

**TILAKOID MEMBRÁN HŐMÉRSÉKLETADAPTÁCIÓJÁT ÉS
TERMOSTABILITÁSÁT BEFOLYÁSOLÓ TÉNYEZŐK CIANOBAKTÉRIUMBAN**

Egyetemi doktori disszertáció

TÖRÖK ZSOLT

Magyar Tudományos Akadémia, Szegedi Biológiai Központ

BIOKÉMIAI INTÉZET

SZEGED

1992.

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK	4
BEVEZETÉS	7
CÉLKITŰZÉSEK	8
IRODALMI ÁTTEKINTÉS	10
A membránfluiditás értelmezése	10
A membránok fizikai állapotát befolyásoló tényezők	12
<i>Lipidek</i>	14
<i>Zsírsavtelítetlenség</i>	15
<i>Fehérjék</i>	17
Hőmérsékletadaptáció és termotabilitás fotoszintetikus szervezetekben	19
<i>A fotoszintetikus szervezetek termotoleranciája</i>	19
<i>Hőmérsékleti adaptáció a tilakoid membrán szintjén</i>	21
A tilakoid membránt alkotó lipidek szerepe a hőmérsékleti adaptációban (21); A tilakoid fluiditásának módosítása (24); Fehérjék hatása a tilakoid membrán fluiditására (25); Fehérje-lipid kölcsönhatások tilakoid membránban (27)	
<i>A fotoszintetikus elektrontranszport hőstabilitása</i>	28
<i>Cianobaktériumok hőmérsékletadaptációja</i>	29

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	34
Tenyésztési körülmények	34
Tilakoid membrán izolálása <i>Synechocystis</i> PCC 6803 -ból	34
Fotoszintetikus aktivitás mérése	35
Gélelektroforézis, fehérje mennyiség mérés	36
<i>Kétdimenziós SDS-poliakrilamid gélelektroforézis</i>	36
<i>Fehérje mennyiség mérése</i>	36
Lipid és zsírsavanalízis	37
<i>Lipid extrakció és elválasztás</i>	37
<i>Zsírsavanalízis</i>	37
Homogén katalitikus hidrogénezés	38
Klorofill és allofikocianin fluoreszcencia hőmérsékletfüggésének mérése	39
Fluiditás mérés fluoreszcencia anizotrópiával	39
Lipid-fehérje kölcsönhatás mérése ESR spektroszkópiával	41
EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK	42
Hosszútávú adaptáció	42
<i>Synechocystis</i> PCC 6803 hőmérsékletadaptációja és termotabilitása	42
Fotoszintetikus aktivitás (42); Változások a tilakoid membrán összetételében hőmérsékletadaptáció közben (44); Izoterm körülmények között fellépő adaptív változások zsírsav mutáns/transzformáns sejtek membránjaiban (48); A tilakoid membrán fluiditásregulációjának mechanizmusa (49); Klorofill fluoreszcencia és hőstabilitás (57)	
Rövidtávú adaptáció	60

Fehérje-lipid kölcsönhatás szintű reguláció	64
Hipotézis a tilakoid membrán hőmérsékletadaptációjának és termostabilitásának kapcsolatára	68
AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA	72
IRODALOMJEGYZÉK	75
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	83

RÖVIDÍTÉSEK

Lipidek:

DGDG;	digalaktozil-diacilglicerol
MGDG;	monogalaktozil-diacilglicerol
PC;	foszfatidil-kolin
PE;	foszfatidil-etanolamin
PG;	foszfatidil-diacilglicerol
SQDG;	szulfoquinovozil-diacilglicerol

Zsírsavak:

16:0;	palmitinsav
16:1;	palmitoleilsav
16:2;	hexadekadiénsav
17:0;	heptadekánsav
18:0;	sztearinsav
18:1;	olajsav
18:2;	linolsav
18:3;	linolénsav
18:4;	oktadekatetraénsav

Elektrontranszporthoz kapcsolódó rövidítések:

ÁPC;	allofikocianin
PQ;	plasztokinon
PSI;	egyed fotoszisztéma
PSII;	kettes fotoszisztéma

Egyéb rövidítések:

ANS;	8-anilino-1-naftalin szulfonsav
DSC;	különbségi kalorimetria
FTIR;	Fouirer transzformációs infravörös spektroszkópia
HEPES;	N-(2-hidroxietyl)piperazin-N'-(2-etán szulfonsav)
HSP;	hő sokk fehérje
H_{II};	fordított hexagonális fázis
L_α;	olvadék kristályos fázis
L_β;	gél fázis
PMSF;	fenilmetil-szulfonil fluorid
S.D.;	standard deviáció
SDS;	Na-dodecilszulfát
sn-1;	glicerinváz 1-es pozíciója
sn-2;	glicerinváz 2-es pozíciója
TES;	N-tris(hidroximetil)metil-2-aminoetán szulfonsav

Fluoreszcens és spinjelzett próbák:

DPH; 1,6-difenil-1,3,5-hexatrién

***n*-AS;** *n*-(9-anthroyloxy) sztearinsav

16-AP; 16-(9-anthroyloxy) palmitinsav

***n*-SASL;** *n*-doxyl-sztearinsav

BEVEZETÉS

A világ élelmiszertermelésének egyik kulcskérdése a fotoszintetikus szervezetek hőmérsékletadaptációja. Felbecsülhetetlen az a kár, amit fontos haszonnövényeink (gabonafélék, zöldség- és gyümölcsfélék, stb.) extrém hőmérsékleti viszonyok hatására bekövetkező termés kiesése okoz. A környezetszennyezés és ennek egyik következménye a Föld légkörének globális felmelegedése számos kutatócsoport figyelmét irányította a fotoszintetikus szervezetek magashőmérsékleti adaptációjának és hőtűrésének irányába. Az alkalmazkodás ill. hőtűrés mechanizmusának megértése rendkívül fontos a félsivatagos, forró égövi viszonyok között haszonnövényt meghonosítani kívánó nemesítő vagy molekuláris biológus számára is.

Ismeretes, hogy a magasabbrendű növényi sejt magashőmérsékleten bekövetkező károsodása szerteágazó láncreakciójának egyik kezdeti lépése a fotoszintetikus membrán dezintegrációja.

A stressztűrés és a stresszhelyzethez való alkalmazkodás nem más, mint a stressz által kialakított új egyensúlyi állapot megteremtésének képessége ill. annak létrehozása. Ez az alkalmazkodás részben a membránok lipid és fehérje összetételének módosulásán keresztül valósul meg. Az élő rendszer ily módon képes a sejtmembránok fizikai és szerkezeti paramétereit, valamint a membránokhoz rendelhető funkcióit optimális szinten tartani a stresszhatás tartós megléte mellett is. A membrán fluiditásának közel állandó értéken tartása a környezeti hőmérséklet változásainak ellenére az ún. "homeoviszkozus adaptáció" elvének érvényesülésével magyarázható. E regulációs mechanizmus tanulmányozására nyújtanak kiváló lehetőséget a magasabb rendű növények kloroplasztiszi modelljeként tekinthető prokarióta cianobaktériumok (régábbi néven kék-zöld algák).

CÉLKITŰZÉSEK

A magasabbrendű növények hőmérsékletadaptációs mechanizmusának vizsgálata fényt derített az adaptáció és a membránfluiditás kapcsolatára. A magasabbrendű fotoszintetizáló szervezetek rendkívüli bonyolultsága, számos élettani ill. biokémiai alapfolyamatának tisztázatlansága nehézséget okozott az adaptív válaszok értelmezésében. Az elmúlt években új lehetőségként merült fel a cianobaktériumok modellként való felhasználása. Ezek a fotoszintetizáló baktériumok egyetlen kloroplasztiszként foghatók fel: kettős sejthártyájuk határolja a tilakoid membránrendszert. Ez utóbbi - a fénybegyűjtő rendszert és a makroszkópikus szerkezetet (gránum, sztróma) kivéve - nagy hasonlóságot mutat a magasabbrendűek tilakoidjával. Felhasználásuk több szempontból is előnyösnek tűnt. Egyszerű membránrendszerük és a membránok könnyű izolálhatósága lehetővé teszi a membrán szintű adaptáció tanulmányozását. Alkalmazásuk másik nagy előnye, hogy meglévő cianobakteriális transzformációs rendszerek lehetőséget teremtenek - a molekuláris biológia eszköztárát felhasználva - a membránfluiditást befolyásoló, reguláló tényezők irányított megváltoztatására. Ezen ismeretek birtokában célként tűztük ki a *A Synechocystis* PCC 6803 cianobaktérium tilakoid membránjának magashőmérséklet adaptációját és termostabilitását befolyásoló tényezők felderítését.

Tanulmányozni kívántuk,

1. hogy a *Synechocystis* PCC 6803 megfelelő modell-e a kívánt adaptációs vizsgálatok elvégzéséhez.
2. a tilakoid membrán összetételének módosulását magashőmérséklet adaptáció során.
3. vajon az adaptációs folyamat megközelíthető-e a membrán fluiditás szintjén.

A különböző hőmérsékletekhez alkalmazkodott sejtek ill. telítetlen zsírsav hiányos változat membránjainak mikroviszkozitása összhangban van-e a "homeoviszkózus" adaptáció elveivel.

Telítetlen zsírsavhiányos mutáns (Fad6/*desA*⁻) segítségével terveztük megvalósítani a zsírsav deszaturáció fiziológias jelentőségének tanulmányozását.

4. a membrán károsodásának lokalizációját, annak *in situ* követésével
5. a szubletális, rövid tartamú hőstressz hatását a membránösszetételre, membránfluiditásra és a hőstabilitásra.
6. a hőmérsékletadaptáció és hőstressz hatását a lipid-fehérje kölcsönhatásokra.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A membránfluiditás értelmezése

A biológiai membránok tulajdonságait mai ismereteink szerint a Singer Nicholson féle folyadék-mozaik modell írja le a legpontosabban (Singer és Nicholson, 1972). E szerint a membránok orientált fehérjék és lipidek "kétdimenziós oldatai". A membránban leggyakrabban előforduló foszfo- és glikolipidek kettősréteget alkotnak. Ez a kétdimenziós lipidmátrix "oldószerű" szolgál az integráns membránfehérjéknek, lehetővé téve azok oldalirányú mozgását és rotációs diffúzióját. E modell azonban már sok tekintetben elavultnak tekinthető. Az eredeti elmélet szerint a fehérjék szabadon mozoghatnak a különböző lipidek homogén eloszlású kettősrétegében. Ez azonban csak bizonyos megszorításokkal igaz. Elméleti megfontolások és kísérleti bizonyítékok léteznek a membránok laterális és transzverzális heterogenitására. Elkülönült lipid, lipid-fehérje mezők létezhetnek, melyek kialakulását a membránkomponensek közötti specifikus kölcsönhatások okozhatják (Curtain és mtsai, 1988).

A biológiai membránok fluiditásának definiálása nem könnyű feladat. Tágabb értelemben a fluiditás a viszkozitás reciprokaként értelmezhető, de ez a megközelítés elvi szempontból nem tökéletes. A biomembránokhoz nem rendelhető makroszkópikus viszkozitás érték (úgy, mint a valódi oldatokhoz), így fluiditási érték sem. A biomembrán speciális szerveződéséből, a komponensek inhomogén eloszlásából eredően célszerűbb a kétdimenziós oldat mikroviszkozitásáról beszélni, a membránfluiditást pedig úgy tekinthetjük, mint ennek a reciprokát (Shinitzky és Barenholz, 1978). Nem helytálló az sem, ha a membránfluiditást mint egyszerű átlagértéket kezeljük, mert elkülönült fluidabb és rigidebb mezők együttes

létezésével kell számolnunk (Wolf és Voglmayer, 1984). A fluiditás inhomogenitása nemcsak a membrán felszínjében, hanem arra merőlegesen is fennálhat, sőt a biomembrán két rétegének aszimmetrikus összetételéből és eltérő szerveződéséből következően a fluiditásszintek rétegenként is különbözőek (Quinn, 1981).

További nehézségekbe ütközünk, ha valamely konkrét fizikai eljáráson alapuló paraméterrel igyekszünk konkrét számértéket rendelni a membránfluiditáshoz. Egy adott, a fluiditás meghatározására szolgáló eljárással ugyanis mindig egy speciális, az alkalmazott szonda fizikai és kémiai tulajdonságaitól függő mikrokörnyezetről származnak információink. A fluiditás jellemzésére használt paraméter pedig egy meghatározott időállandóval jellemezhető mozgáshoz rendelhető. Így pl. a fluoreszcens technikákkal eredményesen vizsgálhatók a 10^{-9} - 10^{-6} s, a hagyományos ESR technikával pedig a 10^{-11} - 10^{-7} s időtartományban lejátszódó molekuláris mozgások. Nyilvánvaló tehát, hogy mivel eljárásonként és szondánként más fizikai tartalmat hordozó fluiditás paraméterekkel kell számolnunk, kezelésükkor nagy körültekintésre van szükség (Brenner, 1984).

Használatos a membránfluiditásnak olyan szűkebb értelmezése, mely szerint a fluiditás a kettősréteg szerkezetbe rendeződő membránlipidek zsírsav alkiláncainak fizikai állapotával, "rendezettségével" kapcsolatos. Ez az interpretáció azon a tényen alapul, hogy a biomembránok mikroviszkozitását izoterm körülmények között döntően az "oldószerül" szolgáló lipidmátrix kémiai összetétele határozza meg, míg a fehérjék, ionok, pH, stb. csupán másodlagos, módosító hatásúak.

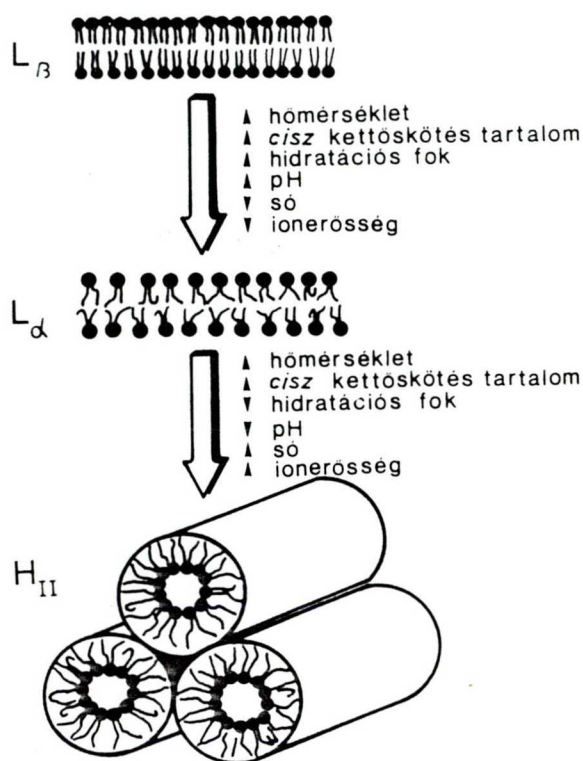
A zsírsav alkiláncok mozgékonyága elsősorban a lánchossz és telítetlenségi szint függvénye, de függ a lipidek ún. "fejcsoportjának" minőségétől is.

A felhalmozódott információkat az alkalmazott módszerek felbontóképessége szerint csoportosíthatjuk (Shinitzky és Yuli, 1982). A mikroszkópikus szint információt nyújt az egyes atomokról ill. molekularészekről a lipidréteg különböző mélységeiben. A

legalkalmasabb vizsgálati módszerek erre a célra a magmágneses rezonancia spektroszkópia (NMR) és a Fourier transzformációs infravörös spektroszkópia (FTIR). A makroszkópikus szint a lipideket, mint izotróp termodinamikai rendszert közelíti meg mechanikai vagy kalorimetrikus eszközökkel (pl. DSC). A szubmakroszkopikus szint molekuláris mélységű felbontását nyújtja a lipidek fluiditásának, főleg spektrális szondák segítségével. A leggyakrabban alkalmazott módszerek a fluoreszcencia anizotrópia és az elektron spin rezonancia spektroszkópia (ESR).

A membránok fizikai állapotát befolyásoló tényezők

A membránfluiditás természetes befolyásoló tényezőit felbonthatjuk belső szerkezeti és külső környezeti tényezőkre. A legfontosabb szerkezeti modulátorok a lipid- és fehérje összetétel, a fehérje/lipid arány és a lipidek zsírsavalkilláncainak telítetlenségi foka (kettőskötéstartalom). A membránban ezen modulátorok aránya különféle szabályozó jelek, stresszhatások következtében megváltozhat. A legfontosabb környezeti fluiditásmódosító tényezők a hőmérséklet, nyomás, pH, ionkoncentráció stb. A lipid kettősréteg biológiai szempontból fontos tulajdonságai visszavezethetők a membrán komponenseinek tulajdonságaira. Az apoláros szénhidrogén láncok között működő intermolekuláris erők nem elég erősek ahhoz, hogy a molekulákat a szilárdtestekhez (kristályokhoz) hasonlóan stabilizálják, így azok a hőmérséklettől függően különböző rendezettségű rendszereket alkothatnak. A lipidek fizikai sajátosságai határozzák meg azt, hogy milyen mértékben képesek befolyásolni a membránok dinamikai tulajdonságait (Murphy, 1986). A membránalkotó lipidek fázisállapotait foglalja össze az 1. ábra.



1. Ábra. A membránalkotó lipidek által felvehető legfontosabb fázisok, és a fázisátmeneteket befolyásoló tényezők (Webb és Green, 1991).

A lipidmembránok legfontosabb kettősréteg szerveződésű fázisállapotai; a gél (L_β) és a folyadékkristályos (L_α) fázis (a biológiai membránok karakterisztikus fázisa). Számolnunk kell azonban nem kettősréteg struktúrákkal is, mint pl. a fotoszintetikus membránlipidek esetében a fordított hexagonális (H_{II}) fázis kialakulásával (1. ábra). Ezek egymásba történő átalakulásának befolyásoló tényezőit is feltünteti az ábra. Egyéb fázisok is létezhetnek, mint pl. a köbös fázis, de ezek általában nem stabilisak és hozzájárulásuk a membránok biológiai tulajdonságaihoz még nem tisztázott.

A fellazult szerkezet miatt a folyadékkristályos-gél fázisátalakulási hőmérsékleten megnövekedhet a membrán permeabilitása. A folyadékkristályos fázisban megnő a lipid- és fehérjemolekulák laterális diffúziója. A lipid kettősréteg szerkezete - különösen a fázisátalakulási hőmérséklet közelében - már igen gyenge környezeti hatások következtében is jelentősen változhat. Ez lehetőséget ad mind a lipidek, mind a fehérjék szerkezeti állapota által befolyásolt transzportfolyamatok érzékeny szabályozására. A membránokban a különböző fázisok egyszerre is jelen lehetnek elkülönült lipid mezők formájában (McConnel és mtsai, 1984).

A következőkben a membrán fő szerkezeti elemeinek fluiditásbefolyásoló szerepét foglalom össze.

Lipidek

A biomembránok működőképesen fluid szinten tartásában döntő jelentőséggel bírnak a membránlipidek intramolekuláris mozgásai (laterális diffúzió, rotáció, "flip-flop"). Ezek tárgyalásakor célszerűnek látszik szétválasztani a foszfo- és galaktolipidek ún. "fejcsoport" régióit az alkilánc övtől. A különböző foszfolipid fejcsoport szegmensek intramolekuláris mozgását többféle fizikai módszer (röntgensugár diffrakció, neutron diffrakció, ^{31}P -NMR, FRAP, stb.) felhasználásával, elsősorban modell membránokban és főleg a PE és PC esetében tanulmányozták. Számos, egymásnak ellentmondó adatból leszűrve általános érvényűnek tűnik, hogy a glicerol övtől pl. a primer (etanolamin) ill. quaterner (kolin) amin csoportok irányába indulva a szegmensek flexibilitása nő. A nagyobb térkitöltésű foszfatidil kolin fejcsoportja, szemben a foszfatidil etanolaminnal, nagyobb mozgékonytágot biztosít a zsírsavláncok számára (Michaelson és mtsai, 1974). A kétféle típusú foszfolipid foszfát régiójában a ^{31}P -NMR vizsgálatok nem jeleznek mozgékonytág különbséget. Vitatott terület

a fejcsoportok konformációja és intermolekuláris kölcsönhatása is. Egyes feltevések szerint a kolin és etanolamin "fejek" jellegzetes konformációs különbségeket mutatnak, szerkezetük és töltésviszonyaik különbségéből eredően. Meg kell még említenünk, hogy az "idegen" lipidek jelenléte (pl. szterolok), továbbá a lipid fejcsoportok egymással és fehérjékkel (integráns és perifériális) való kölcsönhatása, az aktuális hőmérséklet, pH, ionösszetétel, stb. jelentősen befolyásolják a fejcsoportok intramolekuláris mozgásának mértékét.

A magasabbrendű növények és az algák membránjaiban a foszfolipidek mellett főképpen a mono- és digalaktoszil diglicerid (MGDG, DGDG) említhetők, mint a legfontosabb membránalkotó poláros lipidek. A felszín nyomás-terület izotermák összehasonlítása a kétféle galaktolipid 1,2-disztearát glicerol származékára vonatkoztatva azt mutatta, hogy a DGDG - nagyobb térkitöltésű fejcsoportja révén - azonos felületi nyomás mellett nagyobb területigénnyel rendelkezik. A lipidek fázisállapotának "molekula alak" koncepciója szerint azonos zsírsavösszetétel mellett a kisebb fejcsoportú MGDG hajlamosabb fordított hexagonális fázis kialakítására, különösen nagy térigénnyel rendelkező többszörösen telítetlen zsírsavalkilláncok esetén (Selstam és mtsai, 1990).

Zsírsavtelítetlenség

A membránfluiditást értelmezhetjük úgy, mint a lipid molekulák zsírsavalkilláncainak korlátozott mozgékonyágát. A fluiditásmérésre leggyakrabban alkalmazott módszerek az ESR és a fluoreszcencia anizotrópia, melyek a kettősrétegbe juttatott spin-jelölt ill. fluoreszkáló szondákat alkalmaznak. A kísérleti eredményekből számítható fluiditási paraméterek a rendparaméter ill. a molekuláris mozgás jellemzésére bevezetett rotációs korrelációs idő és rotációs diffúziós állandó, translációs diffúziós állandó. A számításokat leíró egyenletek a molekuláris mozgásra alkalmazott modelltől függenek.

