Ph.D. Tézis

A fikobiliszóma felépülése a *Synechocystis* PCC6803 cianobaktérium törzsben

UGHY Bettina

Szegedi Tudományegyetem
Biológia Doktori Iskola
MTA Szegedi Biológiai Központ
Magyarország

Univeristé de Paris-Sud, Centre d'Orsay
École doctorale: Chimie bioorganique et bioinorganique
CEA, Saclay; CNRS URA 2096
Franciaország

Szeged

2005

Bevezetés

A cianobaktériumok oxigén-termelő fotószintetizáló szervezetek, melyek több milliárd évvel ezelőtt jöttek létre a Földön. A fotoszintézis folyamatának köszönhető a Földet az UV sugárzástól védő ózonréteg kialakulása, a légkörünkben található oxigén és a Földön található szerves anyag nagy részének megjelenése. A fotoszintézis a napfény energiájának begyűjtésével kezdődik, amit úgynevezett fénybegyűjtő antenna fehérje-komplexek, a cianobaktérium sejtek esetében egy szupramolekuláris fehérje komplex, a fikobiliszóma végzi. A fikobiliszóma továbbítja a fotonok energiáját a fotoszintetikus apparátus reakciócentrumaiba, ahol a fényenergia kémiai energiává alakul át. Ez a hatalmas, körülbelül 5-20 x 10^6 Da tömegű fehérje komplex, mely 95 %-os hatékonysággal továbbítja a begyűjtött energiát, főként fikobiliproteinekből áll. A fikobiliproteinekben kovalensen kötött pigment molekula, nyílt láncú tetrapirrol, a fikobilin található. Minden fikobiliszóma stabilis alapegysége a trimerekbe és hexamerekbe szerveződött fikobiliprotein oligomer. A fikobiliszóma két fő szerkezeti egységét különböztethetjük meg, a magot és a róla elágazó rudakat. Az általunk vizsgált *Synechocystis* PCC6803 cianobaktérium törzsben a magot három, allofikocianin trimerből álló henger alkotja, melyhez hat rúd kapcsolódik. A rudak három fikocianin hexamerből épülnek fel. A fikobiliszóma szerkezetével és működésével kapcsolatban két fő kérdés merül fel. Az egyik, hogyan áll össze ez a hatalmas komplex szerkezet; a másik, hogyan lehetséges ilyen nagy hatékonyságú energiatovábbítás ennyire korlátozott számú pigment és fehérje segítségével. A kevésbé ismert, úgynevezett kötőfehérjéknek lehet ezekben a folyamatokban meghatározó szerepük. Ezek a fehérjék indukálják a trimerek fej-fej kapcsolódását, valamint összetartják a hexamereket, ezáltal fontos szerepet töltenek be a fikobiliszóma szerkezetének kialakításában. A fikobiliproteinek spektroszkópiai tulajdonságainak módosításával kiemelkedő szerepük van az egyenletes energiatovábbításban is.

A *Synechocystis* PCC6803 cianobaktérium törzsben az első fikocanin hexamert a rúd-mag kötőfehérje kapcsolja a maghoz és további fikocianin hexamerek rudakhoz való kapcsolódásában a 33 és 30 kDa molekuláris tömegű rúdkötőfehérjéknek van szerepe. A rúd-mag kötőfehérjét két gén a *cpcG1* és *cpcG2* kódolja, melyek működését korábban nem vizsgálták. Nem ismert, hogy a különböző gének által kódolt rúd-mag kötőfehérjék egymástól eltérő szerepet töltenek-e be. A rúdkötőfehérjéket kódoló gének a fikocianin alegységeit is kódoló *cpc* operonon találhatóak. Ezen az operonon öt gén található, a fikocianin β és α alegységét kódoló *cpcB* és *cpcA*, valamint a 30, 33 és 10 kDa-os rúdkötőfehérjéket kódoló *cpcC2*, *cpcC1* és *cpcD* gének. Az első fikocianin hexamer maghoz történő kapcsolódása után

