

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM  
Természettudományi és Informatikai Kar

Biológia Doktori Iskola

Doktori értekezés

**Lipidek és karotinoidok szerepe a cianobakteriális  
fotoszintetikus makrokomplexek kialakulásában**



Zakar Tomás

Témavezető: Dr. Gombos Zoltán

Magyar Tudományos Akadémia

Szegedi Biológiai Kutatóközpont –

Növénybiológiai Intézet

2018

Szeged

## Tartalom

Rövidítések jegyzéke .....	5
1.Bevezetés .....	7
2.Irodalmi áttekintés .....	9
2.1 A cianobaktériumok általános jellemzése és jelentősége.....	9
2.2 A cianobaktériumok felépítése.....	11
2.2.1. <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 általános jellemzése.....	13
2.2.2. <i>Arthrospira (Spirulina) platensis</i> általános jellemzése .....	13
2.3. A cianobaktériumok fotoszintézise .....	14
2.4. A cianobakteriális és a növényi PSI összehasonlítása .....	19
2.5. A tilakoid membránt felépítő lipidek .....	21
2.5.1. Az MGDG szerepe a tilakoid membránban .....	21
2.5.2. A DGDG szerepe a tilakoid membránban.....	22
2.5.3. Az anionos lipidek jelentősége a tilakoidban .....	23
2.6. A cianobaktériumok karotinoid összetétele .....	24
2.6.1. A karotinoidok szerepe a fotoszintetizáló szervezetekben .....	25
2.6.2. A karotinoidok bioszintézise .....	26
2.7. A cianobakteriális fikobiliszómák.....	28
3. Célkitűzések.....	29
4. Kísérleti anyagok és módszerek .....	31
4.1. A felhasznált cianobaktérium törzsek nevelési körülményei.....	31
4.1.1. <i>Synechocystis</i> törzsek és nevelési körülményeik.....	31
4.1.2. <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 törzs nevelési körülményei.....	31
4.1.3. A <i>Spirulina</i> platensis törzsek nevelési körülményei .....	31
4.2. Mutánsok létrehozása, a sejtek transzformációja.....	32
4.2.1. Az ROAD mutáns létrehozása.....	32
4.2.2. Az RO/psaL mutáns létrehozása .....	32

4.3. A hőmérsékleti stresszre adott válasz nyomonkövetésének kísérleti terve.....	32
4.4. Elektronmikroszkópia analízis .....	32
4.5. Lipid analízis .....	33
4.6. A sejtsűrűség és a pigmentösszetétel meghatározása.....	34
4.7. Tilakoid membránok izolálása .....	34
4.7.1. Natív poliakrilamid gélelektroforézis kísérletekhez.....	34
4.7.2. Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia mérésekhez .....	35
4.8. Trimerikus és monomerikus PSI frakcionálása.....	35
4.9. Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia mérések .....	35
4.10. Mélyhőmérsékletű fluoreszcencia emissziós spektroszkópia mérések.....	36
5. Eredmények .....	37
5.1. Lipid-karotinoid kooperációs kísérletek .....	37
5.1.1. Cianobakteriális sejt morfológia vizsgálata elektronmikroszkópia analízis segítségével.....	37
5.1.2. Membrán lipid összetétel analízise tömegspektrometriás módszerekkel.....	38
5.1.3. A WT és a mutáns törzsek karotinoid tartalma .....	47
5.1.4. Karotinoid és lipid hiány okozta strukturális változások a fotoszintetikus apparátusban .....	50
5.2. PSI oligomerizáció meghatározása különböző cianobakteriális fajokban non- invazív módszerekkel.....	52
5.2.1. PSI oligomerizáció nyomonkövetése mélyhőmérsékletű fluoreszcencia emissziós spektroszkópiával.....	52
5.2.2. PSI oligomerizáció nyomonkövetése CD spektroszkópia segítségével .....	55
6. Az eredmények megvitatása .....	57
6.1.1. A xantofillok és a többszörösen telítetlen lipidek meghatározzák a sejt- és membránstruktúrákat.....	57
6.1.2. A xantofill- és a többszörösen telítetlen lipid hiány lipid átfarmálódást indukál .....	58

6.1.3 A xantofill- és többszörösen telítetlen lipid hiány karotinoid összetétel változásokat okoz a membránban .....	59
6.1.4. Az egyszeresen telítetlen zsírsavak és a xantofilok stabilizálják a PSI-trimereket .....	60
6.2.1. A mélyhőmérsékletű fluoreszcencia emissziós spektroszkópia kiváló módszer a PSI és PSII tanulmányozásához .....	61
6.2.2. A CD spektroszkópia kézenfekvő non-invazív módszer a különböző cianobakteriális törzsek PSI oligomerizációjának nyomonkövetésére .....	61
7. Összefoglalás .....	62
8. Köszönetnyilvánítás.....	64
9. Közlemények .....	65
A disszertáció alapjául szolgáló közlemények:.....	65
Egyéb közlemények: .....	65
10.1. A Ph.D. értekezés összefoglalója.....	66
10.2. Summary of the Ph.D. thesis .....	70
11. Irodalomjegyzék .....	74

## Rövidítések jegyzéke

AD	Többszörösen telítetlen lipid hiányos <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 mutáns
<i>Anabaena</i>	<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120
Car	Karotinoid (Carotenoid)
CD	Cirkuláris dikroizmus
Chl	Klorofill (Chlorophyll)
DGDG	Digalaktozil-diacilglicerin
Dmyx	Deoxymixoxantofill
Ech	Echinenon
ETL	Elektrontranszportlánc
FPLC	Ion-cserélő MonoQ folyadékkromatográfia (Fast Protein Liquid Chromatography)
GLS	$\gamma$ -linolénsav
HC	Heterociszta
HPLC	Nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia (High Performance Liquid Chromatography)
<i>I22</i>	$\gamma$ -linolénsav hiányos <i>Spirulina platensis</i> mutáns
KK	Kettősréteg képző
LHC	Fénybegyűjtő komplex (Light Harvesting Complex)
MA	Mérsékelten alacsony
MGDG	Monogalaktozil-diacilglicerin
MG1kDG	Monoglikozil-diacilglicerin
MM	Mérsékelten magas
MS	Tömegspektrometria (Mass Spectrometry)
Myx	Mixoxantofill
NHK	Nagy hullámhosszú klorofill
NKK	Nem kettősréteg képző
PAGE	Poliakrilamid gélelektroforézis
PBS	Fikobiliszóma (Phycobilisome)
PG	Foszfatidil-glicerin (Phosphatidyl Glycerol)
PSI és PSII	I-es és II-es fotokémiai rendszer (Photosystem I & II)
RC	reakciócentrum (Reaction Center)

RCC	Reakciócentrum komplex (Reaction Center Complex)
RO	Xantofill hiányos <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 mutáns
RO/psaL	Xantofill- és PSI trimer mentes <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 mutáns
ROAD	Xantofill és többszörösen telítetlen lipid hiányos <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 mutáns
SEM	Pásztázó elektronmikroszkópia (Scanning Electron Microscopy)
<i>SOT</i>	<i>ATCC Médium 1679</i>
<i>Spirulina</i>	<i>Spirulina platensis</i>
SQDG	Szulfoquinovozil-diacilglicerin
<i>Synechocystis</i>	<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803
TEM	Transmissziós elektronmikroszkópia
TM	Tilakoid membrán
VC	Vegetatív sejt (Vegetative Cell)
WT	Vad típus (Wild Type)
Zea	Zeaxanthin
βkar	β-karotin

# 1.Bevezetés

Évmilliárdokkal ezelőtt jelentek meg Földünkön a legősibb prokarióta szervezetek közé tartozó élőlények, a cianobaktériumok. Ezen organizmusok képesek voltak fotoszintézis segítségével oxigén előállítására, melynek következtében körülbelül 2,4 milliárd évvel ezelőtt az akkori redukzív légkör oxidatív légkörré alakult át. A többsejtű szervezetek létrejöttének elengedhetetlen feltétele volt az aerob légző szervezetek megjelenése. A cianobaktériumok a prokarióták közül elsőként tudták megkötni a légköri nitrogént, ezáltal nitrogén hiányos közegben is lehetővé vált elterjedésük. Az eukarióta sejtek megjelenéséhez szükség volt különböző membránnal határolt sejtalkotók kialakulására. Az endoszimbionta elmélet szerint az eukarióta növényi sejt elődje bekebelezett ősi cianobaktériumokat, melyeket nem emésztett meg, így kialakulhatott a szimbiózis a sejtek között. Ebből arra következtethetünk, hogy a mai fotoszintetizáló eukariótákban található kloroplasztiszok ősei cianobaktériumok voltak.

A cianobaktériumok vizsgálata több szempontból előnyös, melyek közül kiemelendő, hogy rendkívül jó modellorganizmusok a fotoszintézis folyamatainak tanulmányozásához, mivel tilakoid membránjuk sok szempontból hasonló az eukarióta fotoszintetizáló szervezetekéhez. Emellett könnyen szaporíthatók, rövid élekciklussal rendelkeznek, fenntartásuk nem igényel különleges körülményeket és mutagenézisük viszonylag egyszerűen kivitelezhető. A genom célzott megváltoztatásával olyan lipid- és karotnoid mutánsok hozhatók létre, melyek vizsgálatával jobban megérthetjük ezen molekulák fotoszintézisben betöltött szerkezeti- és működésbeli szerepét.

A fotoszintézis kutatásban létezik néhány olyan eljárás, mely képes információt szolgáltatni különböző fotoszintetikus paraméterek állapotáról. A fotoszintézisben részt vevő pigment-protein és protein-protein kölcsönhatásokban bekövetkező szerkezeti változások nyomonkövetésére az egyik legkevésbé invazív módszer a cirkuláris dikroizmus spektroszkópia. A vizsgálat során egy adott organizmusra jellemző CD-spektrum jön létre, melyről leolvashatók a fotoszintetikus fehérjekomplexekben bekövetkező szerkezeti eltérések. A mérések alapfeltétele a biológiai mintában található királis molekulák jelenléte.

Jelen munkában bemutatom, hogyan befolyásolja a membránlipidek telítetlenségi állapota, illetve különböző karotnoidok jelenléte a fotoszintetikus membránkörnyezet hő- és fénystresszel szembeni ellenállóképességét. Továbbá, említésre kerülnek a PSI

oligomerek hőkezelés hatására bekövetkező változásai különböző cianobakteriális törzsekben.



## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1 A cianobaktériumok általános jellemzése és jelentősége

A ma élő cianobaktériumok ősei kb. 3-3,5 milliárd évvel ezelőtt jöhettek létre a földtörténeti archaikumban (De Marais, 2000, Lau *et al.*, 2015) olyan prokarióta organizmusokként, melyek képesek voltak szénforrásként szén-dioxidot felhasználni és a fotoszintézis folyamatának köszönhetően oxigént termelni. Az eukarióta szervezetekben megtalálható fotoszintetikus organellek, a kloroplasztiszok is valószínűsíthetően egy fagotróf gazdasejtrel endoszimbiózis révén együttélő cianobaktériumtól eredeztethetőek. A cianobaktériumok morfológiai sokszínűségét példázza, hogy egysejtű, fonalas, planktonikus illetve kolóniaképző típusok találhatók meg közöttük (Whitton és Potts, 2000, Burja *et al.*, 2001). A cianobaktériumok messze a legelterjedtebb fotoszintetikus élőlények. Az ökológiai élőhelyek széles skáláján képesek megélni a tengeri- illetve édesvíztől a földi környezetig. Szintén jól ismertek azon tulajdonságukról, hogy képesek különböző anyagcsere-utak igénybevételel működni és szükség esetén gyorsan váltani egyik anyagcsere-útról a másikra (STAL, 1995). Minden cianobaktérium képes az oxigenikus fotoszintézisre, viszont néhány fajuk akár szulfid-függő anoxigenikus fotoszintézisre is átválthat (Cohen *et al.*, 1986). Néhány, leginkább a Nostocales rendbe tartozó fonalas cianobaktérium, sejtdifferenciálódás során úgynevezett heterocisztákat hoz létre, melyek a légköri nitrogén megkötésében vesznek részt (Capone *et al.*, 2005).

A cianobaktériumok ideálisak különböző kemikáliák és bioüzemanyagok fenntartható előállításához azon tulajdonságuknak köszönhetően, hogy képesek a szén-dioxid redukált formában történő rögzítésére fotoszintetikus rendszereik segítségével. A heterotróf baktériumoktól eltérően a cianobaktériumok csak napfényt, szén-dioxidot, vizet és minimális tápanyagot igényelnek a növekedéshez, kiküszöbölve a szénforrások és az összetett növekedési médium költségeit. A napfény a leginkább elérhető és olcsó erőforrás a Földön, így tehát a cianobaktériumok alkalmazása a napenergiából történő bioüzemanyagok és finomvegyületek előállításához zöldebb utat kínál a szintézis folyamataihoz. A rendkívül hatékony fotoszintézissel rendelkező cianobaktériumok nagyobb biomassza-termelési arányokat mutatnak a növényekhez képest - a napenergia 3-9% -át képesek biomasszává átalakítani, szemben a növények által elért  $\leq 0,25-3\%$  -kal (pl. kukorica, cukornád) (Dismukes *et al.*, 2008). Ezen kívül sokkal kevesebb földterületet igényelnek a nevelésükhöz, mint a szárazföldi növények. A cianobaktériumok a

fotoszintézis során az üvegházhatást okozó gázok egy típusát a széndioxidot hasznosítják, ezáltal elősegítik a szén-vegyületek kibocsátásától mentes termelési folyamatokat. Mint a legtöbb prokariótának, a cianobaktériumoknak is viszonylag egyszerű genetikai háttere van, amely megkönnyíti a genetikailag módosított törzsek létrehozását (Koksharova és Wolk, 2002). Végül, de nem utolsó sorban a nagy értékű vegyületek extrakcióját követően visszamaradt cianobaktérium biomassza állati takarmányként vagy szerves trágyaként felhasználható.

A kutatásban leggyakrabban felhasznált cianobaktériumok közül egyes *Synechocystis* törzseket bioetanol termelésére alkalmazzák (Dexter és Fu, 2009), míg a heterociszta képző *Anabaena* fajokat hidrogén-gáz előállítására használják fel (Masukawa *et al.*, 2001). Néhány *Spirulina* törzs viszont nem csak, mint táplálékkiegészítő, hanem mint kiváló - a szennyvíztisztításban alkalmazható – nehézfém- és szerves vegyület eltávolító organizmus játszik fontos szerepet (Balaji *et al.*, 2014).

A cianobaktériumok rendkívül gazdag forrásai egyes karotinoidoknak (Car-oknak) és fikobiliproteineknek. Ezeket a molekulákat általában élelmiszer színezékként, élelmiszer adalékanyagokként és kiegészítőként hasznosítják, emberi és állati fogyasztásra egyaránt. A Car-ok jól ismertek antioxidáns tulajdonságaikról valamint lehetséges szerepükről egyes emberi betegségek megelőzésében (Guedes *et al.*, 2011). A fikobiliproteineket, mint fluoreszcens jelölőanyagként például a flow citometriás vizsgálatokban is hasznosítják (Telford *et al.*, 2001).

A cianobaktériumok kiválóan használhatók a növényi kloroplasztisz modelljeként. A növényi sejt bonyolultsága miatt nehéz az élettani folyamataiba úgy vizsgálni, hogy egyértelmű eredményeket kapjunk a fotoszintézis folyamatainak tanulmányozása során. A cianobaktériumok, mint a kloroplasztiszok lehetséges ősei, sokkal egyszerűbb szervezetek a növényeknél. Valamely génjük inaktivációjával, várhatóan jól körülhatárolható, egyértelmű hatást tapasztalunk a sejtekben. Tehát, a cianobaktériumok alkalmasak azoknak a kérdéseknek a megválaszolására, amelyek növényi sejtek esetében nem lehetségesek, vagy igen bonyolultak.

