitással magyarázhatjuk. Ha a sötétben nevelt sejteket visszahelyeztük állandó megvilágításra, az eredeti növekedési hőmérséklet megtartásával 3-4 nap múlva a kontroll sejtek spektrumához hasonló spektrumokat kaptunk, a sejtek megnövekedett klorofillszintézissel alkalmazkodtak a fotoszintézisre alkalmas környezethez.



11/b ábra A 35°C-on, fényen és sötétben nőtt *Synechocystis* PCC 6803 sejtek abszorpciós spektrumai. A spektrumok normalizálása a klorofill-a csúcsra történt.

A spektrumok analízise felvilágosítást ad a sejtek pigmentösszetételéről. *Anacystis nidulans* sejteken figyelték meg először, hogy a növekedési hőmérséklettől függően eltérő a fikocianin/klorofill arány (Goedheer, 1976). A 35°C alatt növő kultúrákban magasabb volt a klorofilltartalom, ezért ezeket “zöld” vagy “kék-zöld”

sejteknek nevezte el, míg azok a sejtek melyek 39°C felett nőttek, és a fikocianin dominált bennük, a “kék” elnevezést kapták. Méréseink során azt tapasztaltuk, hogy a sejtszámra vonatkoztatott klorofilltartalom kisebb a heterotróf módon nevelt sejtek esetében (2. táblázat).

2. táblázat A táblázat a különböző módon nevelt kultúrák klorofilltartalmát mutatja. A sejtek optikai denzitását 750 nm-nél mértük. A mintavételek a sejtosztódás késői logaritmikus fázisában történtek (OD₇₅₀:0.8).

Növekedési hőmérséklet 25°C		Növekedési hőmérséklet 35°C	
Optikai denzitás (OD ₇₅₀ :0.8)		Optikai denzitás (OD ₇₅₀ :0.8)	
autotróf	heterotróf	autotróf	heterotróf
6.01 µg klorofill/ml	1.77 µg klorofill/ml	5.14 µg klorofill/ml	2.78 µg klorofill/ml

V/1. A különböző nevelési körülmények között nőtt sejtek zsírsavösszetétele

A biomembránok fizikai tulajdonságainak egyik fontos meghatározó tényezője a membránokban található lipididek. Annak meghatározására, hogy milyen szerepe van a hőmérsékletnek és a fénynek a többszörösen telítetlen zsírsavak szintézisére, autotróf és fényaktivált heterotróf módon nőtt sejtek zsírsavanalízisét végeztük el. Az eredményeket a 3. táblázatban foglaltam össze.

A membránlipidek zsírsavtelítetlenségét sok más tényező mellett a nevelési hőmérséklet is meghatározza. Mind a magasabbrendű növényeknél, mind a cianobaktériumoknál a nevelési hőmérséklet csökkentése a telítetlen zsírsavtartalom növekedését okozta a membránokban. Alacsony hőmérsékleten csökken a membránok mikroviszkozitása, és ezt a negatív hatást a zsírsavtelítetlenség növelésével próbálja kompenzálni az adott élőlény. Az ilyen jellegű reguláció ahhoz szükséges, hogy az élő szervezetek széles tartományban meg tudják őrizni membránjaik épségét és a hozzájuk kötődő funkciók optimális működését (Cossins, 1994). Mint azt korábban *Synechocystis* PCC 6803 sejteken végzett kísérletekkel igazolták, jelentős különbségek adódnak a sejtek zsírsavösszetételében, ha azokat különböző hőmérsékleten nevelték (Murata és mtsai, 1992). A lipidtelítetlenség nő a növekedési hőmérséklet csökkentésével és fordítva.

Ha a sejteket fényen 25°C és 35°C-on neveltük, a legszembetűnőbb változás az volt, hogy a 35°C-on nevelt sejteknél a 18:4 és a α 18:3 zsírsavak csak nyomokban voltak detektálhatók a gázkromatográfiás mérések során. Ezen zsírsavak szintézise alacsony hőmérsékleten történik meg. Egyéb zsírsavak mennyiségében csak elenyésző különbségeket tapasztaltunk. Ha sejteket heterotróf módon neveltük 25°C és 35°C-on, közel azonos volt a sejtek zsírsavtartalma. A 18:4 és a α 18:3 zsírsavak mennyisége

mindkét esetben csak nyomokban volt detektálható csakúgy, mint az autotróf, 35°C-os sejtek esetében.

A fényen és a sötétben nőtt sejtek zsírsavösszetételét összehasonlítva azt kaptuk, hogy az utóbbiak zsírsavösszetétele a fényen, 35°C-on nőtt sejtekével szinte megegyező. Mind a fényen, mind a sötétben növő sejtek legnagyobb mennyiségű zsírsava a 16:0 szénatomszámú zsírsav volt, amely a glicerinváz *sn*-2 pozíciójához kötődik (Murata és Wada, 1995). Ennek a zsírsavnak a mennyiségét nem befolyásolta jelentősen nevelési hőmérséklet bár a sötétben nevelt sejtek esetében csökkenést tapasztaltunk. Ezzel szemben jelentősen megnőtt az egyszeresen telítetlen zsírsavak mennyisége a sötétben nevelt sejtekben a fényen nevelt sejtekkel szemben. A 16:1 mennyisége háromszorosára, míg a 18:1 kétszeresére nőtt sötétben.

Összehasonlítva fényen, 5 mM glükóz hozzáadásával nevelt sejtek zsírsavtartamát az autotróf módon nőtt sejtek zsírsavösszetételével nem kaptunk különbséget. Az eredmények alapján a 18:4 és a α 18:3 zsírsavak eltűnését a membránokból alacsony hőmérsékleten nem a glükóz okozta. Továbbá ezen többszörösen telítetlen zsírsavak megjelenéséhez nem elegendő az alacsony hőmérséklet, mint ezt a korábbi eredmények alapján feltételezték, hanem a fénynek is döntő szerepe van.

3. táblázat *Synechocystis* PCC 6803 sejtek totál lipidjeinek zsírsavösszetétele. A sejtek fényen (autotróf) és sötétben (heterotróf), 5 mM glükóz jelenlétében 25°C és 35°C-on nőttek.

Zsírsavak	Synechocystis PCC6803			
	autotróf		heterotróf	
	növekedési hőmérséklet			
	25°C	35°C	25°C	35°C
	Zsírsav összetétel (relatív %)			
16:0	52	58	44	45
16:1	4	3	14	13
18:0	1	1	1	nyom.
18:1	9	8	16	17
18:2	10	12	10	11
γ18:3	15	17	15	14
α18:3	5	nyom.	nyom.	nyom.
18:4	4	nyom.	nyom.	nyom.

nyom.: nyomokban (<0.5%)

V/2. A különböző nevelési körülmények között nőtt sejtekből izolált membránok zsírsavösszetétele

Mind a citoplazmás membránok, mind pedig a tilakoid membránok zsírsavaiban előfordulnak egyszeresen és többszörösen telítetlen zsírsavak. Az immonogold technika segítségével bizonyították, hogy mind a citoplazmás membránhoz, mind pedig a tilakoid membránhoz kötődnek deszaturáz enzimek (Mustárdy és mtsai, 1996). Valószínűsíthető, hogy a lipiddeszaturáció eltérően megy végbe a tilakoid és a citoplazmás membránban. A különböző nevelési körülmények között nevelt sejtekből tilakoid és citoplazmás membránokat izoláltunk, majd meghatároztuk az egyes membránok zsírsavösszetételét (4. táblázat).

Összehasonlítva egy adott hőmérsékleten, fényen vagy sötétben nőtt sejtek tilakoid és citoplazmás membránjainak zsírsavösszetételét, nem tudtunk jelentős különbséget kimutatni. A 25°C-on, fényen nőtt sejtekből izolált citoplazmás és tilakoid membránokban egyaránt megtalálhatóak a 18:4 és a α 18:3 zsírsavak. Míg ugyanezek hiányoztak az azonos hőmérsékleten, de sötétben nőtt sejtekből. A korábbi eredményekkel összhangban a 35°C-on nőtt sejtekből izolált membránokból, legyen az a citoplazmás vagy a tilakoid membrán, hiányoztak ezek a többszörösen telítetlen zsírsavak ha fényen neveltük őket. Ugyanilyen eredményeket kaptunk akkor is ha 35°C-on, sötétben növesztettük a kultúrákat. Az eredmények azt bizonyítják, hogy bár a citoplazmában és a tilakoid membránban található lipid deszaturáz enzimek, melyek a kettős kötések kialakításáért felelősek, nem azonosak; de abban hasonlóak, hogy alacsony hőmérsékleten a fény elengedhetetlen működésükhöz.

4. táblázat *Synechocystis* PCC 6803 sejtekből izolált tilakoid (TM) és citoplazmás (CM) membránok zsírsavösszetétele. A sejtek fényen (autotróf) és sötétben 5 mM glükóz jelenlétében (heterotróf) nőttek 25°C és 35°C-on.

Zsírsav- vak	Autotróf				Heterotróf			
	Növekedési hőmérséklet							
			35°C		25°C		35°C	
	TM	CM	TM	CM	TM	CM	TM	CM
	Zsírsav összetétel (relatív %)							
16:0	52.8	54.2	55.7	60.3	45.2	43.0	48.1	48
16:1	4.0	4.4	2.8	3.1	12.7	13.7	12.0	11.8
18:0	1	1	1	1	1	1	1	1
18:1	9.2	9.4	6.2	7.0	12.5	13.7	17.9	18.6
18:2	9.5	11.7	10.0	11.8	9.3	9.2	8.4	8.3
γ18:3	14.8	12.3	24.3	16.2	18.7	18.3	13.4	11.3
α18:3	5.6	4.1	nyom.	nyom.	nyom.	nyom.	nyom.	nyom.
18:4	4.4	3.0	nyom.	nyom.	nyom.	nyom.	nyom.	nyom.

nyom.: nyomokban (<0.5%)

V/3. A fény indukálta zsírsavösszetétel változás

Annak eldöntésére, hogy milyen minőségi és mennyiségi változásokat okoz a fény a sötétben nevelt sejtek zsírsavösszetételében, fényre raktuk a kultúrákat. A sejtekben bekövetkező lipidváltozásokat gázkromatográfiás mérésekkel követtük. Az eredményeket a 5. táblázatban foglaltam össze.

5. táblázat A táblázatban a zsírsavösszetételben bekövetkező változások követhetők nyomon az idő függvényében. A sejtek 25°C-on nőttek sötétben, majd ugyanezen a hőmérsékleten történt a fényre helyezésük. A sötétben nőtt sejteket 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ fényintenzitással világítottuk meg.

idő(h)	Zsírsavösszetétel (relatív%)							
	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	γ 18:3	α 18:3	18:4
0	55	5	1	17	9	13	nyom.	nyom.
6	53	5	1	13	9	15	2	1
24	53	4	1	10	8	17	4	2
48	53	5	1	7	9	17	6	3
72	52	4	1	7	10	17	5	3

nyom.: nyomokbam (<0.5%)



A kísérlet eredménye azt mutatja, hogy a fénynek nincsen hatása a 16:0 a 16:1, a 18:0 és a 18:2 zsírsavak mennyiségére. Viszont szembetűnő változás volt az egyszeresen telítetlen zsírsav, a 18:1, és a többszörösen telítetlen, a γ 18:3 a α 18:3 és a 18:4 zsírsavak mennyiségében. A 18:1 mennyisége már 6 óra múlva csökkenést mutatott, 17 %-ról 13 %-ra, míg a γ 18:3 zsírsav 13%-ról 14 %-ra emelkedett. A másik két említett zsírsav a α 18:3 és a 18:4 mennyisége az eddig nyomokban lévő mennyiségből a mérhető tartományba került. A ilyenirányú változás az idő előrehaladtával megmaradt, egyre kifejezettebbé vált. Ezeknek a többszörösen telítetlen zsírsavaknak a mennyisége folyamatosan nőtt, majd 48 órás inkubációs idő után a változások elérték a maximumukat, és további változást már nem tapasztaltunk. Alapvetően két tendenciát figyelhetünk meg: a 18:1 mennyisége csökkent (17%-ról 7%-ra), míg a többszörösen telített zsírsavak mennyisége nőtt.