a további két fikocianin hexamer kapcsolódása két módon lehetséges. Az egyik lehetőség, a 33 és a 30 kDa-os kötőfehérjék felcserélhetők és bármelyik kapcsolhatja a középső, illetve a magtól távolabbi fikocianin hexamert. A másik lehetőség szerint a középső fikocianin hexamer kizárólag az egyik, míg a magtól távolabbi pedig csak a másik kötőfehérjét tartalmazza. A 10 kDa-os kis rúdkötőfehérjét még nem vizsgálták *Synechocystis* PCC6803 cianobaktériumban. Más cianobaktériumokon történt vizsgálatok alapján feltételezik, hogy a 10 kDa-os kötőfehérje a rudak végéhez kapcsolódik és a rudak egyforma hosszúságáért felelős.

A fikbiliszóma által begyűjtött fényenergiát a fotoszintetikus rendszer NADPH és ATP szintézisében hasznosítja. A fotoszintézis utolsó szakaszában a ferredoxin és a $NADP^+$ között az elektron átmenetet a ferredoxin-NADP(H)-oxidoreduktáz (FNR) katalizálja. Az FNR-t a *petH* gén kódolja. A *Synechocystis* PCC6803-ban az FNR-nak két formája található meg: a fikobiliszómához kapcsolódó 46,3 kDa-os forma és a szabad 34,3 kDa-os forma. Széles körben elfogadott, hogy a 34,3 kDa-os forma a 46,3 kDa-os forma lebontásával keletkezik. Lehetséges azonban, hogy a 34,3 kDa-os forma egy alternatív fehérjeátírás terméke, mivel ennek a fehérjének az N-terminális vége metioninnal kezdődik, mely a fehérjék átírásának kezdő kódja. A fikobiliszómához kötődő 46,3 kDa-os FNR-nak az N-terminális vége a 10 kDa-os kis rúdkötőfehérjével nagy hasonlóságot mutat. Emiatt a hasonlóság miatt feltételezik, hogy az FNR a kis rúdkötőfehérjével versenyben a rudak végéhez kapcsolódik; de az is felmerült, hogy az FNR közvetlenül a fikobiliszóma mag részéhez képes kapcsolódni.

Célkitűzés

Munkánk során elsődleges célul tűztük ki, hogy meghatározzuk a különböző kötőfehérjék szerepét a fikobiliszóma rudak felépítésében.

A következő kérdésekre kerestük a választ:

i. Miután a rúd-mag kötőfehérje az első fikocianin hexamert a mag részhez kapcsolta, hogyan építik tovább a fikobilszóma rudakat a 30 és 33 kDa-os kötőfehérjék?

ii. Mi a 10 kDa-os kötőfehérje szerepe a fikobiliszóma szerkezetének kialakulásában?

iii. Befolyásolja-e a fikocianin szintézisét a kötőfehérjék hiánya?

iv. Az általánosan használt Km és Ω kazetta beépítése befolyásolja-e *cpc* operon átírását?

v. Átíródik-e mind a két rúd-mag kötőfehérjét kódoló gén, a *cpcG1* és a *cpcG2* gén? Amennyiben igen, akkor mi a szerepük a fikobiliszóma felépítésében?

vi. Lehetséges-e, hogy a metioninnal kezdődő 34,3 kDa-os FNR egy a *petH* génről történő alternatív fehérjeátírás terméke?

vii. Mivel a 46,3 kDa-os FNR N-terminális része hasonlít a 10 kDa-os kötőfehérjéhez lehetséges-e, hogy mint ahogyan a 10 kDa-os kötőfehérje az FNR is a fikobiliszóma rudak végéhez kapcsolódik? Képes-e az FNR közvetlenül a fikobiliszóma mag részéhez kapcsolódni?