Az alacsonyabb rendparaméter általában a szonda környezetének kisebb mikroviszkozitását és nagyobb rotációs és diffúziós mozgását jelenti. Azonban ez nem minden esetben van így. PC membránban DPH szonda mozgásának szög- és időbontott analízise azt mutatta, hogy a megnövekedett telítetlenség csökkentheti a hidrofób zsírsavalkillánc régió szerkezeti rendjét és ezzel egyidőben csökkentheti a szonda rotációs diffúzióját (Langen, 1989). Koleszterol hozzáadása növelte a DGDG és SQDG liposzómák rendparaméterét (sok más lipid esetében is hasonló hatást mutattak ki) de ezzel egyidejűleg nőtt a rotációs diffúziós koefficiens. Nem találtak következetes összefüggést a telítetlenség és a rend ill. diffúziós paraméterek között. Mindebből azt a meglepő következtetést vonták le, hogy "nincs kapcsolat a molekuláris rend és dinamika között" (Ginkel és mtsai, 1989).

A biomembránok dinamikai tulajdonságait jelentős mértékben befolyásolja a lipidek zsírsavalkilláncainak kettőskötés tartalma (összefoglaló: Quinn és mtsai, 1989). Az egyszer telítetlen zsírsavak általában azonos valószínűséggel találhatók az *sn*-1 és *sn*-2 pozíciókban a különböző lipidekben. A többszörösen telítetlen zsírsavak ezzel szemben döntően az *sn*-2 helyzetben találhatók. A kéalgák és a magasabbrendű növények sejtmembránjainak lipidjei telítetlen zsírsav láncában izolált *cisz* kettőskötéseket tartalmaznak. A *cisz* kettőskötések megjelenése és száma nagymértékben befolyásolja a membránlipidek zsírsavláncainak mozgási viszonyait és rendezetlenségét. Mivel a kettőskötéssel összekapcsolt két szénatom a kapcsolat tengelye körül nem foroghat, továbbá mivel a *cisz* izomer esetében a kötést megelőző és az azt követő csoportok az olefinkötés mentén képzeletben két térfélre tagolható szerkezetnek ugyanazon felén helyezkednek el, a *cisz* kettőskötésnek a láncban való megjelenése kettős hatású. Egyrészt az olefinkötéssel kapcsolt szegmens viszonylag rigid, ám ennek jelentőségét felülmúlja az, hogy a kötéssel rögzített "lánctörés" megnöveli a lánc térkitöltését és így jelentősen fokozza a láncon belül és annak szomszédságában is a rotamerek képződésének esélyét. A *cisz* kettőskötést tartalmazó membrán lipikomponensei ilyen módon kevésbé zsúfoltak,

a membráfelszín megnő, vastagsága csökken. A kettőskötéstartalom és a fluiditásszint nem áll egyenes arányosságban egymással. Általában igaz, hogy az első *cisz* kettőskötés perturbáló hatásához képest minden további bevitele kisebb hatású (Coolbear és mtsai, 1983). A *cisz* kettőskötések alkálláncba való bevitelével történő fluiditásnövekedést számos rendszerben és különböző fizikai mérőmódszerekkel is igazolták (Brenner, 1984; Laskai és Lehoczky, 1986). A zsírsavtelítettség membránfluiditásra ill. membránkötött élettani funkciókra gyakorolt hatásának vizsgálatára kiválóan alkalmas a lipid alkálláncok homogén katalitikus hidrogénezéssel történő telítése (Vígh és Joó, 1983; Joó és mtsai, 1991). Vízoldékony katalizátorok használatával lehetőség nyílik a kettőskötéstartalom és membránfunkciók közötti kapcsolat *in vivo* követésére, ill. a membrán szerkezetének, mikroheterogén struktúrájának felderítésére (Schlame és mtsai, 1990; Mayor és mtsai, 1992; Horváth és mtsai, 1991).

Fehérjék

Egy tipikus biológiai membránban a fehérjék és a lipidek tömegaránya 1:1. Átlagos fehérje és lipid móltömegekkel számítva, a fehérjéket gömbalakúnak feltételezve azt kaphatjuk, hogy átlagosan egy fehérje molekulára 60 lipid molekula jut. A lipidek 50%-a a fehérjékkel közvetlen kölcsönhatásban áll. A fehérje/lipid arány széles határok között változhat, és figyelembe kell vennünk a fehérjék változó nagyságát, alakját és aggregációs fokát. Ezen kívül nemcsak integráns, hanem perifériális fehérjék is kölcsönhatásba kerülhetnek a membránalkotó lipidekkel. Ezek alapján a fehérjéknek fontos szerepük lehet a membrán dinamikai tulajdonságainak kialakításában. Számos vizsgálat irányult különböző specifikus és nem specifikus fehérje-lipid kölcsönhatások felderítésére (összefoglaló: Lee, 1987). A számos megválaszolendő kérdés közül a legfontosabbak: Milyen erős a kölcsönhatás a fehérjék és a lipidek között, a kölcsönhatás mennyire specifikus, és az hogyan módosítja a fehérjékhez

asszociált lipidek mozgásviszonyait? Hogyan képesek a lipidek befolyásolni a membránfehérjék szerkezetét és funkcióját? A perifériális, membránfelszínhez tapadt fehérjék hogyan módosítják a membrán dinamikai sajátságait?

A választ ezekre a kérdésekre eddig többnyire rekonstituált fehérje-lipid modell rendszerekben keresték. A felhasznált módszerek közül a legfontosabbak a ^2H -NMR, az ESR és a fluoreszcens technikák. Spinjelölt lipidek mozgása korlátozott a fehérjék közelében. Ennek eredménye egy kiszélesedett sáv az ESR spektrumban. A kísérleti spektrum felbontható egy, a gyorsan mozgó "bulk" lipid fázisból eredő, és egy sokkal lassúbb, fehérjéhez asszociált lipidektől eredő komponensre. A fehérjék "szolvatációs" lipidburka időben nem állandó. A fehérjékhez közeli lipidek viszonylag gyorsan (kb. 10^{-7}s) képesek helyet cserélni a szomszédos, szabad lipidekkel. Az ESR spektrumok analízisével a két komponens aránya és a lipidek ún. kicserélődési frekvenciája meghatározható (Horváth és mtsai, 1988).

Spinjelölt és brómozott lipid származékok képesek a fehérjékben található triptofán fluoreszcenciájának kioltására. Ennek hatásfoka erősen függ a fehérje és a szonda molekula távolságától, így a fehérje fluoreszcenciájának követésével következtetni lehet arra, hogy mely lipidek milyen mértékben kötődnek a fehérjékhez (Marsh, 1987).

NMR kísérletek szerint a fehérjék jelenléte csak kis hatással van mind a lipidek fejcsoportjainak, mind a zsírsavalkillánc régió mobilitására (Ellena és mtsai, 1986). ESR mérések viszont egyértelműen bizonyítják a fehérjékhez kötött, immobilizált lipidek jelenlétét, és a fehérjék és a lipidek közötti specifikus kölcsönhatások lehetőségét (Marsh, 1987). Fluoreszcencia anizotrópia kísérletek azt is igazolni látszanak, hogy a fehérjék hatással vannak a fehérjével nem közvetlen kölcsönhatásban álló lipidek mozgási tulajdonságaira is. A membrán mikroviszkozitása jelentősen növekedhet a membránba integrálódó fehérjék hatására (Rehorek és mtsai, 1985). Fourier transzformációs infravörös spektroszkópiai (FTIR) adatok, amelyek alkalmasak a zsírsavláncok vibrációs mozgásainak követésére az NMR adatokkal

összhangban nem mutatják a fehérjék jelentős hatását a lipidek mobilitására (Anderle és mtsai, 1986). A fehérjék hatását a lipidek fázistranzícióira kalorimetriás módszerrel is vizsgálták. A fehérjék jelenléte jelentősen növelte a fázistranzíció szélességét, a helyét azonban csak kis mértékben módosította. Ez a módszer is felveti a fehérjékhez kötött ill. fehérje aggregátumokban csapdázott lipidek meglétének lehetőségét (McEhlaney, 1986).

A perifériális fehérjék hatása a membrán dinamikus szerkezetére rendkívül sokrétű. Hatással lehetnek a membrán permeabilitására, fluiditására és fázisállapotára. Jelentős szerephez juthatnak a membránon keresztül történő fehérje transzportban. Mitokondriális prekursor fehérjék szignál szekvenciája a membrán felismerésén túl annak szerkezetét úgy tudja befolyásolni (pl. lokális fordított hexagonális fázis kialakításával), hogy a kevésbé hidrofób citoszólikus fehérjék képesek legyenek azon áthatolni (Killian és mtsai, 1990).

Hőmérsékletadaptáció és termotabilitás fotoszintetikus szervezetekben

A fotoszintetikus szervezetek termotoleranciája

Rendkívül sokféle környezeti hatás éri a növényeket életük során. Minden környezeti tényezőnek van egy maximum és egy minimum értéke amin túl az adott növény már nem képes életben maradni. Ezek a határok nem feltétlenül esnek egybe a károsodás küszöbértékeivel; szubletális körülmények szintén lehetnek károsak, különösen akkor ha ezek több napon keresztül folytatódnak, vagy ismétlődnek. Az egyik legfontosabb ilyen környezeti tényező a hőmérséklet. A különböző fajok és a fajokon belüli genotípusok termotoleranciája nagymértékben különbözhet és megfelel annak a környezetnek, ahol az adott genotípus kifejlődött. Az állatokkal ellentétben a növények nem képesek elrejtőzni vagy elmenekülni a

kedvezőtlen környezeti hatások elől vagy megváltoztatni hőmérsékletüket. Következésképpen, ha életben akarnak maradni, minden eszközzel alkalmazkodniuk kell környezetükhöz.

A növények különböző hőmérsékletekhez való alkalmazkodásának három szintjét különböztethetjük meg: (1) a rövidtávú adaptációt, ami akkor jelentkezik, amikor egy növény hirtelen magas vagy alacsony hőmérsékletnek van kitéve rövid ideig; (2) a hosszútávú adaptációt, amikor a különböző hőmérsékleteken nőtt genotípus új, termotoleranciában különböző fenotípusai jönnek létre; (3) és a genomiális adaptációt, mely során a hőmérsékleti körülmények hatására új genotípusok alakulnak ki (Davison, 1991).

Számos kísérlet igazolja, hogy a növényi életfolyamatok közül a fotoszintézis, egy tilakoid membránhoz kötött funkció, a legérzékenyebb a szervezetet ért magashőmérsékleti stresszre (Berry és Björkman, 1980). Ebből következően a növények hőstabilitásában elsődleges szerep jut a fotoszintetikus membrán stabilitásának.

A rövidtávú adaptáció során a membrán lipidösszetétele nem módosulhat számottevően, így jelentős szerephez juthatnak a hőstressz indukálta fehérjék, a hősokkproteinek (HSP), melyek részt vehetnek a membrán védelmében. Kimutatták a növényi sejt citoplazmájában szintetizálódó kis molekulatömegű HSP-k kloroplasztiszbba történő transzlokációját (Vierling és mtsai, 1989), ilyen HSP-nek a tilakoid membránhoz kötődését (Glaczinski és Koppstech, 1988), sőt e HSP hőstressz közbeni, fotoszintézist védő hatásáról is van adat (Schuster és mtsai, 1988). Ugyancsak ismertek bizonyos, a kloroplasztiszbban szintetizált, tilakoid membránhoz kötött HSP-k is (Krishnasamy és mtsai, 1988). Mindezzel együtt maguk a fehérjék, illetve azok pontos funkciója és lokalizációja még alig ismert.

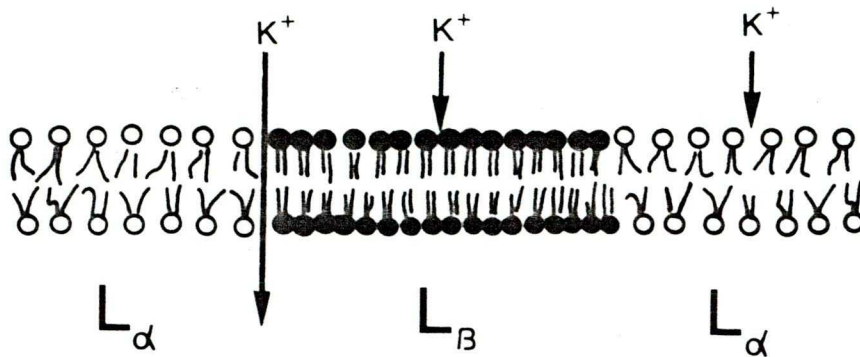
A tilakoid hosszútávú adaptációjával és hőstabilitásával foglalkozó kísérletek eredményét foglalja össze a következő fejezet.

Hőmérsékleti adaptáció a tilakoid membrán szintjén

A tilakoid membránt alkotó lipidek szerepe a hőmérsékleti adaptációban

A fotoszintetikus oxigén fejlődés általánosan előforduló biológiai folyamat az eukarióta algáknál, a magasabbrendű növényeknél és a prokarióták egy csoportjánál, a cianobaktériumoknál. A fény begyűjtése és a fotoszintetikus elektrontranszport a tilakoid membránokban zajlik, melyek a fotoszintetizáló szerevezetek membránjainak 60-80 %-át teszik ki, így az ezeket alkotó fehérjék és lipidek a természet leggyakrabban előforduló szerves összetevői. A tilakoidok lipidösszetétele nagyon sajátos. Az állatok, baktériumok és a növények nem fotoszintetikus membránjainak fő összetevői a foszfolipidek. A tilakoid membránok lipidjeinek zömét azonban két galaktolipid, a monogalaktozil-diacilglicerol (MGDG) és a digalaktozil-diacilglicerol (DGDG) alkotják. Az MGDG, az összes tilakoid lipid 50%-a, önmagában nem képes kettősréteget alkotni. Ez a tény meglepő azért, mert funkcióinak ellátásához a membránnak kettősréteg struktúrába kell szerveződnie. A fentiekén túl a tilakoidok tartalmaznak még szulfo-quinovosil-diacilglicerolt (SQDG) és foszfatidilglicerolt (PG). Felmerül a kérdés, hogy vajon mi a szerepe a tilakoidok sajátos lipidösszetételének? Hogyan vesznek részt az egyes lipidek a fotoszintetikus membrán hőmérsékletadaptációjában, van-e szerepük a termostabilitásban? Ezekre a kérdésekre számos kutatócsoport már régóta keresi a választ (Quinn, 1989).

Általánosan elfogadott, hogy a tilakoid lipidek magas telítetlenségi foka fontos tényezője a fotoszintézis alacsony hőmérsékleti stabilitásának. A növényeknek a növekedési hőmérsékletüktől eltérő hőmérsékletek stresszt jelentenek. A szélsőséges hőhatások a növények pusztulásához is vezethetnek.



2. Ábra. A membránok permeabilitásának fázisállapottól való függésének modellje.

A fagykárosodás kiváltó okát először Lyons (1973) és Raison (1973) próbálták meg a sejt membránjaiban bekövetkező változásokkal magyarázni. Mindkét kutató azt állította, hogy a hidegkárosodás a sejt membránjainak folyadékkristályosból gélbe történő fázistranzíciójával jár együtt. A gél fázisú membrán "hibái" miatt megnő annak permeabilitása az ionok és molekulák számára (2. ábra).

Lyons eredeti elméletének jelenlegi verzióját kloroplasztisz membránokra vonatkozóan Murata és munkatársai alkották meg (Murata és Yamaya, 1984). Elméletük szerint a fagyérzékeny növények tilakoidjában a PG magas olvadáspontú zsírsavspeciesszei segítik elő a gél fázis kialakulását alacsony hőmérsékleteken. Számos kutatócsoport talált pozitív korrelációt a fagyérzékenység és a magas olvadáspontú lipid zsírsavspeciesszek mennyisége között. Mások azonban ezt az összefüggést nem találták meg, és megkérdőjelezték az elmélet általánosságát (Wilson és Crawford, 1974; Kenrick és Bishop, 1986). Egyes vizsgálatok során

nem találtak kapcsolatot a hidegstressz és a tilakoidból izolált poláros lipid extrakt fázisállapota között (Low és mtsai, 1984). Egy friss összefoglaló tanulmányban Somerville és Browse egyenesen arra a következtetésre jutottak, hogy a lipid telítetlenség nem indokolhatja a növények természetben előforduló hidegérzékenységet (Somerville és Browse, 1991). Egy sokkal közvetlenebb kapcsolatot mutattak ki a gél fázis kialakulása és a sejt pusztulása között cianobaktériumokban (lásd a cianobaktériumokról szóló fejezetet).

A tilakoid lipidek zsírsavalkilláncainak mozgékonyága alacsony hőmérsékletek hatására csökken. Ez a mobilis elektronszállító plasztokinon (PQ) diffúzióját a membránban akadályozhatja, ami a fotoszintetikus elektrontranszport működését gátolja (Oquist, 1982). Gombos és mtsai (1988) viszont bizonyítékot találtak arra vonatkozóan, hogy a plasztokinonok két fotoszisztéma közötti diffúziójának sebessége a mátrix-lipidek mikroviszkozitásától független abban a fluiditás tartományban, amely a fotoszintetikus szervezetek környezeti hőmérsékletének valószínűsíthető ingadozása alapján elképzelhető.

A növények adaptív válasza alacsony hőmérsékleteken a membránok mikroviszkozitását csökkenti (a zsírsavtelítetlenség növelésével), ellensúlyozva az alacsony hőmérsékletek által okozott fluiditás csökkenést (Raison, 1973). Számos kísérlet támasztja alá ennek az állításnak a helyességét, azonban olyan kísérleti eredmények is megjelentek, melyek nem találtak összefüggést a zsírsavtelítetlenség és az aktuális túlélési hőmérséklet között (Hellergen és mtsai, 1984).

A membránokban hőmérsékletváltozás hatására bekövetkezhetnek más változások is. Módosulhat a foszfolipid összetétel (Horváth és mtsai, 1981), galaktolipid összetétel (Vígh és mtsai, 1985a), a zsírsavak pozícionális eloszlása (Watanabe és mtsai, 1981) és változhat a membrán egyéb összetevőinek aránya is (Lynch és Steponkus, 1987).

A tilakoid membránok magashőmérsékletek hatására bekövetkező változásairól viszonylag kevés adat áll rendelkezésre. Bizonyítottnak látszik, hogy az MGDG telítetlensége

fontos szerepet játszik a tilakoid hőérzékenységében. 40-50°C-os hőmérsékleti stressz okozhatja a klorofill-protein komplexek irreverzibilis denaturációját (Cramer és mtsai, 1981), a fotoszintetikus oxigén fejlődés, a PSII aktivitás és a fotofoszforiláció csökkenését (Thomas és mtsai, 1986a). Magas hőmérséklet kiválthatja a tilakoid gránum régió szétesését, a lipidek fázisszeeparációját és fordított hexagonális fázis kialakulását (Gounaris és mtsai, 1983). A tilakoid lipidek *in vivo* hidrogénezésével bizonyították a zsírsavtelítettség szerepét a PSII aktivitás védelmében és a fordított hexagonális fázis kialakulása lehetőségének csökkentésében magashőmérsékleteken (Vígh és mtsai, 1989; Thomas és mtsai, 1986b). A zsírsavtelítettség adaptív szerepét bizonyítja az is, hogy az *Arabidopsis thaliana* telítetlen zsírsavhiányos mutáns változatainak hőstabilitása megnőtt a telítetlenebb vad típushoz képest (Somerville és Browse, 1991).

A tilakoid fluiditásának módosítása

Ismeretes, hogy néhány kutatócsoport megkísérelte *in vivo* megváltoztatni a tilakoid fluiditását. Árpa hajtások lipid telítetlensége jelentősen csökkent egy piridazinon származék, a SAN 9785 kezelés hatására. A zsírsavtelítettség növekedése a fotoszintetikus aktivitás csökkenését okozta. Az izolált lipidekből készített liposzómákon DPH fluoreszcencia anizotrópiával mért fluiditás azonban nem változott számottevően (Laskay és Lehoczki, 1986). A Vígh László és Joó Ferenc (1983) által kidolgozott vízoldékony, eltávolítható katalizátorral végezhető homogén katalitikus hidrogénezés lehetővé tette a biológiai membránok *in vitro* és *in vivo* hidrogénezését. A borsó tilakoidokon végzett kísérletek azt mutatták, hogy a tilakoid membrán 10%-os hidrogénezése gátolta az elektrontranszportot a PSII és a PSI között. További hidrogénezés hatására csökkent a PSII aktivitása, a PSI aktivitása azonban a

kettőskötéstartalom 50%-os csökkenéséig nem változott jelentősen (Vígh és mtsai, 1985b; Horváth és mtsai 1986). A katalizátor bizonyítottan nem lépett kölcsönhatásba az antenna komplexszekkel és reakció központokkal (Horváth és mtsai, 1986), klorofilokkal, karotenoidokkal és a plasztokinonnal (Szalontai és mtsai, 1986). A zsírsavtelítés elektrontranszport blokkoló hatását nem a tilakoid membrán "átlagfluiditásának" módosulásával, hanem a PSII mikro környezetében specifikus lipid-fehérje kölcsönhatás változásokkal magyarázták (Gombos és mtsai, 1988). 10%-os hidrogénezés után, amikor a teljes elektrontranszport aktivitása 30%-kal csökkent, az ESR technikával 12-SASL próbát alkalmazva mért rendparaméter nem nőtt, hanem csökkent (Vígh és mtsai, 1985). 40%-os hidrogénezés után 16-SASL spin próbával mért rotációs korrelációs idő csak nagyon kis növekedést mutatott (Horváth és mtsai, 1986). Ez a megfigyelés jó összhangban van azzal, hogy a DGDG kettőskötés tartalmának csökkenése nem okoz jelentős fluiditás csökkenést a membránok hidrofób régiójában az alkalmazott mérési eljárások szerint (Koole és mtsai, 1984).