Kíváncsiak voltunk, hogy a fényintenzitás milyen hatással van a telítetlen zsírsavak felhalmozódására *Synechocystis* PCC 6803 sejtekben ezért a sötétben növő sejteket különböző fényintenzitásokkal világítottuk meg. Az általunk választott fényintenzitások a következők voltak:

- i, normál fényintenzitás ($70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$),
- ii, közepesen erős fényintenzitás ($500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$),
- iii, erős fényintenzitás ($2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$).

Azt tapasztaltuk, hogy a telítetlen zsírsavak felhalmozódása független a megvilágítási fény intenzitásától.

VI. A deszaturáz enzimeket meghatározó mRNS-szint változása

Miután meghatároztuk a fényen és sötétben nőtt sejtek zsírsavösszetételét, és megállapítottuk, hogy a fénynek szerepe van a telítetlen zsírsavak felhalmozódásában, arra szerettünk volna választ keresni, hogy milyen szinten történik a szabályozás.

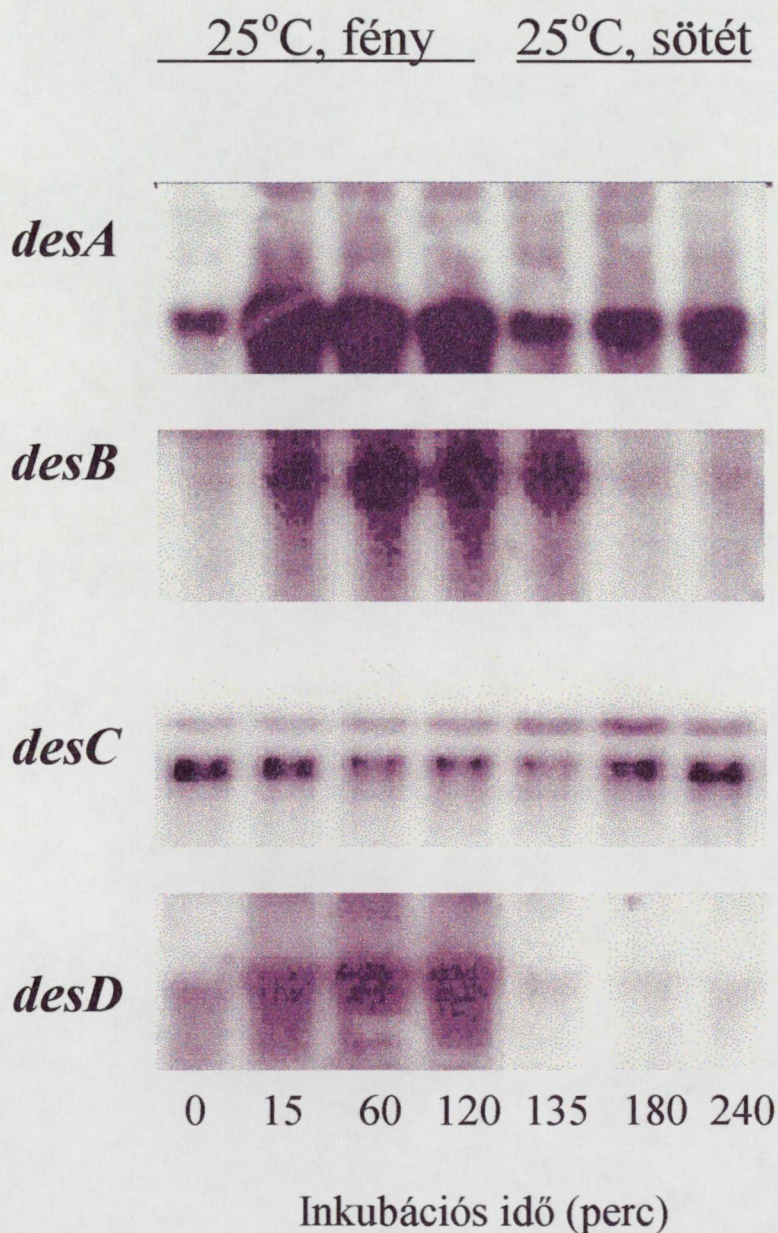
Meghatároztuk a sötétben, 25°C-on növekvő sejtek négy lipid-deszaturáz enzim génjének (*desA*, *desB*, *desC* és *desD*,) az alapállapotú mRNS szintjét, majd a sejteket fényre téve a megváltozott mRNS-szintet. A kultúrákból meghatározott időken vettünk mintákat, melyekből totál RNS-t izoláltunk, majd Northern-blot analízissel határoztuk meg az egyes gének mRNS szintjét. Az eredményeket a 12/a. ábrán foglaltam össze.

Specifikus próbákat használtunk a *desA*, *desB* és a *desD* gének azonosítására és ennek megfelelően egyedüli sávok voltak láthatók a géleken. A *desA* gén transzkriptuma 1.2 kB-nál, a *desB* transzkriptuma 1.4 kB-nál, a *desD* transzkriptuma 1.4 kB-nál volt. A *desC* gén transzkriptuma kettős sávként jelent meg a 1.1 és 1.7 kB-nál. A primer géntermék valószínűleg egy utóérési folyamatban hasítódik.

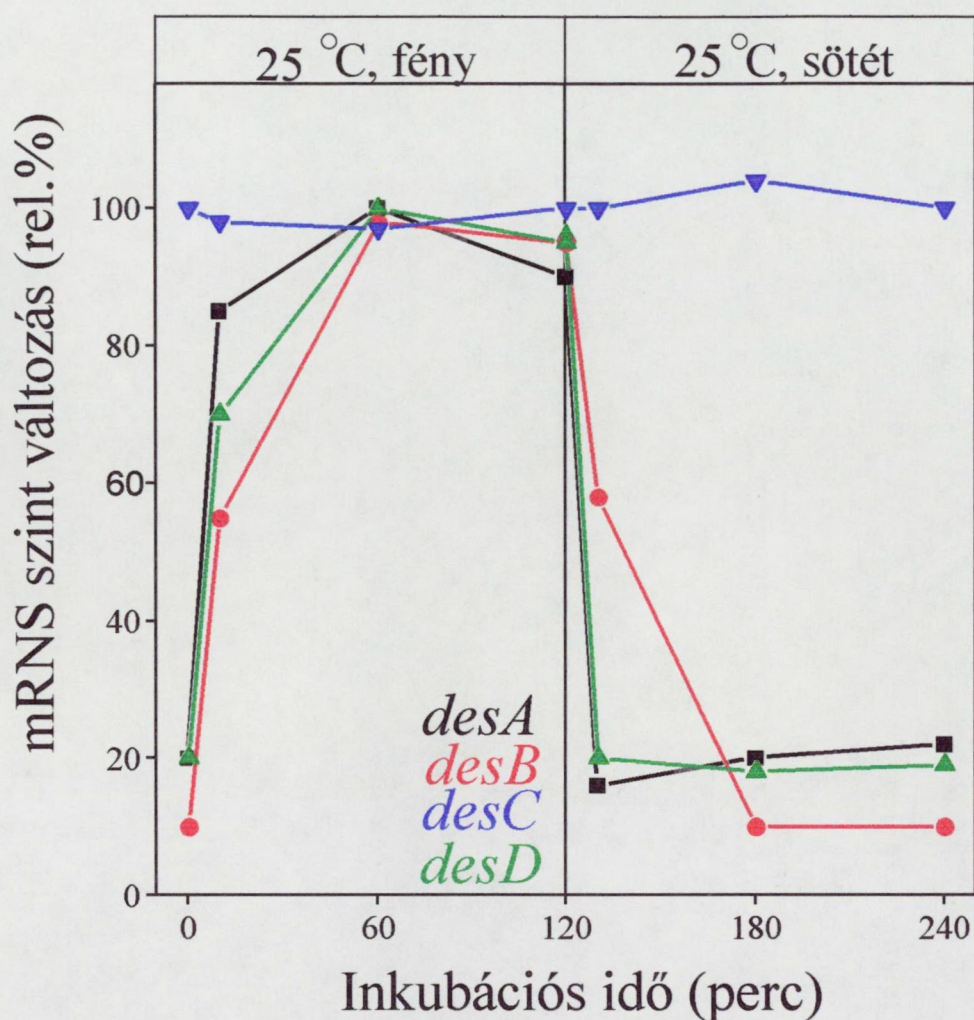
Mint azt a 12/b. ábra mutatja, a *desC* gén konstitutívan fejeződik ki, az általa kódolt mRNS szint mindig közel azonos szinten van függetlenül az alkalmazott nevelési körülménytől. Nem változott sem sötétben, sem világosban.

A másik három gén mRNS szintje nagyon gyorsan emelkedett, ha a sötétben nevelt sejteket fényre helyeztük. Mind három gén mRNS szintjében már 10 perc után jelentős növekedés volt tapasztalható, a *desB* gén által kódolt mRNS szintje 10%-ról 55%-ra, a *desD* gén által kódolt 20%-ról 70%-ra, míg a *desA* gén kódolta 20%-ról 90%-ra emelkedett. Egy óra elteltével az mRNS szintek elérték a 100%-ot, és nem változtak 120 percig. A sötétben nevelt sejtek 120 perces megvilágítása után a sejteket visszahelyeztük a sötétbe. Az érintett három gén transzkriptuma 15 perc múlva már

látványosan csökkent. A *desA* és a *desD* által kódolt mRNS szintje gyorsabban csökkent (100%-ról 20%-ra), mint a *desB* mRNS szintje, mely 100%-ról 60%-ra csökkent. Egy óra elteltével a három gén által kódolt mRNS szint 20% volt és nem változott tovább (12/b. ábra).



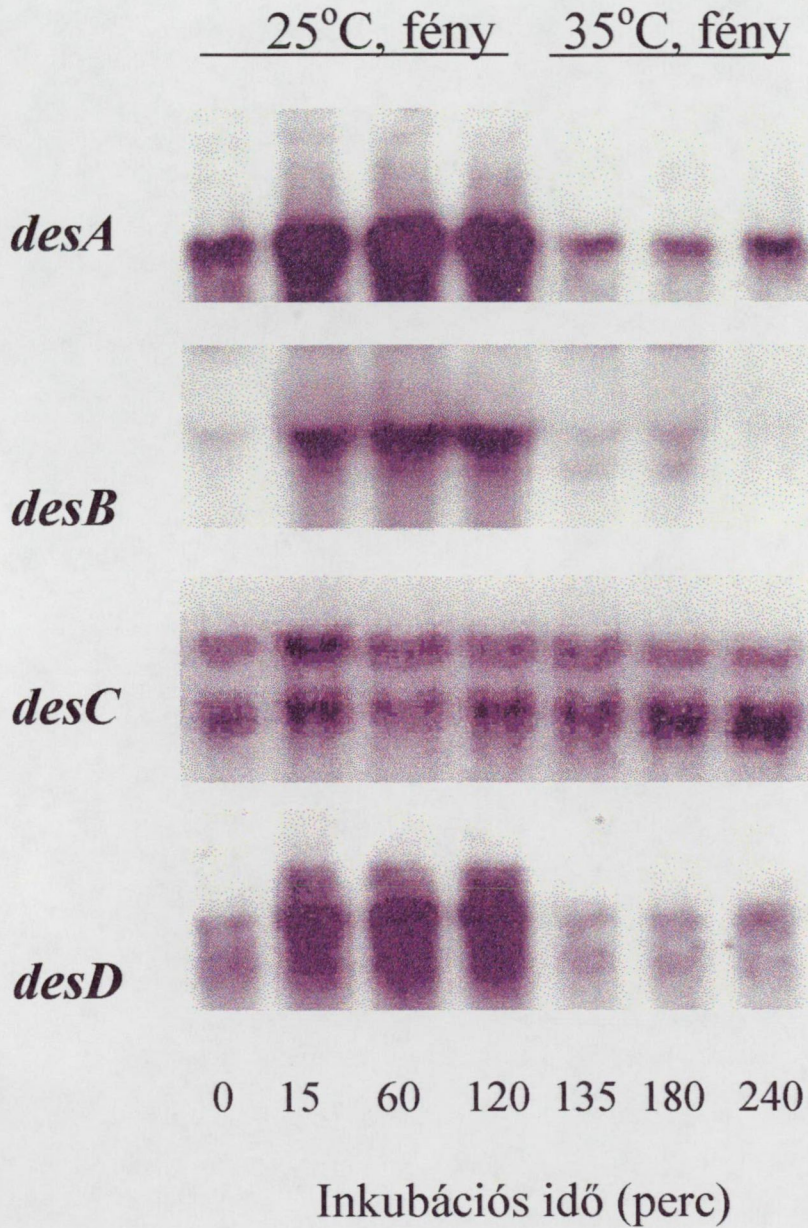
12/a. ábra A heterotróf módon, 25°C-on nőtt *Synechocystis* PCC 6803 törzs acil-lipid deszaturáz géneinek expressziós szintje 25°C-on, fényen (1-4.oszlop) majd visszahelyezve sötétbe, 25 °C-on (5-7.oszlop). Minden sáv 10 µg totál RNS-t tartalmaz.