Kísérleti anyagok és módszerek

Nevelési körülmények

A vad típusú és a mutáns *Synechocystis* PCC6803 cianobaktériumok törzseket fotoautotróf körülmények között 40 μmol m^{-2} s^{-1} fényen, 32 °C hőmérsékleten, széndioxidban gazdag (~5%) légtérben neveltük. A neveléshez módosított BG 11 médiumot használtunk, a következő összetétellel: 30 μM vas-citrát, 3 μM EDTA-diNa, 30 μM nátrium-nitrát, 250 μM kálium-foszfát, 250 μM magnézium-szulfát, 250 μM kálcium-klorid, 200 μM nátrium-karbonát, 10 mM nátrium-bikarbonát és ugyanannyi mikroelemmel mint a BG 11-ben. Amennyiben szükséges volt 25 μg kanamicint, vagy 50 μg spektinomicint és 5 μg sztreptomicint adtunk a nevelési oldathoz. Az agaron történő neveléshez a fenti médiumhoz 1,5 % (w/v) Difco Bacto-agart és 5 mM nátrium-tioszulfátot adtunk. Ebben az esetben a nevelési hőmérséklet 30 °C és a fényintenzitás 30 μmol m^{-2} s^{-1} volt.

Fikobiliszóma vizsgálatához használt mutáns Synechocystis törzsek

Cianobaktérium törzsek	**Jellemzők**
30f	Δ*cpcC2*::*aphI* - *cpcC2* 68 % -ának kivágása (21-től 208-kódig), *aphI* beépítése (Km^r)
30r	Δ*cpcC2*::*aphI* – mint az előző csak az *aphI* ellentétes irányú beépítésével (Km^r)
Δ30D3	Δ*cpcC2, cpcD*$^-$::Ω - *cpcC2* 83 % -ának kivágása (2-től 230-kódig), a *cpc* operon transzkripciójának leállítása a *cpcD* elött (Sp^r, Sm^r)
D3	*cpcD*$^-$::Ω - Ω beépítése a*cpcC1* és a *cpcD* közé, a *cpc* operon transzkripciójának leállítása a *cpcD* elött (Sp^r, Sm^r)
33	Δ*cpcC1*::*aphI* - *cpcC1* 50 % -ának kivágása (77-től 220-kódig), *aphI* beépítése (Km^r)
CB	Δ*cpcC2C1*::*aphI* - *cpcC2* és *cpcC1* teljes kivágása (*cpcC2* 2 kódjától a *cpcC1* utolsó kódjáig), *aphI* beépítése (Km^r)
33c	*psbAII* helyre *cpcC1*-el transzkomplementált 33 (Km^r, Sp^r, Sm^r)
Cbc	*psbAII* helyre *cpcC1*-el transzkomplementált 33 CB (Km^r, Sp^r, Sm^r)
D4	*cpcD*$^-$::Ω - Ω beépítése *cpcD Hin*cII helyére, transzkripció leállítása a *cpcD*-ben (Sp^r, Sm^r)
WD	WT plusz *cpcD* a *psbAII* helyen (Km^r)
D3D	D3 plusz *cpcD* a *psbAII* helyen (Km^r, Sp^r, Sm^r)
D4D	D4 plusz *cpcD* a *psbAII* helyen (Km^r, Sp^r, Sm^r)
CK	Δ*cpc* operon :: aphI, sacB - *cpc* operon 85 % -ának kivágása, *aphI* és *sacB* beépítése (Km^r, $Szukróz^s$)
G1	*cpcG1*$^-$ :: Ω - Ω beépítése *cpcG1 Nru*I helyére (Sp^r, Sm^r)
G2	*cpcG2*$^-$ ::*aphI* - *aph* beépítése a *cpcG2 Bsp*1407I helyére (Km^r)

