

Ph.D. értekezés tézisei

**A *psbA* génexpresszió és a D1 protein szintézis szerepe a  
második fotokémiai rendszer UV-B indukált károsításának  
helyreállításában**

Írta: Máté Zoltán



Témavezetők: Dr. Vass Imre és Dr. Nagy Ferenc

Magyar Tudományos Akadémia  
Szegedi Biológiai Központ  
Növénybiológiai Intézet  
Molekuláris Stressz- és Fotobiológiai Csoport

Szeged  
2000

## BEVEZETÉS

Az emberi tevékenység, főként a klórozott szénhidrogének (CFC) használata, napjainkra jelentősen lecsökkentette a magaslégtörési ózon koncentrációját. A legnagyobb mértékű ózon csökkenés, közismert nevén ózonlyuk kialakulása az élővilág egészségét veszélyeztető jelenség, amely az utóbbi években már az északi féltéke sűrűn lakott és mezőgazdaságilag fontos területein is előfordul. Az ózon a biológiailag káros ultraibolya-B (UV-B, 280-320 nm) sugárzás szelektív elnyelője, ezért mennyiségének csökkenése a Föld felszínét elérő UV-B sugárzás intenzitását nagymértékben növeli. A megnövekedett UV-B sugárzás valamennyi élőlényre káros. Különösen veszélyeztetettek azonban a fotoszintetizáló szervezetek, amelyek a növekedésükhöz szükséges fényenergia hasznosítása közben állandóan ki vannak téve a napsugárzás ultraibolya komponensének. Ezáltal az UV-B sugárzás egyik elsődleges támadási helye a fotoszintézis folyamata, melynek során történik a Nap fényenergiájának kémiai energiává alakítása. A fotoszintézis során a víz fényindukált elbontása és a levegő széndioxidjának beépítése energiadús szerves vegyületek keletkezését eredményezi. A vízbontás melléktermékeként felszabaduló molekuláris oxigén egyúttal a földi oxigén atmoszféra, és ezen keresztül a légköri ózonpajzs forrása is.

Az élőlények UV-B stressztűrését a károsítás hatásait csökkentő ill. azokat helyreállító védekező folyamatok hatékonysága határozza meg. A fotoszintézissel kapcsolatos ilyen jellegű mechanizmusok részletei munkánk kezdetén még jórészt tisztázatlanok voltak, a rendelkezésre álló adatok túlnyomó részét izolált fotoszintetikus membrán frakciókon végzett kísérletek szolgáltatották. A második fotokémiai rendszer (PSII) működését érintő UV-B indukált változások tanulmányozására modellként a kloroplasztisz evolúciós őseinek tekinthető cianobaktériumokat választottuk. Ezek az élőlények -köztük az általunk használt *Synechocystis* sp. PCC 6803- prokarióták lévén genetikai vizsgálatra különösen alkalmasak, továbbá a fotoszintetikus apparátusuk alapvetően a magasabbrendű növényekhez hasonlóan szerveződik. A Molekuláris Stressz és Fotobiológiai Csoport fő kutatási irányvonalának megfelelően a dolgozatban szereplő kísérletek arra irányultak, hogy bővebb információt nyerjünk a fotoautotróf sejtek UV-B toleranciájának hátterében húzódó molekuláris szintű folyamatokról.

## CÉLKITŰZÉSEK

A spektrum UV-B tartományának élő szervezetekre gyakorolt hatása napjainkban intenzív kutatás tárgyát képezi. Csoportunk kimutatta, hogy az UV-B sugárzás egyik fontos hatóhelye a fotoszintetikus apparátus, azon belül is a második fotokémiai rendszer. *In vitro* kísérletek bizonyítják, hogy a PSII elektrontranszport gátlásának első lépése a vizbontó komplex sérülése. Annak ellenére, hogy a Q<sub>A</sub> és Q<sub>B</sub> elektron akceptorok ill. a Tyr-Z és Tyr-D redox aktív aminosavak szintén az UV-B sugárzás lehetséges célpontjai lehetnek, károsodásuk mégis lassabban következik be. A gátlási folyamat további fontos lépése a D1 és D2 reakciócentrum fehérjék specifikus degradációja, melyben az UV-B sugárzás által keltett ún. aktív oxigén formák szerepet játszanak.