12/b. ábra A *Synechocystis* PCC 6803 törzs acil-lipid desaturáz génjei által meghatározott mRNS szintek változása, 25°C-on fényen és sötétben. A sejtek heterotróf módon nőttek 25°C-on, sötétben, majd 120 percig fényre tettük őket. A 120 perces inkubáció után a sejteket visszahelyeztük a sötétbe.

A következő kísérletekben összehasonlítottuk, hogy milyen különbségek adódnak a mRNS mennyiségében a különböző kezelések hatására. A sejteket sötétből fényre,

vagy eltérő hőmérsékletre helyeztük, mint azt már korábban leírták (Sakamoto és mtsai, 1993, Wada és mtsai, 1993). Az eredményeket a 13/a. ábra mutatja

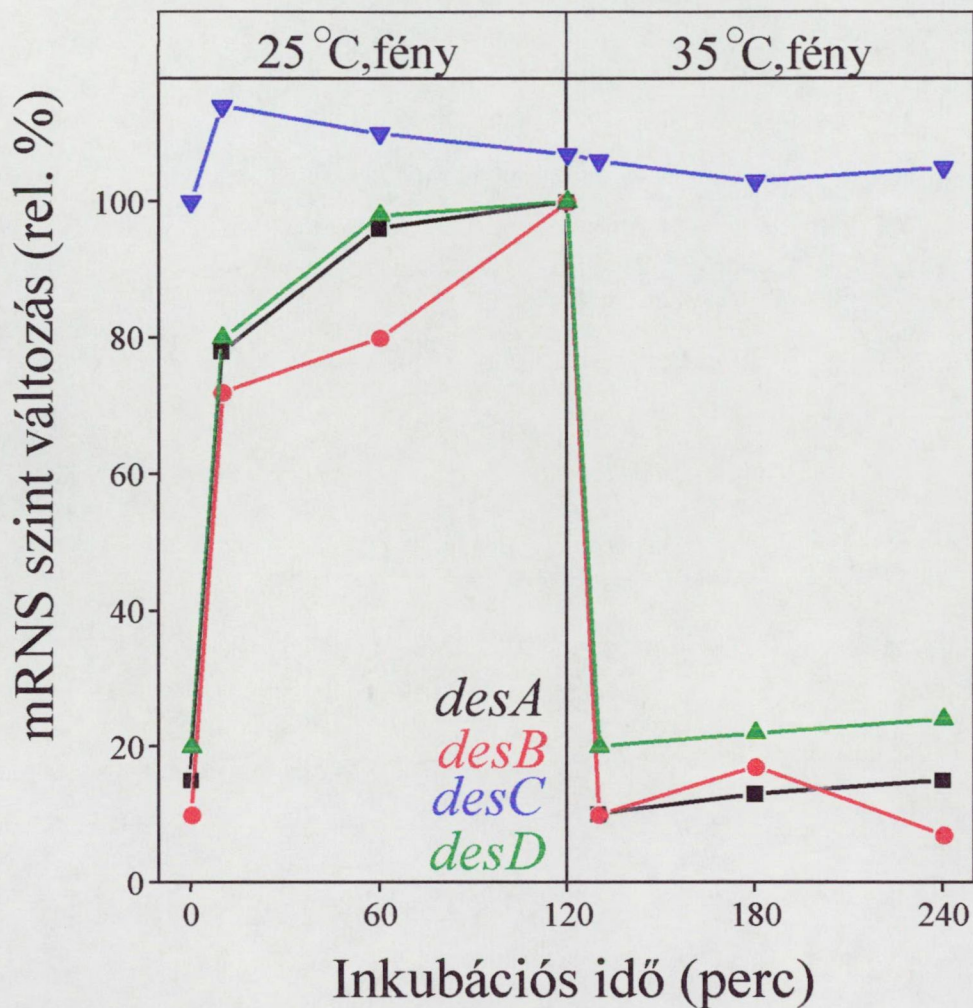


13/a. ábra Az autotróf módon, 35°C-on nőtt *Synechocystis* PCC 6803 törzs acil-lipid deszaturáz génjeinek expressziós szintje 25°C-ra helyezve fényen (1-4. oszlop) majd 120 peres inkubáció után 35°C-on, fényen (5-7. oszlop). Minden sáv 10 µg totál RNS-t tartalmaz.

Az autotróf, 35°C-on módon nőtt sejteket 120 percre 25°C-ra helyeztük, mialatt meghatározott időközökben mintákat vettünk, totál RNS-est izoláltunk, amit Northern-blot technikával analizáltunk. 120 perc után a sejteket visszahelyeztük az eredeti nevelési hőmérsékletükre.

Mint azt a 13/a. ábra mutatja a négy lipid deszaturáz gén transzkriptumának szintje és mintázata ahhoz az ábrához hasonlít, amelyben a sötétben nevelt sejteket fényre, majd sötétbe helyeztük vissza. A *desC* gén expressziója ebben az esetben is konstitutív volt. A másik három gén által kódolt mRNS szint nagyon gyorsan emelkedett, ha a sejteket 35°C-ról 25°C-ra helyeztük. 10 perc után a *desD* gén által kódolt mRNS szintje 20%-ról 80%-ra, a *desA* által kódolté 15%-ról 75%-ra, míg a *desB* gén transzkriptuma 10%-ról 72%-ra változott. Egy óra elteltével a *desD* és *desA* gének által kódolt mRNS szint 100%-ra, a *desB* gén transzkriptuma 80%-ra emelkedett, a 100%-ot 2 óra után érte el. Visszahelyezve a sejteket eredeti növekedési hőmérsékletükre a *desC* által kódolt mRNS szint kivételével a másik három gén által kódolt transzkriptumok mennyiségében jelentős csökkenés volt, 10 perc után 10-20%-ra estek vissza (13/b. ábra).

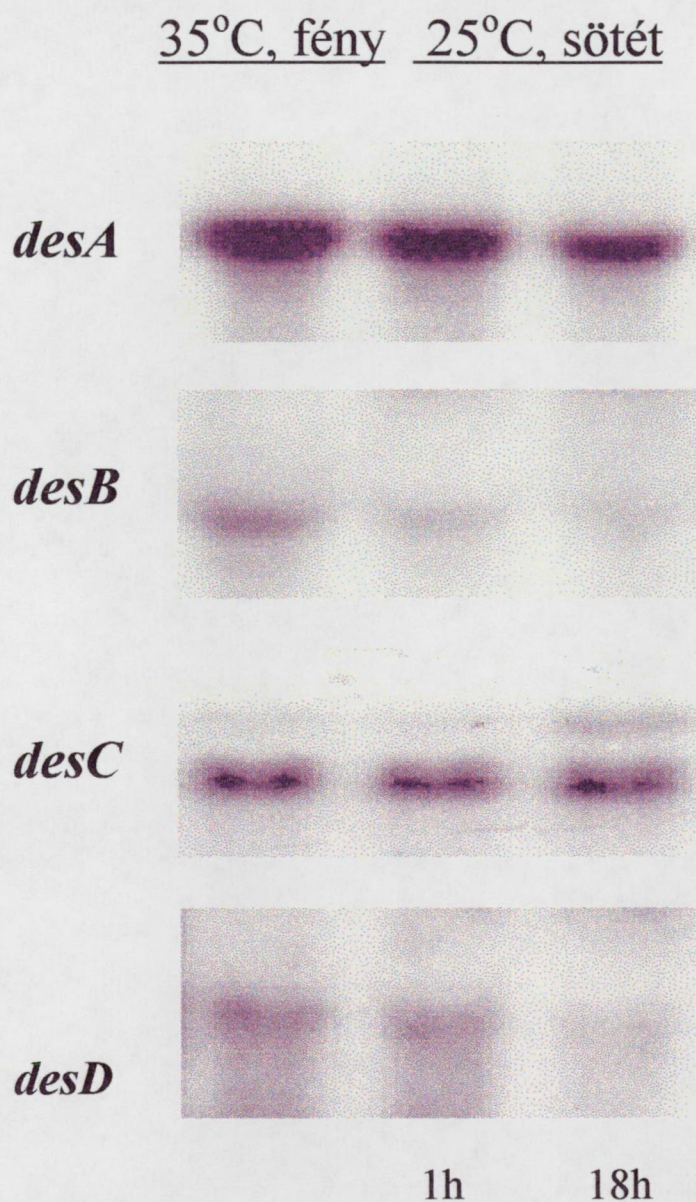
A kísérletekből azt a következtetést vontuk le, hogy a lipid-deszaturáz gének által kódolt transzkriptumokban hasonló tendenciájú változások történnek, ha heterotróf módon, 25°C-on nőtt sejteket fényre helyezzük, vagy az autotróf módon 35°C-on nőtt sejteket 25°C-ra helyeztük, azaz a *desC* gén által kódolt mRNS szint változatlan marad, míg a másik három transzkriptum szintje 10 perces kezelés után már jelentősen megnő. Ha a kezelt kultúrákat visszahelyeztük eredeti nevelési körülmények közé, a transzkriptumok szintjének csökkenését tapasztaltuk. Ez alól csak a *desC* gén által kódolt mRNS szint volt kivétel.



13/b. ábra A *Synechocystis* PCC 6803 törzs acil-lipid deszaturáz génjei által meghatározott mRNS szintek változása 25°C-on és 35°C-on fényen. A sejtek autotróf módon nőttek 35°C-on, fényen, majd 120 percig 25°C-ra tettük őket. A 120 perces inkubáció után a sejteket visszahelyeztük 35°C-ra.

Ha a sejteket 5 mM glükóz jelenlétében fényen 35°C-on neveltük, majd a sejteket 25°C-ra helyeztük és sötétben tartottuk a Northern-blot analízis szerint a lipid-deszaturáz

enzimeket kódoló gének indukciójában nem történt változás. Az alacsony hőmérsékleten, fényen bekövetkező deszaturáz génindukció sötétben gátolt volt (14. ábra).