A cianobaktériumok felhasználásának további előnye, hogy a növényi sejttel ellentétben esetükben lehetőség van olyan gének inaktiválására is, amelyek a sejt számára esszenciálisak, ha a sejt képes a hiányzó génterméket, vagy az általa katalizált reakció végtermékét felvenni a sejtfalon át a környezetből. Ilyen anyagok pl. bizonyos lipidek (Domonkos, 2006).

## 2.2 A cianobaktériumok felépítése

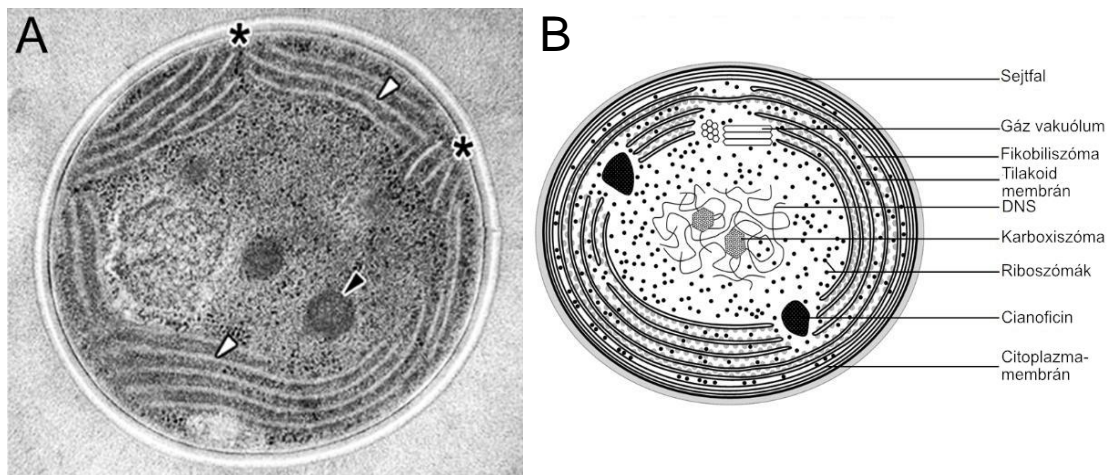
A cianobaktériumok Gram-negatív jellegű sejtfalának peptidoglikán rétege vastagabb, mint általában a Gram-negatív baktériumoké. Sejtfaluk ezen tulajdonsága főként a mechanikai védelemben játszik szerepet. Külső membránjukban jelentős mennyiségű lipopoliszacharid található, emellett sok fajt akár nyálkaburok is boríthat.

Genomjuk, akár 7-15 kópiaszámban is előforduló cirkuláris DNS, amely a protoplazmában helyezkedik el. A genetikai információ plazmidok formájában is jelen van a sejt belsejében. Membránorganellumaik nincsenek, viszont riboszómák, valamint különféle granulomok - amelyek raktározott tápanyagot vagy enzimet tartalmaznak – megtalálhatók a citoplazmájukban (**I. ábra**).

Egyes cianobaktérium fajokra jellemzőek az ún. cianoficin granulomok, amelyek előfordulását eddig semmilyen más élőlényben nem igazolták. Ezek a szemcsék aszparaginsav és arginin aminosavakból álló polimerek [multi-L-arginil-poli-(L-aszparaginsav)], akár a sejt tömegének 18%-át kitehetik, és főként nitrogén raktározására szolgálnak. A cianoficint felépítő arginil-aszpartát egységek egyenként 5 nitrogénatomot tartalmaznak, a cianoficin molekulák a sejt belső pH-ja és ionerőssége mellett oldhatatlanok, ezért membrán nem öleli körül ezeket a szemcséket (Borsodi, 2013).

Membránrendszerüket háromféle membrán alkotja (**I. B ábra**). A külső membrán a sejtfa részéként főként fehérjékből és lipopoliszacharidokból áll, Car-okat és lipideket kisebb arányban tartalmaz. A külső membránban leginkább különféle transzportmolekulák találhatóak: egyrészt porin fehérjékből álló, passzív diffúziót lehetővé tevő csatornák, másrészt „facilitált” diffúziót biztosító csatornák, valamint aktív transzport komplexek. Ez utóbbiak összekötik a külső membránt a citoplazmamembránnal (CM) átnyúlva a rigid peptidoglikánréteg pórusain. A külső membránban jelentős mennyiségben előforduló Car-kötő fehérjék valószínűleg „védőernyőt” képezve óvják a cianobaktérium sejtet a túl erős fénytől (Jürgens és Mäntele, 1991).

A sejtfallal belső oldalán található CM lipidösszetétele hasonlít a tilakoid membránrendszeréhez, mely főként glikolipidekből és fehérjékből épül fel, ellenben nem hasonlít a baktériumok főként foszfolipidekből álló membránjára. A CM fehérjéi között találunk transzportfehérjéket - pl. nitrát- és nitritspecifikus aktívtranszport rendszereket (Maeda *et al.*, 1998) - valamint a légzési elektrontranszportlánc (ETL) és az oxidatív foszforiláció fehérjéit (Bryant, 1994) is. A cianobaktériumok sötétben a légzés biokémiai reakcióin keresztül biztosítják a megfelelő ATP szintet. A CM-nak fontos szerepe van az ozmotikus regulációban is (Inaba *et al.*, 2001).



**I. ábra: A *Synechocystis* sejt elektronmikrográfja (A) (van de Meene *et al.*, 2006) valamint a cianobaktérium sejtek felépítésének sematikus ábrája (B). Az ábrán látható fehér nyilak a tilakoid membránokat, a fekete nyíl a citoplazmatikus zárványokat, a fekete csillagok pedig a tilakoid membránpárok leginkább periferikus helyeit jelölik.**

Az intracelluláris elhelyezkedésű tilakoid membrán (TM) (**I. A és B ábra**) a sejtfallal párhuzamosan futó rétegekből áll, melyek nem tapadnak össze, - ellentétben a növények gránumos szerveződésű tilakoidjával - hanem egymástól 60-70 nm távolságban, párosával helyezkednek el. A tilakoidpárok közti tér része a sejt citoplazmájának, míg a tilakoidpár két membránja közti tér alkotja a tilakoid lumenét. A TM ad teret a fotoszintetikus ETL fehérjekomplexeinek és mobilis elemeinek, valamint tartalmazza a légzési ETL komponenseit is. A cianobaktériumok sajátossága, hogy ugyanabban a sejt-kompartimentben képesek oxigéntermelő fotoszintézisre és légzésre is.

Elektronmikroszópos felvételeken megfigyelhető, hogy a TM és a CM több ponton is kapcsolódik egymáshoz (**I. A ábra**).

### **2.2.1. *Anabaena* sp. PCC 7120 általános jellemzése**

A Nostocales rendbe tartozó cianobaktérium kiváló modellorganizmusként szolgál a heterociszták kialakulásáért felelős gének differenciálódásának tanulmányozására. Az *Anabaena* sp. PCC 7120 (*Anabaena*) genomja 1 darab 6 Mbp-ból valamint több, mint ötezer fehérje kódoló régióból, továbbá 6 darab különböző méretű plazmidból áll. Az *Anabaena* genom szekvenálása segítséget nyújt a sejtdifferenciáció genetikájának, élettanának és a nitrogén fixáció mechanizmusainak tanulmányozásában (Huang *et al.*, 2005).

Az *Anabaena* fotoautotrofikus, oxigenikus fotoszintézisű cianobaktériumként hosszú, leginkább ún. vegetatív sejtekből (VC) álló fonalakat alkot. Nitrogén-szegény környezetben körülbelül minden tizedik vegetatív sejtől heterociszta (HC) differenciálódik, mely képes az általa fixált nitrogénforrással a szomszédos sejteket ellátni. A HC-k nem képesek a fotoszintézisre, ezért a VC-től a fixált nitrogénért (ammónium) cserébe fotoszintézisük végtermékeit kapják. Ezen funkciók elkülönítése esszenciális, mivel a HC-ban a nitrogén megkötéséért felelős enzim, a nitrogénáz rendkívül instabil oxigén jelenlétében (Herrero és Flores, 2008).

Az oxigénmentes környezet elérése érdekében a HC-k olyan stratégiákat fejlesztettek ki, melyek alacsony szinten tartják az oxigént a sejten belül. Annak érdekében, hogy megakadályozzák az oxigén bejutását a sejtbe, a fejlődő HC-k három további réteget képeznek a sejtfaon kívül, mely az oxigéndiffúzió arányát a VC-khez képest a 100-szorosára csökkenti. Az intracelluláris oxigénszint csökkentése érdekében a légzés sebessége fokozódik, azért, hogy a maradék oxigén is felhasználódjon (Haselkorn, 1998).

A legtöbb cianobaktériumban a PSI trimer, illetve monomer formájában létezik. A kutatók által vizsgált *Anabaena* fajokra ez a tulajdonság nem jellemző, hiszen ezek VC-jeiben a PSI tetramer, illetve dimer formában van jelen (Watanabe *et al.*, 2014).

### **2.2.2. *Arthrospira (Spirulina) platensis* általános jellemzése**

A *Spirulina platensis* (*Spirulina*) volt az első fonalas, nem N<sub>2</sub>-fixáló cianobaktérium, melynek genomját megszekvenálták. A genomja egyetlen, 6,8 Mbp méretű, 44,3%-os G-C-tartalommal bíró cirkuláris DNS-ből áll és körülbelül 6630 fehérje kódoló gént tartalmaz (Fujisawa *et al.*, 2010).

Az *Spirulina* egy többsejtű, fonalas, alkalofil cianobaktérium, mely rendszertanilag az ún. Oscillatoriales rendbe és a Phormidiaceae családba tartozik

(Prepelitchi *et al.*, 2015). Szinte ez a legszélesebb körben felhasznált (az orvos-biológia felhasználástól az élelmiszeriparon át a szennyvíztisztításig) cianobaktérium a világon. Minden egyes nem elágazó, hengeres filamentumot trichómának nevezünk, melyek kb. 6  $\mu\text{m}$  átmérővel rendelkeznek. Ezek a trichómák jellegzetesen nagyon hosszúak és spirál alakzatot vesznek fel (folyékony tápközegben baloldali helikális struktúrát). A spirálon belül a sejtek jóval szélesebbek, mint amilyen hosszúak és haránt-válaszfalak által különülnek el. A sejtfaluk 4 rétegből tevődik össze (belülről kifelé haladva): egy fibril-, egy peptidoglikán-, egy fehérjékből álló- és egy, az összes Gram-negatív baktériumra jellemző külső réteg alkotja. Annak ellenére, hogy a *Spirulina* nem rendelkezik flagellumokkal, megfigyelték, hogy „kígyózó” mozgásra képes, bár ennek a pontos háttere még nem ismert. A *Spirulina* citoplazmája tartalmaz gáz vakuólumokat, karboxiszómákat és természetesen TM-rendszereket is. A gáz vakuólumok növelik a sejtek felhajtóerejét, így a sejtek a víz felszínének közelében maradnak, ahol a fényintenzitás a legnagyobb (Ciferri, 1983, Gao és Ma, 2008, Ogawa és Terui, 1970, van Eykelenburg, 1979).

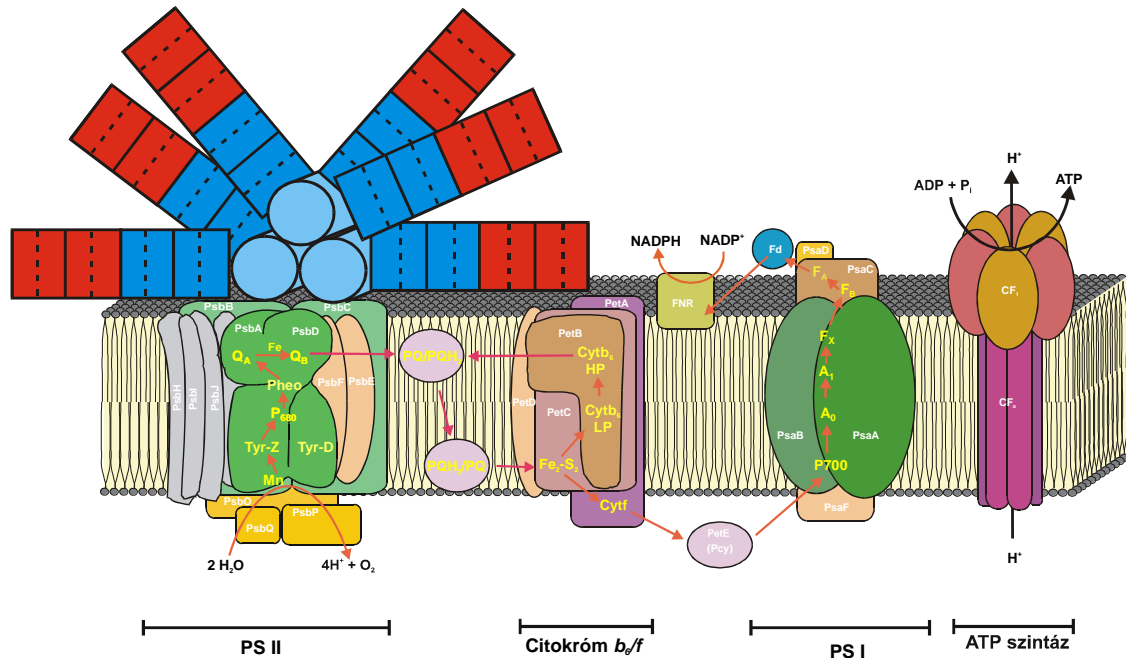
### 2.3. A cianobaktériumok fotoszintézise

A cianobaktériumok ősi szervezetek, fotoszintézisük a TM-rendszerükben zajlik. A sejtfaluk egy külső membránból és egy változó vastagságú peptidoglikán rétegből áll. Ez a struktúra védelmet nyújt a plazmamembránnal határolt cianobaktérium sejtnek. A cianobaktériumok belső membránrendszere, a TM, a sejtek citoplazmájának kromatoplazma területén koncentrikus körökben fut (**I. ábra**), a köztük lévő membránközi tér kb. 60-70 nm széles.

A TM-ok 15-20 nm vastagságú kettős membránrétegeinek zárt végei teszik lehetővé a proton grádiens kialakulását a membránon keresztül. A magasabbrendű növények kloroplasztiszaival ellentétben, a cianobaktériumok TM-jai nem rendeződnek gránumokba, ehelyett rétegesen helyezkednek el, 3-8 membrán kettősréteget képezve. A cianobaktériumok TM-jainak felszínéhez kötve helyezkednek el külső fénybegyűjtő komplexeik, a fikobiliszómák (PBS-k).

A fotoszintetikus apparátus két fő fehérjekomplexe az I-es és II-es fotokémiai rendszer (PSI és PSII), melyekben a fényenergia kémiai energiává alakításának első lépése zajlik, fényindukált töltésszétválasztás formájában. A töltésszétválasztást követően az elektronok a fotonok energiáját felhasználva mozognak az elektrontranszportláncban (ETL) a PSII reakciócentrumtól (RC) a plasztokinon

molekulákon át, a citokróm-*b<sub>6</sub>/f* komplexen és a vízdékony elektronszállító plasztocianin vagy citokróm-*c<sub>6</sub>* molekulákon keresztül a PSI RC-ig (**II. ábra**).