Fehérjék hatása a tilakoid membrán fluiditására

A fenti eredmények közvetve azt is igazolják, hogy a zsírsavtelítetlenség nem az egyetlen tényező, ami befolyásolhatja a tilakoid membrán fluiditását. Ezt a tételt támasztják alá azok a kísérletek, melyek a tilakoid lipidekből rekonstruált liposzómák fluiditását hasonlították össze az intakt tilakoiddel. Kimutatták, hogy a tilakoid mikroviszkozitása nagyobb, mint az izolált lipideké (Ford és Barber, 1983). A fehérjék fluiditást csökkentő hatását támasztja alá, hogy a sztróma tilakoid fluiditása nagyobb, mint a gránum tilakoidé, ugyanis a sztróma tilakoidban a fehérje/lipid arány kisebb, de a lipidek telítetlensége megegyezik a gránum

régióival (Murphy és Woodrow, 1983). Spin jelölt PC, PG és MGDG lipidekkel végzett ESR mérések szerint a PSII gazdag membránrégióban a rotációs korrelációs idő szintje lényegesen alacsonyabb az L_{α} fázisú tiszta lipid membránhoz viszonyítva. Néhány esetben azt tapasztalták, hogy a növények alacsony hőmérséklet adaptáció során tilakoidjuk fluiditását a protein/lipid arány csökkentésével állítják be inkább, mint a zsírsavtelítettség módosításával (Chapman és mtsai, 1983). Ezt igazolja az az ESR vizsgálat is, melyben alacsony hőmérsékletre adaptálódott *Synechococcus sp.* tilakoid membrán fluiditását és összetételét hasonlították össze. Nem találtak szoros összefüggést az alacsony hőmérsékletek esetén megnövekedett zsírsavtelítetlenség és a tilakoid fluiditása között (Miller és mtsai, 1988). *Arabidopsis thaliana* fadC mutánsának tilakoidjában 50%-kal kisebb a kétszeresen ill. háromszorosan telítetlen zsírsavak aránya. Ezzel szemben a protein/lipid arány 30%-kal csökkent. Ezen változások mellett a teljes fotoszintetikus elektrontranszport lánc és a PSI aktivitása változatlan maradt, amíg a PSII aktivitása 20%-kal csökkent (Hugly és mtsai, 1989). *Anacystis nidulans* sejtek nitrátéheztetése fordított eredményre vezetett. A nitrátmentes közegben növesztett sejtek plazmamembránjában a protein/lipid arány jelentősen csökkent, ugyanakkor a membrán mikroviszkozitása nem változott. Ezt a lipidek zsírsavalkilláncainak egyidejűleg megnövekedett telítettsége okozta (Gombos és mtsai, 1987). E kísérletek a lipidtelítettség és a fehérje/lipid arány komplement változtatásának lehetőségét vetik fel az adaptáció során.

Összefoglalva: csak néhány organizmusban és talán csak specifikus membrán rendszerekben tekinthető a zsírsavtelítetlenség elsődleges válasznak alacsony hőmérséklet adaptáció során. Amint láttuk, még ha a telítetlenség szintje növekszik, akkor sem biztos, hogy növekszik a membrán fluiditása. A tilakoid lipidek lehetnek erősen telítetlenek, ami elősegítheti a PQ gyors diffúzióját, de jelentős rigidizáló tényezőt jelent a tilakoid membrán magas fehérje tartalma. Egy bizonyos *cisz* kettőskötés szint biztosíthatja, hogy a membrán a

folyadékkristályos állapotban legyen, ám magas hőmérsékletek esetén ez a tilakoid instabilitásához vezethet, amikor is a telítetlen MGDG molekulák fordított hexagonális fázis kialakulását idézhetik elő.

Fehérje-lipid kölcsönhatások tilakoid membránban

A tilakoid lipidek zsírsavspecieszeinek rendkívül heterogén előfordulása számos kutatócsoport figyelmét irányította membránfehérjék és lipidek közötti specifikus kölcsönhatások keresésére. A fehérjékhez asszociált, "kötött" lipidek a membránfehérjék szerkezetének stabilizálásában vehetnek részt, vagy funkcionális fehérje-lipid komplexek létrejöttét segíthetik elő (Murphy, 1986). ESR vizsgálatok szerint a spin jelölt PG nagyobb arányban kötődik a fehérjékhez a tilakoidban ill. PSII és PSI gazdag membrán frakciókban, mint a spin jelölt PC és MGDG (Li és mtsai, 1989). Ez a PG specifikus asszociációját jelentheti mindkét fotoszisztémához.

Számos vizsgálat foglalkozott azzal, hogy mely lipidek maradnak együtt a tilakoid membránból izolált fehérjékkel ill. pigment-fehérje komplexekkel az izolálási eljárás során. Az eredmények - valószínűleg a tisztítási metodikák különbségei miatt - sokszor ellentmondanak egymásnak. Murata és mtsai azt találták, hogy a PSII komplexszel sok PG és valamennyi MGDG izolálható, míg egyáltalán nem található benne SQDG és PC. A kötött lipidek sokkal telítettebbek voltak, mint a membrán átlagos telítettsége (Murata és mtsai, 1990). A negatív töltésű SQDG spinót és *Dunaliella salina* esetén a CF₀-CF₁ komplexhez kötődött, és *in vitro* növelte az enzim aktivitását (Pick és mtsai, 1985). A fenti eredményekkel ellentmondásban más munkacsoportok az SQDG-t majdnem az összes fő pigment-protein

komplexszel együtt tisztíthatónak találták. A DGDG különböző fehérjekomplexszekkel való együtt tisztíthatóságára vonatkozóan az irodalomban nem található adat.

A membránok permeabilitását jelentősen módosíthatják a fehérjék és a lipidek kapcsolódásánál esetlegesen előforduló szerkezeti hibák. Ezt a feltevést támasztja alá pl. citokróm oxidáz rekonstitúciója különböző összetételű liposzómákban (Madden és mtsai, 1983). A tilakoid membránban az MGDG egyik lehetséges szerepe lehet, hogy ilyen nem specifikus membrán permeabilitást gátoljon a nagy pigment-protein komplexek közelében (Murphy, 1986). E modell érdekessége, hogy megengedi az MGDG molekulák nem-kettősrétegbe való szerveződését "normál" körülmények között.

A fotoszintetikus elektrontranszport hőstabilitása

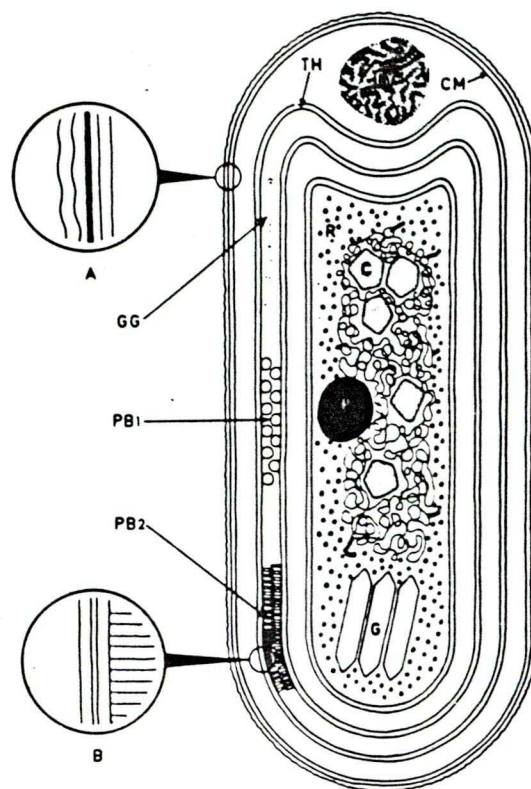
A magashőmérsékleti stressz drámai hatással van mind a fotoszintetikus aktivitásra mind a fotoszintetikus membrán szerkezetére. Magasabbrendű növények leveleinek, vagy izolált kloroplasztiszainak 35-45°C-on történő inkubációja a fotoszintetikus oxigénfejlődés, a széndioxid fixáció és a fotofoszforiláció jelentős csökkenését eredményezi (Berry és Björkman, 1980). Levél protoplaszton (Thebud és Santarius, 1982) és intakt kloroplasztokon (Kraus és Santarius, 1975) végzett vizsgálatok azt mutatják, hogy a fotoszintetikus hőinaktiváció kimutathatóan alacsonyabb hőmérsékleteken következik be, mint a sejt plazmamembránjának vagy a kloroplaszt "envelope"-jének dezintegrációja vagy a fotoszintézis kulcsenzimeinek termikus denaturációja (Santarius, 1976). Ez arra utal, hogy az elsődleges károsodást magashőmérséklet stressz közben a tilakoid membrán szenved el.

A II. fotoszisztémán (PSII) keresztüli elektrotranszport különösen érzékeny magas hőmérsékletekre. Kezdetben úgy gondolták, hogy a primér károsodás helye az oxigén fejlesztő

apparátus. Azonban helyettesítő elektron donorok (pl. difenilkarbazid) segítségével az elektrontranszport csak kis mértékben volt helyreállítható hőstressznek kitett kloroplaszt esetén, ami a PSII szerkezeti károsodását jelentheti (Gounaris és mtsai, 1983). A klorofill *a* fluoreszcenciájának hőmérséklet függése arra a következtetésre vezetett, hogy a hőmérséklet emelkedése először a PSII reakció központot gátolta, majd az antenna pigment-protein komplexek és a PSII fénybegyűjtő apparátus központi magjának disszocióját idézte elő (Schreiber és Armond, 1978). E következtetés helytállóságát bizonyítják növényi kloroplaszt fagyasztva töréses elektronmikroszkópiás vizsgálatai is. Hőstressz közben a gránum régió elveszti integritását, változik a PSII-re utaló intramembrános részecskék mérete és eloszlása (Gounaris és mtsai, 1984). Gounaris és mtsai azt javasolták, hogy ezen disszociációs jelenségek kapcsolatba hozhatók a nem kettősréteget alkotó lipidek szeparációjával és fordított hexagonális fázisállapotok létrejöttével, melyek észlelhetők is magashőmérsékleteken kloroplaszt tilakoid membránban (Gounaris és mtsai, 1983). Az I. fotoszisztéma (PSI) hőstabilitása minden esetben nagyobb a PSII-énél (Thomas és mtsai, 1986).

Cianobaktériumok hőmérsékletadaptációja

A cianobaktériumok a Gram-negatív baktériumok családjába tartoznak. Sejtjeiket egy kettős membrán határolja, a külső és a plazma (belső) membrán. E kettős membránrendszer által határolt intracelluláris térben található a körkörösen futó tilakoid membránok (3. ábra). A cianobakteriális sejt membránszerkezete hasonló a magasabbrendű növények kloroplasztiszához. A tilakoid membránok tartalmazznak klorofill *a*-t és β -karotint. A magasabb rendű növényektől eltérően a fotoszintézishez szükséges fény begyűjtését nem integráns membránfehérje komplexek (fénybegyűjtő komplexek), hanem a fikobiliszómák végzik.



3. Ábra. A cianobakteriális sejt vázlatos rajza (Stainer, 1988). CM: sejt membrán; TH: tilakoid membrán; PB1 és PB2: fikobiliszóma szemből és oldalnézetben; GG: keményítő granulum; C: a nukleoplazma által körülvevett karboxiszóma; R: riboszóma; G: gáz vezikulum. A: a sejtmembrán kinagyított részlete a külső membránnal, a peptidoglikán sejtfallal és a belső vagy citoplazmás membránnal. B: a tilakoid membrán kinagyított részlete a két tilakoid közti lumennel és a tilakoid felszínén elhelyezkedő fikobiliszómákkal.

A tilakoid membránokban zajlik le mind a fotoszintetikus, mind a légzési elektron transzport.

A plazmamembrán és a külső membrán tartalmaz még xantofillokat, de nem tartalmaznak klorofill a -t és β -karotint.

Az alacsony hőmérsékletek hatását a lipidösszetételre, a membránfluiditásra és a különböző élettani folyamatokra eddig csak néhány cianobakteriális rendszerben vizsgálták (*Anacystis*

nidulans, *Anabaena variabilis*, *Synechococcus lividus*, *Synechocystis* PCC 6803) (összefoglaló: Murata, 1989).

A cianobaktériumok membránjait alkotó négy fő glicerolipid az MGDG (50-60%), DGDG (10-20%), SQDG (10-20%) és a PG (10-20%). A tilakoid, a plazma ill. a külső membrán lipidösszetételében *A.nidulans* esetén nem találtak szignifikáns különbséget. A relatív szárazsúlyban mért lipidtartalom a tilakoidokban 19%, a plazmamembránban 57%, a külső membránban 3 % volt. A cianobakteriális lipidek zsírsavösszetételének fő komponensei a palmitinsav (16:0), palmitoleilsav (16:1), hexadekadiénsav (16:2), sztearinsav (18:0), olajsav (18:1), linolsav (18:2), α -linolénsav (18:3 (9,12,15)), γ -linolénsav (18:3 (6,9,12)) és az ω -3,6,9,12-oktadekatetraén sav (18:4). Ezen belül a különböző törzsek esetén kisebb nagyobb eltérések mutatkoznak. Az *A.nidulans* és a *S.lividus* csupán telített és egyszeresen telítetlen zsírsavakat tartalmaznak. Az *Anabaena variabilis* ezeken kívül még tartalmaz 18:2 és α -18:3-at, a *Synechocystis* PCC 6803-ban pedig az előbbieken túl még található γ -18:3 és 18:4 is (Kenyon és mtsai, 1972).

Murata és munkatársai a zsírsavtelítettség és a környezeti hőmérséklet kapcsolatát több cianobaktérium esetén vizsgálták. *Anabaena variabilis* esetén kimutatták, hogy a 22°C-on nőtt sejtek összes lipidosztályában csökkent az olajsav és nőtt a linolénsav tartalom a 38°C-on tenyésztett sejtekhez viszonyítva. Amikor a 38°C-on tenyésztett sejtek környezeti hőmérsékletét hirtelen 22°C-ra csökkentették a összes lipidemennyiség nem változott 10 óra alatt, de a monogalaktozil-diacylglicerolban a 16:0 szintje csökkent és ezzel egyidőben nőtt a 16:1 tartalom. Ahogy a lipidszintézis újra beindult, a 16:0 és a 16:1 tartalom lassan visszatért a hőmérsékletkezelés előtti szintre. A kettőskötés gyors és átmeneti megjelenése a 16:0-ban, ami az MGDG *sn*-2 pozíciójában található, tekinthető egy vészreakciónak ami arra hivatott, hogy az alacsony hőmérséklet által csökkentett fluiditást kompenzálja. Ez a deszaturáció nem igényelte a zsírsavak *de novo* szintézisét. A 18:1 és 18:2 tartalom

csökkenése ill. a 18:3 tartalom emelkedése, mely zsírsavak a lipidek *sn*-1 pozíciójában található, hosszabb időt vett igénybe (Sato és Murata, 1980).

Amikor *Anacystis nidulans* sejteket 0°C-on inkubáltak, azok elvesztették élettani aktivitásukat, majd elpusztultak. Az alacsonyhőmérsékleti károsodást a plazmamembrán lipidjeinek fázistranzíciója indította. A tilakoid membrán fázistranzíciója, ami a plazmamembránénál magasabb hőmérsékleten következett be, csupán a fotoszintetikus aktivitás reverzibilis elvesztését eredményezte. Ezen vizsgálatok alapján írták le a következő modellt (Murata, 1989). A plazmamembrán és a tilakoid membránok határt jelentenek az ionok és molekulák számára. A növekedési hőmérsékleten mind a plazmamembrán, mind a tilakoid membránok folyadékkristályos állapotban vannak, és áthatolhatatlanok az ionok és molekulák számára. A hőmérséklet csökkentésével a tilakoid membrán fázisszeparált állapotba kerül, benne gél fázis alakul ki és átjárhatóvá válik az ionok számára. Ezen körülmények között a fotoszintetikus aktivitás reverzibilisen csökken. A hőmérséklet további csökkenése esetén a plazmamembrán is fázisszeparált állapotba kerül és permeábilissá válik, és a citoplazma és a környezet között az ionok, és kisebb molekulák szabadon áramolhatnak, ami végül a sejt pusztulásához vezet (Murata, 1989). A modell helyességét Vígh László és munkatársai is alátámasztották, akik homogén katalitikus hidrogénezéssel szelektíven csökkentették a plazmamembrán telítetlenségét. A telítettség növekedése, a plazmamembrán fázisátalakulási hőmérséklete, a K⁺ kifolyás és a fotoszintézis irreverzibilis károsodása szoros párhuzamot mutatott (Vigh és mtsai, 1985c). A zsírsavtelítetlenség fagyérzékenységben betöltött szerepének további bizonyítékát adta az a kísérlet, melyben *Anacystis nidulans* sejteket transzformáltak *Synechocystis* Δ 12-deszaturáz génnel és a sejtek hidegérzékenysége szignifikánsan csökkent (Wada és mtsai, 1990).

A zsírsavtelítetlenségnek a magashőmérséklet adaptációban betöltött szerepéről cianobakteriális rendszerekben hasonlóan a magasabbrendű növényekhez csak nagyon kevés

adat áll rendelkezésre. *Synechocystis* PCC 6803 vad, Fad12 és Fad12/*desA* mutáns sejtvonalaiknak magashőmérséklet stabilitását összehasonlítva azt a meglepő eredményt kapták, hogy a különböző sejtvonalak fotoszintetikus aktivitásának hőmérsékletfüggése, azaz hőstabilitása ill. a PSI és PSII aktivitásban nem mutattak mérhető különbséget annak ellenére, hogy zsírsavtelítetlenségi szintjük jelentős különbségeket mutatott. Arra a következtetésre jutottak, hogy a tilakoid membránt alkotó lipidek kétszeresen ill. háromszorosan telítetlen zsírsavspeciesszei nem játszanak jelentős szerepet a mért fotoszintetikus folyamatok hőstabilitásában (Gombos, 1991).

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Tenyésztési körülmények

A *Synechocystis* PCC 6803 vad ill. Fad6/*desA*- sejt vonalakat Wada és mtsai által leírtak szerint tenyésztettük (Wada és Murata, 1990). A sejteket BG-11 folyadékkultúrában (Allen, 1968) fotoautotróf körülmények között $70 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ erősségű fehér fény megvilágítás mellett neveltük. A tenyészeteket 1% CO_2 -t tartalmazó steril levegővel buborékoltattuk. A tenyésztés hőmérséklete az adaptációs kísérleteknél 22°C , ill. 36°C volt. A sejtek növekedését a 800nm-en mért abszorpció változásával követtük és exponenciális növekedési szakaszukban ($\text{OD}_{800}=0.5-1.0$) használtuk fel azokat az adott kísérlet céljára.

Tilakoid membrán izolálása *Synechocystis* PCC 6803 -ból

A sejteket 7000 g-s, 10 perces centrifugálással gyűjtöttük, majd 50 mM HEPES-NaOH ($\text{pH}=7.0$), 30 mM CaCl_2 , 0.8 M Szorbitol pufferben (izoláló puffer) vettük fel. Ezután végig ezt a puffert használtuk. A kapott sejtuszpenziót egy órán keresztül jégben, sötétben inkubáltuk. Az ezt követő izolálási lépéseket 4°C -on végeztük. A sejtek feltörése üveggyöngyös technikával történt (Pakrasi és mtsai, 1989). Normál kémcsőben a szuszpenzióval megegyező térfogatú 0.1mm átmérőjű üveggyöngyöt kevertünk össze, majd sötétben 3x3 perces vortexszeléssel (két vortexszelés között 3 percig jégen hűtve) végeztük a sejtek feltárását. Az üveggyöngyök eltávolítása után a sejttörmeléktől és a feltáratlan sejtektől 7000 g-s, 10 perces centrifugálással szabadultunk meg. A felülúszót óvatosan



leszítettük, majd 27.000 g-s 30 perces centrifugálás üledékeként nyertük a tilakoid membránban gazdag frakciót. Az üledéket minimális mennyiségű izoláló pufferben vettük fel.

A klorofill meghatározást minden esetben spektrofotometriás módszerrel végeztük, 90%-os acetonos kivonattal (Arnon, 1949).

50 μ l tilakoid szuszpenzióhoz 3 ml 90%-os acetont adtunk, majd a csapadéktól 2000 g-s 5 perces centrifugálással szabadultunk meg. A tiszta, klorofillt tartalmazó felülúszó abszorpcióját mértük 664 nm-nél.

$$OD_{664} \cdot 12.19 = \mu\text{g chl} / \text{ml}$$

Fotoszintetikus aktivitás mérése

A fotoszintézis hőinaktivációjának követésére a fény indukálta oxigén fejlődést mértük Clark típusú oxigén elektróddal. Az oxigénfejlődés mérést intakt sejteken végeztük kúlsőleg adott elektron donor és akceptor nélkül. Az öszsagyűjtött sejteket kétszer 50mM Tricine-NaOH (pH 7.5) pufferrel mostuk, majd ugyanebben a pufferben felszuszpendáltuk a mérés előtt. A megvilágító fényt izzólámpa szolgáltatva kiegészítve egy vörös optikai szűróvel (VR620, Hoya Glass Co., Tokyo). A megvilágítás erőssége $3.5 \text{ mEm}^{-2}\text{s}^{-1}$ volt. A mérés előtt a sejteket sötétben 60 percig inkubáltuk az adott hőmérsékleten, majd a sejtsuszpenzió koncentrációját 15 $\mu\text{g Chl/ml}$ -re állítottuk be. Az oxigénfejlődést minden esetben 22°C-on mértük (Gombos és mtsai, 1991).

Az intakt sejtek PSII aktivitásának mérésénél az elektrontranszport nagyságát mértük a H_2O -tól 1,4-benzokinonig. A mérésnél 1.0mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ és 1.0 mM 1,4-benzokinon volt jelen a sejtsuszpenzióban.

Gélelektroforézis, fehérje mennyiség mérés

Kétdimenziós SDS-poliakrilamid gélelektroforézis

A 36°C-on nevelt *Synechocystis* PCC 6803 tenyészetet 42°C-on 3 órán keresztül hő sokknak tettük ki. Ezt követően tilakoidot izoláltunk. A tilakoid izoláló médium ebben az esetben a következő összetételű volt: 10mM TES-NaOH, 10mM MgCl₂ + proteáz gátlók (1mM PMSF, 1mM benzamidin, 1 mM ε-amino-kapronsav).

A nem denaturáló gélelektroforézis körülményei (O'Farrel, 1975): 50-50μg fehérjét tartalmazó tilakoid szuszpenziót 50-50μl O'Farrell-féle mintapufferben szobahőmérsékleten 2 óráig inkubáltuk.

Az első dimenzióhoz használt poliakrilamid-gél 2% amfolitot tartalmazott a következő arányban: Pharmalyte pH 5-8 : Pharmalyte pH 3-10 = 4:1. A negatív elektród puffere: 0.02M NaOH. A pozitív elektród puffere: 0.01M foszforsav. A mintát először 18 órán át 300V-on, majd 4 órán át 400V-on futtattuk az egyensúlyi állapot eléréséig. Ezt követően a géleket SDS-merkaptotanol tartalmú oldatban szobahőmérsékleten ekvilibráltuk 30 percig, majd -20°C-on tároltuk.

Második dimenzióban 8-16.5%-os grádiens SDS gélelektroforézist használtunk. A gélek fehérjemintázatát ezüst-festéssel tettük láthatóvá.

Fehérje mennyiség mérése

A fehérje/lipid arány meghatározásánál a fehérjetartalmat Lowry módszere szerint mértük (Peterson, 1977) SIGMA Lowry reagensek felhasználásával.

Lipid és zsírsavanalízis

Lipid extrakció és elválasztás

A lipideket Bligh és Dyer (1959) által leírt módon kloroform és metanol 1:2 arányú elegyével nyertük ki a sejtekből. A lipidek analízisét és lipidosztályokra történő elválasztását a Sato és Murata (1988) által közölt eljárás alapján végeztük. A szilikagél vékonyrétegen (Merck 5721) való azonosítás során a futtató közeg kloroform, metanol és 28%-os ammonium-hidroxid (65:35:5) elegye volt.