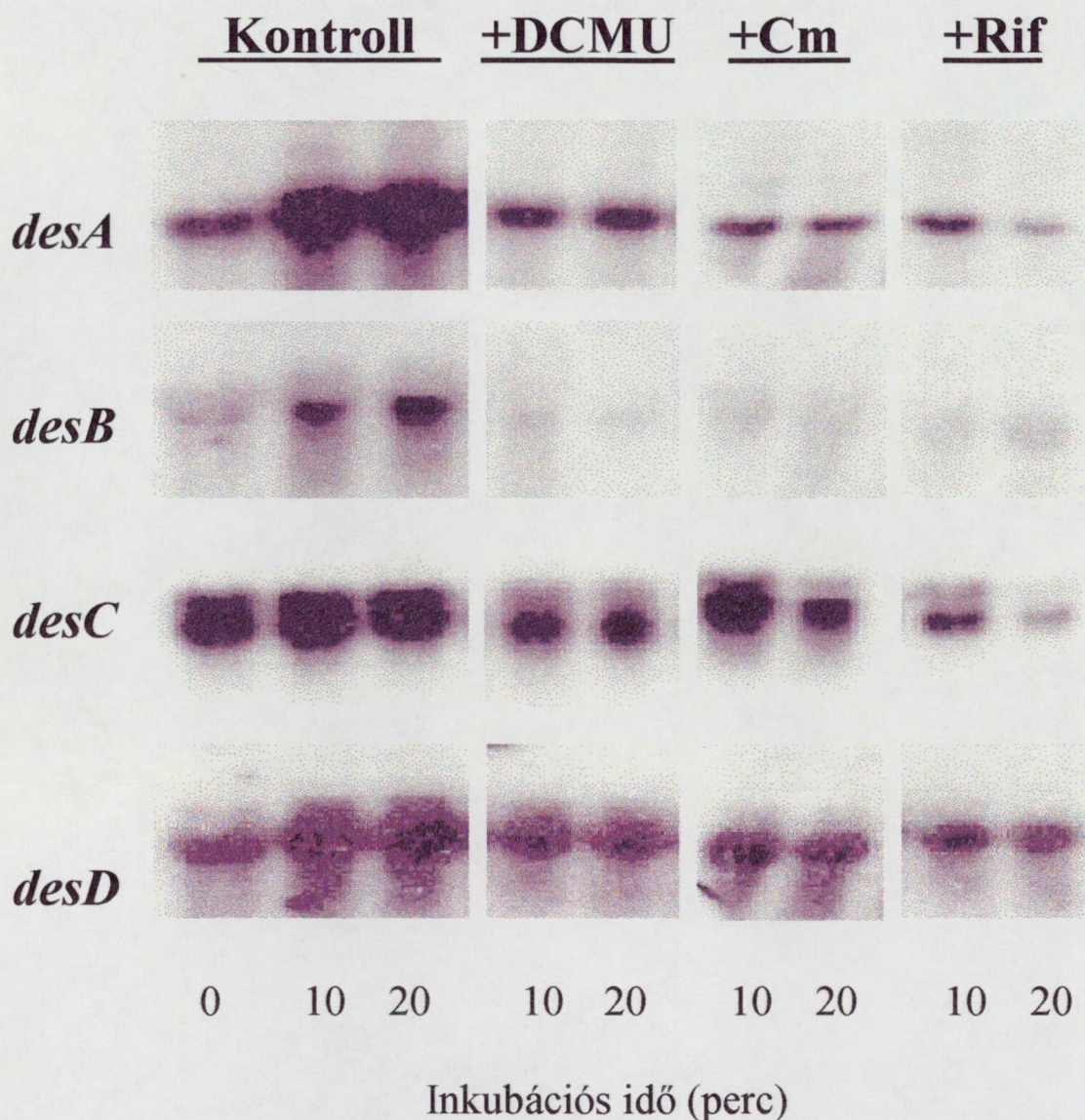


14. ábra *Synechocystis* PCC 6803 sejtek acil-lipid deszaturáz génjei által kódolt mRNS szintváltozások. A sejtek 35°C-on, fényen, 5 mM glükóz jelenlétében (fotoheterotróf módon) nőttek(1. oszlop) majd 25°C-ra és sötétbe helyeztük(2-3. oszlop). Minden sáv 10 µg totál RNS-t tartalmaz.

VII. A jelátviteli mechanizmus tanulmányozása

A deszaturáz gének expressziójának lehetséges jelátviteli útjának tanulmányozására két párhuzamos kísérletet végeztünk el. Először arra kerestünk választ, hogy a fény aktiválta gének (*desA*, *desB* és *desD*) transzkriptumai milyen kapcsolatban állnak a fotoszintetikus elektrontranszport lánc tagjainak redox állapotával, ezért a sötétben nőtt sejteket DCMU-val előinkubáltuk. Az eredményeket a 15. ábra mutatja.

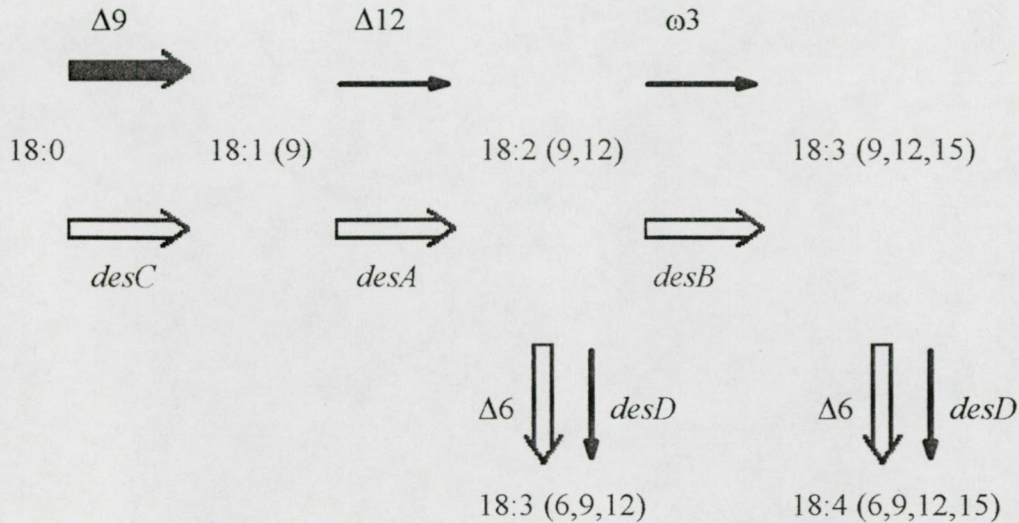
Ha a sötétben nevelt sejteket DCMU-val előinkubáltuk majd megvilágítottuk, a *desA* *desB* és *desD* gének transzkriptumainak felhalmozódása gátolt volt. A kísérlet második részében arra voltunk kíváncsiak, hogy ezeknek a transzkriptumoknak a felhalmozódása függ-e a *de novo* szintézistől. Baktériumoknál használt transzkripciót gátló inhibítort, a rifampicint, és a fehérje transzlációgátló kloramfenikolt használtuk, mert lehetséges, hogy a génexpresszió regulálásában fehérje faktor(ok) is szerepet játszanak. Az 15. ábra mutatja, hogy nemcsak az elektrontranszport gátló DCMU, hanem ez a másik két inhibitor is gátolja a fényindukálható deszaturáz gének expresszióját.



15. ábra A DCMU (fotoszintézis gátló, 4-5 oszlop) a kloramfenikol (traszláció gátló, 6-7. oszlop) és a rifampicin (transzkripció gátló, 8-9. oszlop) hatása a lipid-deszaturáz gének expressziójára *Synechocystis* PCC 6803 sejtek esetében. A sejtek heterotróf módon 25°C-on nőttek majd fényre helyeztük a kultúrákat. A DCMU-val kezelt mintát 1 percig sötétben előinkubáltuk, minden sáv 5 µg totál RNS-t tartalmazott. Az alkalmazott inhibitor koncentrációk a következők voltak: Rif: 200 µg/ml, Cm: 40 µg/ml, DCMU: 10 µg/ml,

A cianobaktériumok membránjainak zsírsavösszetételben bekövetkező változásokat eddig egyedül a különböző nevelési hőmérséklettel magyarázták. Arra a kérdésre, hogy a külső környezetben bekövetkező hőmérsékletváltozás milyen jelátviteli mechanizmussal történik, napjaink egyre inkább kutatott területe. Vígh és mtsai (1993) egy specifikus alacsony hőmérsékleti receptort tétéleztek fel a citoplazmás membránban, amely részt vesz a jelátviteli folyamatban, de a hőmérsékleti jel észlelése és az ezáltal bekövetkező biokémiai reakciók többnyire még ismeretlenek. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy az alacsony hőmérsékleti stresszhez való alkalmazkodás során nem egy specializált hőmérsékleti szenzor játszik szerepet, hanem sokkal inkább a sejtek energetikai és metabolikus állapota határozza meg az alkalmazkodás eredményességét. Kísérleti eredményeink továbbá azt is bizonyítják, hogy minden olyan hatás, amely befolyásolja a fotoszintetikus aktivitást, hatással van az alkalmazkodás folyamatára. Ez a hipotézis jól összeegyeztethető a következő korábbi megfigyelésekkel: a biokémiai reakciók és a fotoszintetikus aktivitás, amely az energiát szolgáltatja, nagymértékben csökkennek alacsony hőmérsékleten és jelentős hőmérsékleti függést mutatnak nemcsak a cianobaktériumok esetében, hanem más fotoszintetikus szervezeteknél is (Gombos és mtsai, 1991). Ezt a megváltozott aktivitást a tilakoid membránjaik glicerolipidjeinek telítetlenségében bekövetkező változással kompenzálják (Sato és Murata, 1980). A sötétben nevelt sejtek esetében, ahol nem működik a fotoszintézis, az adaptációs folyamat gátolt a fotoszintetikus membrán szintjén és a zsírsavdeszaturáció csökkent mértékben valósul meg. A zsírsavanalízisek során kapott adatok azt bizonyítják, hogy a fotoszintézis folyamata játszik elsődleges szerepet a zsírsavdeszaturáció folyamatában, valószínűleg a fotoszintézis-függő faktorokon keresztül. Ez a megfigyelés nem egyezik az un. homeoviszkozus adaptáció elméletével (Cossins, 1994).

Eredményeink alapján és a korábban leírtak szerint az acil-lipid deszaturáz gének expressziójának lehetséges sémáját a 16. ábra mutatja.



16. ábra Lipid deszaturáz gének expressziójának lehetséges sémája a *Synechocystis* PCC 6803 törzsben. Üres nyilak a gének expresszióját fényen, 25°C-on, a sötét nyilak sötétben, 25°C-on mutatják. A nyilak vastagsága az egyes gének aktivitását mutatják.

Ezeknek az acil-lipid deszaturáz géneknek az expressziós mintázata, beleértve a transzkriptumok felhalmozódásának sebességét, mennyiségét és csökkenését, a helyreállási folyamat során közel azonos azzal, mint amit akkor figyeltek meg, amikor a sejteket alacsony hőmérsékletre helyezték (Wada és Murata, 1990, Sakamoto és Bryant, 1997, Los és mtsai, 1997). A deszaturáz gének által kódolt mRNS-felhalmozódás mindig gyorsabban történik, mint a glicerolipid $\omega 3$ helyzetében bekövetkező deszaturáció. Ez azzal magyarázható, hogy rövid lehűlés esetén nem szükséges a membránstruktúra teljes átszervezése, viszont hosszú távon elengedhetetlen. Ez az újonnan létrehozott membránszerkezet adja a hátteret a megváltozott körülmények között végbemenő fotoszintézishez. Az így kapott eredményeket a következőekben foglalhatom össze:

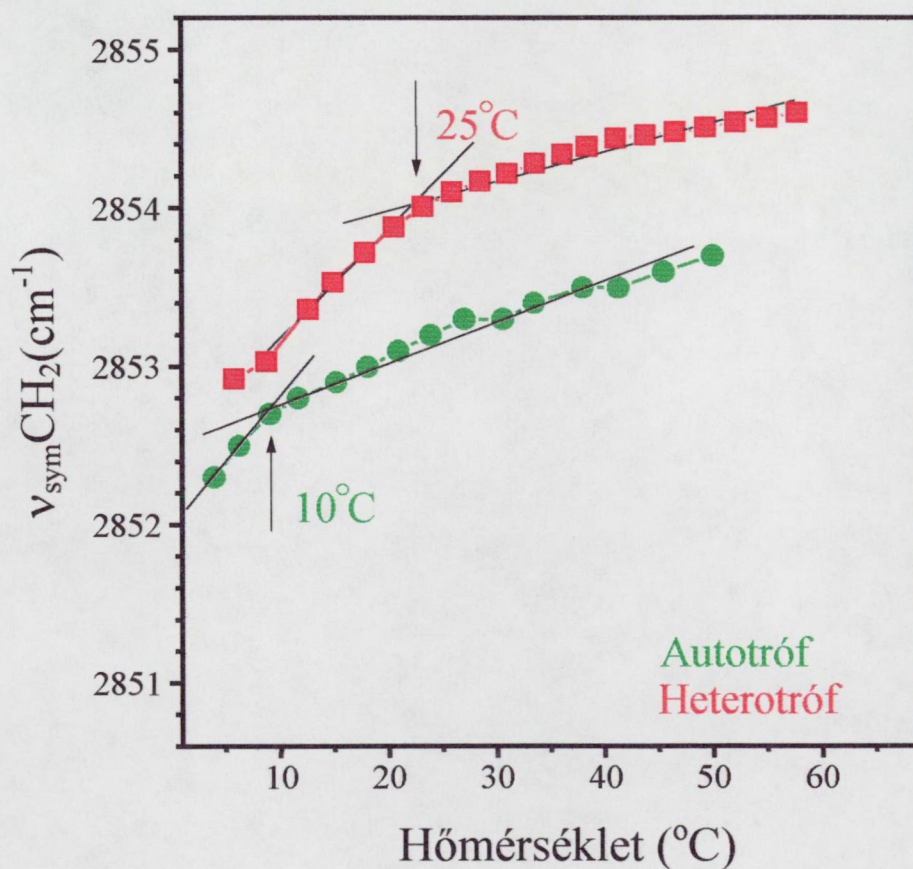
Bizonyított, hogy a fényindukált lipid deszaturáz gének működése során

- 1, *de novo* fehérjeszintézis szükséges
- 2, a reguláció valószínűleg a transzkripció szintjén történik
- 3, a jelátviteli mechanizmus a fotoszintézis kontrollja alatt áll
- 4, a fényindukált zsírsavdeszaturáció nem függ a fényintenzitás erősségétől (mint azt *Synechococcus* PCC 7002 esetében Sakamoto és Bryant 1997-ben leírta).

Azt, hogy a hőmérsékleti jel és a fényjel milyen kapcsolatban áll egyenlőre ismeretlen. Nem ismert, hogy a zsírsav deszaturáció függ-e a fény minőségétől. Továbbá arra kérdésre sincs még kielégítő válasz, hogy a fényjel milyen mechanizmussal kapcsolódik a deszaturáció folyamatához. Azt kideríteni, hogy milyen faktorok (pl. kinázok és így a foszforiláció vagy aciláció) játszanak szerepet a jelátviteli folyamatban, a későbbi terveinkben szerepelnek.

VIII. Az FTIR spektrumok C-H régiójának analízise

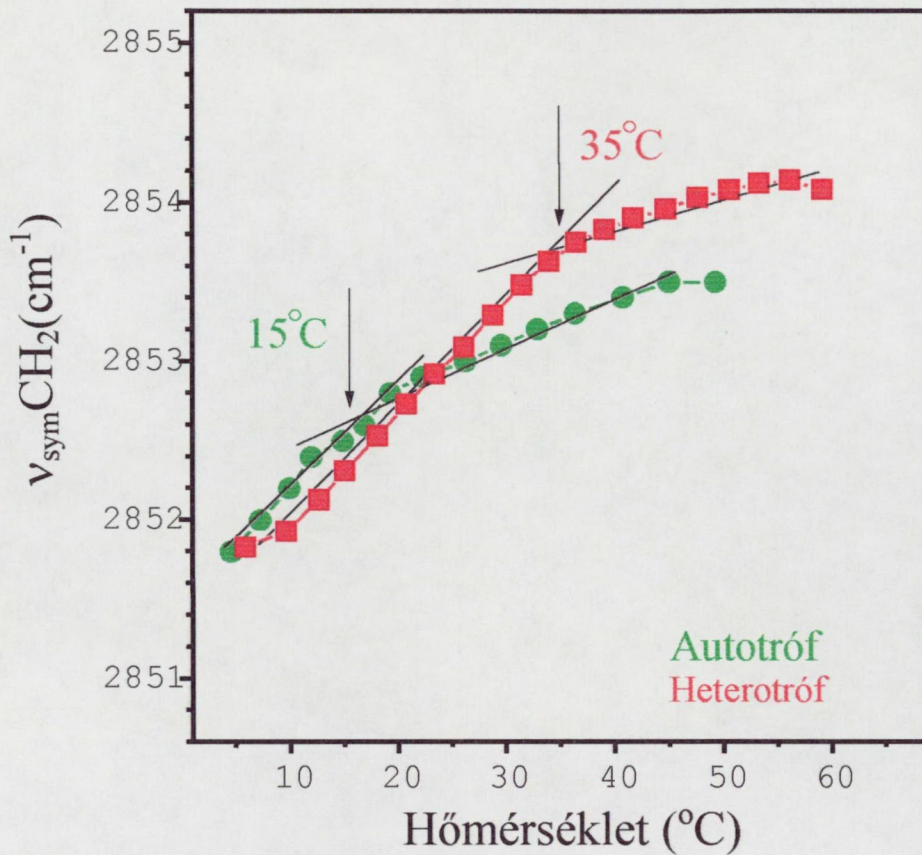
A nyújtott C-H régióval, (különösen a 2851 cm^{-1} sáv körülivel, amit CH_2 -nek neveznek) a biológiai membránok lipidjeinek zsírsav láncában bekövetkező változásokat lehet elsődlegesen karakterizálni. Meghatároztuk a $\nu_{\text{sym}} \text{CH}_2$ rezgések energiájának hőmérsékletfüggő változását 25°C -on és 35°C -on fényen és sötétben nőtt tilakoid membránok esetében.



16. ábra 25°C -on, fényen és sötétben nevelt *Synechocystis* PCC 6803 sejtekből izolált tilakoid membránok $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ rezgések energiájának hőmérsékletfüggő változása.

A 25°C-on nőtt sejtekből izolált membránokat vizsgálva CH₂ rezgések alapján azt kaptuk, hogy a fényen nőtt sejtekből izolált tilakoid membránoknak 10°C fok körül van fázistranzíciós pontja. A fázistranzíció pontja, az a pont amely alatt a sejtek membránjai gél fázisban vannak. Ebben az állapotban a membránt alkotó lipidek zsírsavláncai döntő többségben *all-trans* állapotban vannak, míg a töréspont fölött a *gauche* konformerek aránya dominál, ami a folyadék-mozaik kristályos állapotra jellemző. A sötétben nevelt sejtekből izolált tilakoid membránok ettől eltérő görbét mutatnak, a fázisátalakulásra jellemző töréspont 25°C körül van, ami megegyezik a nevelési hőmérséklettel. Ez a fáziseltolódás azt jelenti, hogy sötétben a sejtek membránjai magasabb hőmérsékleten érik el a folyadék-mozaik kristályos szerkezetet. Ezzel összhangban fiziológiás méréseink szerint 25°C alatt sötétben nem nőttek a sejtek. A mérési adatok alapján a görbe másik karakterisztikus vonása, hogy maga a görbe magasabb hullámszámok felé tolódott el.

35°C-on nőtt sejtek esetében az előzőekhez hasonló görbéket figyelhetünk meg. Ha a sejtek fényen nőnek, akkor a belőlük izolált tilakoid membránok fázistranzíciós pontja 14-16°C körül adódik. Mindez a sötétben nevelt sejteknél 33-35°C körül van, azaz a töréspont még magasabb hőmérséklet felé tolódott el, mint a 25°C-os sejtek esetében. További tulajdonsága ennek a görbének, hogy az általunk mért hőmérsékleti tartományban a görbe a teljes fázistranzíciós görbét mutatja, míg a 25°C-on nőtt sejtek esetében az *all-trans* állapot teljessé válása nem figyelhető meg. A görbe szigmoid alakú, alacsony hőmérsékleten a gélfázisra jellemző lefutást mutatja, majd láthatjuk az átmenetre jellemző töréspontot. A görbe magasabb, 35°C fölötti tartománya a folyadék-mozaik kristályos állapotot mutatja. Itt is megfigyelhetjük, hogy a görbe magasabb hullámszám felé tolódik el, ha, a sejteket sötétben neveljük. Az eredményeket a 18. ábra mutatja.



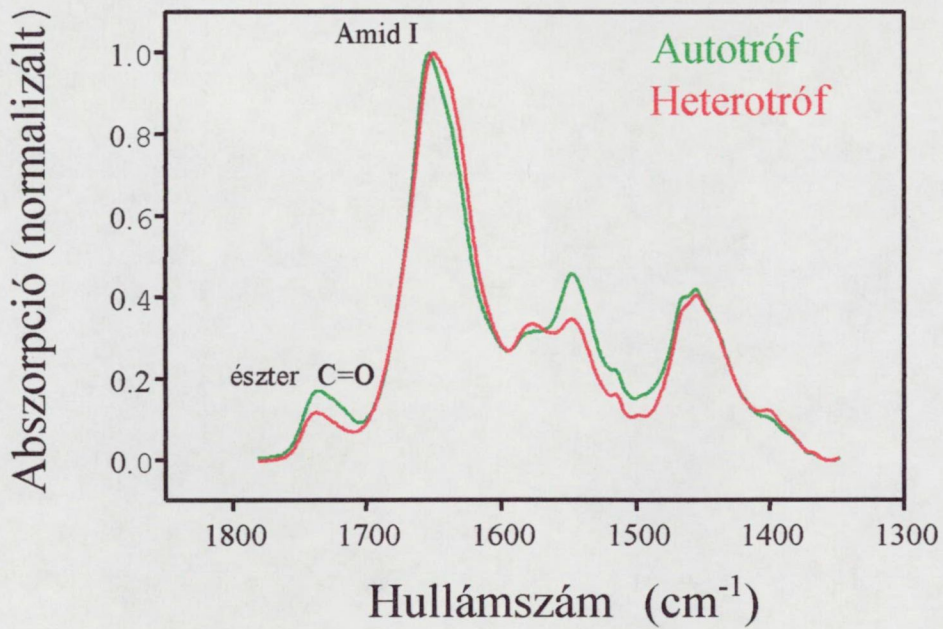
18. ábra 35°C-on, fényen és sötétben nevelt *Synechocystis* PCC 6803 sejtekből izolált tilakoid membránok $\nu_{\text{sym}} \text{CH}_2$ rezgések energiájának hőmérsékletfüggő változása

Arra a kérdésre, hogy a sötétben nevelt sejtekből izolált tilakoid membránok hőmérsékletfüggő görbéit összehasonlítva az ugyanazon a hőmérsékleten, fényen nevelt tilakoid-membránok hőmérsékletfüggő görbéivel miért tolódnak el magasabb hőmérsékletek felé, ezen membránok lipidanálízise illetve a membránok fehérje-lipid arányának meghatározása ad választ. A lipidanálízis szerint a sötétben nevelt sejtek tilakoid-membránjában felhalmozódnak az egy kettős kötést tartalmazó lipidek a világosban nevelt sejtekhez képest. Ezek a lipidfajták, mint intermedierek szerepelnek a

fényen nőtt sejteknél és ezekből keletkezik a többi lipidmolekula. Ezzel párhuzamosan a többszörösen telített lipidek aránya lecsökken a sötétben nevelt sejtek tilakoid-membránjaiban. 25°C-on a 18:4 és a α 18:3 tartalmú lipidek eltűnnek a membránokból. 35°C-on fényen nem szintetizálódnak a 18:4 és a α 18:3 tartalmú lipidek, csökkenés a 18:2 és γ 18:3 zsírsavak mennyiségében tapasztalható. Ezek a lipid telítetlenségben bekövetkező változások magyarázhatják azt, hogy a sötétben nevelt sejtek tilakoid membránjai csak magasabb hőmérsékleten érik el azt a rendezetlenségi állapotot, a folyadék-kristályos szerkezetet, ahol a membránok a funkcióikat maradéktalanul ellátják.