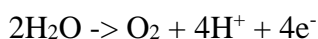
**II. ábra: A cianobaktériumok fotoszintetikus apparátusának sematikus ábrája (Sozer et al., 2011).**

A cianobaktériumok a vörös és a kék színű fényt ciklikus tetrapirrolok, a klorofilok (Chl), míg a zöld, sárga és narancs-színű fényt nyitott láncú tetrapirrolok, a fikobilinek segítségével nyelik el. A fikobilinek kovalens kötással vízdékony fehérjékhez kötődnek, ezek szupramolekuláris komplexei a PBS-k, melyek a cianobaktériumok elsődleges fénybegyűjtő antennái. A PBS fényelnyelése az 560-650 nm hullámhossztartományba esik. A félkorong alakú PBS komplexek a PSII sztróma felőli oldalán találhatóak. Ezzel szemben a növényi PSII membránba ágyazott külső fénybegyűjtő-antennája (LHCII) Chl *a* és Chl *b* pigmenteket kötő fehérjékből áll, melyek trimerré szerveződve veszik körbe a PSII dimereket.

A PSII dimer struktúrája nagyon hasonló a cianobaktériumokban és a növényekben. A PSII komplexet 17 fehérje-alegység alkotja, amely 35-40 Chl molekulát és 8-12 Car molekulát köt meg. Két központi alegysége a D1 és D2 fehérjék, melyek az aktív RC-ban heterodimert alkotnak. A PSII központi (core) komplexét alkotják még a két citokróm *b<sub>559</sub>* alegység, a Chl-kötő belső antenna-komplexek (CP43, CP47), és az ún. minor LHC fehérjék.

A PSII katalizálja a víz oxidációját és a plasztokinon redukcióját. A heterodimerhez kötődnek az ETL kofaktorai, redoxkomponensei: a P680 primer donor, az elsődleges akceptor, a feofitin, továbbá az elsődleges és másodlagos kinon akceptor, a Q<sub>A</sub> és a Q<sub>B</sub>.

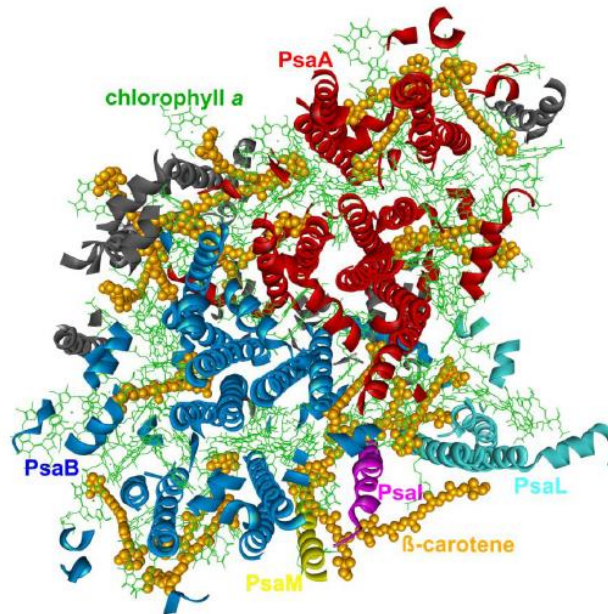
A PBS által elnyelt fényenergia több lépésben a PSII reakciócentrum speciális Chl *a* molekulapárjára, a P680-ra jut (Hankamer *et al.*, 1997). A reakciócentrum gerjesztését követő elsődleges töltésszétválasztás során először egy feofitin molekula (Pheo) – mely egy speciális, magnéziumot nem tartalmazó Chl molekula származék – redukálódik. A donor oldalon a P680<sup>+</sup> egy tirozin-oldalláncot (Z) oxidál, mely képes a mangán-komplexet tartalmazó vízbontó rendszert oxidálni. A redukált feofitin egy kötött plasztokinon-molekulának, a Q<sub>A</sub>-nak adja át az elektront. Majd a két elektron és két H<sup>+</sup> felvételével redukálódó Q<sub>B</sub> leválik a PSII-ről és a plasztokinon gyűjtőnek (PQ) adja át elektronjait. A megvilágítás hatására oxidálódott P680 a vízbontásból származó elektronokkal redukálódik.



A plasztokinont a Rieske-féle protein - mely vasat és ként tartalmaz - és a citokróm-b<sub>6</sub>/f oxidálja. A citokróm komplextől az elektront egy mobilis, réztartalmú fehérje, a plasztocianin (PC) szállítja tovább, ami a PSI RC oxidált primer donorát, a P700<sup>+</sup>-at redukálja. A PSI akceptor oldalán a redukált ferredoxin (Fd) az elektrontranszportban a flavodoxin, majd a ferredoxin: NADP<sup>+</sup> oxidoreduktáz enzim követi, mely egy redukált NADP-t hoz létre. A PSI és PSII működése során a membrán két oldalán kialakuló proton gradiens működteti az ATP-szintáz enzimkomplexet, amely a protonok kémiai potenciálját építi be az ATP makroerg kötésébe. A PSI tulajdonképpen egy fény hatására indukálódó oxidoreduktáz enzimeként funkcionál (**II. ábra**).

A cianobakteriális és a növényi PSI közötti különbség az, hogy míg a cianobaktériumok PSI komplexe a fényviszonyoktól függően felvehet trimer ill. monomer formát, addig a növényi PSI mindig monomer formában van jelen (Kouril *et al.*, 2005). Továbbá, lényeges különbség van a cianobakteriális (PBS) és a növényi (LHC) fénybegyűjtő antennák szerkezete között.



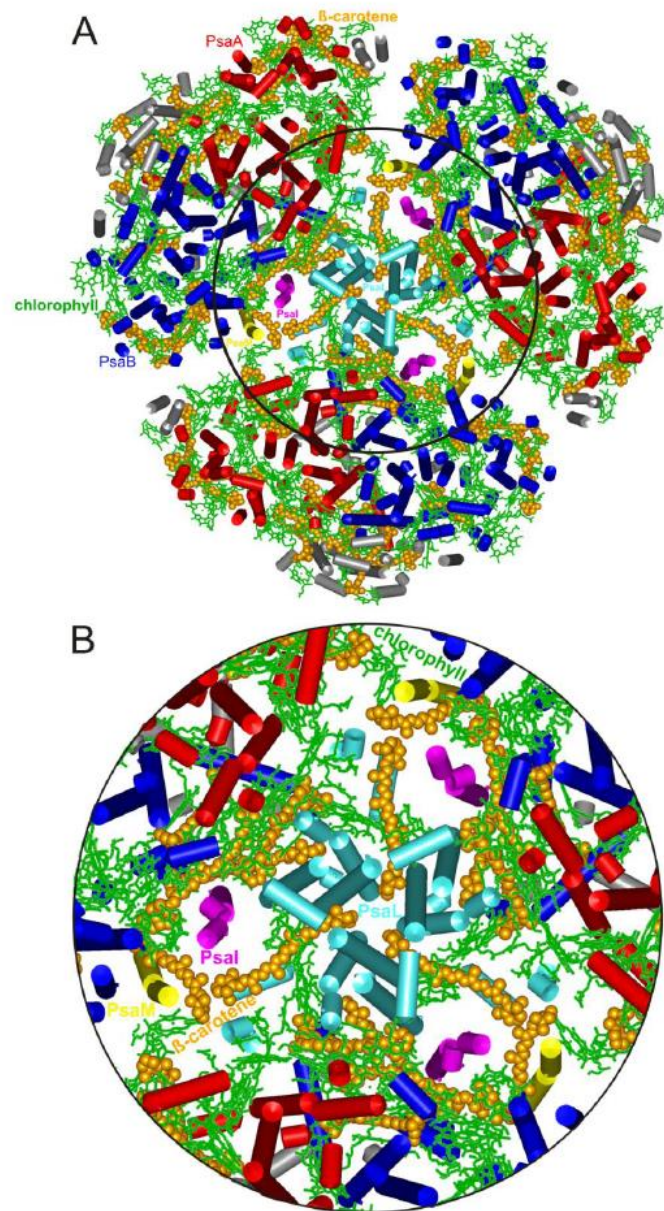


**III. ábra:** A PSI monomer szerkezet röntgenkristallográfiás képe (Sozer *et al.*, 2011).

A PsaA és PsaB a PSI RC legnagyobb alegységei összekapcsolódva a RC magját alkotják (**III. ábra**). Ezen heterodimerek az építőelemei a PSI trimer szerkezetének, melyeket sokféle kisebb fehérje alegység kapcsolódása alakít ki. A PsaL struktúrfehérjét, mely a trimer középpontjában található, trimer-képző fehérjének is nevezik. A PsaL fehérje hiányos mutánsban kizárólag csak monomer PSI szerkezet alakul ki (Chitnis és Chitnis, 1993).

A PsaI, a PsaL is hidrofób kapcsolódási felületet biztosítanak a Car-ok számára, azonban a PsaL három antenna Chl $a$  molekula ligálásában is közreműködik (**IV. ábra**).

A PSI legkisebb alegysége, a PsaM, amely kizárólag cianobaktériumokban fordul elő. Kis mérete ellenére a PsaM egy Chl  $a$  antenna-molekula működését koordinálja, ill. közeli Car-ok hidrofób kölcsönhatásainak kialakításában vesz részt. A PsaM által koordinált Chl fontos szerepet tölt be a monomerek közti energiatranszferben.



**IV. ábra: A PSI trimer röntgenkristallográfiás szerkezete.** A PSI trimer szerkezete és a benne fekete körrel jelölt trimerképző központi rész (A), melynek része a PsaL fehérje. A kinagyított trimerképző központi fehérje együttes (B) (Sozer *et al.*, 2011).

Figyelemre méltó a szerkezeti hasonlóság a PSI és a PSII központi magjai között, annak ellenére, hogy a DNS-szekvenciáiknak kevesebb, mint 15 százaléka azonos. A struktúrák összehasonlításából azonban megállapították, hogy az összes foto-reakciócentrum közös őstől származik (Blankenship, 1992, Schubert *et al.*, 1998).

## 2.4. A cianobakteriális és a növényi PSI összehasonlítása

Az PSI-nek, mint energiaátalakító rendszernek a szerkezeti és funkcionális alapjai megőrződtek a növényvilág evolúciójának 1,5 milliárd éve alatt. Az ETL kofaktorai, mint a PSI funkcionálisan legfontosabb részei, azonosnak tekinthetők a cianobaktériumokban és a növényi kloroplasztiszban (Jordan *et al.*, 2001, Ben-Shem *et al.*, 2003).

Nem ismert, hogy a trimer szerkezetű PSI miért előnyösebb a cianobaktérium számára, azonban kimutatták, hogy a trimerizációra képtelen PsaL-hiányos *Thermosynechococcus elongatus* sejtek szaporodása alacsony fényintenzitáson szinte teljesen leáll (Mühlenhoff *et al.*, 1996, Schubert *et al.*, 1998). Feltételezhető, hogy a trimer szerkezet az optimális fénybegyűjtéshez szükséges alacsony fényintenzitáson, amely a mélyebb vizekben élő cianobaktériumok számára általánosan előforduló környezeti tényező volt az evolúció során.

A cianobakteriális PSI-hez általában nem kapcsolódik külső antenna, azonban bizonyos körülmények között az egyébként a PSII-höz kötődő fikobiliszómák, eddig fel nem tárt módon a PSI-hez kapcsolódva, gerjesztési energiájukat közvetlenül a PSI-hez továbbítják. Vashiány esetén, amikor a fikobiliszómák lebomlanak, a PSI trimerek körül 18 IsiA fehérjéből álló membránba ágyazott gyűrű alakul ki, amely külső antennaként szolgál (Bibby *et al.*, 2001). Az IsiA-gyűrű a PSII-ben levő CP43 alegységhez hasonló Chl-tartalmú fehérjékből áll, melyek több ponton kapcsolódnak a PSI trimerhez, de főként a PsaF és PsaJ alegységeken keresztül továbbítják a gerjesztési energiát a PSI RC felé.

Sem PBS, sem IsiA-gyűrű nincs a zöldalgákban és a magasabbrendű növényekben, helyette Chl-tartalmú membránintegráns fehérjék alkotnak fénybegyűjtő-antennát (LHCI és LHCI) a PSI- és PSII-komplexek körül. A PSI külső felszíne mentén elhelyezkedő LHCI antennát fehérjedimerek alkotják, melyek négyféle Lhca fehérjéből állhatnak. Az LHCI antenna fehérjeösszetétele az aktuális fényintenzitástól függ (Ben-Shem *et al.*, 2003).

A cianobakteriális és a növényi PSI kissé különbözik fehérjealegységeiben is. A PsaM és PsaX alegységek csak a cianobaktériumokban fordulnak elő, a növényekben pedig négy új alegység jelent meg az evolúció során. Kisebb változások következtek be a növényi PsaL és a PsaF szerkezetében is: a PsaL megrövidült, hiányzik az a kitüremkedés, amely a szomszédos monomerrel teremt kapcsolatot, a PsaF pedig hosszabb lett.

A PsaF alegység lumenben elhelyezkedő N-terminálisa nagyobb változáson ment keresztül. A lumenális domén 25 aminosavval hosszabb lett, és ez a szakasz közvetlen kapcsolatot hoz létre a vízdékony elektronszállító plasztocianin és a PSI RC között (Hippler *et al.*, 1996, Hippler *et al.*, 1998). Cianobaktériumokban ez a kapcsolat hiányzik, a PsaF nem vesz részt a vízdékony elektronszállítók kötésében. Míg a növényekben a plasztocianin a PSI elektrondonora, a cianobaktériumok és egyes algák a plasztocianin mellett a citokróm- $c_6$  molekulát is elfogadják elektrondonorként. Valószínűleg a vastartalmú citokróm- $c_6$  ősi elektronszállító, mint a plasztocianin, mivel az oxigénfejlesztő fotoszintézis elterjedése előtti tengerekben a vas-ionok gyakoribbak voltak a rézionoknál (Crowley *et al.*, 2002). Ebben az időben a citokróm- $c_6$  megfelelő elektronszállító volt, később azonban, mikor az atmoszféra oxigénszintje megemelkedett, a vas ritka elemmé vált, ritkábbá, mint a réz, emiatt a kifejlődő növények a réztartalmú plasztocianinnal váltották fel a citokróm- $c_6$ -ot.

A növényi PSI komplex PsaH alegysége a cianobakteriális PSI trimerizációs doménjében helyezkedik el, ez meggátolja a növényi PSI trimerek létrejöttét. A PsaH alegység a kötőhelye az LHCII-nek, amikor erős fényen a PSII fénybegyűjtő-komplexe a PSI-hez kapcsolódva, gerjesztési energiáját a PSI-nek adja át (Lunde *et al.*, 2000, Ben-Shem *et al.*, 2003).

A PsaG alegység megjelenése valószínűleg a PsaK fehérje génduplikációjának eredménye. A PsaG kialakulása igen jelentős a PSI fejlődése szempontjából, mivel ez a fehérje teremti meg az egyetlen intramembrán kapcsolatot az LHCI és a RC között. A PsaG az Lhca1 fehérjéhez kötődve erős és stabil kihorgonyzást biztosít az antennaövegnek. Ugyanakkor, mivel az antenna többi alegysége az Lhca1-hez kapcsolódik, és közvetlenül a PSI-komplexhez csak gyenge másodlagos kölcsönhatásokkal kötődik, sztöchiometriáját könnyen és gyorsan változtatva alkalmazkodik az aktuális fényviszonyokhoz (Ben-Shem *et al.*, 2003). Ez a változtatható antenna előnyösebb a változó fényviszonyok között az óceán felszínén élő algák, és méginkább a szárazföldön élő növények számára, mint a cianobaktériumok szimmetrikus, kevésbé változtatható fénybegyűjtő-komplexe (Ben-Shem *et al.*, 2004, Kovacsics, 2011).