FNR vizsgálatához használt mutáns Synechocystis törzsek

Cianobaktérium törzsek	**Jellemzők**
I	FNR M 113 pontmutációja I-ná, Ω beépítése
V	FNR V 102 pontmutációja nem kezdő V-ná, Ω beépítése
H	Ω beépítése, mint I és V-ben
FS1	C beépítése, kód 110 az FNR-ban stop kód
FS2	C kivágása, kód 113 az FNR-ban stop kód

Gén transzformáció

Synechocytis PCC6803 (OD_{580nm}≈ 1,0) kultúrából 3 ml-t lefugáltunk, majd a sejteket átmostuk friss módosított BG 11-el és végül 150 μl módosított BG 11-ben vettük fel őket. Körülbelül 2 μg plazmid DNS-t adtunk a sejtekhez, majd 6-12 óráig kevés fényen tartottuk. Ezután módosított BG 11-es agarra vittük fel a sejteket, ami alá 12-24 óra múlva antibiotikum tartalmú oldatot kentünk.

Northern blot

Az RNS mintákat denaturálás után glioxal/DMSO pufferrel nátrium-foszfát puffert és jodoacetátot tartalmazó 0,8 % -os agaróz gél zsebeibe pipettáztuk. Az RNS-t a gélben 45 V-al 6,5 órán át 10 mM nátrium-foszfát pufferben futtattuk úgy, hogy a futtató puffert folyamatosan kevertettük a futtató kád két oldala között. Az elektroforézis után a gélt 15 percen át 200 ml 0,025 M NaOH oldatban áztattuk. Vizes öblítés után 15 percen át 200 ml 20 x SSC oldatban enyhén rázatva áztattuk tovább a gélt. Az RNS-t kapilláris blottal nitrocelulóz filterbe (Millipore Immobilon TM-Ny+ Transfer membrán) vittük át 20 x SSC oldattal. Az RNS-t a membránhoz Stratalinker UV Crosslinker Model 2400-al rögzítettük. A hibridizálást a Millipore javaslata alapján végeztük. A próbák jelölését Amersham Biosciences Ready-To-Go-DNA (-dCTP) jelölő kittel végeztük. A hibridizálást 68 °C-on 16 órán át tartott. Hibridizálás után a membránt 1 x SSC és 0,1 % SDS valamint 0,2 x SSC és 0,1 % SDS tartalmú oldattal mostuk, hogy a nem kötött jelölőt eltávolítsuk. A radioaktív jelet Molecular Dynamics STORM 860 Phosphorimager-rel rögzítettük. A felvitt RNS minták mennyiségének összehasonlításához az egyenletesen expresszálódó *rnpB* génre specifikus próbát használtuk.

A vizsgálatokhoz felhasznált próbák:

- a *cpc* operonról átíródó mindhárom transzkripttel hibridizáló próba,
- a *cpc* operonról átíródó két nagyobb transzkripttel hibridizáló próba,
- *aphI* specifikus próba,
- *cpcD* specifikus próba,
- *cpcG1* specifikus próba,
- *cpcG2* specifikus próba.

Fikobiliszóma izolálás

A cianobaktérium kultúrákból (OD_{580nm}= 0,8 – 0,9) 500 ml-t szobahőmérsékleten lefugáltunk (6500 g 5 min), majd az így összegyűjtött sejteket átmostuk 0,8 M kálium/nátrium-foszfát pufferrel (pH = 8,0) és lefagyasztottuk – 20 °C-on. A sejteket kiolvasztás után Complete™ (Roch) proteázt tartalmazó 0,8 M kálium/nátrium-foszfát pufferben (pH = 8,0) üveg gyönggyel hatszor egy percen át rázattuk, hogy feltárjuk a sejteket. A feltárt sejteket tartalmazó oldatot 2 percig 1500 g-vel fugáltuk, hogy eltávolítsuk az üveggyöngyöt és az esetleg össze nem tört sejteket. A felülúszót új csőbe helyeztük, majd Triton-100-t adtunk hozzá úgy, hogy a végkoncentrációja 0,2 % (v/v) legyen, majd 20 percig szobahőmérsékleten sötétben tartottuk. Az oldatot ezután polikarbonát csőben 15 percen át 3100 g-vel fugáltuk 18 °C-on. A centrifugálás után a felülúszót óvatosan lepipettáztuk a tetején úszó, klorofillt tartalmazó réteg alól. A felülúszóból 2 ml-t Beckman Ultra Clear™ 14x89-es csőben lépcsős cukor gradiensre rétegeztük. A cukor gradiens a következő rétegeket tartalmazta: 2,0 M (3 ml); 1,0 M (2 ml); 0,5 M (2 ml); 0,25 M (3 ml). A cukor oldatok 0,8 M kálium/nátrium-foszfát (pH = 8,0) puffer felhasználásával készültek. Centrifugálás (SW41 rotorral 35000 rpm-el 18 °C-on 16 órán át) után a fikobiliszómát tartalmazó kék részeket a cukorgradiensről fecskendővel gyűjtöttük össze.