Az egyes lipidek mennyiségi meghatározását két lépésben végeztük. A vékonyrétegen történő szétválasztás után a foltokat ANS-sel előhívtuk, 17:0 belső sztenderdet cseppentettünk azokra, majd ampullákba kapartuk, metileztük és a zsírsavakat gázkromatografáltuk. A komplex lipidek mennyiségét az átlagos móltömegük alapján számoltuk.

Zsírsavanalízis

A gázkromatográfiás vizsgálatokhoz a zsírsavak metilésztereit használtuk. A bepárolt összlipidekre ill. előzőleg elválasztott és ampullákba kapart komplex lipid foltokra mintánként 3 ml 5% cc. sósavat tartalmazó metanolt öntöttünk, széndioxiddal lefuvattuk és leforrasztottuk. 2 óráig 80°C-on történő inkubáció után az ampullákat feltörtük, tartalmukat kémcsövekbe vittük. 6ml víz és 3 ml petroléter hozzáadása és rázás után megvártuk a fázisok szétválását. A petroléteres fázist N₂-nel szárazra pároltuk, majd benzolban vettük fel. A metilészter törzsoldatból 1-2 µl-t gázkromatografáltunk, 30m-es SP2330 kapilláris oszloppal felszerelt Jeol JGC-20K készüléket használva. Az oszlop és láng-ionizációs detektor hőmérséklete 180°C ill. 260°C volt. Az egyes kromatográfiás csúcsok azonosítását

sztenderdekkel ill. a retenciós idők alapján végeztük. Mennyiségi meghatározásukhoz 17:0 belső sztenderdet használtunk, a csúcsok alatti területek meghatározását elektronikus integrátor (HP 3394A) segítségével végeztük.

A zsírsavak meghatározásának hibája 2.5% alatt volt a fő komponensek ill. 5% az egyéb komponensek esetében.

Homogén katalitikus hidrogénezés

A frissen izolált tilakoidok lipidjeinek homogén katalitikus hidrogénezését hidrogén atmoszférában végeztük. A homogén hidrogénező katalizátor a palládium szulfonált alizerin komplexe ($\text{Pd}(\text{QS})_2$) volt (Vígh és mtsai, 1985b).

A katalizátort 5mg/ml koncentrációban 10mM Na-foszfát pufferben (pH 6.5) előaktiváltuk (Joó és mtsai, 1991): Vákuum, majd H_2 alá helyeztük. Ezt a műveletet háromszor ismételtük meg. Az eredetileg lila színű katalizátor oldatot addig tartottuk H_2 atmoszféra alatt, míg színe barnává nem vált. Ezután levegőn ráztuk. Rázás után az oldat lilás-vörös volt. Ezt az aktivált katalizátor-formát (B-forma) használtuk a további lépések során (az így nyert katalizátor aktivitását egy napig megőrizte).

A hidrogénező médium 10 mM TES-NaOH pH 7.0 volt. Az eredetileg 1mg klorofill/ml koncentrációjú tömény tilakoid szuszpenziót $3\mu\text{g}$ klorofill/ml koncentrációra hígítottuk, majd ezt a tilakoid szuszpenziót speciális hidrogénező csőbe töltöttük. A mintát vákuum, majd H_2 alá helyeztük háromszor 15-15s-ig. A H_2 atmoszféra alatt lévő szuszpenzióhoz szeptumon keresztül fecskendeztük az aktivált tömény katalizátor oldatot úgy, hogy a katalizátor koncentrációja a tilakoid szuszpenzióban 0.1mg/ml legyen. A reakciót ezzel indítottuk, majd jégen kevertetve 1.5 percig folytattuk. Ezután a csövet felnyitottuk, és

levegőn ráztuk addig, amíg a szuszpenzió színe lilás-vörös nem lett, ami a reakció leállítását jelentette. Ezután a tilakoidot háromszor mostuk az ESR jelölő pufferben.

Klorofill és allofikocianin fluoreszcencia hőmérsékletfüggésének mérése

A klorofill és allofikocianin fluoreszcenciájának mérését egész sejteken BG 11 tápoldatban végeztük. A sejtsuszpenzió koncentrációja $10 \mu\text{g Chla/ml}$ volt. A fluoreszcencia mérését egy PTI LS00 (Photon Technology International Corp. London, Canada) lumineszcencia spektrofotométerrel végeztük. A hőmérséklet szabályozása átfolyós külső keringetés segítségével történt. A sejtsuszpenzió aktuális hőmérsékletét a küvettába helyezett termopárral mértük. A réseket minden esetben 4nm szélességűnek választottuk. A gerjesztő fény hullámhossza APC fluoreszcencia mérése esetén 620 nm , klorofill fluoreszcencia mérésnél 435 nm volt. Az emittált fény intenzitását az első esetben 658 nm -nél, a második esetben pedig 680nm -nél mértük. A különböző sejtvonalak fluoreszcenciájának hőmérsékletfüggését egyidőben vettük fel, amit az automatikus mintacsere tett lehetővé.

Fluiditás mérés fluoreszcencia anizotrópiával

Membránfluiditás

A tilakoid membrán "átlagos" fluiditását DPH fluoreszcencia anizotrópiájának mérésével határoztuk meg (Barber és mtsai, 1984). Jelölés: $50\mu\text{g}$ klorofill/ml tilakoid szuszpenzióhoz (tilakoid izoláló médiumban) tömény DPH (SIGMA) oldatot (2mM DPH tetrahydrofuranban) adtunk úgy, hogy a DPH koncentrációja $5\mu\text{M}$ legyen. Ezután a szuszpenziót 40 percig sötétben szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd $10\mu\text{g}$ klorofill/ml -re

hígítottuk tilakoid izoláló pufferrel. A fluoreszcencia anizotrópia mérését egy anizotrópia mérésre átalakított Hitachi MPF-2A típusú fluoriméterrel végeztük. Egy ZX SPECTRUM típusú számítógép AD konverter segítségével mérte a fluoreszcencia intenzitást és szabályozta egy Peltier elemen keresztül a kuvetta hőmérsékletét. Azért, hogy a minta át tudja venni a mintatartó hőmérsékletét, lépcsős fűtést alkalmaztunk. A mintát a kívánt hőmérsékleten 2 percre inkubáltuk. Ennyi idő elegendő volt ahhoz, hogy a minta felvegye környezete hőmérsékletét. Erről ellenőrző mérésekkel győződünk meg. A mintát mágneses keverővel kevertettük. A mérések során a gerjesztő fény hullámhossza 360 nm volt 20 nm résszélesség mellett. Az emittált fény intenzitását 460 nm-en detektáltuk 20 nm résszélességgel. A gerjesztő fényt polarizációs szűrő segítségével polarizáltuk, és a fluoreszcencia gerjesztő fény polarizációjának irányára merőleges ill. párhuzamos összetevőjét az adott hőmérsékleten egymás után mértük. A mért fluoreszcencia intenzitást a jelöletlen minta háttérével korrigáltuk. Az anizotrópiát Barber és mtsai (1984) alapján számoltuk.

A tilakoidból izolált lipidekből liposzómákat készítettünk. 300 μg lipidet 3 ml CHCl_3 -ban vettünk fel, majd N_2 alatt 10ml-es szonikáló cső aljára bepároltuk. A száraz lipid filmre 4 ml tilakoid izoláló médiumot és 10 μl DPH törzsoldatot (0.2mM DPH tetrahidrofuránban) mértünk. Ezt a lipid szuszpenziót jégen 3x20 s-ig szonikáltuk ... szonikátorral. A kapott liposzóma szuszpenziót 40 percre sötétben szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd a DPH fluoreszcencia anizotrópiáját a hőmérséklet függvényében a fent leírt módon mértük.

Fluiditás grádiens

A tilakoid fluiditás grádiensét különböző mélységekben jelölt anthroyloxy zsírsav fluoreszcens próbák (2-AS, 6-AS, 9-AS, 12-AS, 16-AP; Molecular Probes (Eugene, Oregon)) fluoreszcencia anizotrópiájának segítségével határoztuk meg (Thulborn és mtsai, 1979). A

jelölést és a mérést a DPH fluoreszcencia anizotrópiájának mérésénél leírtak szerint végeztük a következő eltérésekkel: A mérést állandó hőmérsékleten végeztük (36°C). A jelölt mintákat 10 percig 36°C-on előinkubáltuk. A gerjesztő fény hullámhossza 380nm volt.

Lipid-fehérje kölcsönhatás mérése ESR spektroszkópiával

Az izolált tilakoidokat centrifugálással összegyűjtöttük, majd 10mM TES-NaOH pH 7.0, 10mM MgCl₂ pufferben 0.5 Chla/ml koncentrációra állítottuk be. Az így elkészült tilakoid szuszpenzió 0.5 ml-éhez 20μl 1mg/ml koncentrációjú etanolban feloldott 14-SASL (SIGMA) spin jelölőt adtunk. Ezután a mintát egy percig vortexszeltük, majd 10 percig sötétben, szobahőmérsékleten inkubáltuk. A jelölt tilakoid membránokat eppendorf centrifugával összegyűjtöttük (10perc), majd 100μl-es, egyik végén beforrasztott kapilláris mintatartóba töltöttük (Li, 1989).

Az ESR spektrumokat egy szabályozható hőmérsékletű mintatartóval felszerelt JEOL JES-PE-1X (Tokio, Japán) típusú spektrométer segítségével vettük fel. A mikrohullámú teljesítmény 10mW, a megfelelő kristálydetektor áram 0.5 mA volt. A derivált abszorpciós spektrum felvételéhez 100 kHz-es modulációs technikát alkalmaztunk, a moduláció mélysége 0.12 mT volt. 10 mT szélességű mérési tartományt használtunk. A fázisérzékeny erősítő jelét A/D konverter segítségével komputer tárolta. Egy-egy hőmérsékleten 2 percig inkubáltuk a mintát, majd 4 spektrumot átlagoltunk.

A mérés kiértékelését komputer szoftver segítségével végeztük (Horváth és mtsai, 1988). A hiba egyik spektrum esetében sem haladta meg az 1%-ot.

EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

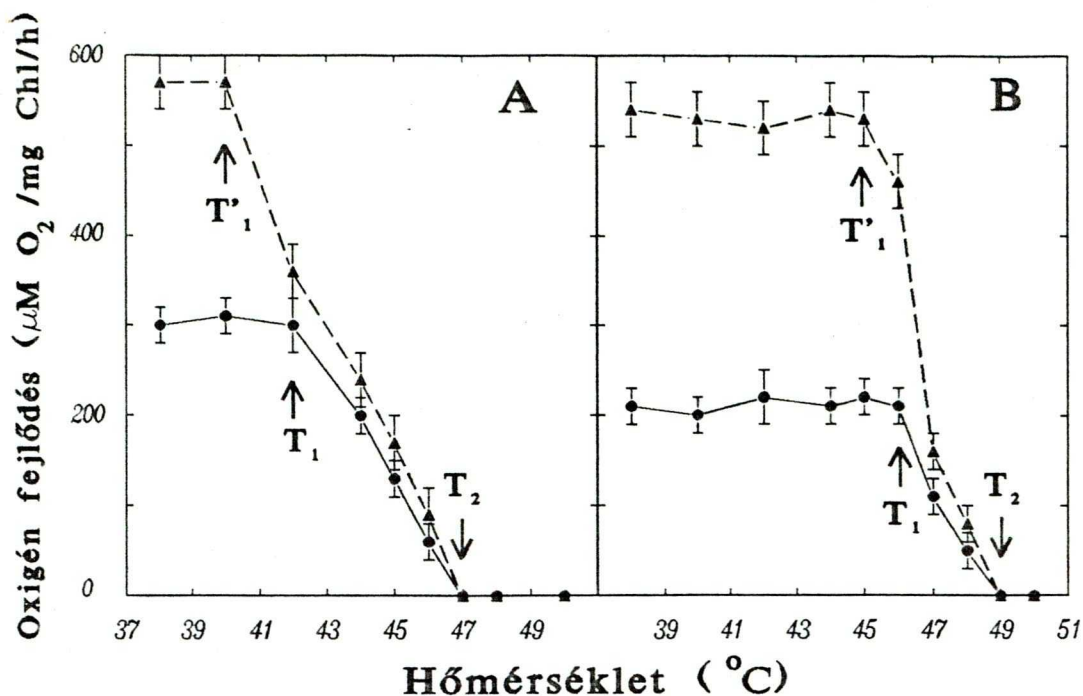
Hosszútávú adaptáció

Synechocystis PCC 6803 hőmérsékletadaptációja és termostabilitása

Adaptációs vizsgálataink elvégzéséhez a *Synechocystis PCC 6803* cianobaktériumot választottuk. Arra kerestünk választ, hogy mi történik a sejtek fotoszintetikus membránjaiban (összetétel, fluiditás) hőmérsékletadaptáció közben, változik-e a membránok hőstabilitása, és ha igen, milyen tényezők járulnak hozzá a sejtek megváltozott hőstabilitásához. Ezen az úton kívántuk megérteni a membránok magashőmérsékleti stressz hatására bekövetkező struktúrális változásainak mechanizmusát. Modell választásunk helyességét több módszerrel is alátámasztottuk.

Fotoszintetikus aktivitás

A sejteket egy alacsony (22°C) és egy magas (36°C) hőmérsékleten tenyésztettük, majd mértük a sejtek fotoszintetikus aktivitásának hőmérsékletfüggését. A 4. ábra A része mutatja a 22°C-on, a B része pedig a 36°C-on előnevelt sejtek fotoszintetikus O₂ fejlődésének és a 2. fotoszisztéma (PSII) aktivitásának hőmérsékletfüggését. Megállapíthattuk, hogy a 36°C-hoz adaptálódott sejtek kb. 5°C-al később veszítik el fotoszintetikus aktivitásukat, azaz megnőtt a hőstabilitásuk. Fork és mtsai (1987) szerint egy kritikus hőmérsékletet definiálhatunk (T_i), amely alatt nincs, vagy csak kis hatása van a hőkezelésnek és ami felett jelentős aktivitás csökkenést tapasztalunk.



4. Ábra. A fotoszintézis (●) és a PSII (▲) hő inaktivációja 22°C-on (A) és 36°C-on előnevelt *Synechocystis* PCC 6803 sejtekben. A fotoszintetikus oxigén fejlődést külső elektronakceptor hozzáadása nélkül mértük. A PSII aktivitásának meghatározásánál a fény indukálta oxigén fejlődést 1,4-benzokinon elektronakceptor hozzáadásával teszteltük. A sejteket az egyes stressz-hőmérsékleteken 60 percig inkubáltuk, majd ezt követően az oxigén fejlődést 22°C-on teszteltük. Az ábrán feltüntetett értékek három független kísérlet átlagai.

Egy másik karakterisztikus hőmérsékletet is meghatározhatunk (T_2), mely felett már a cianobaktérium nem képes O_2 fejlesztésre. A T_2 aktuális értéke függ a hőkezelés időtartamától (Gombos és mtsai, 1991). A fent leírt kritériumok alapján a 22°C-on és a 36°C-on nevelt sejtek esetén az O_2 fejlődésre vonatkozó T_1 hőmérséklet 42°C ill. 46°C, a T_2 pedig 47°C ill. 49°C. A PSII aktivitás hőmérsékletfüggéséből származtatható T_1 értéke 40°C az alacsony, és 45°C a magashőmérséklet adaptált sejtek esetén. Érdekes módon a T_2 kritikus hőmérséklet

megegyezett a teljes elektrontranszport esetén mért megfelelő értékkel. Látható, hogy a teljes elektrontranszport lánc aktivitásának csökkenése kb. 2°C-al (22°C-os sejtek) ill. 1°C-al (36°C-os sejtek) később következik be, mint a PSII aktivitásának csökkenése. Ebből arra következtethetünk, hogy a fotoszintézis gátlását a PSII valamilyen károsodása okozhatta. A sejtek túlélését vizsgálva ugyanezen karakterisztikus hőmérsékleteket kaphatjuk (Lehel és mtsai, 1992), ami jól alátámasztja azt a feltételezést, hogy a tilakoid membrán, különösen a PSII jelentős szerepet játszik a fotoszintetizáló sejtek magashőmérséklet károsodásában. *Anacystis nidulans* sejtek esetében a fentiekhez hasonlóan azt tapasztalták, hogy a magashőmérséklet adaptáció a T₁ és T₂ értékének növekedését eredményezte (Fork és mtsai, 1987). Késleltetett fluoreszcencia és alacsony hőmérsékleti (77K) fluoreszcencia vizsgálatok alapján az O₂ fejlődés csökkenését a PSII károsodásával hozták összefüggésbe. A károsodás pontos helyére vonatkozóan egyértelmű bizonyíték nincsen. Nash és mtsai (1985) szerint a PSII reakciócentrum legsérülékenyebb része a vízbontó enzim.

Változások a tilakoid membrán összetételében hőmérsékletadaptáció közben

A következő kísérletekben azt vizsgáltuk, hogyan változik a tilakoid membrán összetétele az adaptáció során. Miután a tilakoid membránt a többi biológiai membránhoz hasonlóan alapvetően két komponens építi fel; lipidek és fehérjék, értelemszerűen ezek mennyiségét és arányát mértük.

Az 1. táblázat tünteti fel a 22°C ill. 36°C-on növesztett *Synechocystis* PCC 6803 tilakoid membránjának lipidösszetételét. A táblázatból kitűnik, hogy a tilakoid lipidösszetétele viszonylag egyszerű, összesen négyféle komplex lipidet tartalmaz. Azonos arányban (10-20%) van jelen a DGDG, az SQDG és a PG. A tilakoidban a legnagyobb mennyiségben előforduló

lipid az MGDG, ami több mint az 50%-át teszi ki az összes lipidnek. Láthatjuk, hogy a membrán lipidösszetétele, korábbi vizsgálatokkal összhangban (Wada és Murata, 1989; Raison és mtsai, 1982), a hőmérséklet adaptáció során lényegében változatlan marad.

1. Táblázat. A különböző hőmérsékleteken növesztett *Synechocystis* PCC 6803 sejtek tilakoid membránjának lipidösszetétele.

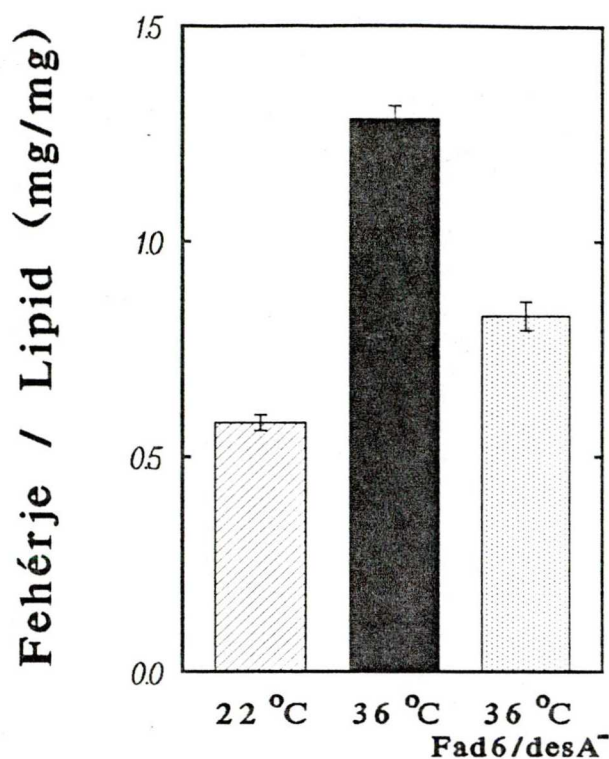
Lipid (%)	22°C	36°C
MGDG	54	53
DGDG	18	16
SQDG	15	19
PG	13	12

A következő kísérlet során arra kerestünk választ, hogy miképp módosul a különböző komplex tilakoid lipidek zsírsavösszetétele a tárgyalt hőmérsékleti adaptáció során a kétféle fenotípusban. A 2. táblázat mutatja, hogy csak a 16 és 18 szénatom hosszúságú lipid zsírsavspeciesszerekkel kell számolnunk. Külön érdekessége és értéke rendszerünknek, hogy lényegében ugyanazokat a telítetlen zsírsavakat tartalmazza, mint a magasabb rendű növények kloroplasztizai (kivéve, hogy a magasabbrendű növények, kevés kivételtől eltekintve, nem tartalmaznak γ -linolénsavat). A vizsgált cianobaktérium tehát ilyen értelemben is jó összehasonlítási alapot biztosít mind a túlélés, mind a lipidösszetétel tekintetében a magasabbrendű növényekkel. A 36°C-on nevelt sejtek tilakoidja kismértékben több sztearin savat, olajsavat ill. linol savat tartalmaz, egyáltalán nem tartalmaz α -linolénsavat és 18:4-et, és a γ -linolénsav tartalom is a felére csökkent a 22°C-on növesztett sejtekhez viszonyítva

(2/A. táblázat). Általános tendencia, hogy a sejtek tilakoidjának lipidjei magashőmérséklet adaptáció során telítettebbé válnak. *Synechocystis* PCC 6803 sejteket vizsgálva Wada és Murata (1990) az alacsony hőmérséklet okozta zsírsavtelítetlenség növekedést egész sejt szinten is kimutatták. A zsírsavak deszaturációja sötétben és fotoszintézis gátlók jelenléte mellett nem következett be, viszont zsírsavszintézis inhibitorok esetén zavartalan volt. Ebből arra a következtetésre jutottak, hogy a zsírsavdeszaturáció a fotoszintetikus elektrontranszporttal kapcsolt, és nem igényli a zsírsavak *de novo* szintézisét.

2. Táblázat. A kétféle hőmérsékleten növesztett vad típusú (A) és a 36°C-on nevelt Fad6/*desA*⁻ mutáns (B) *Synechocystis* sejtvonalak tilakoid membránjának zsírsavösszetétele. (ny: nyomnyi, <0.4%)

	A		B
Zsírsav (%)	22°C	36°C	36°C 6,12
16:0	51	58	55.5
16:1 (9)	3	2	4
18:0	ny.	2	3.3
18:1 (9)	2	9	37.2
18:2 (9,12)	6	15	ny.
α 18:3 (9,12,15)	8	-	-
γ 18:3 (6,9,12)	22	14	-
18:4 (6,9,12,15)	8	-	-



5. Ábra. A különböző hőmérsékleteken növesztett vad típus és *Fad6/desA*⁻ mutáns *Synechocystis* PCC 6803 sejtvonalak tilakoid membránjának fehérje/lipid aránya. (3 mérés átlaga, a hiba az átlagos eltérést mutatja)

A lipid és zsírsavanalízist követően megvizsgáltuk, hogyan módosul a fehérje/lipid arány a tilakoid membránban a hőmérsékletadaptáció során. Magashőmérséklet adaptáció esetén ez az arány 0.5mg/mg -ról (22°C) 1.3mg/mg -ra (36°C) nőtt (5. ábra). A tilakoid membrán fehérje/lipid arányának adaptív szerepét Chapman és mtsai (1983) vetették fel borsó tilakoidon végzett vizsgálataik alapján. A magasabb hőmérsékleten nevelt növények tilakoidjában a fehérje/lipid arány szignifikánsan megnövekedett. Magyarázatuk szerint ez a membrán fluiditásának optimális szinten tartását célozza.