## 2.5. A tilakoid membránt felépítő lipidek

A TM-t négy fajta glicerolipid építi fel. A glicerolipidek vázát glicerín molekula képezi, melyet *sn*-1 és *sn*-2 helyzetben zsírsavláncok észtereszítenek, *sn*-3 helyzetben pedig valamilyen poláros fejcsoport épül be.

A tilakoid glicerolipidjei közül három glikolipid: a neutrális monogalaktozil-diacilglicerín (MGDG) és digalaktozil-diacilglicerín (DGDG), valamint a negatív töltésű szulfokvinovozil-diacilglicerín (SQDG). A cianobaktériumokban előforduló egyetlen foszfolipid a foszfatidil-glicerín (PG) (Block et al., 1983, Wada és Murata, 1998).

Az összes glicerolipid több mint fele MGDG, 15,20% DGDG, az SQDG és PG aránya 5,20% között változik. Kis mennyiségben egy ötödik lipidfajta is előfordul a cianobaktériumokban, a monoglikozil-diacilglicerín (MGlkDG). Ez a glikolipid az MGDG szintézise során keletkező köztes termék, melynek aránya általában kevesebb, mint 1% (Naoki és Norio, 1982), azonban fényben nevelt és az optimálisnál magasabb hőmérsékletnek kitett *Synechocystis* sejtekben megnő a mennyisége a tilakoidban. Ez a megnövekedett mennyiségű, csak telített zsírsavakat tartalmazó MGlkDG, mint hősokk-lipid. növeli a membrán rendezettségét, stabilizálja szerkezetét, ezáltal szerepe lehet a magas hőmérsékletre való alkalmazkodásban (Balogi et al., 2005).

### 2.5.1. Az MGDG szerepe a tilakoid membránban

A egyes lipidosztályok különböző szerepet töltenek be a TM szerkezetének fenntartásában és a fotoszintézis folyamataiban.

A glikolipidek szerepét főként magasabbrendű növényekben vizsgálták. *Arabidopsis thaliana*-ban 3 gén kódol MGDG-szintáz enzimet. Közülük elsősorban az *MGDI* gén által kódolt MGDG-szintáz felelős a kloroplasztiszban előforduló MGDG-molekulák szintéziséért. Az *Arabidopsis mgd1* mutáns az *MGDI* gén promóter régiójába történt T-DNS inszercióval jött létre, melynek hatására 75%-kal csökkent a génről átíródó mRNS mennyisége. A mutáns sejtekben az MGDG tartalom 42%-kal csökkent, a növények alacsony növésűek voltak, Chl-tartalmuk csökkent, a kloroplasztiszok kevesebb, megváltozott szerkezetű tilakoidot tartalmaztak (Jarvis et al., 2000). Az *mgd1* mutáns tulajdonságai egyértelműen jelezték az MGDG jelentőségét a kloroplasztisz kialakulásában. Az MGDG esszenciális voltát az is jelzi, hogy nem sikerült *mgd1* nullmutánst létrehozni *Arabidopsis*-ban (Awai et al., 2001). A TM szerkezetének kialakítása szempontjából nagy jelentőségű, hogy az MGDG molekula nem kettősréteg képző (NKK) lipid. A molekula kicsi fejcsoportja miatt kúp alakú, vizes közegben ún.

inverz hexagonális ( $H_{II}$ ) szerkezetet vesz fel. A tilakoidban előforduló többi lipid kettősréteg képző (KK), vizes közegben lamelláris szerkezetet alkot. A KK és az NKK lipidek aránya meghatározó a fehérjék feltekeredése, a fehérjék membránba ágyazódása és a fehérjék sejten belüli szállítása szempontjából (Kusters *et al.*, 1994).

A fotoszintetikus reakciók membránkörnyezetének kialakításán kívül a fotoszintetikus apparátus működésében is kimutatható MGDG-molekulák szerepe. Röntgenkrisztallográfiás szerkezet-meghatározás mutatta ki egy MGDG-molekula jelenlétét a PSI RC-ban (Jordan *et al.*, 2001), 6 MGDG-molekulát írtak le a PSII RC-ban (Loll *et al.*, 2005), valamint MGDG játszik szerepet a xantofill-ciklus működésében, a violaxantin-deepoxidáz aktivitásának fenntartásában is (Latowski *et al.*, 2004).

Az MGDG szintéziséért felelős gént cianobaktériumban is sikerült azonosítani (Ohta *et al.*, 1981), de ez nem homológ a növényi MGDG-szintáz génekkel, és a róla szintetizálódó fehérje sem hasonlít a növényi enzimre. A feltételezett MGDG-szintáz gén inaktiválása és részleges szegregáltatása után az MGDG szintézise jelentősen csökkent a mutáns sejtekben.

### **2.5.2. A DGDG szerepe a tilakoid membránban**

Dörmann és mtsai 1995-ben DGDG-hiányos mutánst izoláltak *Arabidopsis thaliana*ból. A *dgd1* mutánsban pontmutációval stopkodon jött létre a *DGD1* génben, melynek hatására a sejtek DGDG-tartalma 90%-kal csökkent. A mutáns növények növekedése elmaradt a vad típustól, kevesebb kloroplasztiszt, benne módosult szerkezetű tilakoidot tartalmaztak, a Chl mennyisége és a fotoszintézis hatásfoka csökkent (Hartel *et al.*, 1997, Reifarth *et al.*, 1997, Härtel *et al.*, 1998), illetve zavart szenvedett a fehérjék kloroplasztiszba történő importja (Chen és Li, 1998). Végül Kelly és mtsai által 2003-ban létrehozott *dgd1.dgd2-1* kettős mutáns, mely egyáltalán nem szintetizált DGDG molekulákat, egyértelműen megmutatta, hogy a DGDG alapvető szerepet játszik a normális PSII aktivitás fenntartásában, valamint azt is, hogy a *dgd1* mutánsban még szintetizálódott kevés DGDG esszenciális a funkció szempontjából. Ha ezt a maradék DGDG-t is eltávolítjuk (*dgd1.dgd2-1* kettős mutáns), a növények fejlődése visszamarad, Chl-tartalmuk erősen lecsökken, a fotoszintézis kvantumhatásfoka csökken (Kelly *et al.*, 2003). Az észlelt nemlineáris kapcsolat a DGDG mennyisége és a PSII-re kifejtett hatása között jelzi, hogy a TM DGDG tartalma heterogén: a molekulák egy kisebb része szorosan kötődik a PSII-komplexhez és szükséges annak működéséhez, míg a DGDG molekulák zöme nem játszik közvetlen szerepet a PSII működésében (Steffen *et al.*,

2005). A fentieket igazolják a röntgenkristallográfiás szerkezetkutatás adatai, melyek szerint 4 DGDG molekula található a PSII RC-ban az ETL közelében (Loll *et al.*, 2005).

### 2.5.3. Az anionos lipidek jelentősége a tilakoidban

Az anionos SQDG és PG a membránalkotó lipideknek csak csekély hányadát teszik ki, de negatív töltésük révén igen jelentős szerepet játszanak a membránlipidek és a fehérjék közötti kölcsönhatásban.

Az SQDG bioszintézise növényekben a kloroplasztiszban történik. A szintézis első enzimét az UDP-szulfokvinovóz-szintázt, mely a sztrómában található, növényekben az *SQD1* gén, cianobaktériumokban az *sqdB* gén kódolja. A szintézis másik enzimét, az SQDG-szintázt, mely a kloroplaszt belső burkolómembránjához kötött, növényekben az *SQD2* gén kódolja, cianobaktériumokban az *sqdX*. E két enzim génjeiben létrehozott mutációk segítségével vizsgálták az SQDG szerepét *Arabidopsis thaliana*-ban (Essigmann *et al.*, 1998, Yu *et al.*, 2002, Yu és Benning, 2003), *Chlamydomonas reinhardtii* zöld algában (Sato *et al.*, 1995, Minoda *et al.*, 2002, Riekhof *et al.*, 2003), *Synechococcus* PCC 7942 és *Synechocystis* sp. PCC 6803 (*Synechocystis*) cianobaktériumokban (Benning, 1998, Guler *et al.*, 2000, Aoki *et al.*, 2004). Az eredményekből arra következtethetünk, hogy az SQDG lényeges a PSII optimális szerkezetének és aktivitásának fenntartásához, bár a különböző fajokban különböző mértékben szükséges. *Synechococcus* és *Arabidopsis* SQDG-hiányos mutánsaiban a PSII aktivitása csak kevéssé csökkent, míg a *C. reinhardtii* mutánsban 40%-kal. A *Synechocystis* törzsben mind az *sqdB*, mind az *sqdX* inaktiválása letálisnak bizonyult, a mutáns törzsek csak kívülről adagolt SQDG jelenlétében voltak fenntarthatók. Az eltérés oka talán az eltérő evolúciós fejlődésükben keresendő (Guler *et al.*, 2000, Aoki *et al.*, 2004).

A növények növekedése szempontjából gyakran limitáló tényező a talaj vagy a víz anorganikus foszfát-tartalma. Foszfáthiány esetén nemcsak a növekedés gátolt, de megváltozik a növények lipidösszetétele is: a foszfolipidek aránya csökken, míg az SQDG és DGDG aránya megnő (Essigmann *et al.*, 1998, Dormann és Benning, 2002, Andersson *et al.*, 2003, Jouhet *et al.*, 2003). A lipidösszetétel oly módon változik, hogy a PG és az SQDG együttes aránya állandó maradjon (Benning, 1998, Dormann és Benning, 2002, Kelly *et al.*, 2003), ezáltal a membrán anionos karaktere ne változzon. Hasonló reguláció figyelhető meg SQDG-hiányos mutánsokban is, melyekben optimális körülmények között a megnövekedett mennyiségű PG helyettesíti a hiányzó SQDG-t

(Riekhof *et al.*, 2003), ezért ezekben az eukarióta szervezetekben és a *Synechococcus*ban az SQDG nem tűnik esszenciális lipidnek. Érdekes különbség, hogy *Synechocystis*ben nem helyettesíthetik egymást az anionos lipidek, mindkettő nélkülözhetetlen (Aoki *et al.*, 2004).

Az SQDG/PG helyettesítési hipotézis bizonyítására Yu és Benning (Yu és Benning, 2003) elkészítették az *sqd2.pgpl-1* kettős mutánst *Arabidopsis*ban. A kettős mutánsban az SQDG-szintáz enzim génje T-DNS-inszerció következtében inaktiválódott, ezáltal a mutáns egyáltalán nem szintetizált SQDG-t, a PG szintje pedig a vad típus PG szintjének kb. 30%-a volt, a kloroplasztisz FGP-szintázát kódoló *FGPI* génben létrejött pontmutáció következtében. A kloroplasztiszban az összes anionos lipid mennyisége 30%-kal csökkent. Az anionos lipidek hiánya szerkezeti változásokat okozott: a levelekben a mezofillumsejtek száma csökkent (nőtt az intercelluláris tér aránya), csökkent a sejtekben levő kloroplasztiszok száma és a plasztiszban levő tilakoid mennyisége is. A TM-ből szinte teljesen hiányzott a gránumokba szerveződés. A sejtek Chl- és Car-pigment-tartalma harmadára csökkent, a PSII-n áthaladó lineáris elektrontranszport kvantumhatásfoka csökkent, a sejtek DCMU-érzékenysége nőtt, az elsődleges kinon elektronakceptor  $Q_A$  redukáltsági állapota módosult az anionos lipidek elvesztésével (Yu és Benning, 2003). Bebizonyosodott, hogy az SQDG hiánya is lehet növekedést gátló tényező, ha a PG-re alapuló kompenzáló mechanizmusok nem működnek. E kettős mutáns tanulmányozása alátámasztotta az anionos lipidek, különösen a PG fontosságát a fotoszintetikus folyamatokban.

A cianobaktériumokban és a kloroplasztiszban előforduló egyetlen foszfolipid, a PG nélkülözhetetlen a TM szerkezetének kialakításához és működésének fenntartásához (Hagio *et al.*, 2000, Gombos *et al.*, 2002). Szerepét *in vitro* és *in vivo* kísérletekkel próbálják tisztázni (Domonkos, 2006).

## 2.6. A cianobaktériumok karotinoid összetétele

A Car-ok alkotják az élővilágban előforduló pigmentek legnagyobb csoportját, több mint 700 Car-ot azonosítottak napjainkig (Britton *et al.*, 2004). Minden fotoszintetizáló szervezet állít elő Car-okat, így cianobaktériumok, algák és magasabbrendű növények (Frank és Cogdell, 1996). Továbbá anaerob baktériumok, egyéb nem fotoszintetizáló baktériumok, illetve gombák (Goodwin, 1988) is képesek ezen pigmentek szintézisére, de az állatvilágban is találunk erre számos példát.



A karotinok a lipidek csoportjába tartozó terpénszármazékok. Ezek olyan molekulák, melyek lúgos hidrolízissel nem bonthatók több alkotórészre. A legtöbb Car-ot C<sub>40</sub>-es szénhidrogén váz alkot, mely nyolc C<sub>5</sub>-ös izoprenoid (2-metil-butadién) egységből épül fel és konjugált kettős kötések tartalmazzák. A Car-ok lineáris molekulák, egyik, vagy mindkét végükön megtalálható β-ionon gyűrűvel.

Az oxigéntartalmú karotinszármazékokat xantofilloknak nevezzük. Azonosítottak több glükózilált Car-ot és karotin észtert is (Goodwin és Britton, 1988).

### **2.6.1. A karotinoidok szerepe a fotoszintetizáló szervezetekben**

A Car pigmentek sokféle funkciót látnak el a fotoszintetizáló szervezetekben, melyek közül a legfontosabb a fénybegyűjtő szerepük, a fotooxidatív károsító hatások kivédése (Fujimori és Livingston, 1957, Palozza és Krinsky, 1992) és a pigment-protein komplexek szerkezetének stabilizálása (Plumley és Schmidt, 1987, Paulsen et al., 1990).

A fénybegyűjtő antennák pigment-protein komplexeinek építőelemeiként, a Car-ok képesek 450 és 570 nm közötti hullámhosszon fotonokat elnyelni és továbbítani a felvett energiát a Chl molekuláknak (Cogdell és Gardiner, 1993).

A Car-oknak a fotokémiai RC-ok felépítésében is fontos szerepük van. 1977-ben írták le, hogy a cianobaktériumok PSII komplexével Car-ok kapcsolódnak össze (Suzuki és Fujita, 1977). A magasabbrendű növényekben és a cianobaktériumokban 12 Car-molekula fordul elő a röntgenkristallográfiás analízisek szerint (Guskov *et al.*, 2009) a PSII reakciócentrum magjában, két β-karotin molekula helyezkedik el. Ezen β-karotin molekulák pontos funkciója még nem teljes mértékben tisztázott. Izolált PSII RC-ban figyelték meg, hogy a két β-karotin molekula védi a P680 Chl a károsító hatásoktól (De Las Rivas *et al.*, 1993) és feltételezhetően a D1 alegység degradációjának megakadályozásában is fontos szerepet töltenek be (Sandmann *et al.*, 1993).

A *Thermosynechococcus elongatus* PSI komplexek szerkezetében röntgenkristallográfiás módszerrel monomerenként 22 Car-molekulát azonosítottak (Grotjohann és Fromme, 2005). A β-karotin a PSI fő polipeptidjéhez kötődik és hatásos antennaként működik.