A növényi sejtekben az UV-B sugárzás káros hatásainak kivédésére különböző mechanizmusok alakultak ki az evolúció folyamán. Amíg a DNS-sel kapcsolatos elváltozások javításának folyamatáról részletes ismeretek állnak rendelkezésre, addig a PSII fehérje szintű helyreállításával kapcsolatban keveset tudunk. Az a tény, hogy alacsony intenzitású UV-B besugárzás fokozza a D1 és a D2 fehérjék újrasyntézisét magasabbrendű növényekben ilyen jellegű helyreállító mechanizmus működését feltételezi. A látható fény által okozott gátlás, a fotoinhibíció -amely elsődlegesen a D1 proteint károsítja- kivédésében az ún. D1 repair ciklus játszik. Annak ellenére, hogy az UV-B hatás mindkét reakciócentrum fehérjét érinti, az általa okozott károsítás helyreállításában hasonló típusú folyamat részvétele valószínűsíthető.

A D1 fehérjét a *psbA* gén kódolja, amely egy példányban fordul elő a kloroplasztisz genomban. Ezzel szemben cianobaktériumokban a D1 protein előállításáért több *psbA* gének kópiája felelős, melyek a kromoszóma különböző szegmensein található. A *Synechocystis* sejteiben előforduló három gén közül a *psbA2* és *psbA3* a fény mennyiségére érzékeny módon járulnak hozzá a D1 fehérje szintéziséhez szükséges *psbA* mRNS létrehozásához, míg a *psbA1* gén előtt nem találtak a transzkripcióhoz szükséges genetikai elemeket. Közönséges nevelési körülmények között az átíródo transzkriptumok túlnyomó részét a *psbA2* mRNS képviseli. A magas expressziót biztosító *psbA* promóterek és a luciferáz riporterből álló kimérák használata a közelmúltban a cianobaktériumokban is lehetővé tette a cirkadián óra által befolyásolt génműködés vizsgálatát.

A fentiek alapján az alábbi kérdések megválaszolását tűztük ki célul:

1. Képesek-e a *Synechocystis* sp. PCC 6803 cianobaktérium sejtek a PSII reakciócentrum fehérjéit érintő UV-B károsodás javítására?
2. A bíorbaktériumok reakciócentrumával való hasonlóságok és különbségek figyelembevételével milyen mértékű a kinon elektron akceptorok hozzájárulása a D1 és D2 fehérjék UV-B indukált szelektív degradációjához?
3. Milyen *psbA* génextpressziós változások kísérik a PSII UV-B által okozott károsítását *Synechocystis* sejtekben?
4. Mi a funkcionális összefüggés a *psbA* gének expressziója és a károsodott D1 proteinek új, működőképes fehérjékre történő kicserélődése között az UV-B stressz korai szakaszában?
5. Alkalmaz-e a luciferáz riporter gén rendszer az UV-B indukált génszintű stresszválaszok vizsgálatára?

### ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

- Synechocystis* sp. PCC 6803 sejt kultúrák tenyésztése
- Cianobaktérium sejtek [<sup>35</sup>S]-metioninnal történő pulzusjelölése
- Fotoszintetikus aktivitás mérése oxigénpolarográfiával
- SDS-PAGE gélelektroforézis és immunoblot analízis
- Molekuláris klónozás, polimeráz lánreakció
- Transzgénikus *Synechocystis* sejtek előállítása
- DNS- és RNS izolálás
- Northern blot analízis
- S1 nukleáz védelem
- Luciferáz aktivitás bioluminometriás mérése
- Herbicid rezisztencia mérések

## EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

1. Annak érdekében, hogy az intakt *Synechocystis* sejtek UV-B károsodást helyreállító képességét vizsgáljuk, a PSII aktivitását és fehérjeösszetételét követtük az UV-B besugárzás alatt és azt követően. UV-B hatására a sejtek oxigénfejlesztő képessége fokozatosan csökkent, melyhez szorosan csatolódtott mind a D1, mind pedig a D2 fehérje mennyiségének változása. A cianobaktérium szuszpenziót az UV-B kezelés után látható fényre helyezve azt tapasztaltuk, hogy a sejtek képesek a PSII aktivitás teljes visszaállítására, mialatt a heterodimer fehérjék mennyisége az erősen lecsökkent értékről gyakorlatilag az eredeti szintre állt vissza. A helyreállás mértéke és kinetikája azonban nagymértékben függ a besugárzás által okozott károsodás mértékétől: nagyobb fokú gátlás esetén az oxigénfejlesztő képesség lassabb, részleges visszaállása volt megfigyelhető. A prokarióta fehérje szintézist gátló linkomicin alkalmazása meggyorsította az UV-B károsító hatását, ill. megakadályozta az oxigénfejlesztő képesség-, és a reakciócentrumok fehérje összetételének helyreállítását.