Izoterm körülmények között fellépő adaptív változások zsírsav mutáns/transzformáns sejtek membránjaiban

A zsírsavtelítettség adaptív és regulációs szerepének mélyebb megértése érdekében a *Synechocystis* PCC 6803 vad típusa mellett olyan mutáns esetén is elvégeztük a zsírsavösszetételre vonatkozó analitikai vizsgálatokat, melyben bizonyos deszaturációs enzimek hiányában nincs mód kétszeresen vagy háromszorosan telítetlen zsírsavak szintézisére.

Feltételeztük, hogy ily módon közvetlenül lehetőség nyílik arra, hogy az élő sejtben a kettőskötéstartalom és a fotoszintetikus aktivitás ill. hőstabilitás kapcsolatát modellezzük. Ez a rendszer az előző fejezetben leírt kétféle, egyidejűleg fellépő adaptív mechanizmus működésének mélyebb megértését teszi lehetővé - választ kaphatunk arra, hogy a feltehetően fluiditásregulációért felelős tényezők képesek-e egymást helyettesíteni mind a fluiditás, mind a fluiditás függő funkciók tekintetében. Vizsgálatainkban a *Synechocystis* Fad6/*desA*⁻ mutáns/transzformánst alkalmaztuk (Wada és mtsai, 1992). A Fad6 mutáns a $\Delta 6$ helyzetű zsírsav deszaturációt végző enzimben hiányos (Wada és Murata, 1989). Az izolált Fad6 mutánst transzformálták kanamicin rezisztenciát kódoló gén inszerciójával elrontott *desA*-val. A *desA* a $\Delta 12$ zsírsav deszaturázt kódoló gén, amit *Synechocystis* PCC 6803 mutánsai felhasználásával izoláltak (Wada és mtsai, 1990). A kanamicin nevű antibiotikummal szembeni rezisztenciát kódoló gén inszerciója megakadályozta a *desA* kifejeződését és jelenléte egyidejűleg lehetővé tette a mutáns/transzformáns szelekcióját, miután kanamicin jelenlétében csak ez volt képes nőni. Ebben mutánsban a polién zsírsavak teljesen hiányoznak, mivel a $\Delta 6$ és $\Delta 12$ kettőskötések kialakítására nem képes (2/B. táblázat). Ez a mutáns 22°C-on nem képes nőni, így csak 36°C-on növesztettük. A 36°C-on nevelt vad típussal összehasonlítva a Fad6/*desA*⁻ mutáns sokkal telítettebb. Telítetlen zsírsavként csak 16:1-et és 18:1-et képes

szintetizálni, ugyanakkor a lipidosztályok relatív arányát tekintve a vad típussal megegyezik. Amint azt később igazolni fogjuk ez a mutáns és vad típus izoterm körülmények között előnevelve egyáltalán nem mutat különbséget a hőstabilitásban. A későbbiekben annak is magyarázatát adjuk, hogy vajon mi okozhatja ezt a látszólagos ellentmondást.

A 36°C-on növesztett mutáns és vad típusok tilakoid membránjának fehérje/lipid arányát összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy az 1.3mg/mg -ról (vad típus) 0.827mg/mg -ra (mutáns) csökkent (36%) (5. ábra), ugyanakkor a fehérjeösszetétel lényegében nem változott. Ezzel bizonyítottuk, hogy egy belső "szerkezeti fluiditás modulátor" (kettőskötéstartalom) megváltoztatása egy másik modulátor egyidejű változását idézi elő. Ebből következően a jelenség hátterében ugyanúgy a fluiditásreguláció állhat, mint amikor e modulátorok arányváltozása a külső környezeti tényezők hatását (hőmérséklet) kompenzálja. A fehérje/lipid arány változása a mutáns tilakoidjában azt is bizonyítja, hogy ez a tilakoid nem egyszerűen polién zsírsavakban szegény membrán, hanem egy, a membrán szerkezetére nézve alapvetően megváltozott rendszer. A célzott genetikai beavatkozásokat követő metabolikus átrendeződés problémáját már más, magasabbrendű növényen végzett vizsgálatok alapján is felvetették (Somerwille és Brows, 1991). A zsírsavtelítetlenség genetikai eszközökkel való drasztikus csökkentése után a tilakoidban olyan funkciók maradnak szinte zavartalanul épségben, melyeket egy *in situ* beavatkozás (pl. hidrogénezés) jelentős mértékben gátol.

A tilakoid membrán fluiditásregulációjának mechanizmusa

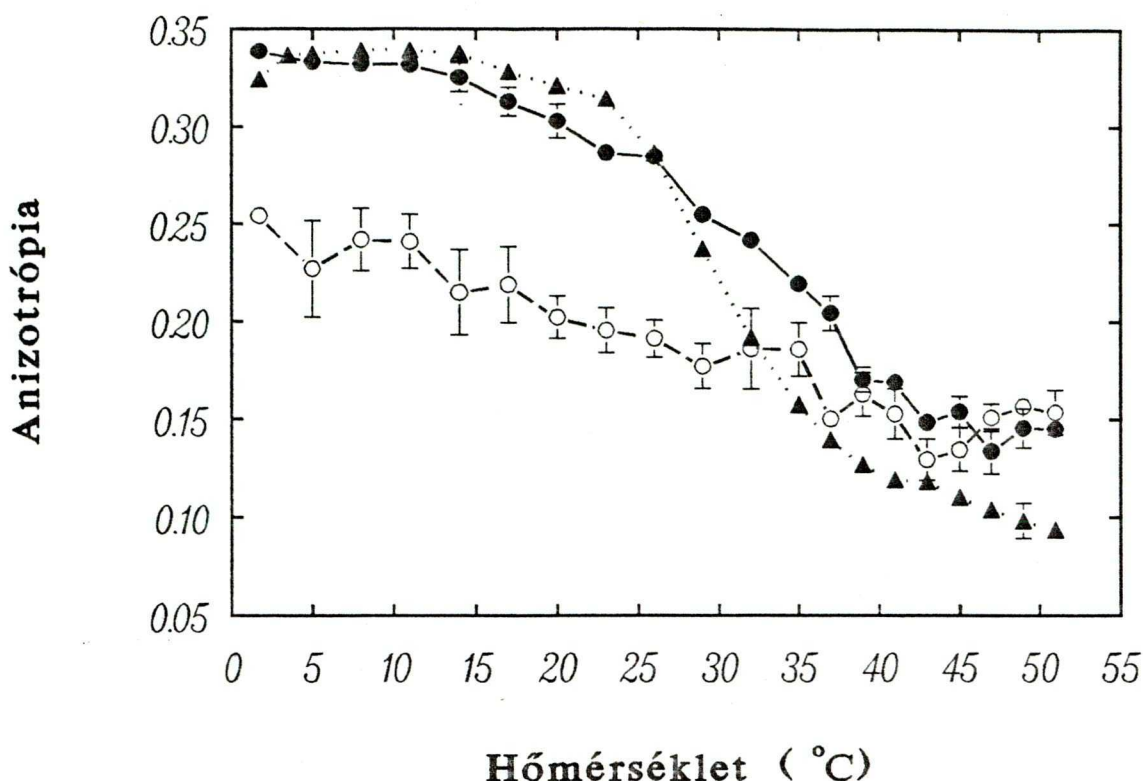
A fentiek során bemutattuk, hogyan változik meg a tilakoid membrán összetétele a kétféle vad fenotípusban a hőmérsékletadaptáció során és a genetikai beavatkozás hatására.

A zsírsavtelítettség növelheti a membrán szerkezeti rendjét, csökkentheti fluiditását. A megnövekedett fehérje/lipid arány növelheti a szerkezeti rendet és stabilizálhatja a membránt (Chapman és mtsai, 1983). Az izoterm körülmények között nevelt vad típus és mutáns sejtek eltérő fehérje/lipid arányértékei szintén a fluiditás regulációjában játszhatnak szerepet. Mindezeket összevetve, úgy tűnik, mintha a hőmérsékletadaptáció a membrán dinamikus szerkezetét védené. Amint arra korábban utaltunk, feltevésünk az volt, hogy a membrán magashőmérséklet okozta károsodását a dinamikai szerkezetében beálló változások eredményezik úgy, hogy a membrán túlfluidizálódik, sőt esetleg az 1. ábrán látható fordított hexagonális fázis is megjelenik, ami a membrán dezintegrációjához vezethet.

A következő kísérletek segítségével azt kívántuk eldönteni, hogy a vad fenotípusokban a membránfluiditások teljesítik-e a "homeoviszkozus adaptáció" elvét ill. a mutáns sejtekben megfigyelt metabolikus átrendeződés értelmezhető-e a membránfluiditás szintjén.

Megvizsgáltuk a tilakoid membrán "átlagos" fluiditásának változását a hőmérsékletadaptáció közben a vad típusban és a mutánsban. A mérést a steady-state fluoreszcencia anizotrópia technika segítségével valósítottuk meg. Szonda molekulaként a difenil-1,3,5-hexatriént (DPH) alkalmaztuk kihasználva, hogy e molekula egyforma valószínűséggel fordul elő a membrán különböző hidrofób régióiban (Shinitzky és Barenholz, 1978).

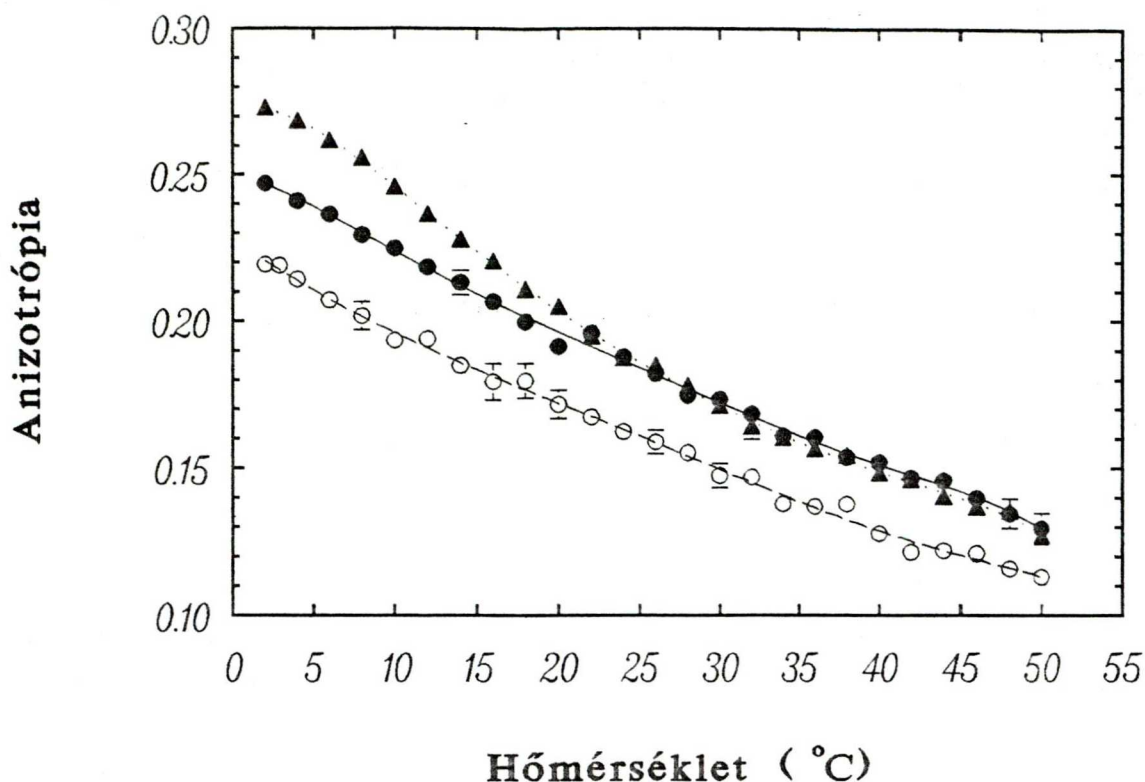
A 6. ábrán látható, hogy a magas hőmérséklethez adaptálódott (36°C) sejtek tilakoidjában a DPH anizotrópia, ezen keresztül a membrán mikroviszkozitása a fiziológiás hőmérsékleteken mindenhol nagyobb, mint az alacsony hőmérsékleteken (22°C) növesztett sejtek esetében. Rendszerünk további előnye, hogy a "homeoviszkozus" adaptáció érvényessége igazolható: a 22°C-on növesztett sejtek 22°C-on és a 36°C-on növesztett sejtek 36°C-on közel azonos membránfluiditást állítanak be. Ezeket a kitüntetett hőmérsékleteket az ábrán az oszlopok jelzik. Tehát a rendszer kompenzálni képes a hőmérséklet változtatásával indukált



6. Ábra. DPH steady-state fluoreszcencia anizotrópiájának hőmérséklet függése 22°C-on (○) ill. 36°C-on (●) növesztett vad és 36°C-on növesztett *Fad6/desA⁻* (▲) mutáns *Synechocystis* PCC 6803 sejtek tilakoidjában. Minden érték 10 mérés átlagának felel meg, a feltüntetett hiba pedig az átlagos eltérést mutatja (S.D.).

fluiditásváltozást egy belső metabolikus átrendeződéssel. A magas hőmérsékleti stressz tartományban azonban a kétféle hőmérséklethez adaptált vad típus tilakoidja nem mutat fluiditás különbséget, sem fázistranzícióra utaló törést az anizotrópia hőmérsékletfüggésében. Így ezzel az "átlagos fluiditás" megközelítéssel nem tudjuk megmagyarázni a membrán dezintegrációját magas hőmérsékletek esetén.

A *Fad6/desA⁻* mutáns tilakoidjában kb. 25°C-ig a DPH fluoreszcencia anizotrópia nem különbözik a vad sejtek tilakoidjától. Ennél magasabb hőmérsékletek esetén azonban a



7.Ábra. DPH steady-state fluoreszcencia anizotrópiájának hőmérsékletfüggése 22°C-on (○) ill. 36°C-on (●) növesztett vad és 36°C-on növesztett *Fad6/desA⁻* (▲) mutáns *Synechocystis* PCC 6803 sejtek tilakoidjából izolált lipidekből készített liposzómákban. Minden érték 10 mérés átlagának felel meg, a feltüntetett hiba pedig az átlagos eltérést mutatja (S.D.).

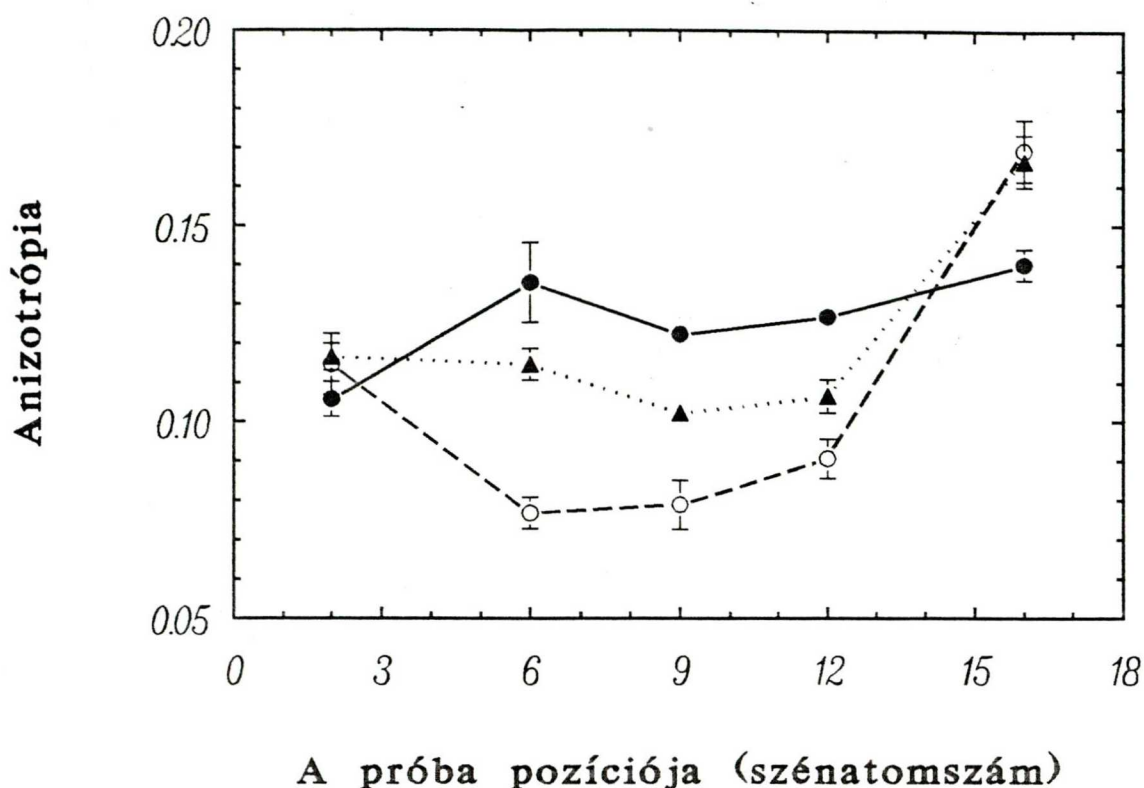
különbség egyre nagyobbá válik. A lipidjeiben telítettebb mutáns tilakoidja meglepő módon fluidabb, mint a hasonló körülmények között nevelt vad típusból származó tilakoid.

A következő kísérletekben megvizsgáltuk a lipidek szerepét (a többi membránalkotótól elkülönítve) a membrán szinten mért fluiditás kialakításában. A különböző hőmérsékleteken növesztett *Synechocystis* PCC 6803 vad típus és *Fad6/desA⁻* mutáns tilakoidjából izolált lipidekből készített liposzómák fluiditásának hőmérséklet függését tünteti fel a 7. ábra. Hasonlóan az intakt tilakoidokhoz, a 36°C-on növesztett vad és mutáns típusokból izolált

lipidek mikroviszkozitása nagyobb a 22°C-on nevelt sejthez viszonyítva azzal a különbséggel, hogy a fluiditásbeli eltérés az egész vizsgált tartományon megfigyelhető. A fehérjék hiányában az izolált lipidek fluiditása nagyobb, mint az intakt tilakoid fluiditása. Ez a megfigyelés összhangban van a korábban leírtakkal, melyek szerint a fehérjék növelik a membránok rigiditását (Raison és mtsai, 1982; Ford és Barber, 1983).

Azt a meglepő eredményt, hogy a telítettebb mutáns és a vad típus lipidjeinek fluiditása 25°C felett lényegében megegyezik, a mutáns magasabb olajsav tartalmával magyarázhatjuk. Az irodalomból ismert, hogy az egy zsírsavláncon kialakuló kettőskötéseknek nem azonos a fluiditást növelő hatásuk. Az alkilláncba bevitt "első" *cis* kettőskötés hatása sokkal nagyobb, mint a "második" ill. "harmadik" kettőskötése (Stubbs és Smith, 1984). Ha a mutáns tilakoidból izolált lipidek fluiditását összehasonlítjuk az intakt tilakoid fluiditásával (6. ábra), azt láthatjuk, hogy a mutáns a fehérje/lipid arány csökkentésével (5. ábra) a 25°C alatti tartományban az izolált lipidjeinél meglévő fluiditáskülönbséget teljes mértékben kiegyenlítette. Ennek célja esetleg az alacsony hőmérsékletek okozta sérülések mérséklése lehet. Ugyanakkor a 25°C feletti hőmérséklettartományban a mutáns és a vad típusokból izolált lipidek fluiditása nem különbözik. E megfigyelés ill. a mutáns alacsonyabb fehérje tartalma magyarázatul szolgálhat az ebben a tartományban tilakoid szinten mért fluiditás különbségre. Utal arra is, hogy a lipideknek jelentős szerepe lehet a hőstabilitásban, mivel ha csak a fluiditást tekintenénk meghatározó tényezőnek akkor a mutáns hőstabilitásának csökkennie kellene, hiszen intakt tilakoidjának fluiditása a magas hőmérsékleti tartományban nagyobb.

A tilakoid membránok fluiditásregulációjának részletesebb felderítése érdekében megmértük a fluiditás változását a membrán különböző mélységeiben (8. ábra). A mérésnél a membrán különböző mélységeiből tudósító *n*-(9-anthroyloxy) zsírsav fluoreszcens szondákat alkalmaztunk (Thulborn és mtsai, 1979).



8. Ábra. 22°C-on (○), 36°C-on (●) növesztett vad és 36°C-on növesztett *Fad6/desA*⁻ (▲) mutáns *Synechocystis* PCC 6803 sejtek tilakoidjának fluiditás grádiense. Minden érték 10 mérés átlagának felel meg, a feltüntetett hiba pedig az átlagos eltérést mutatja (S.D.).

Az intakt tilakoidok fluiditásgrádiense több tényre rávilágít. A C2-es pozícióban a különböző sejtvonalak fluiditása nem mutat szignifikáns különbséget. A DPH anizotrópia viszonylagos alacsony értéke ebben a régióban a lipid fejcsoport régió "laza" szerkezetére utalhat. A fehérje/lipid arányban meglévő különbségek ebben a régióban nem változtatják meg a mozgásviszonyokat.

A membrán közepe felé haladva azonban jelentős különbségek fedezhetők fel a különböző sejtvonalak között. A C6,9,12 pozíciókban lényegében azonos fluiditás eltéréseket tapasztaltunk. Ebben a régióban a 22°C-on növesztett vad típus tilakoidja mindenhol fluidabb

a 36°C-on nevelt vad típushoz viszonyítva. Ez összhangban van mind a zsírsavtelítetlenségben, mind a fehérje/lipid arányban megmutatkozó különbségekkel. Ha a mutáns tilakoid fluiditását vizsgáljuk ebben a tartományban, azt tapasztaljuk, hogy ez a két különböző hőmérsékleten nőtt vad típus között változik. Ebben a régióban jelentős szerephez jutnak a membrán integráns fehérjéi, mivel a legalacsonyabb fehérje tartalmú 22°C-on növesztett vad típus tilakoidja a legfluidabb, és a legmagasabb fehérje tartalmú 36°C-on nevelt vad típus tilakoidja a legrigidebb ebben a tartományban.