Növényekben a nagy fényintenzitás ellen védelmet nyújtó pigmentekként is működnek a Car-ok. Cianobaktériumokban is megfigyelték Car-ok felhalmozódását nagy fényintenzitásnak kitett sejtekben. A cianobaktériumokban található Car-molekulákban a kilenc konjugált kettős kötés π - elektronjai képesek a triplett gerjesztési állapotba került Chl molekulák energiáját átvenni, így megakadályozva a veszélyes szingulett állapotú

oxigén gyökök kialakulását (B Demmig-Adams és W W Adams, 1992), melyek a fotoszintetikus apparátus fotooxidatív károsodását okozhatják.

Antioxidáns tulajdonságának köszönhetően a  $\beta$ -karotin óvja a sejteket a károsító UV-sugaraktól (Tuveson és Sandmann, 1993).

Álgákban és magasabbrendű növényekben a xantofill-ciklus szolgálja a fotoprotekciót. Ennek során a violaxantin deepoxidálódik fény hatására, melynek következtében zeaxantinná alakul. A folyamat sötétben záródik ciklussá azáltal, hogy a reakció ellentétes irányban játszódik le (Stransky és Hager, 1970, Yamamoto, 1979, B Demmig-Adams és W W Adams, 1992). A cianobaktériumokban nincsen jelen a xantofill-ciklus, de a legtöbb törzs szintetizál zeaxantint, vagy egyéb xantofill molekulákat, amely képes a Chl fotoprotekcióját ellátni.

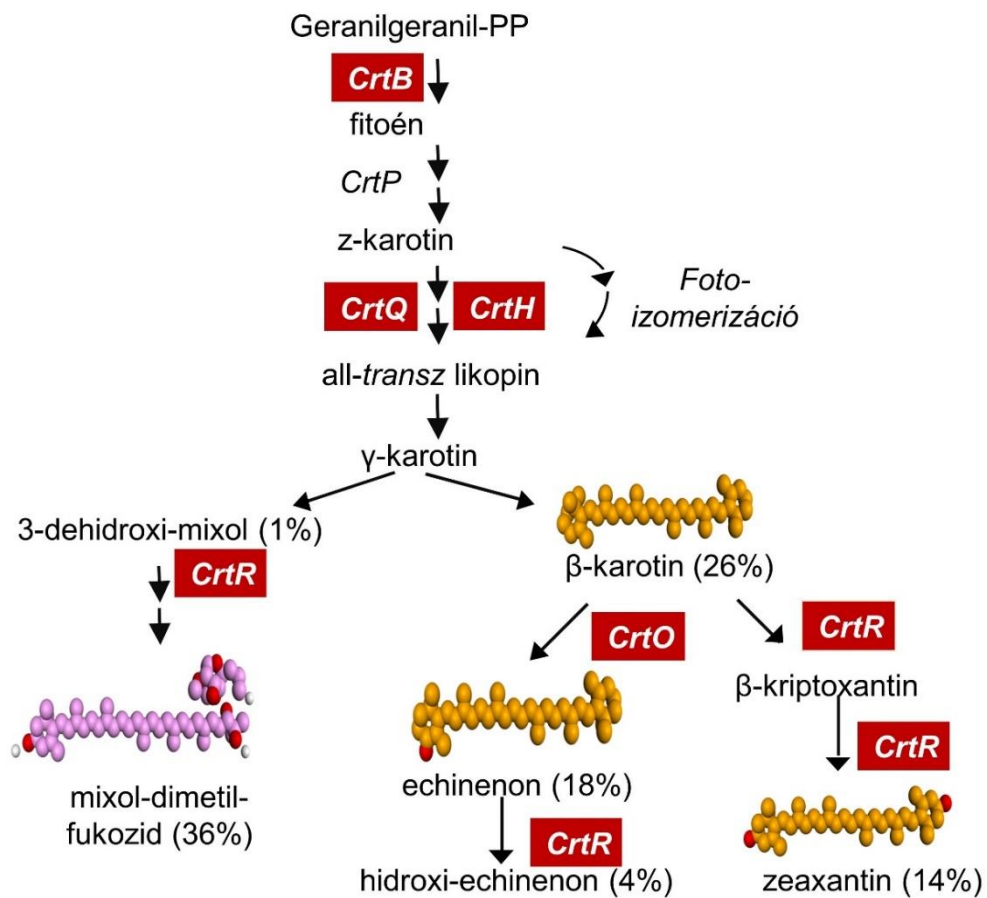
Általánosan elfogadott tény, hogy a fiziológiásan aktív Car pigmentek a biomembránban fehérjékhez kapcsolódva állnak. A fotoszintetikus membrán fénybegyűjtő pigment-proteinjei és a reakciócentrumok protein komplexei is tartalmaznak Car-okat. Azonban számos esetben a Car pigmentek egy bizonyos százaléka közvetlenül a membránok lipid fázisában van jelen. Elmondható ez a retina membrán (Bone és Landrum, 1984, Bone et al., 1992), egyes fotoreceptorok és számos bakteriális és fotoszintetikus membrán estében is (GOMBOS *et al.*, 1987, Yurkov *et al.*, 1993). A xantofill-ciklus pigment molekulái a fehérjékről leválnak és szabadon fordulnak elő a TM-ban. (Kovacsics, 2011).

### **2.6.2. A karotinoidok bioszintézise**

A cianobaktériumok a magasabbrendű növényekben megtalálható Car-okat szintetizálják, de néhány törzs különleges xantofill molekulákat állít elő. A *Synechocystis* fotoszintetikus komplexeiben előforduló legnagyobb mennyiségben azonosított Car, a  $\beta$ -karotin. Ezenkívül előállítanak még zeaxantint, mely a  $\beta$ -karotin hidroxiszármazéka, echinenont és 3'-hidroxiechinenont, melyek ketoszármazékok, valamint mixoxantofillt, amely egy karotinoid-fukozid (**V. ábra**) (Takaichi *et al.*, 2001).

A cianobaktériumok Car-összetétele könnyen meghatározható, így jó modell organizmusként szolgálnak a karotin bioszintézis tanulmányozásához és ezen pigmentek élettani szerepének tisztázásához. A Car-ok szintézisének anyagcsereútvonalait módosítva különféle Car mutáns törzseket nyerhetünk, melyek hozzásegítenek minket funkció- és szerkezetbeli szerepük megértéséhez.

A C<sub>15</sub> farnezil-pirofoszfát (FPP) három izopentil-pirofoszfátból szintetizálódik az izopentil-pirofoszfát-izomeráz által. A továbbiakban egy IPP-t (C<sub>5</sub>-ös izoprén csoportot) kapcsol a farnezil-pirofoszfáthoz a geranilgeranil-pirofoszfát-szintáz (CrtE), létrehozva a C<sub>20</sub>-as geranilgeranil-pirofoszfát (GGPP) molekulát, amely a teljes Car-szintézis alapját adja. Az első Car-molekula kialakításában a fitoén-szintáz (CrtB) vesz részt, így a geranilgeranil-pirofoszfát-szintáz (CrtE) és a fitoén-szintáz (CrtB) (Martinez-Ferez *et al.*, 1994) az első enzimek, melyek szerepet játszanak a *Synechocystis* Car bioszintézisében.



**V. ábra: *Synechocystis*ben található legelterjedtebb karotinoidok bioszintézisének sematikus ábrája (készítette: Dr. Sindhujaa Vajravel).**

A további Car szintetizációs útvonalakat a **V. ábra** szemlélteti. A különféle gének inaktivációjával mód nyílik eltérő Car-okban hiányos mutáns törzsek létrehozására, amely hatékony eszközt kínál a Car-ok élettani szerepének feltárásában (Kovacsics, 2011).

## 2.7. A cianobakteriális fikobiliszómák

A cianobaktériumok különleges fénybegyűjtő komplexekkel rendelkeznek, ezek a tilakoidok felszínén elhelyezkedő PBS-k. Kivételként a *Gloeobacter violaceus* fajnál viszont a PBS-k a CM-on találhatóak. A TM-ok külső felszínén sorba rendezetten helyezkednek el a félgömb, vagy félkorong alakú, 20-70 nm átmérőjű PBS-k, amelyek a járulékos pigmenteket tartalmazzák. A fikobiliszómák egy háromszög alakú magból és a belőle „kiágazó” rúdszerű képletből állnak. A háromszög alakú magot 10-12 nm átmérőjű és három allofikocianinból (APC) álló dupla „korong” alkotja. A magnak a tilakoidokhoz való rögzítését egy kötő (linker) fehérje végzi. A „rudak” alkotásában az allofikocianin felőli oldalon, a kék színű fikocianin (PC) molekulák, illetve a külső részen a fikoeritrin (PE), vagy fikoeritrocianin (PEC) - abban az esetben, ha az adott törzs tartalmaz fikoeritrin, vagy fikoeritrocianint-, valamint az őket összekötő fehérjék vesznek részt. A multiprotein-komplekként felfogható PBS-k a fent említett pigmenteken kívül még különböző Car-okat tartalmaznak (pl. mixoxantin,  $\beta$ -karotin, zeaxantin, nostoxantin, echinenon és kaloxantin). Az antennaként funkcionáló fikobiliproteinek nagy hatásfokkal képesek begyűjteni és továbbítani a fényenergiát a PSII. fotoszintetikus reakciócentrumok számára. A fényt főként a rúdszerű képletekbe rendeződött fikoeritrinek (abszorpciós maximumuk 495-575 nm), vagy fikoeritrocianinok (575 nm) nyelik el és továbbítják a fikocianinoknak (615-640 nm). Utóbbiaktól pedig allofikocianinokon (650-655 nm) keresztül jut az energia a reakciócentrum felé.

A cianobaktériumok többsége nem képes az összes fikobiliproteint előállítani. A zöldes-kék színűekre jellemző az allofikocianin (APC) és fikocianin (PC) tartalom. Sok heterocisztás cianobaktérium az allofikocianin (APC) és fikocianin (PC) mellett fikoeritrocianint (PEC) tartalmaz, de ezekből a szervezetekből soha nem mutatható ki fikoeritrin (PE). Sok sötét színű bentikus faj nagy mennyiségben fikocianint (PC) és fikoeritrin (PE) hordoz. A nagy mennyiségben fikoeritrin (PE) és kis mennyiségben fikocianint (PC) szintetizáló vörös színű cianobaktériumok tipikus élőhelyei a mély tavak és tengerek. A nyílt vizű óceánokban tipikusan előforduló cianobaktériumok, mint a *Synechococcus* és *Trichodesmium* fajok viszont nagy mennyiségben tartalmaznak fikouobilinben gazdag fikoeritrin 495-500 nm közötti abszorpciós maximummal (Borsodi, 2013).

### 3. Célkitűzések

A fotoszintetizáló élőlények TM-jának lipidösszetéle jelentős hatással bír a fotoszintézis fényreakcióira. A cianobaktériumokban valamint a magasabbrendű fotoszintetizáló élőlények kloroplasztiszaiban található TM-ok lipidösszetétele nagy mértékben hasonlít egymásra. Ezen tulajdonságuk és a fotoszintézis szempontjából kulcsfontosságú gének konzerváltága teszi a cianobaktériumokat kiváló modellszervezetekké a fotoszintézis tanulmányozása szempontjából. Bár egyes cianobaktériumok lipidosztályok szempontjából hasonlítanak a növényi kloroplasztiszokra, lipidjeik zsírsavdallancainak telítettségi fokában azonban jelentős eltérést mutatnak.

A Car-pigmentek részt vesznek a fénybegyűjtő folyamatokban (Stamatakis *et al.*, 2014) és a PSII fotoszintetikus komplexek összeszerelésében (Sozer *et al.*, 2011); membrán struktúrákat modulálnak és védik azokat a különböző környezeti stresszfaktoroktól (Domonkos *et al.*, 2009). Ezen kívül a PSII dimerizációjához és a PSI trimerizációjához van szükség rájuk *Synechocystis*-ben (Tóth *et al.*, 2015). A karotinok mellett egy bizonyos szintig megemelkedett hőmérséklet is stabilizálni tudja a PSI trimert (Klodawska *et al.*, 2015).

A glicerolipidek és a Car-ok együttes jelenléte megfigyelhető a PSI és a PSII struktúrális- illetve funkcionális szempontból jelentős helyein. A glicerolipidek és a Car-ok meghatározó szerepet töltenek be ezekben a pigment protein komplexekben (Sozer *et al.*, 2011). Ennélfogva a lipid-karotinoid-protein interakciók vizsgálata fotoszintetikus membránokban egy ígéretes kutatási terület. Ezen kölcsönhatások tanulmányozása szempontjából a következő kérdések vizsgálatát tűztem ki célul:

1: Milyen hatást gyakorol a Car- és/vagy lipidhiány a *Synechocystis* sejtek morfológiájára?

2: Hogyan változik a *Synechocystis* törzsek (WT, RO, AD és ROAD) hőmérsékleti stresszhez való alkalmazkodása a lipid-karotinoid kooperáció által?

2.1: Milyen együttes és egyedi stressz enyhítő hatásuk van a xantofilloknak és a többszörösen telítetlen zsírsavaknak?

3: Okozhat-e a szerkezeti változásokat xantofillok és/vagy lipidek hiánya a fotoszintetikus komplexekben?

3.1: Hogyan változik a PSI oligomerek hőstabilitása az egyes törzsekben?

4: Hogyan különbözik a PSI oligomerek aránya három különböző (1 egysejtes, 2 fonalas) cianobaktériumban – *Synechocystis*-, *Anabaena*- és *Spirulina*-ban?

4.1: Az általunk választott non-invazív technikák (CD- és mélyhőmérsékletű fluoreszcencia emissziós spektroszkópia) közül melyik alkalmasabb a PSI-ben bekövetkező strukturális változások nyomonkövetésére?

## 4. Kísérleti anyagok és módszerek

### 4.1. A felhasznált cianobaktérium törzsek nevelési körülményei

#### 4.1.1. *Synechocystis* törzsek és nevelési körülményeik

A vad típuson (WT) kívül a következő *Synechocystis* sp. PCC6803 (*Synechocystis*) törzseket használtam fel: RO, AD, ROAD, RO/psaL, PsaL és RO/psaL. Az RO mutánsban (Tóth *et al.*, 2015) a *crtR* és a *crtO* gének inaktívált állapotban vannak, ezért ezek nem tartalmaznak xantofilokat. Az AD mutáns sejtvonala (Tasaka *et al.*, 1996) esetében a *desA* és a *desD* gének működésképtelenek, így ezek a sejtek nem tartalmaznak többszörösen telítetlen lipideket. A PsaL mutánsban (Klodawska *et al.*, 2015) az inaktiválódott *psaL* gén miatt a PsaL fehérje hiányzik, ennélfogva ezek a sejtek nem képeznek PSI trimereket, csak PSI monomereket. Az RO/psaL mutánsban az RO és a PsaL mutáns együttes jellegzetességei érvényesülnek (Zakar *et al.*, 2018).

A WT-t és mutáns törzseket fotoautotrofikusan, BG11 médiumban (Allen, 1968) neveltem, mely 5 mM HEPES-NaOH (pH 7.5) is tartalmazott. A sejteket 30 ° C-on, folyamatos 40  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  intenzitású megvilágítás mellett, fehér fényben neveltem. A kultúrák levegőztetését állandó rázatással biztosítottam (körkörös rázó, 100 rpm). A mutáns vonalakat a következő antibiotikumok jelenlétében neveltem fel: RO (40  $\mu\text{g ml}^{-1}$  kanamicin és spektinomycin), AD (40  $\mu\text{g ml}^{-1}$  kanamicin és 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  klóramfenikol), ROAD (40  $\mu\text{g ml}^{-1}$  kanamicin és spektinomycin, 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  klóramfenikol és 30  $\mu\text{g ml}^{-1}$  eritromicin), PsaL (40  $\mu\text{g ml}^{-1}$  kanamicin és spektinomycin), RO/psaL (40  $\mu\text{g ml}^{-1}$  kanamicin és spektinomycin, 30  $\mu\text{g ml}^{-1}$  eritromicin). Az AD és RO mutánsok használatát N. Murata (National Institute for Basic Biology, Okazaki, Aichi, Japán) és K. Masamoto (Kumamoto University, Japán) tették lehetővé számunkra.