A PSII aktivitás csökkenését, ill. az ezzel párhuzamosan végbemenő D1 degradációt kísérő protein újraszintézis tanulmányozására a *Synechocystis* sejtekbe radioaktívan jelölt metionint juttattunk, majd a fehérjékbe való beépülés után ezeket a médiumból való kimosás után jelöletlen -"hideg"- aminosavakkal pótoltuk. Az UV-B besugárzás önmagában, ill. gyenge látható fény jelenlétében a PSII aktivitás csökkentésével párhuzamosan felgyorsította az izotóppal jelölt D1 proteinek eltűnését és az újonnan szintetizált, jelöletlen fehérjék PSII-be történő épülését.

Eredményeink alapján tehát azt mondhatjuk, hogy az intakt fotoszintetikus sejtek képesek az UV-B indukált D1 és D2 protein károsodás, ill. a PSII általi oxigénfejlődés helyreállítására. A reakciócentrum fehérjék *de novo* szintézise nemcsak a helyreállítási szakaszban, hanem a besugárzás alatt is fontos szerepet játszik a PSII károsodás csökkentésében.

2. A bíborbakteriális reakciócentrum az evolúció korai szakaszában alakult ki, amikor a magaslégköri ozon mennyisége még töredéke volt a mai értéknek. A komplex vázát az L és M fehérjék képezik, melyek aminosavsorrendje jelentős homológiát mutat a D1 és D2 proteinnel, továbbá az elsődleges donortól hasonló redox elemek közvetítik az elektronokat

akceptor oldal felé, mint a PSII-ben. A PSII-vel való akceptor oldali hasonlóság ill. a donor oldali jelentős különbségek miatt a bibraktériumok ideális kísérleti rendszert biztosítanak a fotoszintézis és az UV-B sugárzás  $Q_A$  és  $Q_B$  kinon akceptorokat érintő kölcsönhatásának vizsgálatára.

Annak eldöntésére, hogy az UV-B a *Rhodobacter spheroides* R-26 reakciócentrumát milyen mértékben károsítja, az izolált komplexeket olyan intenzitású UV-B-fénnyel kezeltük, amely a PSII-ben a D1 és D2 fehérjék jelentős degradációját okozza. Az L, M és H alegységek mennyiségét elektroforézis után Coomassie festett akrilamid gélen vizsgáltuk. A fehérje sávok denzitometriás analízise azt mutatta, hogy az UV-B kezelés a H alegység mennyiségét mintegy 5%-kal, míg az L és M fehérjékét pedig 10%-kal csökkentette mind a  $Q_B$  jelenlétében, mind hiányában. Az UV-B fénnyel párhuzamosan alkalmazott vörös megvilágítás a 15-20%-os proteinvésztesztet okoz az L és M alegységek esetén, ami arra utal, hogy a szemikion gyökök részt vehetnek az UV-B okozott protein károsodás kiváltásában. A fehérje mennyiség fogyásának dózisfüggése alapján a PSII protein szerkezete azonban kb. tízszer érzékenyebb, mint bakteriális megfelelője, tehát a kétféle fotorendszer eltérő viselkedése a donor oldali komponensekkel kapcsolatos. Eredményeink alapján a D1 és D2 fehérjék UV-B indukált degradációjában nem játszik meghatározó szerepet a kinon-függő mechanizmus.

3. A PSII UV-B indukált károsodásának helyreállítása a D1 fehérje *de novo* szintézisének keresztül többlépcsős folyamatként valósul meg. A kezdeti lépések tanulmányozására a *Synechocystis psbA* géneinek kifejeződését követtük UV-B besugárzás alatt illetve az ezt követő, látható fényen történő helyreállási periódusban. Az UV-B kezelés a *psbA* génnek differenciális expresszióját idézte elő: a *psbA3* mRNS mennyisége kb. 20-szorosára növekedett, míg a *psbA2* transzkriptumok szintje alig változott. A helyreállási periódusban a mindkét géntermék szintje az eredeti értékhez közelített. A *psbA3* nagymértékű indukációját specifikus módon az UV-B komponens (290-320 nm a mi kísérleteinkben) váltotta ki, melyhez a spektrum további tartományainak hozzájárulása nem bizonyult számottevőnek, s amelyet sem a kódoló régió inaktiválása, sem pedig a *psbA2* gén hiánya nem befolyásolt. Az a megfigyelés, hogy az UV-B és a látható fény egyidejű alkalmazása nem befolyásolja a *psbA3*

expressziójának növekedését, arra utal, hogy a folyamat természetes körülmények között -ahol a két komponens mindig egyidejűleg van jelen- is végmegy.