Abszorpciós spektrum

200 μl-t a fikobiliszóma izolátumból 1800 μl 0,8 M kálium/nátrium foszfát (pH 8,0) pufferrel kihígítottuk, majd az így kapott oldat abszorpciós spektrumát 1 ml-es műanyag küvetta felhasználásával Varian Cary-5E dupla spektrofotométerrel, 0,5 nm-enként rögzítettük.

Fehérje analízis

A fikobiliszóma izolátumok fehérje-összetételének vizsgálatához 10-20 % Tris-Glicine gélt, vagy Invitrogene NuPAGE® Novex Bis-Tris 4-12 % gélt használtunk. Harminc µl fikobiliszóma mintát (OD_{620nm}= 10), illetve a csak mag komplexet tartalmazó mintákból 7,5 µl-t azonos mennyiség_ 20 %-os TCA-val jégen 5 perc alatt kicsapattuk. A csapadékot lecentrifugáltuk (2 min 21000 g 4 °C) és 15 µl pufferben feloldottuk, majd 5 percen át 85 °C–on tartottuk és ezt követően felvittük a gélre. A gélek Bio-SafeTM Coomassie (BIO-RAD) –val, illetve a NuPAGE® Novex Bis-Tris gélt Invitrogene SimplyBlue-val is festettük. A gélekről CCD kamerával rögzítettünk képet. Mivel a vad típus fikobiliszómájának fehérje-összetétele ismert, így a mutánsok komplexeinek fehérjéit a vad típus fehérjéinek elhelyezkedése alapján azonosítottuk. A vad típus fehérjéit pedig a molekulasúly jelölő segítségével azonosítottuk.

Eredmények

Molekuláris genetikai módszerek alkalmazásával, különböző fikobiliszóma rúdkötőfehérje mutánsokat hoztunk létre azért, hogy tanulmányozzuk a kötőfehérjék szerepét a *Synechocystis* PCC6803 cianobaktériumban. Megvizsgáltuk a vadtípusú és a mutáns sejtek fluoreszcenciáját. Összehasonlítottuk a vadtípusból és a mutánsokból izolált fikobiliszóma komplexek abszorpciós spektrumát, és SDS poliakrilamid gélen megvizsgáltuk a fehérje-összetételüket. Így meghatároztuk a különböző rúdkötőfehérjék szerepét a fikobiliszóma biogenezisében és működésében.

i. Vizsgálatainkkal bizonyítottuk, hogy a fikobiliszóma rudak felépülésekor a kötőfehérjék meghatározott sorrendben követik egymást. Az első fikocianin hexamer rúd-mag kötőfehérje által a maghoz történő kapcsolódása után a 33 kDa-os kötőfehérje kapcsolja a rudakhoz a második fikocianin hexamert, és csak ezután képes a 30 kDa-os kötőfehérje a harmadik, a rudak magtól távolabbi végén elhelyezkedő fikocianin hexamert beépíteni. A 33 és 30 kDa-os rúdkötőfehérjék nem helyettesítik egymást a fikobiliszóma rudak felépítésében. Eredményünk összhangban van nitrogén éheztetés során tapasztaltakkal, amikor legelőször a magtól távolabbi fikocianin hexamer és a 30 kDa-os kötőfehérje lebomlását majd ezt követően a következő fikocianin hexamer és a 33 kDa-os kötőfehérje lebomlását figyelték meg.