#### 4.1.2. *Anabaena* sp. PCC7120 törzs nevelési körülményei

Kizárólag VC-k nevelése érdekében az *Anabaena* sp. PCC7120 (*Anabaena*) nevelési körülményei megegyeztek a *Synechocystis* WT nevelési körülményeivel.

#### 4.1.3. A *Spirulina platensis* törzsek nevelési körülményei

A *Spirulina platensis* WT-t és  $\gamma$ -linolénsav mentes mutánsát, az I22-t az ún. ATCC Medium 1679 (SOT) médiumban (Ogawa és Terui, 1970) (pH 9.0) neveltem fel. A

nevelés minden más paramétere teljesen megegyezik a *Synechocystis* WT nevelési körülményeivel.

## **4.2. Mutánsok létrehozása, a sejtek transzformációja**

### **4.2.1. Az ROAD mutáns létrehozása**

Az RO mutáns úgy jött létre, hogy kanamicin és spectinomycin kazettákat helyeztek a *crtR* és *crtO* gének kódolórégióiba. Az ROAD mutáns előállításához a *desA* és *desD* gének kódolórégióit PCR segítségével amplifikálták fel. A *desA* gén *HindIII* helyén egy eritromicin kazettát helyeztek be, az *MscI* helyén viszont egy klóramfenikol rezisztencia gén akadályozza működését. Ezeket a DNS konstrukciókat alkalmaztuk az RO törzs transzformálására. Az ROAD mutáns sejtek teljes szegregációját PCR-rel igazoltuk (Zakar *et al.*, 2017).

### **4.2.2. Az RO/*psaL* mutáns létrehozása**

A *psaL* gén kódoló régiójában plazmid konstrukciót hoztak létre és omega kazettával helyettesítették azt (Prentki és Krisch, 1984, Klodawska *et al.*, 2015). Ezt a konstrukciót alkalmaztuk a *Synechocystis* RO mutáns sejteinek transzformálására. A transzformánsokat fotoautotróf nevelési körülmények között szelektáltuk növekvő koncentrációjú spectinomiccinnel kiegészített BG-11 agarlemezekeken. A  $\Delta$ *psaL* mutáns sejtek teljes szegregációját PCR-rel igazoltuk (Zakar *et al.*, 2018).

## **4.3. A hőmérsékleti stresszre adott válasz nyomonkövetésének kísérleti terve**

A *Synechocystis* WT valamint az RO, AD és ROAD mutáns törzsek hőmérsékleti stresszválaszainak követése érdekében a kultúrákat 25, 30 és 35°C-on neveltem. A hőmérsékleti stresszkezelések időtartama három nap volt. Ezt az időintervallumot a 25°C-on rendkívül fényérzékeny AD és ROAD sejtek miatt választottam ki. A WT sejtek esetében az optimális nevelési hőmérséklet 30°C (Tasaka *et al.*, 1996). A 25°C és a 35°C hőmérsékleteket a mérsékelten alacsony (MA) és mérsékelten magas (MM) hőmérsékleti értékeknek tekintettem az optimális hőmérséklethez képest.

## **4.4. Elektronmikroszkópia analízis**

A transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) vizsgálatokhoz az összegyűjtött sejteket 1%-os paraformaldehidben és szintén 1%-os glutáraldehidben rögzítettük 4 órán át 4°C. A további rögzítést 1%-os ozmium-tetroxid segítségével értük el. A mintákat a



növekvő etanol koncentrációjú vizes oldatokban dehidratáltuk, majd Spurr gyantába ágyasztuk. A polimerizációt követően ultravékony, 85-90 nm vastag szeleteket vágunk a Reichert Ultracut E ultramikrotóm (Leica, Wetzlar, Germany) használatával. A szokásos eljárás szerint az elkészült metszeteket uranil-acetáttal és ólom-citráttal kezeltük. A kész mintát Zeiss EM 902 elektronmikroszkóppal (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Németország) vizsgáltuk meg.

A pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) kísérletekhez a sejteket poli-L-lizinnel bevont polikarbonát szűrőn szűrtük le, majd 2,5%-os glutáraldehidben fixáltuk 4 órán át illetve 1%-os ozmium-tetroxidban utórögztítettük. A mintákat a növekvő etanolkoncentrációk vizes oldataiban dehidratáltuk, ezután kritikus ponton szárítottuk, majd a Quorum Q150T ES műszer segítségével felszínükre 10 nm aranyat rétegettünk és a JEOL JSM-7100F/LV pásztázó elektronmikroszkóppal megfigyeltük. A sejttérfogatokat a gömb alakú sejtek átmérőjének meghatározásával számítottuk ki. A WT sejtek térfogatát 100%-nak vettük.

#### **4.5. Lipid analízis**

A teljes lipidtartalmat intakt cianobaktérium sejtekből extraháltuk Welti és mtsai (Welti *et al.*, 2002) módszerével, amit némileg módosítottunk. A felnevelt sejteket ( $OD_{750}=50$ ) lecentrifugáltuk és 2 ml előmelegített, 0,01% butilezett hidroxitoluolt is tartalmazó izopropanolba helyeztük őket és 20 percig 70°C-on inkubáltuk annak érdekében, hogy megvédjük a lipideket a foszfolipáz aktivitástól. Ezután kombinált lipid extrakciót végeztünk. Az izopropanollal történő inkubálás után 1 ml kloroformot és 0,3 ml vizet adtunk hozzá. A csöveket egy órán keresztül szobahőmérsékleten rázattuk, amit a lipid extraktumot tartalmazó kloroform fázis eltávolítása követett. Az extrahálási lépést egyszer ismételtük 3 ml kloroform/metanol 2:1 arányú, 0,01%-nyi butilezett hidroxitoluolt is tartalmazó elegyével, amit egy órán keresztül kevertettünk szobahőmérsékleten. A megmaradt sejttörmelékét szűrőpapírra helyeztük majd egy teljes éjszakán át 105°C-on melegítettük és a tömegét lemértük. A szárított, extrahált sejtek tömege a cianobaktérium sejtek ún. „száraz tömege”. A száraz tömegek 5 és 14mg közötti értékeket mutattak. A kombinált lipidkivonatokat egyszer 1,5ml kloroformmal és 1M káliumkloriddal, majd egyszer pedig vízzel mostuk át. Az oldószert nitrogéngázzal lepároltuk és a lipidkivonatot feloldottuk 0,5ml kloroform/metanol 2:1 arányú elegyében, ezt követően -80°C-on tároltuk. Mielőtt a szárazjégen lévő mintákat elszállítottuk volna, az oldószert lepároltuk és a csöveket nitrogénnel töltöttük fel. Az összes lipidkivonat lipidomikai

analízisét a Kansas Lipidomics Kutatóközpont Analitikai Laboratóriumában végeztettük el, tandem MS-alapú módszerrel

(lásd: [https://www.kstate.edu/lipid/analytical\\_laboratory/lipid\\_profiling/index.html](https://www.kstate.edu/lipid/analytical_laboratory/lipid_profiling/index.html)).

Ismert mennyiségű belső „standard” alkalmazásával a lipidek mennyiségét normalizált jel/mg száraz tömegre számoltuk. A normalizált jel/mg száraz tömeg kiszámítása lehetővé teszi egyes vegyületek összehasonlíthatóságát a minták között, viszont nem biztos, hogy pontosan jelezné a vegyületek relatív mennyiségét a mintában. A különböző lipid-osztályok kettős kötés indexeit is hasonlóképpen számítottuk ki (Falcone *et al.*, 2004) a következő egyenlet segítségével:  $[\Sigma (\text{a normalizált jelintenzitás \% -os aránya} / \text{lipid fajták tömege mg-ban} \times \text{a kettős kötések számával})] / 100$ . A normalizált jelintenzitás %-os aránya / lipid fajták tömege mg-ban három független biológiai ismétlés átlaga.

#### **4.6. A sejtsűrűség és a pigmentösszetétel meghatározása**

A kultúrák sejtsűrűségét OD<sub>750</sub> mérés során határoztam meg egy Shimadzu UV-1601 spektrofotométer segítségével. A Chl-koncentrációt 665 nm-es abszorbancia értéknél mértem, 90% metanolt tartalmazó extraktumokat használva. Az A<sub>665</sub>-ös értéket 78,74 extinkciós együtthatóval szoroztam meg (Meeks és Castenholz, 1971) a Chl a ( $\mu\text{g Chl a ml}^{-1}$ ) koncentrációjának kiszámításához. A minták pigment összetételét Shimadzu nagy hatékonyságú folyadékkromatográf (HPLC) rendszerrel analizáltuk. A Vajravel és mtsai (Vajravel *et al.*, 2016) által leírt pigment kivonási és elválasztási módszert alkalmaztuk. A Car származékokat mind abszopciós, mind retenciós idejük alapján azonosítottuk. A Car-Chl arány kiszámításához a Car fajták és a Chl-ok koncentrációját a Lambert-Beer egyenlete alapján számítottuk ki 440nm-nél meghatározott extinkciós koefficiensük alkalmazásával.

#### **4.7. Tilakoid membránok izolálása**

##### **4.7.1. Natív poliakrilamid gélelektroforézis kísérletekhez**

Membránpreparáláshoz az izoláló pufferben [10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20% glicerin, 25mM MES / NaOH, pH = 6,5 (Dobáková *et al.*, 2009)] lévő sejteket 106 $\mu\text{m}$  – es cirkónium / szilícium-dioxid gyöngyökkel tártam fel Mini-Beadbeater (Biospec, USA) használatával. A membránkomplexek analíziséhez az izolált membránokat, melyek körülbelül 4  $\mu\text{g}$  Chl-a mennyiségnek feleltek meg, 1%-os (m/V) n-dodecil-P-D-maltoziddal szolubilizáltam majd 4-14% (m/V) poliakrilamid lineáris grádiens gélen

választottam el Komenda és mtsai módszere alapján (Komenda *et al.*, 2012). A katódpuffer 0,05% nátrium–deoxikolátot és 0,02% n-dodecil-p-D-maltozidot tartalmazott.

#### **4.7.2. Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia mérésekhez**

A sejteket centrifugálással összegyűjtöttem (3000 x g, 10 perc, szobahőmérséklet), majd izoláló pufferben (10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 25% glicerin, 1 mM PMSF, 25mM MES / NaOH, pH = 6,5), ≤ 106 μm-es üvegyöngyök hozzáadásával Mini-Beadbeater (Biospec, USA) homogenizátor segítségével feltártam. A sejttörmelék és az üvegyöngyök eltávolítása érdekében a homogenizált mintát lecentrifugáltam (3000 x g, 10 perc, 4 °C). A felülúszóban található TM-okat további centrifugálással (40000 x g, 30 perc, 4 °C) gyűjtöttem össze. A felülúszó eltávolítása után a kapott pelletet az izoláló pufferben oldottam fel (Komenda és Barber, 1995).

#### **4.8. Trimerikus és monomerikus PSI frakcionálása**

A PSI pigment-fehérje komplexek monomerjeit és trimerjeit Domonkos és mtsai (Domonkos *et al.*, 2004) által kidolgozott módszer szerint, egy, UV-abszorpció- és vezetőképesség detektorral ellátott Pharmacia ioncserélő MonoQ folyadékkromatográffal (FPLC) választottuk szét. A TM-frakciókat intakt sejtekből izoláltuk, majd n-dodecil-p-D- maltoziddal szolubilizáltuk annak érdekében, hogy megkapjuk a pigment-fehérje komplexek frakcióját. Ezeket MonoQ HR 5/5 oszlopra (Amersham-Pharmacia Biotech) szűrtük és töltöttük. A mintákat 5-200 mM MgSO<sub>4</sub> nemlineáris grádiens használatával eluáltuk 0,4 ml min<sup>-1</sup> áramlási sebességgel (Rogner *et al.*, 1990). Az elnyelést 280 nm-en mértük. A PSI monomerek és trimerek frakcióit a Domonkos és mtsai (Domonkos *et al.*, 2004) által kidolgozott módszer alapján azonosítottuk.

#### **4.9. Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia mérések**

A CD spektrumok rögzítéséhez használt eszközök és paraméterek: J815 (Jasco) dikrográf Peltier modullal, 350-800 nm-es hullámhossztartomány, szobahőmérséklet és 58°C, 5 nm-es sávszélesség, 1 nm-es felbontás, 500 nm min<sup>-1</sup> pásztázási sebesség és 1 sec. integrációs idő. A minták Chl tartalmát 15 mg ml<sup>-1</sup> értékre állítottam, majd a mintákat egy 1 cm-es optikai úthosszal rendelkező QUARTZ SUPRASIL (Hellma) küvettába helyezve mértem meg. A CD spektrumokat a 680nm-re normalizáltam.

A hőfüggőség korrelációhoz minden mintát 10 cikluson keresztül (10 perc), 58°C-on mértem meg. Adatokat 515 nm-nél gyűjtöttem ki, ami a CD spektrum PSI trimer/monomer régiójának csúcsértéke.

#### **4.10. Mélyhőmérsékletű fluoreszcencia emissziós spektroszkópia mérések**

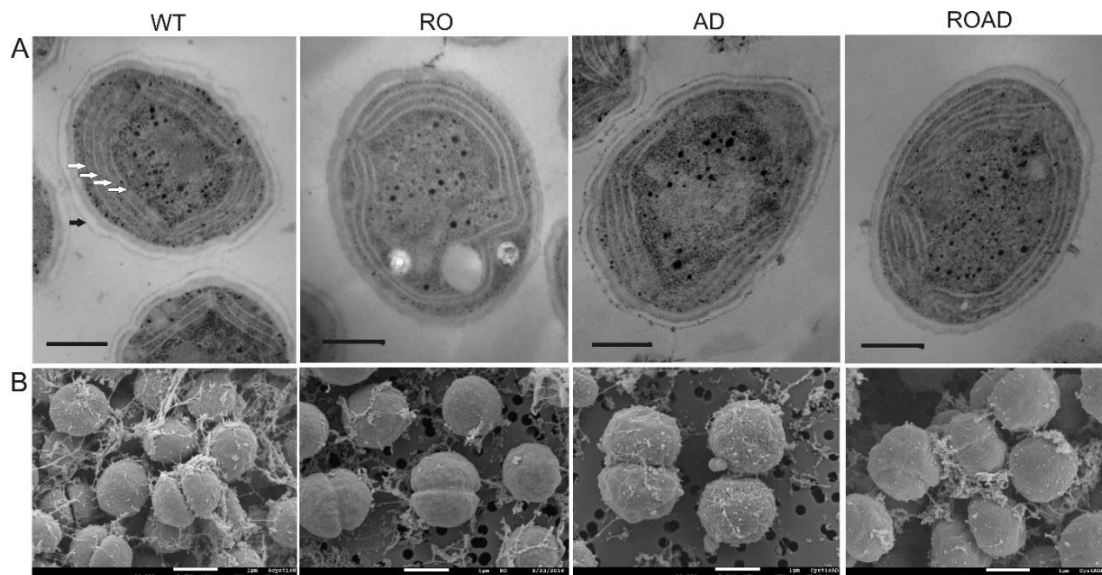
A mélyhőmérsékletű fluoreszcencia emissziós spektrumokat folyékony nitrogénes kriosztáttal felszerelt Fluorolog-3 (Jobin Yvon-Spex Instrument S.A., Inc., Franciaország) spektrofluoriméterrel mértem meg. A mérések előtt 2 µg Chl tartalmú sejtmenyiséget egy korong alakú Whatman GF / C szűrőpapír (25 mm átmérőjű) felületére szűrtem, 5 percig sötétben adaptáltam majd folyékony nitrogénbe mártva lefagyasztottam. A sejteket 436 nm-en gerjesztettem, az összegyűjtött spektrumokat a fotosokszorozó érzékenységére korrigáltam és a maximális fluoreszcencia intenzitásra normalizáltam (Vajravel *et al.*, 2017). Minden spektrumot három független mérés átlagolásával kaptam. Mindegyik spektrumhoz három-három technikai ismétléssel rendelkező biológiai mintát átlagoltam.