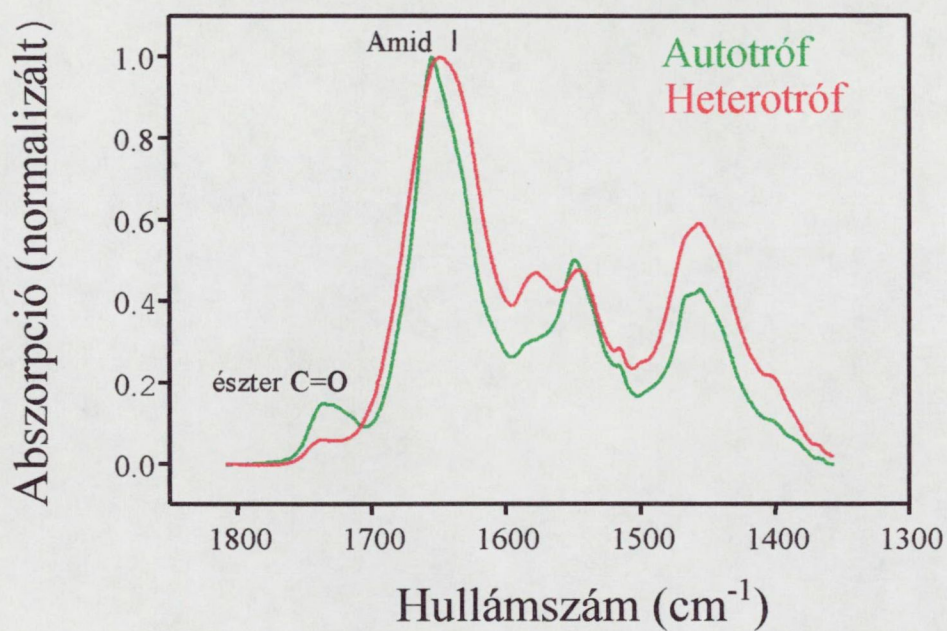
A magasabb hullámszám felé való eltolódást a megváltozott fehérje-lipid aránnyal magyarázzuk. Az infravörös spektrumban 1740 hullámszámnál található a lipidek észterkötéseiből adódó észter C=O csúcs, míg 1656 hullámszámnál van az Amid I sáv, amely a fehérjék α -helikális szerkezetéből adódik. A 25°C-on sötétben nőtt sejteknél megnő a fehérje-lipid arány amit a 19. ábrán látható görbe magasabb hullámszám felé való eltolódása mutat (19. ábra).

Mindkét hőmérsékleten, ha a sejtek sötétben nőnek, az Amid I sáv kiszélesedése is megfigyelhető, ami az α -helikális fehérjék mellett megjelenő egyéb fehérje konformációkból származik. Arra a kérdésre, hogy milyen szerkezettel rendelkeznek ezek a fehérjék egyenlőre még nem tudunk választ adni, ehhez további kísérletek elvégzése szükséges, melyek a közeli jövő tervei között szerepelnek.



19. ábra A 25°C-on fényen és sötétben nevelt sejtekből izolált tilakoid membránok infravörös spektrumai. 1740 hullámszámnál található a lipidek észterkötéseiből adódó észter C=O csúcs, míg 1656 hullámszámnál van a fehérjékre jellemző Amid I sáv.

A 35°C-on sötétben nőtt sejteknél ugyanilyen változást tapasztaltunk, mint azt a 20. ábra mutatja.



20.ábra A 35°C-on fényen és sötétben nevelt sejtekből izolált tilakoid membránok infravörös spektrumai. 1740 hullámszámnál található a lipidek észterkötéseiből adódó észter C=O csúcs, míg 1656 hullámszámnál van a fehérjékre jellemző Amid I sáv.

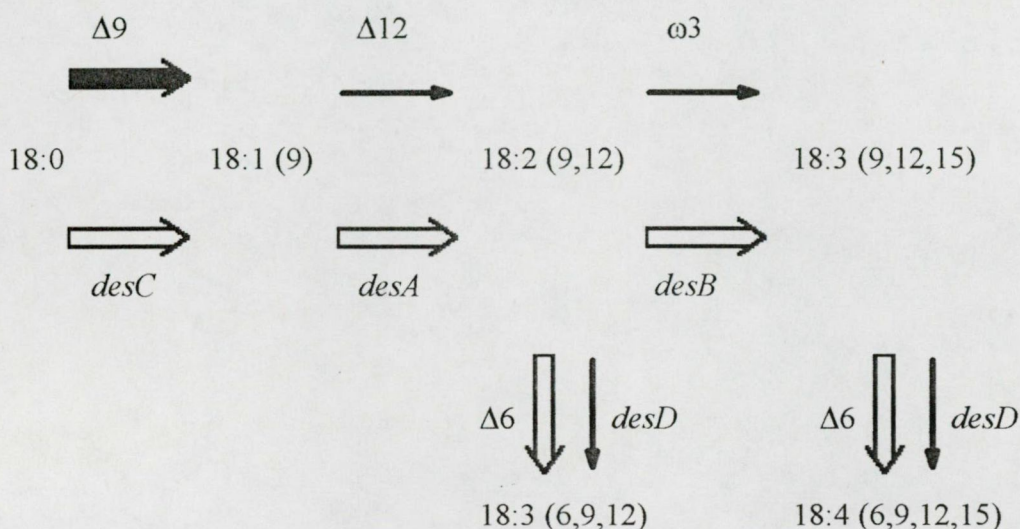
Összefoglalás

Eredményeimet a következőekben foglalhatom össze:

1. A fényen és különböző hőmérsékleteken nőtt sejtek fiziológias állapotára jellemző fotoszintetikus aktivitás hőmérsékletfüggő maximuma jelentősen eltért, a 25°C-on nőtt sejtek esetében a maximum 31°C volt, míg a 35°C-on nőtt sejtek esetében 40°C. A sötétben nevelt sejtek esetében csak jelentéktelen eltérést kaptunk, ugyanezekben a hőmérsékleteken a maximumok 39°C és 41°C voltak. A sejtek fényen adaptálódtak a különböző hőmérsékletekhez, viszont sötétben nem tudtak adaptálódni az alacsony hőmérsékletre.
2. Izoterm hőmérsékleten nem tapasztaltunk jelentős eltérést a növekedési sebességekben, ha a sejtek fényen vagy sötétben nőttek 5 mM glükóz jelenlétében. 35°C-on a sejtek gyorsabban nőttek, mint 25°C-on. A hőmérséklet befolyásolta az osztódás sebességét, míg a fény nem befolyásolta.
3. A sötétben nevelt sejtek pigmentösszetételét összehasonlítva a fényen nőtt sejtek pigment-tartalmával az jelentősen megváltozott. Csökkent a sötétben nevelt sejtek klorofill tartalma.
4. A *Synechocystis* PCC 6803 fotoszintetikus prokarióta cianobaktériumban lévő acil-deszaturáz enzimeket kódoló gének (*desC*, *desA*, *desD* és *desB*) alacsony hőmérsékleten és fényen kifejeződnek, míg sötétben, izoterm körülmények között csak a *desC* gén expressziója teljes. A másik három gén kifejeződése részben (*desA*



és *desD*) vagy teljesen (*desB*) gátolt. A *desC* gén expresszióján kívül a másik három gén fényregulált, ami a különböző hőmérsékletekhez való adaptációs folyamatokban játszik szerepet. A *Synechocystis* PCC 6803 törzs deszaturáz géneinek lehetséges expressziós sémáját 25°C-on fényen és sötétben a következő ábra mutatja.



Lipid-deszaturáz gének expressziójának lehetséges sémája a *Synechocystis* PCC 6803 törzsben. Üres nyilak a gének expresszióját fényen, 25°C-on, a sötét nyilak sötétben, 25°C-on mutatják. A nyilak vastagsága az egyes gének aktivitását mutatják.

- A génexpressziós vizsgálatokkal bizonyítottuk, hogy a lipid-deszaturáció folyamata szoros kapcsolatban van a fotoszintetikus elektrontranszport lánc aktivitásával, a deszaturáció a fotoszintézis kontrollja alatt áll. A fotoszintézis tehát nemcsak energiát szolgáltat a sejt számára, hanem a membránszerkezet kialakításában regulációs szerepet is betölt.
- A megváltozott génexpresszió következménye, hogy a sötétben nevelt sejtek membránjainak eltérő lipidtartalma van, kevesebb bennük a telítetlen lipidek

menyisége a fényen növesztett sejtekhez képest és ez rigidebbé teszi a membránt, ami 25°C alatt a sejtek halálához vezet.

7. A megváltozott lipidösszetétel miatt sötétben megváltozik a membránok szerkezete, amit transzmissziós elektronmikroszkópiával bizonyítottunk. Ez a megváltozott membrán-szerkezet helyre áll, ha a sejteket visszahelyezzük fényre. A fénynek a fotoszintetikus elektrontranszport láncon és a zsírsav deszaturáció folyamatán keresztül szerepe van a makroszkópikus struktúra kialakításában.
8. A tilakoid-membránok finom szerkezeti változásait elsőik között vizsgáltuk infravörös spektroszkópiával, amely egy jól használható új technika. A módszerrel meghatároztuk a különböző nevelési körülmények között növesztett sejtekből izolált tilakoid membránok fázistranzíciós pontjait. A kísérleti eredményekkel összhangban ezzel a módszerrel magyarázni tudjuk azt, hogy egy adott élőlény miért képes az adott hőmérsékleti tartományban élni. A spektrumok analízisével meghatározható a membránok fehérje-lipid aránya, melynek fontos szerepe van az alacsony és a magas hőmérsékletekhez történő adaptációs folyamatokban.
9. Végül, de hangsúlyozottan kijelenthetjük, hogy a fénynek az alapvető bioenergetikai jelentőségén túl kulcsszerepe van a különböző hőmérsékletekhez történő adaptációs folyamatokban és ezt a hatását, a fotoszintetikus folyamatokon keresztül fejt ki.

Summary

Prologue

The level of unsaturation of glycerolipids determines various physical and biochemical characteristics of membranes, and it regulates the physical state of a biological membrane, which plays an important role in physiological functioning (Murata and Wada, 1995). For proper functioning, the liquid-crystalline phase for lipids is desirable to allow rotational and transmembrane movement of membrane lipids and protein molecules. It has been demonstrated in model membranes that the transition from liquid-crystalline phase to a gel phase depends on the level of saturation of the membrane glycerolipids (Coolbear et al., 1983). A higher degree of glycerolipid unsaturation results in a lower temperature of phase transition (Chapman, 1975). In biological membranes, the physiological activities drastically change at the phase transition temperature (Omata and Murata, 1985; Murata, 1989). In photosynthetic membranes, the level of glycerolipid unsaturation is mediated by the activity of fatty acid desaturases (Nishida and Murata, 1996), which introduce double bonds directly into the fatty acyl chains of glycerolipids. It has been shown that the level of activity of these enzymes plays indeed a key role in the responses to changes in ambient temperature, such as the tolerance to low-temperature stress, by modulating the phase transition temperature of the membrane.

The cyanobacterium strain *Synechocystis* PCC 6803 is a transformable strain and its whole genome has been sequenced (Kaneko et al., 1996). This strain has been used extensively as a model for the chloroplast of higher plants (Nishida and Murata, 1996).

The photosynthetic membranes of higher plants and cyanobacteria contain a high level of linolenic glycerolipids, and consequently the phase transition temperature of these membranes should be far below room temperature. In photosynthetic membranes, however, the protein content is considerably higher than that of other non-photosynthetic membranes (Omata and Murata, 1983). Ono and Murata (1982) reported that this higher protein content results in a higher phase transition temperature of the lipids in these membranes. Furthermore, by using electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy, Wada et al. (1984) found that the temperature of the gel to liquid-crystalline phase transition was lower in cytoplasmic membranes than in thylakoids.