Annak vizsgálatára, hogy az eddig leírt UV-B hatás kiváltásában mi a redox szabályzás szerepe a kezeléseknél használt UV-B intenzitást lecsökkentettük, továbbá a *de novo* fehérje szintézist linkomicin hozzáadásával blokkoltuk. Az alacsony intenzitású, mindössze néhány perces UV-B besugárzás -ami a PSII elektron transzportot nem képes működtetni- elegendőnek bizonyult a *psbA3* mRNS felhalmozódásához, tehát a plasztokinon redox állapotán keresztül megvalósuló szabályozás valószínűleg nem játszik szerepet a *psbA3* indukcióban. Ezt támasztja alá az a megfigyelés, hogy a PSII elektrontranszport gátló DCMU (3-(3,4-diklorofenil)-1,1-dimetil-urea) hozzáadása az UV-B választ nem módosította.

Az általunk létrehozott, a *psbA2* és *psbA3* gének promóter szakaszait és a luciferáz riporter kódoló régióját tartalmazó kimérák kifejeződését tanulmányozva megállapítottuk, hogy (i) a *psbA3* gén UV-B indukált expressziója elsősorban a transzkripció szintjén meghatározott, (ii) amelyben a *psbA* transzkriptumok 5' nem transzlálódó régiója nem játszik meghatározó szerepet, ill. (iii) a legfontosabb cisz-helyzetű szabályozó elemek ill. szekvenciák a promóter 80 bp-os részén belül lokalizálódnak.

Annak érdekében hogy közelebb kerüljünk a *psbA3* UV-B indukciójában szerepet játszó jelátviteli elemek megismeréséhez, olyan *Synechocystis* mutánsokat vizsgáltunk, melyekben egyes, feltételezhetően közvetítő szerepű fehérjéket kódoló gének inaktívvá vannak. Sem néhány, konzervált hisztidin-kináz régiót tartalmazó szabályozó fehérje, sem pedig a receptor funkciójú fitokróm hiánya nem befolyásolta az *psbA3* expressziót. Valószínűleg a génexpresszió megváltozása egy UV-B specifikus jelátviteli lánc közreműködésével zajlik, esetleg egyéb molekuláris utakkal való összefonódás mellett.

Eredményeink alapján a *psbA3* gén átmeneti indukciója a *Synechocystis* sejtek gyors UV-B válaszreakciójának tekinthető, vagyis a *psbA3* egy olyan gyorsan reagáló génkópiát képvisel, amelynek megnövekedett transzkripciója segítséget nyújt a PSII működést érintő károsítás enyhítésében az UV-B stressz korai szakaszában.

4. A *psbA2* és *psbA3* gének által kódolt D1 fehérjék 100%-os homológiája miatt annak kimutatása, hogy egy adott fehérje molekula transzlációja melyik mRNS kópiáról történt, nehézségekbe ütközik. Kísérleteinkben erre a célra a P7 jelű *Synechocystis* mutáns törzset

használtuk, amelyben a *psbA2* gén 251. helyzetű alaninja valinra cserélődött. Ebben a törzsben a *psbA2* génről származó D1 fehérje (D1/*psbA2*) beépülése a PSII centrumokban rezisztenciát okoz a metribuzin nevű herbiciddel szemben, ami a Q<sub>B</sub>-zsebbe való irreverzibilis kötődésével a Q<sub>A</sub> és Q<sub>B</sub> kinon akceptorok közötti elektron transzportot gátolja. A *psbA3* gén által kódolt D1 fehérje (D1/*psbA3*) a vad típusú kópiához hasonlóan metribuzin-érzékeny PSII centrumok felépülését eredményezi. A PSII centrumok metribuzin érzékenysége, s ezzel a *psbA2* és *psbA3* mRNS-ekről translálódó D1 fehérjék aránya a változó klorofill fluoreszcencia követésével lehetséges különböző herbicid koncentrációk mellett.