## 5.Eredmények

### 5.1. Lipid-karotinoid kooperációs kísérletek

#### 5.1.1. Cianobakteriális sejt morfológia vizsgálata elektronmikroszkópia analízis segítségével

A lipid és Car összetétel változásának sejt morfológiára gyakorolt hatását TEM használatával tanulmányoztuk. Nem észleltünk jelentős morfológiai különbségeket a 25° C, 30° C, illetve a 35° C-on nevelt sejtek között. Az **1.A ábra** a WT és a mutáns sejtek morfológiáját mutatja 25° C. Az AD, RO és ROAD mutáns sejtek nem mutattak nyilvánvaló morfológiai változásokat a WT-hoz képest.



**1. ábra: 25° C-on nevelt *Synechocystis* vad típusú (WT), RO, AD és ROAD sejtek elektromikrográfjai.** (A), a vékony metszetek TEM mikrográfjai. A fehér nyilak a TM-párokat jelzik; a fekete nyíl a cianobakteriális kültakaró (envelope) S-rétegét mutatja. Lépték: 300 nm. (B), SEM képek, lépték: 1 µm.

Minden vizsgált törzs sejtjei 2-8 pár tilakoidot tartalmaznak, melyek párhuzamosan futnak a CM-mal. A TM-ok szerveződése szintén hasonló az egyes vonalaknál, bár, 50 sejt mére alapján az AD úgy tűnik, kevesebb TM-párt tartalmaz, mint a WT. Az elektronmikroszkópos képeken megfigyelhető, hogy az RO és az ROAD törzseknél az S-réteg (**1.A ábra** fekete nyíl) nem volt kimutatható.

SEM-et használtunk a WT és a mutáns sejtek alakjának összehasonlítására (**1.B ábra**). Az RO és az ROAD sejtek felülete simább volt, mint a WT és az AD sejté. Az

50 nem osztódó WT, RO, AD és ROAD sejtek átmérője  $1.26 \pm 0.09$  (WT),  $1.30 \pm 0.08$  (RO),  $1.37 \pm 0.09$  (AD) és  $1.30 \pm 0.07$  (ROAD)  $\mu\text{m}$  volt. Ennek megfelelően a térfogatokat 100% (WT), 111% (RO), 128% (AD) és 110% (ROAD) értékben számoltuk ki, jelezve a sejtek méretbeli különbségeit.

### 5.1.2 Membrán lipid összetétel analízise tömegspektrometriás módszerekkel

Az egész sejtek lipid összetételét lipidomikai megközelítéssel tanulmányoztuk. Az alkalmazott tandem tömegspektrometriás módszer lehetővé tette a többszörösen telítetlen lipidek és xantofillok hiánya miatt a membrán lipid összetételben bekövetkező változások nyomkövetését. A Car- és a lipid hiány mellett a hőmérsékleti stressz hatásait is vizsgáltuk.

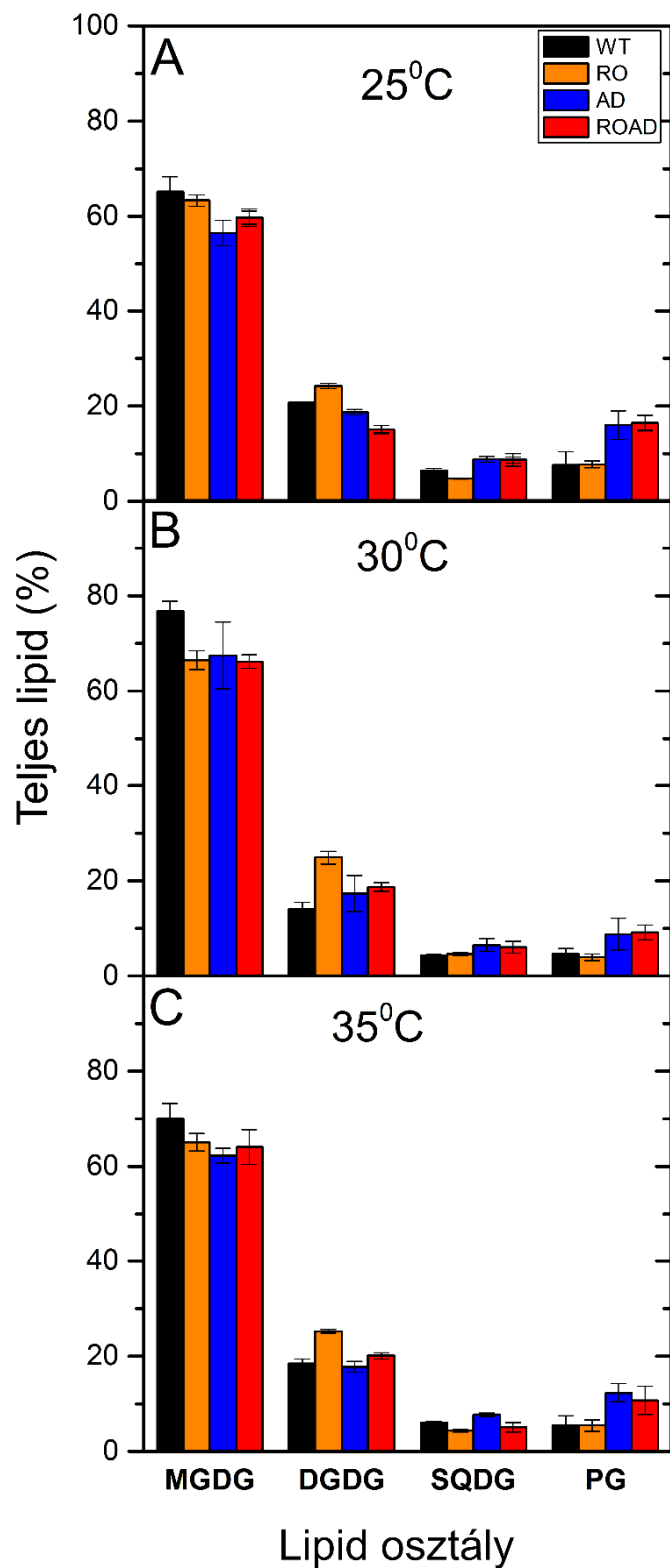
#### 5.1.2.1. Változások a lipid-osztály eloszlásban

A **2. ábrában** összehasonlítom a galaktolipidek (MGDG, DGDG, SQDG) és foszfolipidek (PG) eloszlását WT-ban, valamint a különböző hőmérsékleten nevelt RO, AD és ROAD sejtekben.

A normál hőmérsékleten ( $30^\circ\text{C}$ -on) nevelt WT sejtekben a négy fő lipid-osztály mólszázalékos eloszlása hasonló volt a korábban publikált eredményekhez (Plohnke és mtsai, 2015). Bár a WT és mutáns vonalakban az MGDG volt a legelterjedtebb lipid-osztály, észrevehető különbségek voltak ennek a molekulának az eloszlásában a Car és lipid mutánsokban, valamint a különböző hőmérsékleten nevelt sejtekben (**2. ábra**).  $30^\circ\text{C}$ -os nevelési körülmények között az MGDG szintje jelentősen csökkent a mutánsokban a WT-sal összehasonlítva, míg ez a szint az RO mutánsban jelentősen, az AD és ROAD törzsekben viszont mérsékelten növekedett (**2.B ábra**). A normál növekedési hőmérséklethez képest az MGDG százalékos aránya tovább csökkent a  $25^\circ\text{C}$ -on, illetve a  $35^\circ\text{C}$ -on nevelt WT sejtekben. Az AD és ROAD sejtekben az MGDG tartalom csökkenése jelentősebb volt, mint a WT-ban (**2.A és C ábra**).

$30^\circ\text{C}$ -on a mutánsok SQDG szintje hasonló volt a WT értékéhez (**2.B ábra**). Viszont, ha  $25^\circ\text{C}$ -os stressznek tettük ki őket, az AD és ROAD törzsek SQDG szintje a kétszeresére nőtt a normál nevelési hőmérséklethez képest (**2.A és C ábra**). Érdekes módon, az RO törzsre jellemző xantofill hiány nem változtatta meg az SQDG és PG tartalmakat normál hőmérsékleten. Azonban a többszörösen telítetlen lipidek hiánya az AD és az ROAD mutánsokban körülbelül kétszer magasabb PG szintet eredményezett,

mint a WT-ban azonos hőmérsékleten (**2.B ábra**). Ez a növekedés fokozódott, amikor az AD és ROAD sejteket 25° C-on és 35° C-on neveltem (**2.A és C ábra**).



2. ábra: Lipid-osztály eloszlása 25° C-on (A), 30° C-on (B) és 35° C-on nevelt *Synechocystis* vad-típusú (WT), RO, AD és ROAD sejtekben. Az ábrázolt adatok három független biológiai ismétlésből számított átlag±szórás értékeiből származnak.



A lipid-osztály eloszlás jelentős megváltozása a mutációk vagy a hőmérsékleti stressz következtében lényeges változásokkal járt az NKK/KK lipid arányokban. Az **1. táblázat** a WT és a mutáns sejtek NKK/KK lipid arányát mutatja 25° C, 30° C és 35° C-on.

**1. táblázat: A Nem kettősréteg képző (NKK) illetve a kettősréteg képző (KK) képző lipid arányok *Synechocystis* vad típusban (WT) és annak különböző mutánsaiban (RO, AD és ROAD) 25°C, 30°C és 35°C-on nevelve.**

Hőmérséklet	Cianobakteriális törzsek, NKK/KK lipid arány $\pm$ SD			
	WT(M) $\pm$ SD	RO $\pm$ SD	AD $\pm$ SD	ROAD $\pm$ SD
25	1,89 $\pm$ 0,26	1,72 $\pm$ 0,09	1,30 $\pm$ 0,14	1,48 $\pm$ 0,11
<b>30</b>	<b>3,33 <math>\pm</math>0,39</b>	<b>1,99<math>\pm</math>0,18</b>	<b>2,17 <math>\pm</math>0,77</b>	<b>1,95 <math>\pm</math>0,12</b>
35	2,35 $\pm$ 0,34	1,86 $\pm$ 0,15	1,65 $\pm$ 0,11	1,80 $\pm$ 0,30

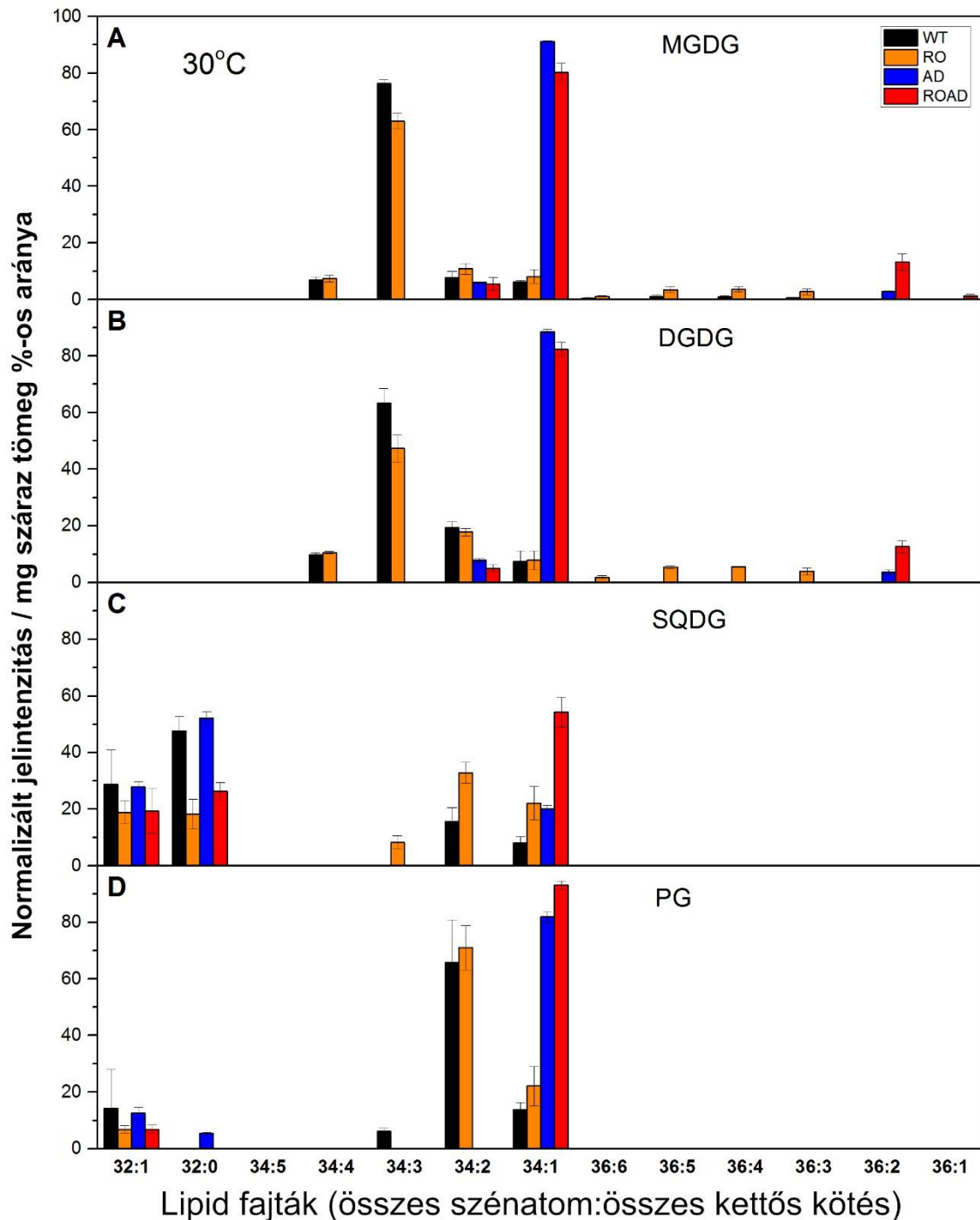
Az SD értékeket három független biológiai ismétlésből számítottuk ki. A főbb különbségeket félkövér betűtípussal jelezve jelenítettem meg.

A normál hőmérsékleten nevelt mutánsokban a NKK/KK arány jelentős csökkenését figyeltük meg a WT-sal összehasonlítva. Az MA hőmérséklet (25° C) kezelés az NKK/KK arány csökkenését eredményezte még a WT sejtekben is, szemben a 30° C-os értékkel. MA hőmérsékleten csak az RO törzs NKK/KK lipid aránya maradt változatlan. Az AD és az ROAD mutánsokban azonban az MA hőmérsékleten bekövetkező lipid arányok csökkenése nagyobb volt, mint a WT-ban. Az MM hőmérsékletnek (35° C) elenyészőbb hatása volt a WT NKK/KK arányára, mint az MA hőmérsékletnek. Mind a xantofill, mind a többszörösen telítetlen lipid mutánsok csökkentett NKK/KK lipid arányt mutattak 35° C-on a WT-hoz képest ugyanazon a hőmérsékleten. Úgy tűnik, hogy az MA és az MM hőmérséklet hatással van a NKK/KK lipid arányokra.