In the present work, we studied

i., the effects of light and light-driven photosynthetic processes on the regulation of the expression of genes encoding acyl lipid desaturases.

ii., the effects of light and light-driven photosynthetic processes on the regulation of the membrane structure and on the formation of the internal photosynthetic membranes of cyanobacterial cells.

Organism and Culture Conditions

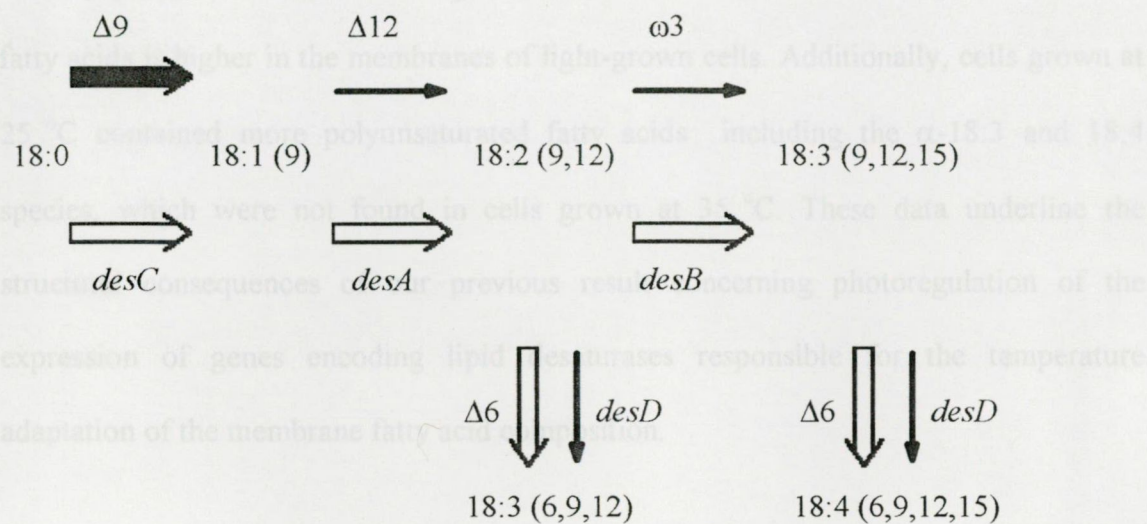
A glucose-tolerant strain of *Synechocystis* PCC 6803 was grown photoautotrophically in BG-11 medium as described earlier (Wada and Murata, 1989). For light-induced photoheterotrophic growth, the cells were cultivated in BG-11 medium supplemented with 5 mM glucose (Anderson and McIntosh, 1991). Liquid cultures (100 ml in 200 ml Erlenmeyer flasks) were kept in darkness with the exception of a 10 minute white-light

pulse per day at the light intensity of $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The cells were grown at 25°C or at 35°C . The growth of the cultures was followed by measuring their optical density at 750 nm (OD_{750}) with a Shimadzu UV/visible spectrophotometer.

Results

i., In cyanobacterial cells, fatty acid desaturation is one of the crucial steps in the acclimation processes to low-temperature conditions. The expression of all the four acyl lipid desaturase genes of *Synechocystis* PCC 6803 was studied as a function of temperature and separately as a function of light. We used cells grown at 25°C in light-activated heterotrophic growth conditions. In these cells, the production of α -linoleic acid and 18:4 fatty acid was negligible and the synthesis of γ -linoleic acid was remarkably suppressed compared to those of the cells grown photoautotrophically. The cells grown in the light in the presence of glucose showed no difference in fatty acid composition compared with cells grown photoautotrophically. The level of mRNA for $\Delta 9$ desaturase was not affected by either the temperature or the light. It was constitutively expressed at 25°C with and without illumination. The level of *desB* transcripts was negligible in the dark-grown cells and was enhanced about 10-fold by exposure of the cells to light. The maximum level of expression occurred within 15 min. The level of *desA* and *desD* mRNAs was higher in dark-grown cells than that of *desB* mRNA for $\omega 3$ desaturase. However, the induction of both *desA* and *desD* mRNAs for $\Delta 12$ and $\Delta 6$ desaturases, respectively, was enhanced by light about 10-fold. Rifampicin, chloramphenicol, and 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea completely blocked the induction of the expression of *desB* and dramatically suppressed the induction of *desA*,

desD. Consequently, we suggest the regulatory role of light via photosynthetic processes in the induction of the expression of acyl lipid desaturases.



Scheme for the expression of fatty acid desaturase genes in *Synechocystis* PCC 6803 cells at 25°C in the light (open arrows) and in the dark (solid arrows). The difference in width of the arrows represents the activity of the expression of the individual genes.

ii., in the cells grown in the darkness at 35°C, phycobilisomes and thylakoids were less abundant; their amount was further depleted in cells grown at 25°C. The temperature dependence of photosynthetic oxygen evolution revealed that dark-grown cells were unable to acclimatize their membranes to the actual growth temperature. Analysis of Fourier transform infrared spectra of the thylakoid and cytoplasmic membranes revealed a looser structure for the membranes of dark-grown cells. In light-grown cells, phase transition temperatures of the membranes were lower, and so was the protein to lipid ratio compared to that of dark-grown cells. The differences between light- and dark-

Irodalom

- Anderson, S.L., McIntosh, L. (1991) *J. Bacteriol.* 173: 2761-2767.
- Andrews, J., Olhrogge, J.B., Keegstra, K. (1985) *Plant Physiol.* 79: 259-265.
- Arrondo, J. L. R., Muga, A., Castresana, J. Goni, F.M., (1993) *Prog. Biohyps. Molec. Biol.*, Vol. 59: 23-56.
- Berenyi, B., Krause G.H. (1985) *Planta* 163: 218-226.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J. (1959) *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
- Block, M.A., Dorne, A.-J., Joyard, J., Douce, R. (1983) *J. Biol. Chem* 258: 13281-13286.
- Boese, S.R., Huner N.P.A. (1990) *Plant Physiol.* 94: 1830-1836.
- Brenner, R.R. (1984) *Prog. Lipid Res.* 23: 69-96.
- Chapman, D.J. (1975) *Quart. Rev. Biophys.* 8: 185-235.
- Chapman, D.J., Quinn, P.J. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 3791-3795.
- Chen, N.R. Ho, J.T. (1985) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 127: 220-225.
- Church, G.M., Gilbert, W. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1991-1995.
- Cossins, A.R. (1994) Homeoviscous adaptation of biological membranes and its functional significance. In: Cossins A.R. (ed.) *Temperature Adaptation of Biological Membranes*. 63-76. London: Portland.
- Coolbear, K.P., Berde, C.B., Keough, K.M.W. (1983) *Biochemistry* 22: 1466-1473.
- Devaux, P.F. Siegneuret, M. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 822: 65-125.
- Dorne, A.-J., Block, M.A., Joyard, J., Douce, R. (1982) *FEBS Lett.* 145: 30-34.
- Falk, S., Samuelsson, G., Öquest, G. (1990) *Physiol. Plant.* 78: 173-180.
- Farkas, T., Vigh, L., Horváth, I. (1982) *MTA Biol. Oszt. Közl.* 24: 377-393.

- Fischer, W., Heinz, E., Zeus, M. (1973) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354: 1115-1123.
- Goedheer, J.C. (1976) Photosynthetica 10: 411-422.
- Gombos, Z., Wada, H., Murata, N. (1991) Plant Cell Physiol. 32: 205-211.
- Gombos, Z., Wada, H., Murata, N. (1992) Proc. Natl. Sci. Acad. USA 89: 9959-9963.
- Gombos, Z., Wada, H., Murata, N. (1994) Proc. Natl. Sci. Acad. USA 91: 8787-8791
- Gombos, Z., Kanervo, E., Tsvetkova, N., Sakamoto, T., Aro, E-M., Murata, N. (1997) Plant. Physiol. 115: 551-559.
- Haris P.I. Chapman (1992) Trends in Biochemical Sciences, Vol. 17: 328-333.
- Higashi, S., Murata, N. (1993) Plant Physiol. 102: 1275-1278.
- Hirayama, O. (1967) J. Biochem. 61: 179-185.
- Horváth, I., Török, Z., Vígh, L., Kates, M. (1991) Biochim. Biophys. Acta 1085: 126-130.
- Johns, R.B., Nichols, P.D., Gillan, F.T., Perry, G.J. Volkman, J.K. (1981) Compar.Biochem. Physiol. 69B: 843-849.
- Joó, F., Beck, M.(1973) Magy. Kém. Foly. 79: 189-192.
- Joó, F., Tóth, Z. (1981) Kémiai Közl. 55: 353-371.
- Kaneko, T.S. Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, Y., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirosawa, M., Sugira, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M., Tabata, S. (1996) DNA Res 3: 109-136.
- Kenervo, E., Tasaka, Y., Murata, N., Aro, E-M. (1997) Plant Physiol. 114: 841-849.
- Kates, M. (1966) Annu. Rev. Microbiol. 20: 13-44.
- Kenyon, C.N. (1972) J. Bacteriol. 109: 827-834.
- Kenyon, C.N., Rippka, R., Stainer, R.Y. (1972) Arch. Microbiol. 83: 216-236.

- Laskay, G., Lehoczy, E. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 849: 77-84.
- Lem, N.W., Stumpf, P.K. (1984a) *Plant Physiol.* 74: 134-138.
- Lem, N.W., Stumpf, P.K. (1984b) *Plant Physiol.* 75: 700-704.
- Los, D.A., Horváth, I., Vígh, L., Murata, N. (1993) *FEBS Lett.* 318: 57-60.
- Los, D.A., Malay, K.R., Murata, N. (1997) *Molecular Microbiology* 25(6):1167-1175.
- Lyons, J.M. (1973) *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 24: 445-466.
- Mantsch, H.M., McElhaney, R.N. (1991) *Chem. Phys. Lipids* 57:213-226.
- McElhaney, R.N. (1994) In: Cossins A.R. (ed.) *Temperature Adaptation of Biological Membranes.* 31-48. London: Portland
- Mendelsohn, R., Senak, L. (1993) Quantitative determination of conformational disorder in biological membranes by FTIR spectroscopy. In: *Biomolecular spectroscopy, Part A*, Clark, R.J.H., Hester, R.E. (eds) John Wiley & Sons Ltd. Chichester, 339-380.
- Millonig, G. (1961) *J. Appl. Physics*, 32: 1637
- Moon, Y.B., Higashi, S.I., Gombos, Z., Murata, N. (1995) *Proc. Natl. Sci. Acad. USA* 92: 6219-6223.
- Moore, T.S. (1984) Structure, function and metabolism of plant lipids. (Siegenhtaler, P.-A., Eichenberger, W. eds.) 83-91. Elsevier Science Publisher. Amsterdam.
- Moore, D.J., Mendelsohn, R. (1994) *Biochemistry* 33: 4080-4085.
- Moore, D.J., Sills, R.H. Mendelsohn, R. (1995) *Biospectroscopy* 35: 229-235.
- Murata, N. (1989) *J. Bioenerg. Biomembr.* 21: 61-76.
- Murata, N., Wada, H., Hirasawa, R. (1984) *Plant Cell Physiol.* 25: 1027-1032.
- Murata, N., Ono, T. (1988) *Methods in Enzymology* 167: 245-251.
- Murata, N., Wada, H., Gombos, Z. (1992) *Plant Cell Physiol.* 33: 933-941.
- Murata, N., Wada, H. (1995) *Biochem. J.* 308: 1-8.