A membrán közepén, a C16 pozícióban, a modellmembránokban tapasztaltaktól (Thulborn és mtsai, 1979) eltérően a legkisebb fluiditást mutatja mindhárom sejtvonal. A 22°C-on nevelt vad és a 36°C-on nevelt *Fad6/desA* mutánsok tilakoidjának fluiditása ebben a régióban azonosan alacsony értéket mutat, amíg a 36°C-on nevelt vad típus fluiditása itt nagyobb. Ez ismét a fehérjék hatására utal. Tehát a fehérjék rigidizáló hatása nemcsak hőmérsékletfüggő (lásd fent), hanem a membrán különböző mélységeiben is eltérő. A fluiditás pontos beállítására a lipidekhez képest óriási méretű fehérjék bizonyára nem alkalmasak, ehhez többször telítetlen zsírsav alkilánccok kellenek, amelyek a mutánsban hiányoznak. Valószínűleg a C16 pozícióban tapasztalt fordított hatás is a fehérje/lipid arány módosulással ill. specifikus protein-átrendeződéssel kapcsolatos. Ezt támasztja alá, hogy a fehérje/lipid arányában közel megegyező 22°C-on növesztett vad és 36°C-on növesztett mutáns fluiditásgrádiense hasonló.

Összefoglalva leszögezhetjük, hogy bár a magas hőmérséklet tartományban DPH-val mért fluiditásszintek a tényleges túlélésbeli különbségeket nem tükrözik, a 25°C-30°C alatti tartományban mért mikroviszkozitás értékek a membránfluiditás homeosztázisának kontroljára utalnak. A mutáns viselkedése rámutat egy másik fontos tényre: A mutáns sejtek ebben az értelemben pontosan arra képesek, amire a vad fenotípusok hőmérsékletadaptáció során. Azt a fluiditás különbséget és/vagy fehérje-lipid kölcsönhatás változást, amit a megnövekedett

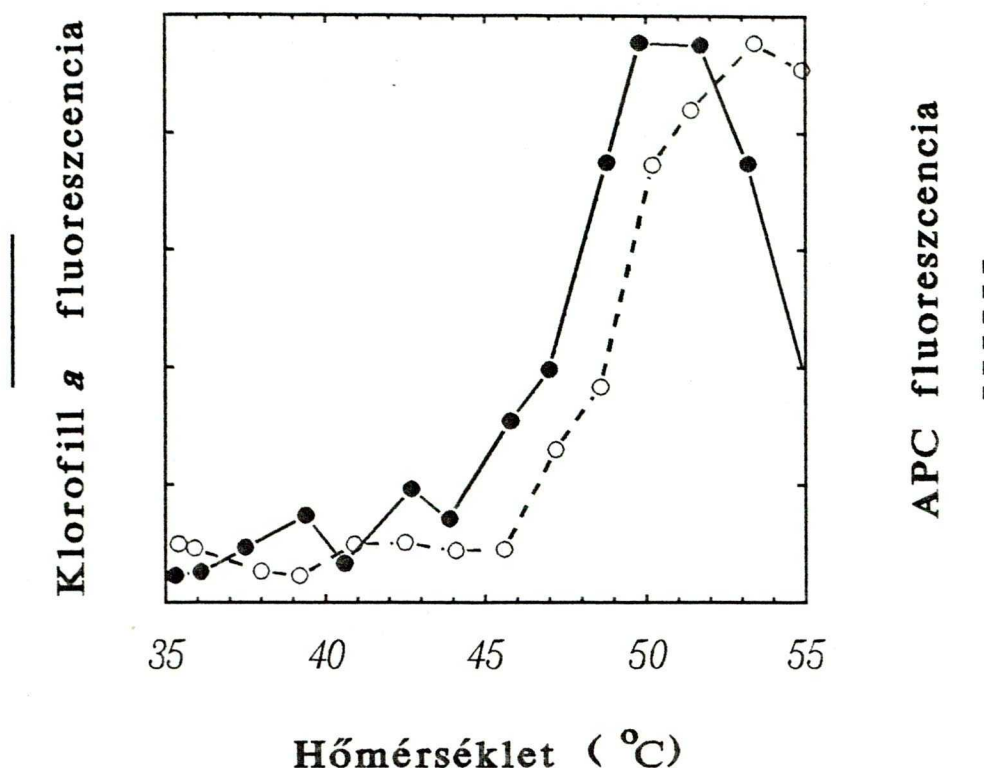
lipid telítettség okoz. a protein/lipid arány csökkentésével igyekszik kiegyenlíteni. Azaz, ha egy sejtnak egy adott hőmérsékletre kell adaptálnia, az képes mindkét reguláló tényező együttes használatára (zsírsavtelítetlenség, fehérje/lipid arány módosítása), ám, ha az egyiket valamilyen okból nem képes alkalmazni, akkor a másik regulációs lehetőség kap nagyobb hangsúlyt. Egy további értéke is lehet a fenti megfigyelésnek. Nemcsak azt igazolja, hogy a rendszer képes két látszólag független szabályozó mechanizmus segítségével közel "izofluid" állapotot elérni, de arra is utal, hogy a mutánsok nem feltétlenül kell, hogy élettani különbségeket mutassanak, ha az adott membránkötött élettani folyamat fluiditásfüggő ill. valamiképp összefügg a membrán fizikai állapotával. A membránszintű reguláció azonban, mint láttuk, nem tökéletes. Ezért e mutánsok alkalmazásával esetleg sikerül kideríteni, hogy mely adaptív változások fontosak igazán a hőstabilitás megőrzésében és melyek helyettesíthetők.

Mint láttuk a különböző hőmérsékletekhez adaptálódott sejtek eltérő hőstabilitása "átlagos" membránfluiditás eltérésekkel nem volt magyarázható. Ezért a "határfluiditás" elv (Raison és mtsai, 1982) - mely szerint létezik egy még elviselhető legmagasabb fluiditás szint, ami felett a membránkötött funkciók károsodnak és amit sikeres magashőmérsékletadaptációval a membrán magasabb hőmérsékleten ér el - esetünkben nem igazolható. Ez magyarázható azzal, hogy az általunk alkalmazott mérési technika nem teszi lehetővé a membrán lokális túlfluidizálódásának észlelését, kis területű részein előforduló fordított micellák (Cullis és mtsai, 1983) vagy fordított hexagonális fázis (Gounaris és mtsai, 1983) detektálását.

A magashőmérséklet okozta fotoszintetikus károsodás helyének felderítése céljából megvizsgáltuk a különböző pigment-protein komplexek közötti energiaátadás hőmérséklet függését. Ennek vizsgálatára kiválóan alkalmas a különböző fotoszintetikus pigmentek fluoreszcenciájának mérése. Ha a különböző pigmenteket tartalmazó komplexek közül valamelyikben, vagy valamelyik kettő között a fénykibocsátás nélküli energiatranszport valamilyen okból sérül, akkor megnövekszik a fluoreszcencia intenzitása (Schreiber és Armond, 1978). Az emittált fény hullámhossza jellemző az energiaáramlás gátlásának helyére és így megfelelő módszernek tűnt a hőinaktiváció hatóhelyének valószínűsítésére.

A cianobaktériumok fő fénybegyűjtő pigment-protein komplexei a fikobiliproteinek, melyek sajátos szupramolekuláris komplexekbe szerveződnek és alkotják a fikobiliszómát, ami a tilakoid membrán felszínéhez kapcsolódik. Az abszorbeált fényenergiát a fikobiliszómák főként a PSII reakcióközpontjába közvetítik. Az energia áramlás iránya a *Synechocystis* PCC 6803 fikobiliszómáiban: fikocianin --> allofikocianin (APC). A PSII reakciócentrumhoz legszorosabban az allofikocianin kapcsolódik (Glazer, 1987).

Elsődleges célunk annak felderítése volt, hogy mi okozza a PSII aktivitásának már vizsgált hőinaktivációját. A meglazult fikobiliszóma-PSII kölcsönhatás, vagy a PSII szerkezeti károsodása. Az allofikocianin fluoreszcenciájának intenzitása kb. 2°C-al magasabb hőmérsékleti tartományban növekedett meg, mint a klorofill *a* fluoreszcenciája (9. ábra). Ebből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az elsődleges károsodást nem a fénybegyűjtő komplexek és a PSII reakciócentrum közötti energia áramlás szenved el, hanem maga a PSII reakció centrum. Ezzel tökéletes összhangban a klorofill fluoreszcencia által detektált PSII károsodás ugyanazon a hőmérsékleten indult, ahol a fotoszintetikus oxigénfejlesztés

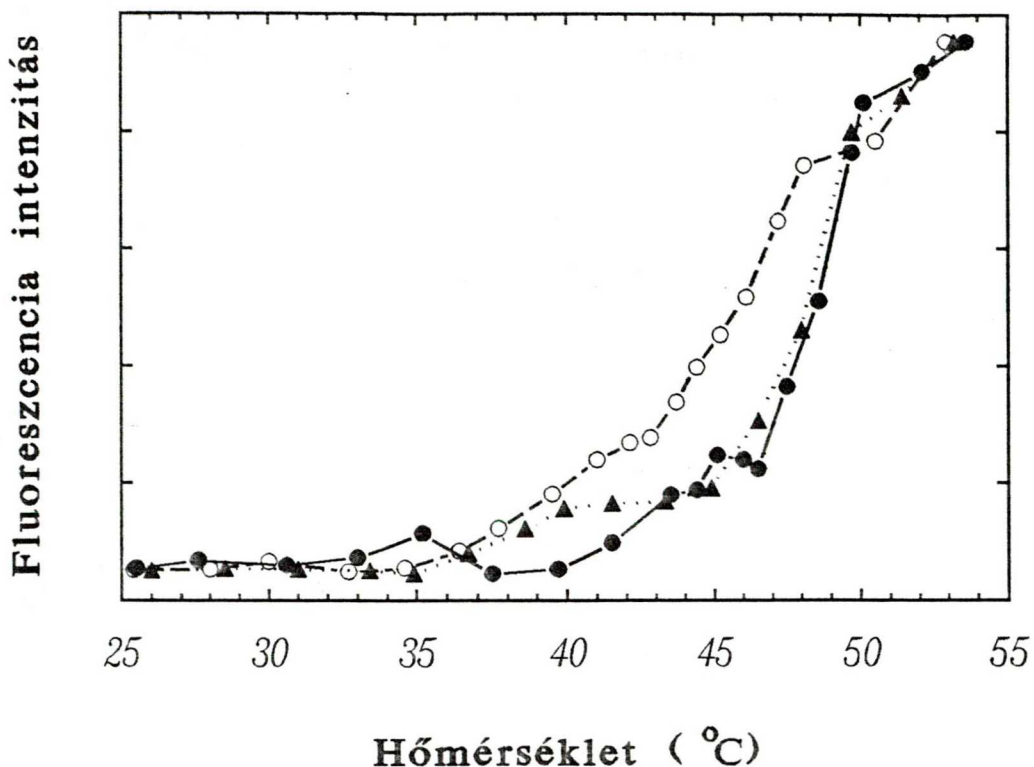


9. Ábra. Az allofikocianin (○) és a klorofill *a* (●) fluoreszcenciájának hőmérsékletfüggése 36°C-on növesztett intakt *Synechocystis* PCC 6803 sejtekben. A gerjesztő fény hullámhossza 435nm (klorofill *a*) ill. 620nm (APC) volt. Az emittált fényt 680nm-nél (klorofill *a*) ill. 658nm-nél (APC) detektáltuk.

károsodása (46°C). Tehát a klorofill *a* fluoreszcenciájának követése alkalmas módszer a hőstabilitás mérésére intakt sejteken.

E mérést elvégeztük a különböző hőmérsékletekhez adaptálódott vad és *Fad6/desA* mutáns *Synechocystis* sejtvonalakon (10. ábra). Az eredmény a fotoszintetikus aktivitás méréssel teljesen megegyező eredményt mutatott (4. ábra). A 36°C-on nevelt sejtek hőstabilitása kb. 4°C-al nagyobb volt mint a 22°C-on nevelt sejteké. A mutáns és a vad típusok tilakoidjának hőstabilitása ugyanakkor nem adott szignifikáns különbséget.





10. Ábra. A klorofill *a* fluoreszcenciájának hőmérsékletfüggése 22°C-on (○), 36°C-on (●) növesztett vad és 36°C-on növesztett *Fad6/desA⁻* (▲) mutáns *Synechocystis* PCC 6803 sejtek esetében. A gerjesztő fény hullámhossza 435nm volt, az emittált fényt 680nm-nél detektáltuk.

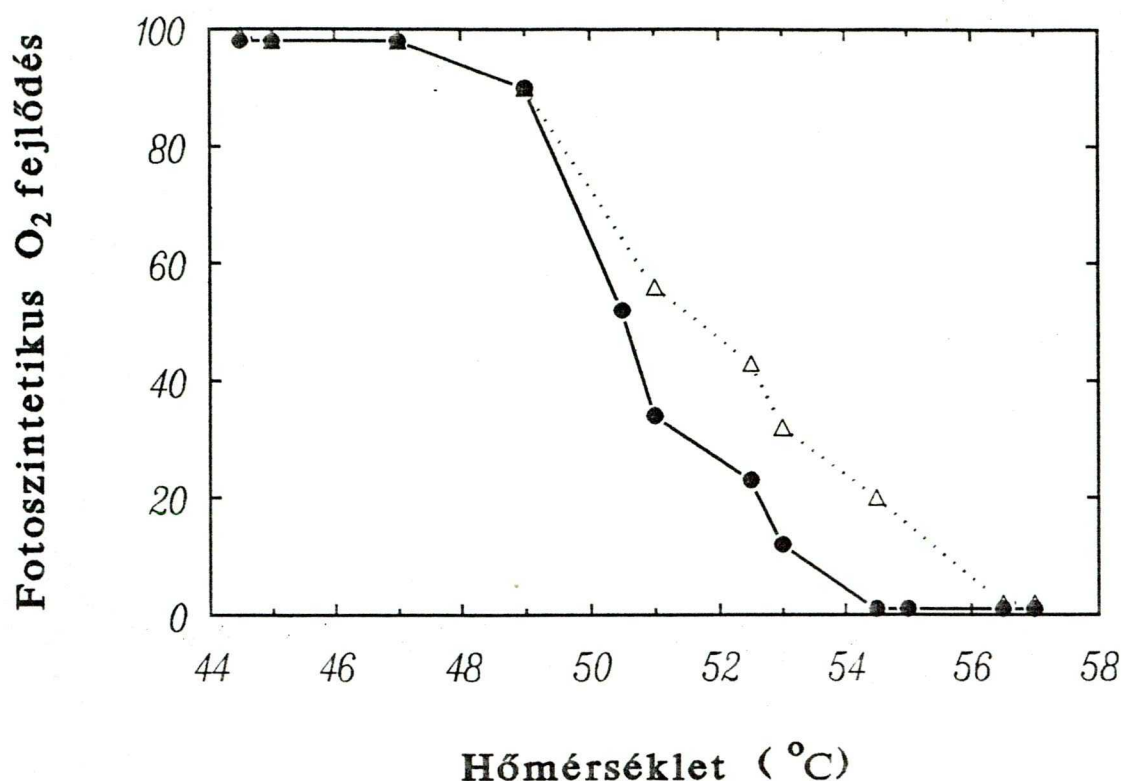
A fentiekben tárgyaltakat összevetve megállapíthattuk, hogy a genetikai beavatkozással módosított többszörösen telítetlen zsírsav szint a tilakoid membrán funkcióinak hőstabilitását nem befolyásolta. Továbbra is nyitott kérdés azonban, hogy mindezek háttérében a membrán hőstabilitásának és lipidjei telítetlenségének függetlensége, avagy a telítetlen zsírsavak bizonyos hatásainak "helyettesíthetősége" áll. Azt a tényt, hogy bizonyos telített zsírsav molekulaszpecifikus arányának növekedése a tilakoid membrán hőstabilitását valóban fokozza, csoportunk igazolni tudta a membránok in situ katalitikus hidrogénezésével. Akkor ugyanis, ha a *Fad6/desA⁻* 18:1 tartalmának kb. egyharmadát sztearinsavvá konvertáltuk, a PSII aktivitás

(víztől a parabenzokinonig) hő-indukálta csökkenése szignifikánsan eltolódott a magasabb hőmérséklet tartományba (nem bemutatott adat). A zsírsavtelítettség hőstabilitást fokozó hatását mutatja az is, hogy a hőtűrőbb növények kloroplasztiszában tilakoid membránjában a galaktolipidek zsírsavalkilláncainak telítettsége nagyobb (Süss és Yordanov, 1986).

Rövidtávú adaptáció

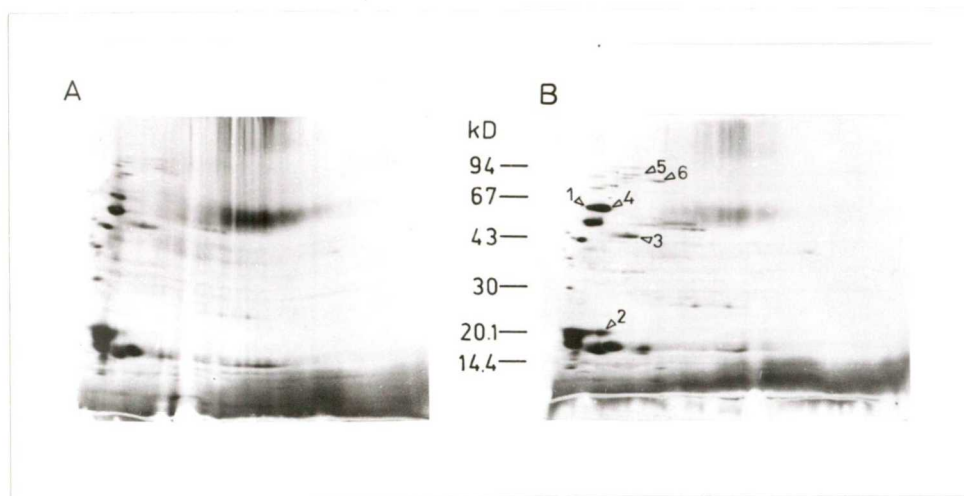
Az eddigiekben az adaptációnak főként azzal a formájával foglalkoztunk, mely során a sejteknek több nap áll rendelkezésükre a megváltozott hőmérsékleti viszonyokhoz való alkalmazkodásra. Az adaptáció ill. a hőstabilitás időfüggésének vizsgálatakor azonban egy nagyon érdekes eredményt kaptunk. Kiderült, hogy ha a magas hőmérsékletre adaptálódott sejt néhány órán keresztül olyan szubletális hőstressznek van kitéve, amit még károsodás nélkül képes túlélni akkor a sejt hőstabilitása tovább fokozódik.

A 11. ábra mutatja a teljes fotoszintetikus elektrontranszportlánc hőmérséklet-függését. A 3 órán keresztül 42°C-on inkubált 36°C-hoz adaptálódott sejtek hőstabilitása szignifikánsan megnövekedett. Úgy tűnik tehát, mintha a sejt "emlékezne" a hősokra. A lipid- és zsírsavösszetétel ezen 3 óra alatt egyáltalán nem változott meg, és a lipidek degradációja nem volt megfigyelhető. A *Drosophila*-tól a magasabbrendű növényekig számos szervezetben kimutatták, hogy a szubletális hősokk által indukált termotolerancia a HSP szintézissel ill. azok redisztribúciójával (pl. membránhoz kötődésével) magyarázható (összefoglaló: Howarth, 1991).



11. Ábra. A fotoszintetikus oxigénfejlődés hőmérsékletfüggése 36°C-on növesztett kontroll (●) és 3 óráig 42°C-on inkubált (Δ) *Synechocystis* PCC 6803 sejtek esetén.

Ezt követően megvizsgáltuk, hogyan változott a tilakoid membrán fehérje összetétele e rövid hőkezelés során két dimenziós elektroforézis technikával. Méréseink azt igazolták, hogy a 3 óráig 42°C-on hősokkolt sejtekből izolált tilakoidban bizonyos fehérjék mennyisége megnövekedett (12. ábra). Az ábra B részében a legjelentősebb mennyiségi különbséget mutató fehérjéket számok jelzik. A hat jelzett fehérje közül a 4. számú azonos azzal a 64 kDa molekulatömegű GroEL "chaperonin" fehérjével, melyet csoportunk a *Synechocystis* PCC 6803 hősokkfehérjei közül elsőként azonosított (Lehel és mtsai, 1992a,b). A hősokk fehérjék 60 kDa-os családját nevezik "chaperonin"-oknak. Ezeknek fontos szerepük van a fehérjék transzportjában (Hartl és Neupert, 1990) és különböző oligomer struktúrák

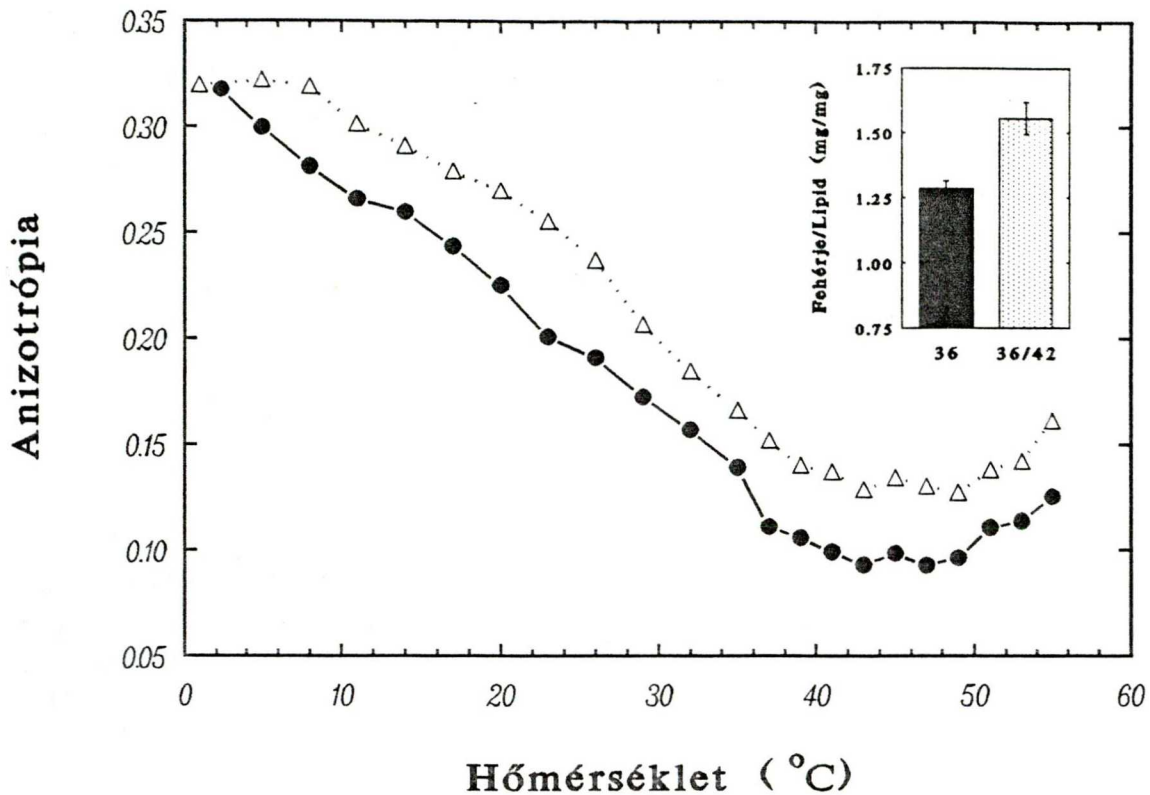


12. Ábra. 36°C-on növesztett kontroll (A) és 3 órára 42°C-on inkubált (B) *Synechocystis* PCC 6803 sejtek tilakoidjának fehérjeösszetétele.

felépítésében (Cheng és mtsai, 1989). Habár a hőszokkproteinek szerepe a fotoszintetikus sejtekben még nem tisztázott, némelyikük részvétele a fotoszintézis hőstabilitásának fokozásában már bizonyított (Schuster és mtsai, 1988). A 64 kDa-os fehérje szintézise hőszokk körülmények között jelentősen növekszik.