ii. A 10 kDa-os rúdkötőfehérje hozzákapcsolódott azoknak a rúdkötőfehérje mutánsoknak a fikobiliszómáihoz is melyek rúdjai csak egy vagy két fikocianin hexamerből álltak. A

mutánsok azonban kisebb mennyiségben tartalmazták a kis rúdkötőfehérjét, mint a vadtípus; amit kezdetben a beépített Km kazetta hatásával magyaráztuk. Nagyobb mennyiségben tartalmazta a kis rúdkötőfehérjét annak a Km kazettát is tartalmazó mutáns fikobiliszómája, melyben a 33 és a 30-as kötőfehérje is jelen volt, mint amelyikben csak a 33-as kötőfehérje volt jelen. Ez a megfigyelésünk azt bizonyította, hogy a kis rúdkötőfehérjének nagyobb az affinitása a 30 mint a 33 kDa-os kötőfehérjét tartalmazó fikocianin hexamerekhez. A kis rúdkötőfehérje hiányos mutáns nem mutatott különbséget a vadtípushoz képest. Ezért túltermeltettük a kis rúdkötőfehérjét, hogy meghatározzuk a szerepét. A mutánsok melyekben a kis rúdkötőfehérjét a *psbAII* promóter kontrolja alá helyeztük azt mutatták, hogy a transz visszahelyezett gén terméke gyorsan lebomlik. Ismert, hogy a kötőfehérjék érzékenyek a proteolízisre amíg nem kapcsolódnak a fikobiliproteinekhez.

iii. A kötőfehérjék mennyisége meghatározza a fikobiliszómába beépülő fikobiliproteinek mennyiségét és ezáltal a fotoszintetikus apparátushoz történő energiatovábbítás hatékonyságát. Szabad, a fikobiliszómához nem kapcsolódó, fikocianinok jelenléte a különböző rúdkötőfehérje mutánsokban azt bizonyította, hogy ezeknek a kötőfehérjéknek a hiánya nem befolyásolja a fikocianin bioszintézist.

iv. A mutánsaink szelektáláshoz Km és Ω kazettát használtunk. A mutánsaink fikobiliszómája a Km kazetta beépítésekor kisebb mennyiségben tartalmazta az inaktivált gén után kódolt fehérjéket, ami az adott kötőfehérje hiányának, vagy a beépített Km kazetta hatásának a következménye lehetett. A Km kazettát széles körben használják, de nem vizsgálták miként hat a beépítése az inaktivált gén környezetében elhelyezkedő gének átírására. A *cpc* operonról átíródó mRNS-ek méretének és mennyiségének Northern-blot analízisével kimutattuk, hogy a kanamicin rezisztencia kazetta genomba történő beépítése orientációjától függetlenül hatással lehet más, a beépítés által közvetlenül nem érintett gén expressziójára. A *cpc* operonról három mRNS íródik át. Legnagyobb mennyiségben az 1,6 kb-os, a *cpcB* és *cpcA* gént tartalmazó mRNS íródik át. A két hosszabb mRNS közül az egyik a fikocianin alegységeit kódoló gének mellett a 33 és a 30 kDa-os kötőfehérjék szekvenciáit, míg a másik mindezeken felül még a 10 kDa-os kötőfehérje kódoló szekvenciáját is tartalmazza. Ennek az utóbbi két mRNS-nek a mérete és a mennyisége is változott a rúdkötőfehérje mutánsokban. A Km kazetta a rúdkötőfehérjéket tartalmazó transzkriptumok stabilitását csökkentette. Km kazetta specifikus próbával az *aphI* promóterétől kiinduló és a kazettán túlnyúló transzkriptumokat mutattunk ki. Így amennyiben a Km kazetttát az átírással ellentétes irányban helyezzük antiszensz mRNS hatással is számolnunk kell. Vagyis az ellentétes irányban átíródó mRNS hozzákötődhet az eredetileg átíródó mRNS-hez, ezáltal akadályozva a fehérjeátírást és így az inaktivált gén előtt