- Mustárdy, L., Los, D.A., Gombos, Z., Murata, N. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 10524-10527.
- Nagy, F., Kay, S.A., Chua, N-H. (1988) *Plant Gene Research Manual*, eds. Gelvin, S.B., Schilperoort, A.R. (Kluwer, Dordrecht, The Netherlands), 1-29.
- Nichols, B.W., Harris, R.V., James, A.t. (1965) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 20: 256-262.
- Nichols, B.W., Wood, B.J. (1968) *Lipids* 3: 46-50.
- Nishida, I., Murata, N. (1996) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 541-568.
- Omata, T., Murata, N. (1983) *Plant Cell Physiol.* 24: 1101-1112.
- Omata, T., Murata, N. (1986) *Plant Cell Physiol.* 27: 485-490.
- Ono, T-A., Murata, N. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 545:69-76.
- Ono, T-A., Murata, N. (1981) *Plant Physiol.* 67: 176-181.
- Ono, T-A., Murata, N. (1982) *Plant Physiol.* 69: 125-129.
- Oren, A., Fattom, A., Padan, E., Tietz, A. (1985) *Arch. Microbiol.* 141: 138-142.
- Pearcy R.W. (1978) *Plant Physiol.* 61: 484-486.
- Powles, S.B. (1984) *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35: 15-44.
- Quinn, P.J. (1981) *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 34: 109-173.
- Quinn, P.J. és Williams, W.P. (1978) *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 34: 109-173.
- Raison, J.K. (1973) *J. Bioenerg.* 4: 258-309.
- Ramesha, C.S., Thompson, G.A. (1982) *Biochemistry* 21: 3612-3617.
- Ramesha, C.S., Thompson, G.A. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 731: 251-260.
- Ramesha, C.S., Thompson, G.A. (1984) *J. Biol. Chem.* 14: 8706-8712.
- Reddy, A.S., Nuccio, M.L., Gross, L.M., Thomas, T.L. (1993) *Plant. Bol. Biol.* 22: 293-300.
- Reynolds, E.S. (1963) *J. Cell Biol.*, 17: 208-212

- Sakamoto, T., Los, D.A., Higashi, S., Wada, H., Nishida, I., Ohmori, M., Murata, N. (1993) *Plant. Mol. Biol.* 26: 249-263.
- Sakamoto, T., Los, D.A., Higashi, S., Wada, H., Nishida, I., Ohmori, M., Murata, N. (1994a) *Plant. Mol. Biol.* 26: 249-264.
- Sakamoto, T., Wada, H., Nishida, I., Ohmori, M., Murata, N. (1994b) *Plant. Mol. Biol.* 24: 643-650.
- Sakamoto, T., Wada, H., Nishida, I., Ohmori, M., Murata, N. (1994c) *J. Biol. Chem.* 269: 25576-25580.
- Sakamoto, T., Bryant, D.A. (1997) *Mol. Microbiol.* 23: 1281-1292.
- Sato, N., Murata, N. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 619:353-366.
- Sato, N., Murata, N. (1981) *Plant Cell Physiol* 22: 1043-1050.
- Sato, N., Murata, N. (1982a) *Biochim. Biophys Acta* 710: 271-278.
- Sato, N., Murata, N. (1982b) *Biochim. Biophys Acta* 710: 279-289.
- Sato, N., Murata, N. (1982c) *Plant Cell Physiol.* 23: 1115-1120.
- Sato, N., Murata, N., Miura, Y., Ueta, N. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 572:19-28.
- Sato, N. (1995) *Nucleic Acids Res.* 23: 2161-2167.
- Sauer, A., Robinson, D.G. (1985) *J. Exp.Bot.* 36:1257-1266.
- Schmidt, H., Heinz, E. (1990a) *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9477-9480.
- Schmidt, H., Heinz, E. (1990b) *Plant Physiol.* 94: 214-220.
- Shinitzky, M., Yuli, I. (1982) *Chem. Phys. Lipids* 30: 261-282.
- Siebert, F.(1995) *Methods in Enzymology*, Vol. 246: 501-526)
- Simensky, M. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 522-525.
- Singer, S.J., Nicholson, G.L.(1972) *Science* 175: 720-731.
- Somersalo, S., Krause. G.H. (1990b) *Planta* 180: 181-187.

- Stainer, R.Y., Kunisawa, R., Mandel, M., Cohen-Bazire, G. (1971) *Bacteriol. Rev.* 35: 171-205.
- Stainer, R.Y., Cohen-Bazire, G. (1977) *Annu. Rev. Microbiol.* 31: 225-274.
- Stapleton, S.R., Jaworski, J.G. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 794: 249-255.
- Stevens, S.E. Jr., Nierzwicki-Bauer, S. (1991) The cyanobacteria. In: Stolz J.F. (ed.) *Structure of Phototrophic Prokaryotes*, 15-47. CRC Press, Inc, Boca Raton
- Tasaka, Y., Gombos, Z., Nishiyama Y., Mohanty, P., Ohba, T., Ohki, K., Murata, N. (1996) *EMBO J.* 15: 6416-6425.
- Thompson, G.A. (1980) CRC Press, Boca Raton, Florida
- Van Stokkuk I. H. M., Linsdell. H. Hadden J. M., Haris, P. I., Chapman, D., Bloemendal, M. (1995) *Biochemistry.*, 34: 10508-10518.
- Vígh, L., Joó, F. (1983) *FEBS Lett.* 162: 423-427.
- Vígh, L., Horváth, I., van Hasselt, P.R., Kuiper, P.J.C. (1985a) *Plant Physiol.* 79: 756-759.
- Vígh, L., Joó, F., Cséplő, Á. (1985b) *Eur. J. Biochem.* 146: 241-244.
- Vígh, L., Los, D.A., Hováth, I., Murata, N. (1993) *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 90: 9090-9094.
- Wada, H., Hirasawa, R., Omata, T., Murata, N. (1984) *Plant Cell Physiol.* 25: 907-911.
- Wada, H., Murata, N. (1989) *Plant Cell Physiol.* 30: 971-978.
- Wada, H., Murata, N. (1990) *Plant Physiol.* 92: 1062-1069.
- Wada, H., Murata, N. (1995) *Biochem. J.* 308: 1-8.
- Wada, H., Gombos, Z., Murata, N. (1990) *Nature* 347: 200-203.
- Wada, H., Gombos, Z., Sakamoto, T., Murata, N. (1992) *Plant Cell Physiol.* 33: 535-540.
- Wada, H., Schmidt, H., Heinz, E., Murata, N. (1993) *J. Bacteriol.* 175: 544-547.

- Wada, H., Gombos, Z., Murata, N. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 4273-4277.
- Wolf, D.E., Voglmayer, J.K. (1984) *J. Cell Biol.* 98: 1678-1684.
- Williams, J.G.K. (1988) *Methods in Enzymol.* 167: 766-778.
- Williams, J.G.K., Szalay, A.A. (1983) *Gene* 24: 37-51.
- Zepke, H.D., Heinz, E., Randuz, A., Linscheid, M., Pesch, R. (1978) *Arch. Microbiol.* 119: 157-162.

Publikációs lista

A dolgozatban felhasznált közlemények

1. Kis, M., **Zsíros O.**, Farkas, T., Wada, H., Nagy, F., Gombos, Z.

Light-induced expression of fatty acid desaturase genes (1998) Proc. Natl. Acad.

Sci. USA 95: 4209-4214.

2. **Zsíros, O.**, Kis, M., Mustárdy, L., Farkas, T., Várkonyi, Zs., Ughy, B., Gombos, Z., Szalontai, B.

Light-driven structural changes in thylakoid cytoplasmic membranes of a

cyanobacterium, *Synechocystis* PCC 6803 (Plant Physiology, elküldve)

- 3., **Zsíros O.**, Várkonyi, Zs., Mustárdy, L., Ughy, B., Gombos, Z.,

Light is necessary in the acclimation process of photosynthetic organism to low-temperature stress

In: Advances in Plant Lipid Research (1998) Sánchez, J., Cerdá-Olmedo, E.,

Martinez-Force, E. (eds) 118-121. Printed in Spain, Universidad de Sevilla

Egyéb közlemények

1. Gombos, Z., Kis, M., **Zsíros O.**, Ughy, B., Várkonyi, Zs., Wada, H., Tasaka, Y., Farkas, T., Murata, N.

Light induction of lipid desaturation and its role in acclimation to low temperature

In: Advances in Plant Lipid Research (1998) Sánchez, J., Cerdá-Olmedo, E.,

Martinez-Force, E. (eds) 118-121. Printed in Spain, Universidad de Sevilla

2. Gombos, Z., Hideg, É., **Zsíros O.**, Wada, H., Murata, N.

The role of lipid desaturation in protection mechanism against temperature stresses

(1995) Acta Phytopat. Entomol. Hung. 30(1-2): 89-92.

3. Masamoto, K., **Zsíros O.**, Gombos, Z.

Accumulation of zeaxanthin in cytoplasmic membranes of the cyanobacterium

Synechococcus sp. Strain PCC 7942 grown under high light conditions (1999) J.

Plant Physiol. 155: 136-138.

4. Várkonyi, Zs., **Zsíros O.**, Gombos, Z.,

The application of genetically manipulated cyanobacterial strains in the study of

glycerolipid unsaturation of photosynthetic membranes in the tolerance of

photosynthetic machinery to temperature stresses (1996) J. Scien. Indust. Res. 55:

658-668.

5. Fodor, E., **Zsíros O.**, Várkonyi, Zs., Gombos, Z., Kovács, A., Mustárdy, L., Horváth, I. L., Hiripi, L., Farkas T.

Exceptional to seasonal adaptation: cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*
(Applied and Environmental Microbiology, elküldve)

6. Gombos, Z., Tasaka, Y., **Zsíros O.**, Várkonyi, Zs., Murata, N.

Lipids of photosynthetic membranes in cyanobacteria: roles in protection against
low-temperature stress

In: The Phototrophic Prokaryotes (1999) G.A. Peschek, W. Löffelhardt, G.
Schmetterer (eds.) 647-655. Kluwer Academic Publishers, Printed in USA

7. Debreczeny, M., Szalontai, B., Gombos, Z., **Zsíros O.**, Tasaka, Y., Murata, N.

Elimination of polyunsaturated lipids affects the structure of photosynthetic
membranes

In: Photosynthesis: from Light to Biosphere Vol III. (1995) Mathis, P. (ed.) 409-
412. Kluwer Academic Publishers , Printed in the Netherlands

8. Z. Gombos, M. Kis, **O. Zsíros**, B. Ughy, Zs. Várkonyi, H. Wada, T. Farkas, F. Nagy

Light induction of lipid desaturation and its role in acclimation to low temperature

In: Photosynthesis: Mechanism and Effects Vol. III. (1998) G. Garab (ed.) 1783-
1786. Kluwer Academic Publishers , Printed in the Netherlands

9. Zs. Várkonyi, **O. Zsíros**, T. Farkas, G. Garab, B. Ughy, Zs. Szegletes, Z. Gombos

Adaptation mechanism of the photosynthetic apparatus of *Cylindrospermopsis*
raciborskii ACT 9502 to different environmental effects

9. Masamoto, K., Furukawa, K., **Zsíros O.**, Gombos, Z.

Accumulation of zeaxantin in cytoplasmic membranes of the cyanobacterium, *Synechococcus* PCC 7942 grown under high light conditions (1997) Plant Physiol. 155: 136-138.

10. Várkonyi, Zs., **Zsíros O.**, Kovács, A.

Physiological characterization of *Cylindrospermopsis raciborskii* ACT 9502 isolated from the shallow lake Balaton, Hungary (1997)

In: Book of abstracts of IX International Symposium on phototrophic procaryotes, Vienna, Austria, September 6-13, 1997

Köszönetnyilvánítás

Mindenek előtt köszönettel tartozom *Dr. Gombos Zoltánnak*, témavezetőmnek, aki lehetővé tette számomra, hogy a laboratóriumában dolgozzak. Hálával tartozom neki a hosszú éveken át tartó bizalmáért, türelmes tanításáért, amely során bevezetett a cianobaktériumok világába. Köszönöm kritikai észrevételeit, a baráti légkört, amely a laboratóriumát jellemzi.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani *Dr. Dudits Dénes* akadémikus főigazgatónak, és *Dr. Vass Imre* intézeti igazgatónak.

Köszönöm *Dr. Garab Győzőnek*, csoportunk vezetőjének, hogy csoportjában lehetővé tette számomra a PhD fokozat megszerzését.

Köszönöm a segítséget azoknak is, elsősorban csoportunk tagjainak, akiket itt név szerint nem említettem meg.