Csoportunk immunológiai módszerekkel is igazolta, hogy az említett GroEL-típusú fehérje szubletális hőstressz esetén tilakoid-kötötté válik (Kovács és mtsai, 1992). A tilakoid-fehérje kötés természetének vizsgálata azt mutatta, hogy az hidrofób és döntően felszíni eredetű. Az eddig közzétett esetekben a chaperoninok fehérjékkel történő asszociációját azok részleges denaturációja előzte meg, ami szintén együtt járt a "target" hidrofóbicitásának növekedtével (Goloubinoff és mtsai, 1989). A chaperon fehérjék tilakoid asszociációjának molekuláris hátterét jelenleg csoportunkban vizsgáljuk.

A 2. számmal jelzett fehérje molekulatömege megközelítőleg 21 kDa. Csupán érdekességképpen említem meg, hogy a kloroplasztiszban szintén találtak ilyen 20-22 kDa



13. Ábra. A DPH fluoreszcencia anizotrópia hőmérsékletfüggése 36°C-on növesztett kontroll (●) és 3 órára 42°C-on inkubált (Δ) *Synechocystis* PCC 6803 sejtek tilakoidjában, és ugyanezen tilakoidok fehérje/lipid aránya (inszert).

tömegű hősokkfehérjét, ami a tilakoid gránum régiójához asszociálódott, és feltehetően szerepe van a fotoszintetikus pigment-protein komplexek védelmében (Glaczinski, 1988).

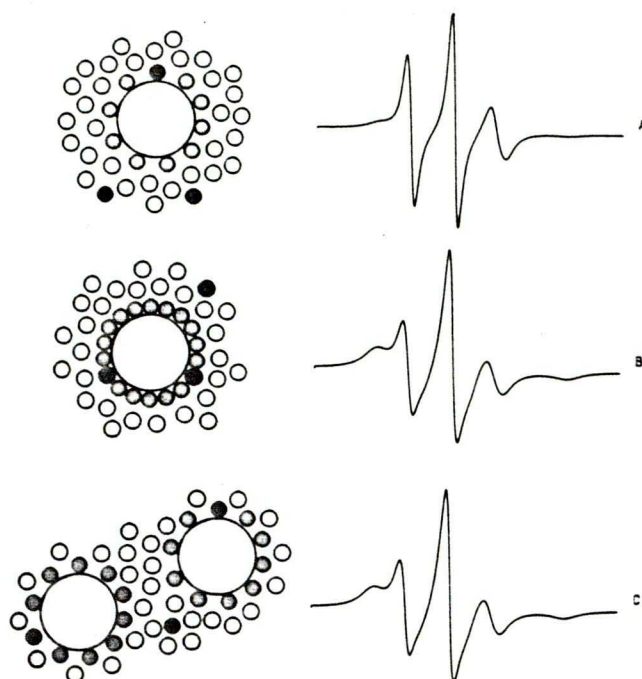
Amint láttuk, a szubletális hőstressz a hosszútávú adaptáció hatására "szuperponálódik", és a sejt hőtűrése tovább fokozódott. A szubletális hőstressz hatására bizonyos fehérjék jelennek meg a membránban. Ezen állításunk további bizonyítéka, hogy a fehérje/lipid arány a 3 óráig 42°C-on inkubált 36°C-on növesztett sejtekben 20%-al nőtt (13. ábra inszertje). A részben azonosított fehérjék beépülése jól reprodukálható szignifikáns anizotrópia, ezen keresztül mikroviszkozitás növekedést eredményezett (13. ábra).

A fentiekben tárgyaltak további bizonyítékát adják annak, hogy a tilakoid hőstabilitása ill. a membrán aktuális fizikai állapota szorosan kapcsolódhatnak egymáshoz. Elképzelhető, hogy a szubletális hőstressz megfigyelt hatása bizonyos, a membránban eredetileg is meglévő és a stressz hatására felhalmozódó ill. a membránhoz hő hatására kötődő fehérjék fluiditást csökkentő képességére vezethető vissza. Ismeretes, hogy más baktériumokban, így az *Escherichia coli* K1060 törzsben, annak külső membránjába hőkezeléskor bizonyos fehérjék épülnek be és egyidejűleg megnő a membrán mikroviszkozitása magas hőmérséklet tartományban is, hasonlóan a mi esetünkhöz (Yatvin, 1987).

A chaperonok nemcsak a vázolt fehérje importban vehetnek részt, de ezen túlmenően kötődésük bizonyos részlegesen denaturált membrán-fehérjékhez, azok védelmét ill. renaturációját is előidézheti. Az irodalomból ismert példa, hogy a chaperon fehérjék részt vesznek az RNS-polimerázok reaktiválásában (Skowrya és mtsai, 1990). A tilakoid fehérje összetételének és tartalmának módosulása befolyással lehet a mikroheterogén szerveződésű membrán speciális fehérje-lipid kölcsönhatásaira is. E témakörrel a következő fejezetben foglalkozok.

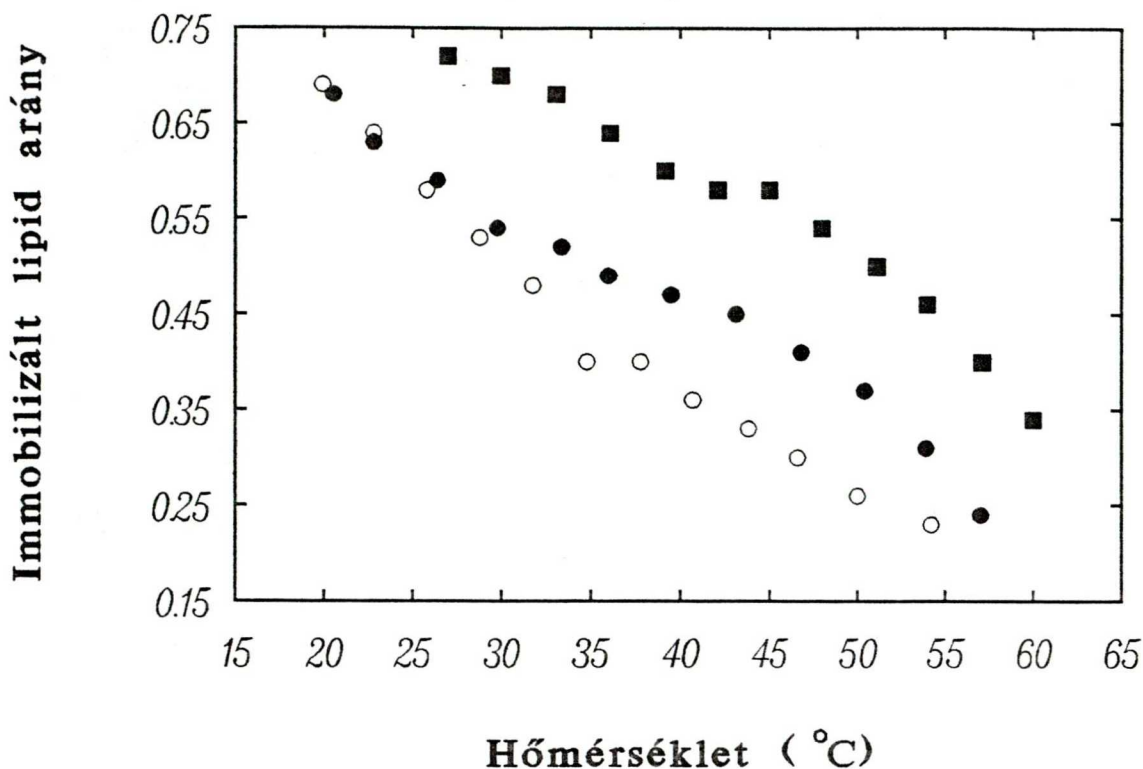
Fehérje-lipid kölcsönhatás szintű reguláció

Az eddigiek során bizonyítottuk, hogy a hosszútávú adaptáció megváltoztatta a membránlipidek telítettségét ill. a fehérje/lipid arányt. Igazoltuk azt is, hogy néhány órás időtartamú hőstressz hatására is megfigyelhető a fehérje/lipid arány változása. Felvetődik a kérdés, hogy vajon hogyan változik meg a membránban a lipidek és fehérjék közötti kölcsönhatás az adaptáció hatására, és mi lehet a szerepe e kölcsönhatásoknak a tilakoid membrán hőstabilitásában.



14. Ábra. Az immobilizált, fehérjékhez kötött lipidek megfigyelése ESR módszerrel. A fehérjét tartalmazó lipid kettősrétegbe juttatott spinjelölt zsírsav vagy lipid (●) ESR spektruma két komponensre bontható. A spektrumban az immobilizált lipidekre utaló "váll" jelenik meg, melynek nagysága az immobilizáció növekedésével nő.

Az irodalmi áttekintésben említett ESR technika alkalmas lehet ezen vizsgálatok elvégzésére. E módszerrel lehetővé válik az immobilizált, fehérjékhez kötött és a szabad mátrix-lipidek arányának meghatározása. Az immobilizált lipidek aránya egy membránban nőhet akár oly módon, hogy a lipidek válnak fehérjekötöttebbé (B), akár oly módon, hogy fajlagosan megnő a membrán fehérjetartalma (C) (14. ábra).



15. Ábra. Az immobilizált lipidek arányának hőmérsékletfüggése a 22°C-on (○), 36°C-on (●) nevelt *Synechocystis* PCC 6803 sejtek tilakoidjában, és a 22°C-on nevelt sejtek hidrogénezett tilakoidjában (■).

A következőkben megvizsgáltuk, az immobilizált lipidek arányának változását a hőmérséklet függvényében a 22°C-on és a 36°C-on nőtt *Synechocystis* PCC 6803 sejtek tilakoidjában (15. ábra). Ebben a kísérletben jelölőként 14-SASL spin jelzett sztearinsavat alkalmaztuk. Amint az a 15. ábra alapján nyilvánvaló a 36°C-on nevelt sejtek tilakoidjában, főként a magas hőmérsékleti tartományban az immobilizált lipidek aránya számottevően nagyobb, mint a 22°C-on nevelt sejtek esetében. Úgy tűnik, hogy a magashőmérséklet adaptált tilakoidban a fehérjék "később" veszítik el kötött lipidjeiket. E feltevés alapján elképzelhető, hogy az esetleges nem kettősréteget alkotó lipidek (MGDG telítetlen molekulafajta) nem kerülnek "szabad" lipid fázisba, következésképpen nem

szegregálódnak és nem alkotnak pl. önálló fordított hexagonális fázist. E magyarázat helyességét látszik igazolni, hogy az a hőmérséklet, ahol a lipidek leválnak a fehérjéről a 36°C-on nevelt sejtek tilakoidjában kb. 46-47°C. Ez a hőmérsékleti tartomány pedig egybeesik a fotoszintetikus aktivitás hőkárosodásával. A hosszútávú adaptáció során megnövekedett lipid immobilizációnak két oka is lehet: a fokozott zsírsav telítettség és a magasabb fehérje/lipid arány. A zsírsavtelítettség szerepének kiemelt vizsgálatát teszi lehetővé az alkilán-cok homogén katalitikus hidrogénezéssel történő módosítása. Hidrogénezéssel a tilakoid membrán zsírsavalkilán-cainak telítettségét úgy lehet növelni, hogy közben értelemszerűen a membrán összetétele változatlan marad. Így egy olyan változtatást hajthatunk végre a 22°C-on nevelt sejtek tilakoidján, hogy az zsírsavösszetételében bizonyos hasonlóságot mutasson a 36°C-on nevelt sejtek tilakoidjával. Ily módon az adaptív változások komplexitásából kihasítva a zsírsavtelítettség szerepe elkülöníthetően tanulmányozhatóvá válhat.

3. Táblázat. A 22°C-on ill. 36°C-on nevelt *Synechocystis* PCC 6803 sejtek tilakoidjának, és a 22°C-on nevelt sejtek hidrogénezett tilakoidjának zsírsavösszetétele. (ny: nyomnyi, <0.4%)

Zsírsav (%)	22°C	36°C	22°C H ₂
16:0	51	58	52
16:1 (9)	3	2	ny.
18:0	ny.	2	21
18:1 (9)	2	9	12
18:2 (9,12)	6	15	4
α18:3 (9,12,15)	8	-	2
γ18:3 (6,9,12)	22	14	9
18:4 (6,9,12,15)	8	-	-

A 3. táblázat mutatja, hogy a tilakoid membrán *in situ* hidrogénezése következtében hogyan módosult a membrán zsírsavösszetétele. A membrán telítettsége nőtt, ami a többszörösen telítetlen zsírsavak mennyiségének csökkenésével járt. A hidrogénezés hatására sem a fehérje, sem a lipidösszetétel nem változott. A fehérjéhez kötött spinjelzett 14-SASL aránya ugyanakkor jelentősen növekedett (15. ábra). Ebből arra következtethetünk, hogy a zsírsavtelítettségnek jelentős szerepe van a fehérjék szolvatációs lipidburok méretének kialakításában. A fentiekhez hasonló megfigyelést tettek Schlame és mtsai (1990). Megállapították, hogy patkány májból izolált mitokondrium membránban mind a szabad sav (14-SASL), mind egy komplex lipid (PC-SASL) esetében növekszik a fehérjekötött lipidek aránya hidrogénezés hatására. További vizsgálatok vannak folyamatban, melyek a zsírsavtelítettség immobilizáció növelő mechanizmusát igyekeznek felderíteni (fejcsoport specificitás, telítetlen spinjelölők felhasználása stb.).

Összefoglalva, a hőmérsékletadaptáció okozta lipid-fehérje kölcsönhatás változások összefüggésbe hozhatók a fehérje-lipid arány és a zsírsavtelítetlenségi szint változásával. A megnövekedett immobilizált lipid arány az alábbi hipotézis alapján jelentős szerepet játszhat a membrán hőstabilitásának fokozásában.

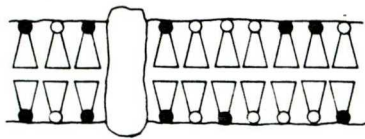
Hipotézis a tilakoid membrán hőmérsékletadaptációjának és termostabilitásának kapcsolatára

A magas hőmérséklet mind a membrán szerkezetét, mind az integráns membránfehérjék szerkezetét módosíthatja. E kedvezőtlen folyamatok végsősoron a kettősréteg struktúra felbomlását, fordított hexagonális fázis kiválását segíthetik, ami a membrán funkcióvesztését idézheti elő (Quinn, 1989). A lipidekre gyakorolt hatást már

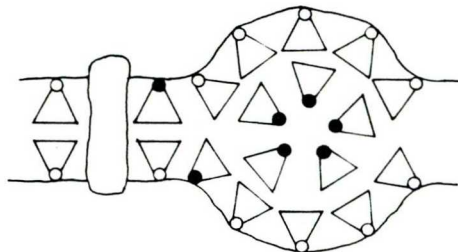
viszonylag régóta tanulmányozzák: a hőmérséklet emelkedése kiválthatja a kettősréteg struktúrát nem kedvelő lipidek (különösen a többszörösen telítetlen zsírsavakkal észterezett MGDG) szegregálódását a többi lipidtől, ami bizonyos határt túllépve önálló hexagonális fázis kialakulásához vezet (Thomas és mtsai, 1986b; Williams és Quinn, 1987). Ezt a folyamatot tovább erősítheti a hőnek a fehérjékre kifejtett direkt hatása. Magas hőmérsékleteken a fehérjék kis erők által fenntartott harmadlagos szerkezete meg bomlik, és felszínre kerülhetnek addig rejtett struktúrák: hidrofób szekvenciariészletek, reaktív -SH csoportok (Rothman, 1989). A felszínre került reaktív csoportok inter- és intramolekulárisan egyaránt kölcsönhatásba léphetnek egymással: a kovalens S-S hidak kialakulása (Caldwell, 1989) és a fehérjék hidrofób felszíneinek összetapadása a fehérjék aggregációját idézhetik elő. A membrán lipid kettősrétegében a fehérjék aggregációja miatt fehérje gazdag és fehérjében szegényebb régiók jöhetnek létre. A lipid kettősréteg stabilizálásában a fehérjéknek fontos szerepük lehet (Quinn, 1989), ezért a fehérje szegény területek kialakulása önmagában is fokozza a hexagonális fázis kialakulásának valószínűségét.

A dolgozatban leírt vizsgálataink ill. a fenti megfontolások alapján a sejtek magashőmérséklet adaptációja során megnövekedett hőstabilitásának magyarázatául a következő modellt vázoltuk fel (16. ábra). A fotoszintetikus aktivitás és klorofill fluoreszcencia mérések igazolták, hogy a magas hőmérsékleti károsodás elsődlegesen a tilakoid membránt érinti. A magashőmérséklethez adaptálódott sejtek hőtűrése megnőtt ill. fotoszintetikus aktivitásukat magasabb hőmérsékleten veszítették el. E sejtek tilakoidjában a zsírsavtelítettség és a fehérje/lipid arány egyaránt megnőtt. A tilakoid membránok állapota befolyásolta a membránlipidek fehérjékhez történő asszociációjának hőmérsékletfüggését és a membrán fluiditását. Hőstressz körülmények között bizonyos hősokkfehérjék asszociálódtak a tilakoid membránhoz, ami a membránfluiditás csökkenését és a fotoszintetikus elektrontranszport hőstabilitásának további növekedését idézte elő.

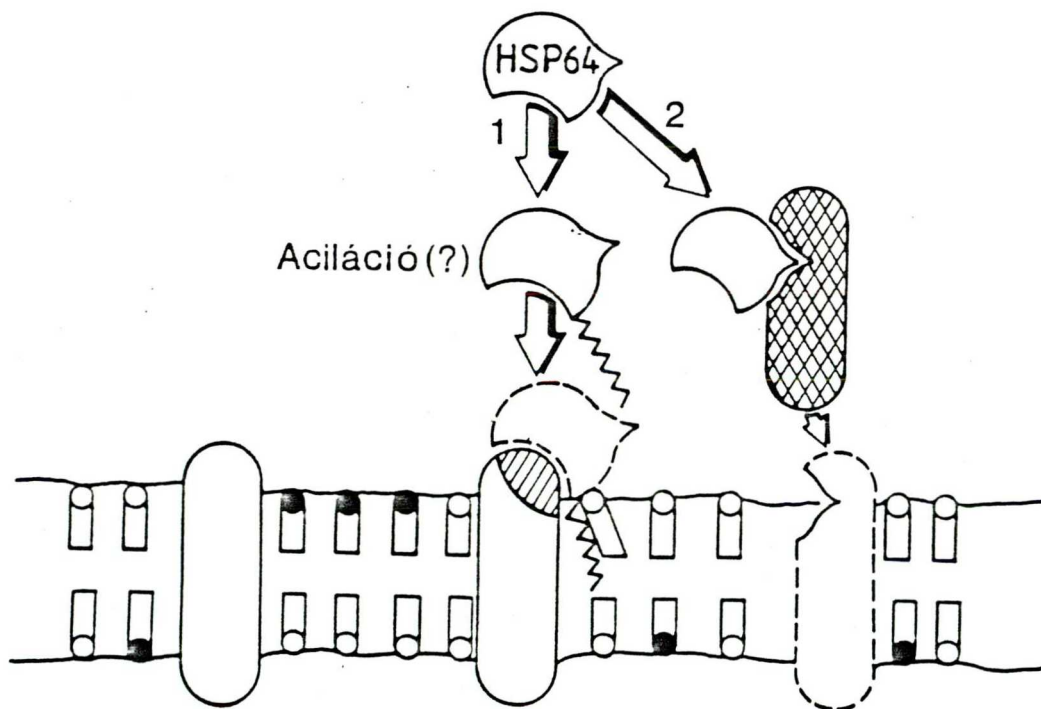
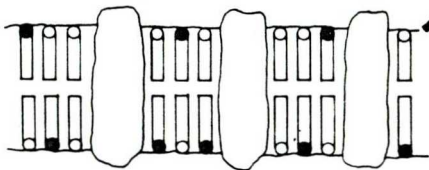
22° C - adaptált



Hőstressz
(40-47°C)



36° C - adaptált



16. Ábra. A hőmérsékletadaptáció és a termostabilitás membránmodellje

E fehérjék közül a legnagyobb mennyiségben előforduló fehérjék egyike a 64 kDa molekulatömegű GroEL chaperonin, melynek komoly szerepe lehet a membránfehérjék védelmében és más fehérjék membránba történő transzportjában ill. ténylegesen károsodott fehérjék kijavításában (Ellis és Vies, 1991). A magasabb hőmérséklethez adaptált sejtek tilakoidjában megnövekedett a zsírsavtelítettség és a fehérje/lipid arány. A megváltozott lipid-fehérje kölcsönhatások következtében a membrán túlfuidizálódása, és a nem kettősrétegű struktúrák kialakítását előnyben részesítő lipidek fehérjékről való leválása magasabb hőmérsékleteken következhet be, így a membrán hőstabilitása megnő. A magashőmérséklet adaptációval indukálható termotolerancia egyéb módon is kapcsolatban állhat a tilakoid lipid-fehérje kölcsönhatásainak adaptív módosulásával. Az irodalmi áttekintésben részletesen tárgyaltam, hogy a fotoszintetikus elektrontranszport speciális pigment-lipid-protein komplexeken keresztül zajlik, melyek pontos molekuláris szerveződése ma nem ismeretes. Amint arra szintén utaltam, valószínű továbbá, hogy e komplexekben a fehérjekötött és általában magas telítettségű lipid zsírsav molekulaspecieszek funkcionális szereppel bírnak. Következésképpen elképzelhető, hogy bizonyos lipidek adaptáció során szorosabbá váló fehérje-kölcsönhatásai az elektron transzporter komplexek (pl. PSII) natív, működőképes állapotának megtartását célozzák.

AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Igazoltuk, hogy a *Synechocystis* PCC 6803 megfelelő modell a kívánt hőmérsékletadaptációs vizsgálatok elvégzésére. A magasabb hőmérsékleten nevelt sejtek fotoszintetikus oxigén fejlődése ill. PSII aktivitása magasabb hőmérsékleten károsodott, mint az alacsony hőmérséklet adaptált sejteké. Mivel a PSII aktivitásának csökkenése kisebb hőmérsékleten következett be, mint a teljes fotoszintetikus elektrontranszport inaktiválódása, ebből arra következtethettünk, hogy a sejtek magashőmérsékleten bekövetkező károsodása a PSII komplex-szel hozható összefüggésbe.

A sejtek eltérő hőstabilitását okozó adaptációs válaszok felderítése céljából megvizsgáltuk a tilakoid membrán összetételének változását a nevelési hőmérséklet függvényében. A tilakoid lipidösszetétele az adaptáció során változatlan maradt, amíg a lipidek zsírsavalkilláncainak telítettsége és a membrán fehérje/lipid aránya a magashőmérsékletadaptáció hatására megnövekedett.

A zsírsavtelítettség adaptív és regulációs szerepének mélyebb megértése érdekében olyan deszaturációs mutáns sejtvonalon is elvégeztük a vizsgálatokat, melyben a többszörösen telítetlen zsírsavak teljesen hiányoznak. A *Synechocystis* Fad6/*desA*⁻ mutáns tilakoidjában a lipidek zsírsavalkilláncai az izoterm körülmények között nevelt vad típusával összehasonlítva telítettebbek, miközben a lipidosztályok aránya megegyezik. A mutáns tilakoid membránjában a fehérje/lipid arány kisebb, mint a vad típusban. Ezzel bizonyítottuk, hogy egy belső szerkezeti fluiditás modulátor (kettőskötéstartalom) megváltozása egy másik modulátor (fehérje/lipid arány) egyidejű változását idézi elő, aminek hátterében a fluiditásreguláció állhat. A fehérje/lipid arány változása a mutáns tilakoidjában azt is bizonyítja, hogy ez a

tilakoid nem egyszerűen többszörösen telítetlen zsírsavakban szegény membrán, hanem a zsírsavdeszaturáció gátlása együtt jár a membránszerkezet általános megváltozásával.

A tilakoid membránok fluiditásregulációjának megértése céljából vizsgáltuk a membrán "átlagos" fluiditásának és fluiditás grádiensének módosulását a hőmérsékleti adaptáció hatására. Bizonyítottuk, hogy a vad típusú sejtek teljesítik a "homeoviszkozus" adaptáció elvét. Ezzel szemben a mutáns esetén ez nem igazolható, melyből azt a következtetést vontuk le, hogy a membránfluiditás pontos beállítására a fehérjék kevésbé alkalmasak, mint a lipidek. A mutáns sejt - hasonlóan a vad fenotípusok hőmérsékletadaptációjához - azt a fluiditás különbséget és/vagy fehérje-lipid kölcsönhatás változást, amit a megnövekedett lipid telítettség okoz, a fehérje/lipid arány csökkentésével igyekszik kompenzálni. A tilakoid membránból izolált lipideken végzett fluiditásvizsgálataink igazolták a fehérjék jelentős fluiditáscsökkentő hatását, ami azonban a hőmérséklettől függ. Vizsgálataink bizonyították, hogy a rendszer képes két látszólag független szabályozó mechanizmus segítségével közel "izofluid" állapotot létrehozni. A különböző hőmérséklethez adaptálódott sejtek eltérő hőstabilitása "átlagos" membránfluiditás eltérésekkel nem volt magyarázható, azaz a "határfluiditás" elve rendszerünkben az alkalmazott mérési eljárások segítségével nem igazolható.

A magashőmérséklet okozta fotoszintetikus károsodás helyének felderítése céljából megvizsgáltuk a különböző pigment/protein komplexek közötti energiaátadás hőmérsékletfüggését. Bizonyítottuk, hogy az elsődleges károsodást nem a fénybegyűjtő komplex (fikobiliszóma) és a PSII közötti energiaáramlás, hanem a PSII reakciócentrum szenved el. A mutáns hőstabilitása az izoterm körülmények között nevelt vad típusával megegyezett, tehát a genetikai beavatkozással módosított sejtekben a többszörösen telítetlen zsírsavak hiánya a tilakoid membrán funkcióinak hőstabilitását nem befolyásolta.

Igazoltuk, hogy egy szubletális hőstressz a sejtek hőstabilitását tovább fokozza. Ezt az indukált termotoleranciát a tilakoid membránba beépülő fehérjék okozzák, amit a hőkezelés

hatására megnövekedett fehérje/lipid arány bizonyít. A tilakoiddal kölcsönhatásba lépő fehérjék közül a legjelentősebb a GroEL chaperonin, ami egy hősokkfehérje.

Bizonyítottuk, hogy a hőmérsékletadaptáció okozta lipid-fehérje kölcsönhatás változások összefüggésbe hozhatók a fehérje/lipid arány és a zsírsavtelítetlenségi szint változásával.

Hipotézist állítottunk fel a tilakoid membrán hőmérsékletadaptációjának és termostabilitásának kapcsolatára.

A fenti ismeretek birtokában lehetőség van élő organizmusok irányított befolyásolására, a membránszerkezet módosítására oly módon, hogy az magasabb hőmérsékleti stressznek kitéve nagyobb stabilitást mutasson.

IRODALOMJEGYZÉK

Allen, M.M. (1968) Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates.

J. Phycol. **4**, 1-4

Anderle, G. and Mendelsohn, R. (1986) *Biochemistry* **25**, 2174-2179

Barber, J., Ford, R.C., Mitchell, R.A.C. and Millner, P.A. (1984) *Planta* **161**, 375-380

Berry, J.A. and Björkman, O. (1980) Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **31**, 491-543

Bligh, E.G., Dyer, W.J. (1959) *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911-917

Brenner, R.R. (1984) *Prog. Lipid Res.* **23**, 69-96

Caldwell, C.R. (1989) *Plant. Physiol.* **91**, 1339-1344

Chapman, D., Urbina, J., and Keough, K.M. (1974) *J. Biol. Chem.* **249**, 2512-2521

Chapman, D.J., De-Felice, J. and Barber, J. (1983) *Plant Physiol.* **72**, 225-228

Cheng, M.Y., Hartl, F.U., Martin, J., Pollock, R.A., Kalousek, F., Neupert, W.,

Hallberg, E.M., Hallberg, R.L., Horwich, A.L. (1989) *Nature* **337**, 620-625

Coolbear, K.P., Berde, C.B. and Keough, K.M.W. (1983) *Biochemistry* **22**, 1466-1473

Cramer, W.A., Whitmarsh, J. and Low, P.S. (1981) *Biochemistry* **20**, 157-162

Cullis, P.R., de Kruijff, B., Hope, M.J., Verkleij, A.J., Nayar, R., Farren, S.B.,

Tilcock, C., Madden, T.D. and Bally, M.B. (1983) in *Membrane Fluidity in Biology*

(Aloia, R.C., ed.) vol 1., 39-81 Academic Press, New York

Davison, I.R. (1991) *J. Phycol.* **27**, 2-8

Ellena, J.F., Pates, R.D. and Brown, M.F. (1986) *Biochemistry* **25**, 3742-3748

Ellis, R.J. and van der Vies, S.M. (1991) *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 321-347

Ford, R. and Barber, J. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* **722**, 341-348

- Fork, D.C., Sen, A. and Williams, W.P. (1987) *Photosyn. Res.* **11**, 71-87
- Van Ginkel, G., Van Langen, H. and Levine, Y.K. (1989) *Biochimie* **71**, 23-32
- Glaczinski, H. and Klopstech, K. (1988) *Eur. J. Biochem.* **173**, 579-583
- Glazer, A.N. (1987) In: *The cyanobacteria* (Fay, P. and Van Baalen, C., eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 69-94
- Goloubinoff, P., Christeller, J.T. Gatenby, A.A. and Lorimer, G.H. (1989) *Nature* **342**, 884-889
- Gombos, Z., Barabás, K., Joó, F. and Vígh, L. (1988) *Plant. Physiol.* **86**, 335-337
- Gombos, Z., Kis, M., Páli, T. and Vígh, L. (1987) *Eur. J. Biochem.* **165**, 461-465
- Gombos, Z., Wada, H., Murata, N. (1991) *Plant Cell Physiol.* **32**, 205-211
- Gounaris, K., Brain, A.P.R., Quinn, P.J. and Williams, W.P. (1983) *FEBS Lett.* **153**, 47-52
- Gounaris, K., Brain, A.P.R., Quinn, P.J. and Williams, W.P. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* **766**, 198-208
- Hartl, F.U. and Neupert, W. (1990) *Science* **247**, 930-938
- Hellergen, J., Lundborg, T. and Widell, S. (1984) *Physiol. Plant.* **62**, 162-166
- Horváth, G., Droppa, M., Szito, T., Mustárdy, L.A., Horváth, L.I. and Vígh, L. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* **849**, 325-336
- Horváth, I., Vígh, L. and Farkas, T. (1981) *Planta* **151**, 103-108
- Horváth, L.I., Brophy, P.J. and Marsh, D. (1988) *Biochemistry* **27**, 46-52
- Howarth, C.J. (1991) *Plant, Cell and Environment* **14**, 831-841,
- Hugly, S., Kunst, L., Browse, J. and Somerville, C. (1989) *Plant Physiol.* **90**, 1134-1142
- Joó, F., Balogh, N., Horváth, L.I., Filep, Gy., Horváth, I. and Vígh, L. (1991) *Anal. Biochem.* **194**, 34-40
- Kenrick, J. R. and Bishop, D. G. (1986) *Plant Physiol.* **81**, 946-949

- Kenyon, C.N., Rippka, R. and Stanier, R.Y. (1972) *Arch. Microbiol.* **83**, 216-236
- Killian, J.A., De Jongh, A.M.Ph., Bijvelt, J., Verkleij, A.J. and De Kruijff, B. (1990) *EMBO J.* **9**, 815-819
- Koole, P., Dammers, A.J., Van Ginkel, G. and Levine, Y.K. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* **777**, 297-305
- Krause, G.H., Santarius, K.A. (1975) *Planta* **127**, 285-299
- Krishnasamy, S., Mannan, R.M., Krishnan, M. and Gnanam, A. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 5104-5109
- Van Langen, H., Van Ginkel, G., Shaw, D. and Levine, Y.K. (1989) *Eur. J. Biophys.* **178**, 37-48
- Laskay, G. and Lehocski, E. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* **849**, 761-767
- Lee, A.G. (1987) *J. Bioenerg. Biomembr.* **19**, 581-603
- Li, G., Knowles, P.F., Murphy, D.J., Nishida, I. and Marsh, D. (1989) *Biochemistry* **28**, 7446-7452
- Low, P.S., Ort, D.R., Cramer, W.A., Whitmarsh, J. and Martin, B. (1984) *Arch. Biochem. Biophys.* **231**, 336-344
- Lynch, D.V. and Steponkus, P.L. (1987) *Plant Physiol.* **83**, 761-767
- Lyons, J.M. (1973) *Annu. Rev. Plant Physiol.* **24**, 445-466
- Madden, T.D., Hope, M.J. and Cullis, P.R. (1983) *Biochemistry* **22**, 1970-1974
- Marsh, D. (1987) *J. Bioenerg. Biomembr.* **19**, 677-689
- McConnell, H.M., Tamm, L.K. and Weis, R.M. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 3249-3253
- McEhlaney, R.N. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* **864**, 361-421
- Michaelson, D.M., Horwitz, A.F. and Klein, M.P. (1974) *Biochemistry* **13**, 2605-2612

- Miller, M., Pedersen, J.Z. and Cox, R.P. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **943**, 501-510
- Murata, N. (1989) *J. Bioenerg. Biomembr.* **21**, 61-75
- Murata, N. and Yamaya, J. (1984) *Plant Physiol.* **74**, 1016-1024
- Murata, N., Higashi, S.I. and Fujimura, Y. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* **1019**, 261-268
- Murphy, D.J. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* **864**, 33-94
- Murphy, D.J. and Woodrow, I.E. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* **725**, 104-112
- Nash, D., Miyao, M. and Murata, N. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* **807**, 127-133
- O'Farrel, P.H. (1975) *J. Biol. Chem.* **250**, 4007-4021
- Oquist, G. (1982) *Plant. Physiol.* **69**, 869-875
- Pakrasi, H.B., Diner, B.A. Williams, J.G.K., Arntzen, C.J. (1989) *The Plant Cell* **1**, 591-597
- Peterson, G.L. (1977) *Anal. Biochem.* **83**, 346-
- Pick, U., Gounaris, K., Weiss, M. and Barber, J. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* **808**, 415-420
- Quinn, P.J. (1981) *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **38**, 1-104
- Quinn, P.J. (1989) *J. Bioenerg. Biomem.* **21**, 3-19
- Raison, J.K. (1973) *J. Bioenerg.* **4**, 285-309
- Raison, J.K., Roberts, J.K.M. and Berry, J.A. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* **688**, 218- 228
- Rehorek, M., Dencher, N.A. and Heyn, M.P. (1985) *Biochemistry* **24**, 5980-5988
- Rothman, J.E. (1989) *Cell* **59**, 591-601
- Santarius, K.A. (1976) *J. Therm. Biol.* **1**, 101-107
- Sato, N. and Murata, N. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* **619**, 353-366
- Sato, N., and Murata, N. (1988) *Meth. in Enzymol.* **167**, 251-259
- Schlame, M., Horváth, L. and Vígh, L. (1990) *Biochem. J.* **265**, 79-85

- Schreiber, U. and Armond, P.A. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* **502**, 138-151
- Schuster, G. Evan, D., Kloppstech, K. and Ohad, I. (1988) *EMBO J.* **7**, 1-6
- Selstam, E., Brentel, I. and Lindblom, G. (1990) In: *Plant Lipid Biochemistry, Structure and Utilization* (Quinn, P.J. and Harwood, J.L., eds.), pp.39-46 Portland Press Limited, London
- Shinitzky, M. and Barenholz, Y. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* **515**, 367-394
- Shinitzky, M. and Yuli, I. (1982) *Chem. Phys. Lipids* **30**, 261-282
- Singer, S.J., Nicholson, G.L. (1972) *Science* **175**, 720-731
- Skowyra, D., Georgopoulos, C. and Zylicz, M. (1990) *Cell* **62**, 939-944
- Somerville, C. and Browse, J. (1991) *Science* **252**, 80-87
- Stainer, G. (1988) *Met. Enzym.* **167**, 157-172
- Stubbs, C.D. and Smith, A.D. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* **779**, 89-137
- Süss, K.H. and Yordanov, I. (1986) *Plant Physiol.* **81**, 192-199
- Sweet, W.D. and Schroeder, F. (1988) in *Advances in membrane fluidity* (Aloia, R.C., Gordon, L.M. and Curtain, C.C., eds.) vol **2**, 17-42 Alan R. Liss, Inc.
- Szalontai, B., Droppa, M., Vígh, L., Joó, F. and Horváth, G. (1986) *Photobiochem. Photobiophys.* **10**, 233-240
- Thebud, R., Santarius, K.A. (1982) *Plant Physiol.* **70**, 200-205
- Thomas, P.G., Dominy, P.J., Vígh, L., Mansourian, A.R., Quinn, P.J. and Williams, W.P. (1986b) *Biochim. Biophys. Acta* **849**, 131-140
- Thomas, P.G., Quinn, P.J. and Williams, W.P. (1986a) *Planta* **167**, 133-139
- Thulborn, K.R., Tilley, L.M., Sawyer, W.H. and Treloar, F.E. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* **558**, 166-178
- Vierling, E., Harris, L.M. and Chen, Q. (1989) *Mol. Cell. Biol.* **9**, 461-468

- Vígh, L., Gombos, Z., Horváth, I. and Joó, F. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* **979**, 361-364
- Vígh, L., Gombos, Z. and Joó, F. (1985c) *FEBS Lett.* **191**, 200-204
- Vígh, L., Horváth, I., Van Hasselt, P.R. Kuiper, P.J.C. (1985a) *Plant Physiol.* **79**, 756-759
- Vígh, L. and Joó, F. (1983) *FEBS Lett.* **162**, 423-427
- Vígh, L., Joó, F., Droppa, M., Horváth, L. and Horváth, G. (1985b) *Eur. J. Biochem.* **147**, 477-481
- Wada, H., Gombos, Z. and Murata, N. (1990) *Nature* **347**, 200-203
- Wada, H., Gombos, Z., Sakamoto, T. and Murata, N. (1992) *Plant. Cell Physiol.* (in press)
- Wada, H., Murata, N. (1989) *Plant Cell Physiol.* **30**, 971-978
- Wada, H., Murata, N. (1990) *Plant Physiol.* **92**, 1062-1069
- Watanabe, T., Fukushima, H., Kasai, R. and Nozawa, Y. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* **665**, 666-673
- Webb, M.S. and Green, B.R. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1060**, 133-158
- Williams, W.P. and Quinn, P.J. (1987) *J. Bioenerg. Biomem.* **19**, 605-624
- Wilson, J. M. és Crawford, R. M. M. (1974) *New Phytol.* **73**, 270-273
- Wolf, D.E. and Voglmayer, J.K. (1984) *J. Cell Biol.* **98**, 1678-1684
- Yatvin, M.B. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* **901**, 147-156

Elfogadott publikációk és kéziratok listája

(* Az értekezés alapjául szolgáló cikkek és kéziratok)

Benkő, S., Horváth, I., Török, Zs., Joó, F. and Vigh, L. Selective hydrogenation of surface membranes in platelet using a polymer-anchored colloidal palladium catalyst (benyújtva, *J. Molec. Catal.*)

Horváth, I., Török, Zs., Vígh, L. and Kates, M. (1991) Lipid hydrogenation induces elevated 18:1-CoA desaturase activity in *Candida lipolytica* microsomes *Biochim. Biophys. Acta* **1085**, 126-130

*Kovács, E., Lehel, Cs., Mustárdy, L., Gombos, Z., Török, Zs., Horváth I. and Vígh L. (1992) Heat stress induces association of the GroEL-related chaperonin with thylakoid membranes in cyanobacterium, *Synechocystis* PCC 6803 (benyújtva, *Eur. J. Biochem.*)

*Lehel, Cs., Gombos, Z., Török, Zs. and Vígh, L. (1992b) Growth temperature modulates thermotolerance and heat shock response of cyanobacterium, *Synechocystis* PCC 6803 (benyújtva, *Plant Physiol. Biochem.*)

Lehel, Cs., Wada, H., Kovács, E., Török, Zs., Gombos, Z., Horváth, I., Murata, N. and Vígh, L. (1992a) Heat shock protein synthesis of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 : purification of the GroEL-related chaperonin *Plant. Molec. Biol.* **18**, 327-336

Lehel, Cs., Wada, H., Loss, D., Györgyei J., Kovács, E., Török, Zs., Gombos, Z., Horváth, I., Murata, N. and Vígh, L. Cloning and nucleotide sequence of groESL operon, encoding chaperonins of the cyanobacterium, *Synechocystis* PCC 6803 (előkészületben)

Mayor, J-P., Török, Zs., Siegenthaler, P-A. and Vigh, L. (1992) Differential accessibility of a hydrogenation catalyst to glycolipids in thylakoid membranes from atrazine-resistant and -susceptible *Solanum nigrum* biotypes *Plant Cell Phys.* **33**, 209-215

- Schlame, M., Horváth, I., Török, Zs., Horváth, L.I. and Vigh, L. (1990)
Intramembraneous hydrogenation of mitochondrial lipids reduces the substrate availability but not the enzyme activity of endogenous phospholipase A. The role of polyunsaturated phospholipid species *Biochim. Biophys. Acta* **1045**, 1-8
- *Török, Zs., Gombos, Z., Horváth, I., Lehel, Cs., Wada, H., Murata, N. and Vígh, L.
Mechanisms of fluidity regulation in thylakoids of the wild type and fatty acid desaturase mutant/transformant, *Fad6/desA* of cyanobacteria, *Synechocystis* PCC 6803 (benyújtva, *Biochim. Biophys. Acta*)
- *Török, Zs., Kovács, E., Gombos, Z., Horváth, I. and Vígh, L. Association of stress-proteins with thylakoids increases membrane microviscosity and confers thermostability in cyanobacteria, exposed to sublethal heat stress (előkészületben)
- *Vígh, L., Lehel, Cs., Török, Zs., Gombos, Z., Balogh, N. and Horváth, I. (1990) Factors affecting thylakoid thermal stability in cyanobacterium, *Synechocystis* PCC 6803 In: *Plant Lipid Biochemistry, Structure and Utilization* (Quinn, P.J. and Harwood, J.L. eds.), pp.373-381 Portland Press Limited, London

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Dolgozatomban az 1989-1992 között, az MTA Szegedi Biológiai Központ Biokémiai Intézetében végzett vizsgálataim eredményeit foglaltam össze. Ezúton szeretnék köszönetet mondani az intézet vezetőinek, hogy munkámat lehetővé tették.

Legfőképpen témavezetőmnek és csoportvezetőmnek, Vígh Lászlónak tartozom köszönettel, akinek mérhetetlen szakmai segítsége és türelmes, baráti támogatása nélkül e dolgozat nem készülhetett volna el.

Köszönettel tartozom Horváth Ibolyának és Gombos Zoltánnak szakmai segítségükért és tanácsaikért.

Szeretném megköszönni Balogh Nándornak az ESR vizsgálatokban, Kovács Eszternek és Lehel Csabának a hősokkfehérjék vizsgálatában nyújtott segítségét. Köszönöm Petrényi Lászlóné és Nikovics Krisztina lelkiismeretes technikai segítségét. Köszönettel tartozom Farkas Tibornak dolgozatom elolvasásáért és értékes tanácsaiért.

Külön köszönettel tartozom Horváth Ibolyának, Vígh Lászlónak és Gombos Zoltánnak azért a szakmai és baráti légkörért, melyben munkámat örömmel végezhettem.

Végül szeretném megköszönni feleségem támogatását és türelmét.