elhelyezkedő gének által kódolt fehérjék mennyiségét is lecsökkentheti. Két kis rúdkötőfehérje hiányos mutánst hoztunk létre, az egyikben közvetlenül a kis rúdkötőfehérjét kódoló génbe építettük be az Ω kazettát, míg a másikban az Ω kazettát a kódoló gén elé építettük be elrontva ezzel az egyik *cpc* operonról átíródó mRNS 3‘ stabilizáló szerkezetét. Ez utóbbi mutáns fikobiliszómája kevesebb fikocianint tartalmazott mint a vadtípus és a másik kis rúdkötőfehérje mutáns. Ennek oka az érintett mRNS csökkent stabilitása lehetett, ezért arra a következtetésre jutottunk, hogy az Ω kazettának nincsen 3‘ stabilizáló hatása.

v. RT-PCR-al és Northern-blot analízissel bizonyítottuk, hogy a vadtípusú sejtekben mindkét rúd-mag kötőfehérjét kódoló *cpcG1* és *cpcG2* génről íródik át mRNS. A fikobiliszóma szerkezetének kialakításában azonban csak a *cpcG1* által kódolt fehérjének van szerepe, hiszen amikor ezt a gént inaktiváltuk a rudak nem kapcsolódtak a fikobiliszóma mag részéhez. Ugyanakkor a *cpcG2* gén inaktiválása nem befolyásolta a fikobiliszóma szerkezetét.

vi. Az FNR 34,3 kDa-os formájáról általánosan elfogadott, hogy a 46,3 kDa-os forma lebomlásával keletkezik. Az FNR-t kódoló *petH* gént megvizsgálva azonban két olyan aminosav kódot találtunk az első metionin után melyek lehetnek fehérje átírásának kezdő kódjai: a valin 102 melyet GTG kódol és a metionin 113 melyet ATG kódol. A V mutánsban a valin 102 kódját kicseréltük szintén valint kódoló GTC kódra, mely azonban nem fehérje átírást kezdő kód. Az I mutánsban a metionin 113 ATG kódját kicseréltük ATC-re mely nem fehérje átírást kezdő kód és izoleucint kódol. A vadtípus és a mutánsok FNR tartalmát Western-blot analízissel vizsgáltuk. A vadtípus és a V mutáns mindkét FNR formát tartalmazta, a 46,3 kDa-os formát nagyobb és a 34,3 kDa-os formát kisebb mennyiségben. Az I mutáns csak a 46,3 kDa-os formát tartalmazta, mely jelezheti azt, hogy a metionin 113 egy második fehérje átírás kezdő pontja. Amennyiben a metionin 113 a fehérje bontás specifikus helye, akkor a metionin lecserélése izoleucinra megakadályozhatja a fehérjelebontást, ami szintén lehet a magyarázata annak, hogy csak a nagyobb forma van jelen az I mutánsban. Ezért annak érdekében, hogy bizonyítsuk a metionin 113 fehérjeátírást kezdő kód olyan mutánsokat hoztunk létre az eredeti metionin 113 kódjának megváltoztatása nélkül, melyek közül az egyikben egy citozin beépítésével a *petH* génbe, a 110. kód stop kód lesz; illetve a másikban a *petH* gén egy citozinjának eltávolításával a 113. kód lesz a stop kód. Ebben a két mutánsban így az első metionintól induló fehérje átírás leáll a stop kódnál, de amennyiben a metionin 113 fehérje átírás kezdő kódja, akkor tőle kiindulva íródhat át fehérje. Ezekben a mutánsokban detektáltuk a 34,3 kDa-os FNR-t, vagyis a metionin 113-tól kiindulva történik fehérje átírás a *petH* génről. Ezzel bizonyítottuk, hogy minden korábbi feltételezéssel ellentétben a 34,3 kDa-os formája az FNR-nak *Synechocystis* PCC6803 cianobaktériumban nem a 46,3 kDa-os formájának a lebomlásával keletkezik, hanem egy a *petH* génről történő