Közönséges nevelési körülmények között a P7 sejtek nagymértékű, a vad típusú sejtekhez képest kb. 100-szoros metribuzin rezisztenciát mutatnak, hiszen a D1 fehérjék többsége a pontmutációt hordozó *psbA2* mRNS-ről származik. Ebben az állapotban a centrumok 85%-ában metribuzin rezisztens D1 fehérje található, míg a metribuzin érzékeny *psbA3* génterméket mintegy 15%-uk tartalmazza. UV-B besugárzás a D1/*psbA3* fehérjék arányát mintegy 40%-ra növeli, majd látható fényen a metribuzin érzékeny centrumok száma majdnem az eredeti szintre csökkent vissza. Abban az esetben, ha a kezelést linkomicin jelenlétében végeztük, a D1/*psbA3* fehérjét tartalmazó centrumok száma nem változott, tehát a proteincseréhez aktív transláció szükséges.

Összegzőképpen elmondhatjuk, hogy a *psbA3* gén UV-B sugárzás által kiváltott indukciója a *psbA3* mRNS-ről történő D1 fehérje translációjához és PSII centrumokba épüléséhez vezet. Ezek szerint a *Synechocystis* sejtei a PSII-t ért UV-B károsítás kijavítását a D1 fehérje szintéziséhez rendelkezésre álló mRNS populáció megemelésével szabályozzák, az UV-B stresszgéennek tekinthető *psbA3* indukcióján keresztül.

5. Az általunk előállított *psbA* promóterek által vezérelt luciferáz gént hordozó cianobaktériumokban a riporter kifejeződése RNS-szinten jól követte az endogén gének UV-B hatására bekövetkező expresszióváltozását. Sikertült olyan *Synechocystis* transzgenikus vonalakat létrehozunk, melyekben a *psbA3* gén UV-B indukált átmeneti indukciója biolumineszcencia mérésrel *in vivo* követhető, amely reményeink szerint lehetőséget nyújt az UV-B választ sejten belül közvetítő molekuláris elemek izolálására.



## PUBLIKÁCIÓS LISTA

(\* az értekezés alapjául szolgáló közlemények)

Közlemények nemzetközi tudományos folyóiratokban:

- \*Tandori, J., Máté, Z., Maróti, P., Vass, I. (1996) Resistance of reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides* against UV-B radiation. Effects on protein structure and electron transport. *Photosynth. Res.* 50, 171-179.
- \*Sass, L., Spetea, C., Máté, Z., Szekeres, M., Nagy, F., Vass I., (1996) Repair of UV-B induced damage of Photosystem II via *de novo* synthesis of the D1 and D2 reaction centre subunits in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Photosynth. Res.* 54, 55-62.
- \*Máté, Z., Sass, L., Szekeres, M., Vass, I., Nagy, F. (1998) UV-B induced differential transcription of *psbA* genes encoding the D1 protein of Photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *J. Biol. Chem.* 273, 17439-17444.
- \*Vass, I., Kirilovsky, D., Perewoska, I., Máté, Z., Nagy, F., Etienne, A.-L. (2000) UV-B radiation induced exchange of the D1 reaction centre subunits produced from the *psbA2* and *psbA3* genes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Eur. J. Biochem.* 267, 2640-2648.

Viczián, A., Máté, Z., Sass, L., Vass, I., Nagy, F. (2000) UV-B induced differential transcription of *psbD* genes encoding the D2 protein of Photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Photosynth. Res.* (közlés alatt).

Közlemények referált nemzetközi konferencia "proceedings"-ekben

Vass, I., Máté, Z., Sass, L., Szekeres, M., Nagy, F., Kirilovsky, D., Etienne, A.-E. (1998) UV-B induced damage of Photosystem II and its repair via *de novo* synthesis of the D1 and D2 reaction centre subunits. *Photosynthesis: Mechanisms and Effects (Garab, Gy. ed)* Vol. III., pp. 2109-2114, Kluwer Academic Publishers.

- \*Máté, Z., Sass, L., Szekeres, M., Vass, I., Nagy, F. (1998) UV-B induced differential transcription of *psbA* genes encoding the D1 protein of Photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Photosynthesis: Mechanisms and Effects (Garab, Gy. ed)* Vol. III., pp. 2337-2340, Kluwer Academic Publishers.

Viczián, A., Máté, Z., Sass, L., Vass, I., Nagy, F. (1998) UV-B induced differential transcription of *psbD* genes encoding the D2 protein of Photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Photosynthesis: Mechanisms and Effects (Garab, Gy. ed)* Vol. III., pp. 2341-2344, Kluwer Academic Publishers.