második fehérjeátírás terméke.

vii. Az FNR ugyanolyan mennyiségben volt megtalálható a különböző fikobiliszóma rúd mutánsokból tisztított fikobiliszóma mintákban, mint a vadtípusúban, de nem volt jelen a csak fikobiliszóma mag-komplexet tartalmazó mintákban. Ez azt bizonyította, hogy az FNR nem képes közvetlenül a maghoz kapcsolódni, ugyanakkor nem is a kis rúdkötőfehérjével van versenyben ugyanazon kötőhelyért, hanem feltehetően a rudak maghoz közelebbi részén kötődik a rudakhoz.

Publikációs lista

Ughy, B., Ajlani, G.
Phycobilisome rod mutants in *Synechocytis* sp. strain PCC6803
Microbiology 2004. 150: 4147-4156

Domonkos, I., Malec, P., Sallai, A., Kovács, L., Itoh, K., Shen, G., **Ughy, B.**, Bogos, B., Sakurai, I., Kis, M. Strzalka, K., Wada, H., Itoh, S., Farkas, T., Gombos, Z.
Phosphatidylglycerol is essential for oligomerization of photosystem I reaction center
Plant Physiology 2004. 134: 1471-1478

Várkonyi, Zs., Masamoto, K., Debreczeny, M., Zsiros, O., **Ughy, B**., Gombos, Z., Domonkos, I., Farkas, T., Wada, H., Szalontai, B.
Low-temperature-induced accumulation of xanthophylls and its structural consequences in the photosynthetic membranes of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*: An FTIR spectroscopic study
PNAS 2002. 99(4): 2410-2415

Gombos, Z., Kis, M., Zsiros, O., **Ughy, B.,** Várkonyi, Zs., Wada, H., Farkas, T., Nagy, F.
Light induction of lipid desaturation and its role in acclimation to low temperature.
In: Photosynthesis: Mechanism and Effects Vol. III. (1998) G. Garab (ed.) 1783-1786.
Kluwer Academic Publishers , Printed in the Netherlands

Várkonyi, Zs., Zsiros, O., Farkas, T., Garab, G., **Ughy, B.,** Szegletes, Zs., Gombos, Z.
Adaptation mechanism of the photosynthetic apparatus of *Cylindrospermopsis raciborskii* ACT 9502 to different environmental effects.
In:Photosynthesis: Mechanism and Effects Vol. III. (1998) G. Garab (ed.) 1819-1822.
Kluwer Academic Publishers , Printed in the Netherlands

Zsiros, O., Várkonyi, Zs., Mustárdy, L., **Ughy, B.,** Gombos, Z.
Light is necessary in the acclimation process of photosynthetic organism to low-temperature stress
In: Advances in Plant Lipid Research (1998) Sánchez, J., Cerdá-Olmedo, E., Martinez-Force, E. (eds) 122-125. Printed in Spain, Universidad de Sevilla

Gombos, Z., Kis, M., Zsiros, O., **Ughy, B.,** Várkonyi, Zs., Wada, H., Tasaka, Y., Farkas, T., Murata, N.
Light induction of lipid desaturation and its role in acclimation to low temperature.
In: Advances in Plant Lipid Research (1998) Sánchez, J., Cerdá-Olmedo, E., Martinez-Force, E. (eds) 118-121. Printed in Spain, Universidad de Sevilla