#### **5.1.2.2. A lipidek összetételében bekövetkező változások**

A tandem MS lehetővé tette a fent említett lipidosztályok egyes lipidfajtáinak azonosítását és relatív mennyiségi meghatározását a teljes acil-lánc hossz és az összes

kettős kötés szintjén. A **3. ábra** az MGDG, a DGDG, az SQDG és a PG fajlagos eloszlását szemlélteti a 30° C-on nevelt WT és a mutáns törzsek esetében.



**3. ábra: A 30° C-on nevelt *Synechocystis* vad típusú (WT) és a mutánsok (RO, AD, ROAD) zsírsavtartalma.** (A) MGDG, (B) DGDG, (C) SQDG és (D) PG lipid fajták. Az első számok jelölik az összes szénatomszámot, míg a második szám az összes kettős kötések számát jelöli. Az ábrázolt adatok három független biológiai ismétlésből számított átlag±szórás értékeiből származnak.



A deszaturázók (desA és desD) hiánya miatt az AD és az ROAD sejtek eltérő lipid-fajta mintázattal rendelkeznek, a WT-hoz és az RO-hoz viszonyítva. Maga a Car mutáció is változásokat eredményez, főként a különböző lipidfajták eloszlásában, de ez szignifikánsan nem változtatta meg a lipidek telítetlenségi szintjét. Meghatároztuk a lipidfajták zsír-acil összetételét is. A zsírsavak sn-1 és sn-2 pozíciói nem ismertek, ezeket az acil-transzferázok már ismert tulajdonságai alapján becsülték meg, melyek az sn-2 esetében 16-lán-cú zsírsavakat, míg az sn-1 pozícióban 18C-zsírsavakat észtereszítenek (Murata *et al.*, 1992).

A lipidosztályok közül az MGDG és a DGDG mutatta a legnagyobb változatosságot (**3.A és B ábra**). A WT sejtekben a legelterjedtebb MGDG fajták többszörösen telítetlenek voltak, mint a 34:3, 34:4 (**3.A ábra**). Ez összhangban van a Plonke *et al.* 2015 cikkben található eredményekkel. Az RO mutáns hasonló eredményeket mutatott, mint a WT, de kisebb arányban (34:3). A többszörösen telítetlen MGDG fajtákat (36:6, 36:5, 36:4, 36:3) tartalmazó hosszabb zsírsavlán-cok aránya RO-ban magasabb volt, mint a WT-ban, ahogy azt a **3.A ábra** is szemlélteti. Az AD és ROAD törzsek a deszaturázók inaktiválódása miatt nem tartalmaznak többszöröse telítetlen fajtákat. Várakozásunknak megfelelően, ezekben a mutánsokban az egyszerűen telítetlen lipid fajta, a 34:1 aránya drámai mértékben megemelkedett (**3.A ábra**). Érdekes módon az MGDG 36:2 szint az ROAD sejtekben szignifikánsan magasabb, mint az AD mutánsban, míg a WT és az RO sejtekben csak nyomokban található meg (**3.A ábra**).

A WT és a mutáns törzsek DGDG molekuláris fajtáit a **3.B ábra** szemlélteti. Ezek ugyanolyan mintázatot mutatnak a fajták tekintetében, mint az MGDG esetében (DGDG 34:2 csökkenés és 34:2 növekedés). A C36-os többszörösen telítetlen lipid fajta szintje észrevehetően nőtt az RO mutánsban a WT-hoz viszonyítva.

Az SQDG és a PG szintek (**3.C és D ábra**) a fent említett MGDG és DGDG szintek összehasonlítása során jelentős különbségekre lettünk figyelmesek. A hosszú szénlán-cú fajták (C36) teljesen hiányoznak, valamint a többszörösen telítetlenség szintje a C34 fajtáknál (34:3) drasztikusan lecsökkent. Amint az a **3.C** ábrán látható, új, rövidebb zsírsavlán-c tartalmú SQDG fajták (32:0 és 32:1) jelentek meg a WT-ban és az összes mutáns törzsb-en. A xantofilok hiánya miatt azonban kevesebb C32:0 volt jelen az RO és az ROAD sejtekben, mint a WT-ban és az AD-ban. Továbbá, nagy mennyiségben megtalálható fajta volt az SQDG 34:1, melyet minden vizsgált törzsb-en kimutattunk, az

SQDG 34:2-es azonban csak a WT-ban és RO-ban volt észlelhető. Az RO, AD és ROAD törzsekben a 34:1 aránya magasabb volt a WT-hoz viszonyítva. Ezen vizsgálatok során felhasznált törzsek közül az ROAD törzsben volt a legmagasabb az SQDG 34:1 aránya.

A korábbi kísérletekkel összhangban (Plohnke *et al.*, 2015) a WT sejtekben a 34:1 és a 34:2 voltak a legelterjedtebb PG fajták (**3.D ábra**). Az RO mutáns a WT-hoz hasonló lipidfajta eloszlást mutatott, esetében a 34:2 PG fajták dominálnak. Ezzel szemben az AD és ROAD mutánsok esetében a 34:1 volt a domináns PG fajta.

Az MA és MM hőmérsékleten nevelt törzsek mindegyike hasonló lipid fajta-eloszlást mutatott, mint amelyet a 30° C-on nevelt törzseknél láhattunk (Zakar *et al.*, 2017). Csak minimális különbség figyelhető meg, elsősorban az SQDG és a PG fajták szintjén.

25° C-on az egyszeresen telítetlen SQDG (32:1) tartalom drasztikusan nőtt valamennyi törzsben (Zakar *et al.*, 2017), szemben a 30° C-on nevelt törzsekkel (**3.C ábra**). A magasabb növekedési hőmérséklet az SQDG 32:1 lipidfajták mennyiségének nagymértékű növekedését is okozta, elsősorban az RO, AD és ROAD törzsekben (Zakar *et al.*, 2017) (**3.C ábra**). MA hőmérsékleten az SQDG 34:3 és a PG 34:3 tartalom drasztikusan megnövekedett a WT és RO sejtekben (**3.C és D ábra**), miközben MM hőmérsékleten ezek a lipidfajták szinte teljesen eltűntek (Zakar *et al.*, 2017).

Érdekes módon a 32:1 PG mennyisége kevésbé csökkent a MA és a MM hőmérsékleten nevelt törzsekben. A WT- és RO vonalakban továbbra is a 34:2 volt a legmeghatározóbb PG fajta, míg az AD és ROAD vonalak esetében a 34:1-es PG volt a legelterjedtebb (Zakar *et al.*, 2017) ugyanúgy, mint a normál növekedési hőmérsékleten nevelt sejteknél.

Miután meghatároztuk a lipidosztályok fajlagos eloszlását WT- és a mutáns vonalakban különböző hőmérsékleten, kíváncsiak voltunk arra, hogy a xantofilok és/vagy a hőmérsékleti stressz eliminálása befolyásolhatja-e a membránokban lévő teljes telítettségi szintet. Amennyiben igen, meg akartuk határozni a különböző lipidosztályok arányos hozzájárulását a teljes membrántelítettségi szinthez. Ezért kiszámítottuk a 25° C, 30° C és 35° C hőmérsékleten nevelt WT- és mutáns törzsekben található különböző lipidosztályok kettős kötésiindexeit (**2. táblázat**). A **3. ábrán** megfigyelhető kettős kötésiindexeket a normalizált jel/mg molekula fajta száraz tömegének százalékos aránya segítségével számítottuk ki. A **2. táblázat** a WT és mutáns sejtek kettős kötésiindexei között jelentős eltéréseket mutat.

**2. táblázat: A különböző lipidosztályokhoz és az összes lipidekhez tartozó lipidek kettős kötés indexei *Synechocystis* vad típusú (WT) és különböző hőmérsékleten nevelt mutáns (RO, AD és ROAD) törzsekben.**

Lipid osztály	Hőmérséklet	Cianobakteriális törzsek, a lipid fajták kettős kötés indexei			
		WT	RO	AD	ROAD
MGDG	25	3,09	3,08	1,14	1,14
	<b>30</b>	<b>2,91</b>	<b>2,94</b>	<b>1,09</b>	<b>1,19</b>
	35	2,79	2,71	1,09	1,14
DGDG	25	2,99	3,05	1,15	1,15
	<b>30</b>	<b>2,76</b>	<b>2,99</b>	<b>1,11</b>	<b>1,18</b>
	35	2,73	2,76	1,11	1,16
SQDG	25	0,97	1,55	0,78	0,78
	<b>30</b>	<b>0,68</b>	<b>1,31</b>	<b>0,48</b>	<b>0,74</b>
	35	0,51	1,11	0,48	0,69
PG	25	2,06	2,06	1,00	1,00
	<b>30</b>	<b>1,78</b>	<b>1,71</b>	<b>0,95</b>	<b>1,00</b>
	35	1,75	1,72	0,95	1,00
Összes lipid	25	9,12	9,75	4,07	4,06
	<b>30</b>	<b>8,13</b>	<b>8,95</b>	<b>3,63</b>	<b>4,10</b>
	35	7,78	8,31	3,63	3,99

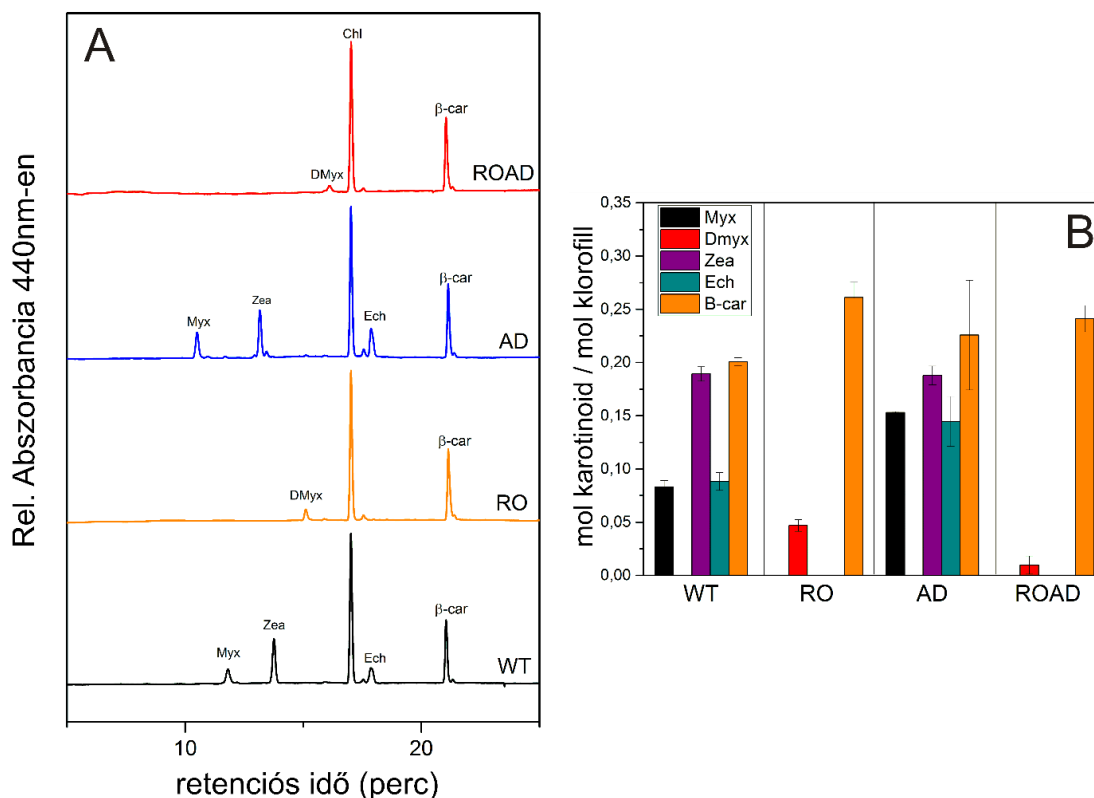
A kettős kötés indexeket az **Kísérleti anyagok és módszerek**-című fejezetben leírtak alapján számítottuk ki. A főbb különbségeket félkövér betűtípussal jelöltem.

Ahogy vártuk, a többszörösen telítetlen lipidhiány miatt az AD és az ROAD sejtek kettős kötés mutatói a WT értékeinek kevesebb, mint felére csökkentek. A WT-hoz képest az RO törzsből az összes kettős kötés indexeknek csak enyhe növekedése volt tapasztalható. Ez úgy tűnik, hogy az ebben a mutánsban lévő SQDG fajták rendkívül magas kettős kötés indexeinek értékeiből származik. Az AD és ROAD sejtek nem mutattak érzékelhető változást kettős kötés indexükben, amikor hőmérsékleti stresszhatásnak voltak kitéve. Ezzel szemben az RO-sejtekben ezen értékek további növekedése látható MA hőmérsékleten illetve kis mértékű csökkenés tapasztalható MM

hőmérsékleten. Az SQDG kettős kötési indexének közel kétszeresét észleltük a 25° C-on nevelt RO sejtek esetében (2. táblázat).

### 5.1.3. A WT és a mutáns törzsek karotinoid tartalma

A xantofill- és a többszörösen telítetlen lipidhiány következtében fellépő Car-összetétel változásainak kimutatására HPLC analízist alkalmaztunk. A 4.A ábrán a normál hőmérsékleten nevelt WT- és mutáns törzsekben azonosított fő Car-ok láthatók.



**4. ábra: A HPLC-vel analizált *Synechocystis* vad típusú (WT), RO, AD és ROAD sejtek Car-összetétele.** (A) A vizsgált törzsek azonosított pigmentjeit ábrázoló reprezentatív kromatogramok. Myx (mixoxantofill); Zea (zeaxantin); Dmyx (deoximixoxantofill); Chl (klorofill); Ech (echinenon); β-car (β-karotin). (B) A WT és a mutáns sejtek relatív Car-tartalma (mol Car / mol Chl). Az értékeket három független biológiai reprodukció átlag±SD adatai alkotják.

WT sejtekben a β-car, a Zea, az Ech és a Myx voltak a legelterjedtebb Car-ok, alátámasztva a korábbi eredményeket (Domonkos *et al.*, 2009, Kusama *et al.*, 2015, Tóth *et al.*, 2015). Az AD törzs hasonló Car összetételt mutatott a WT-sal. Az RO és az ROAD sejtek xantofill hiányosak. Ezekben a mutánsokban a β-car volt a domináns Car. A mutáció miatt hiányoznak a fő xantofillok, csak Dmyx, a Myx prekuzora volt jelen. A

**4.B ábra** a fő Car típusok arányait mutatja. Az összes mutánsban nőtt a  $\beta$ -kar tartalom a WT-hoz képest. A ROAD mutáns kevesebb Dmyx-et tartalmazott, mint az RO.

Érdekes módon az AD sejtekben a többszörösen telítetlen lipidek hiánya jelentősen megnövelte a Myx és Ech tartalmat. Ez magasabb xantofill /  $\beta$ -karotin arányt eredményezett az AD vonalban, összehasonlítva a WT-sal (**3. táblázat**). Ez az arány tovább nő a MA hőmérsékleti (25° C) stressz során. A MM hőmérséklet (35° C) nem változtatta meg jelentősen az AD sejtek Car arányait a WT-hoz képest.

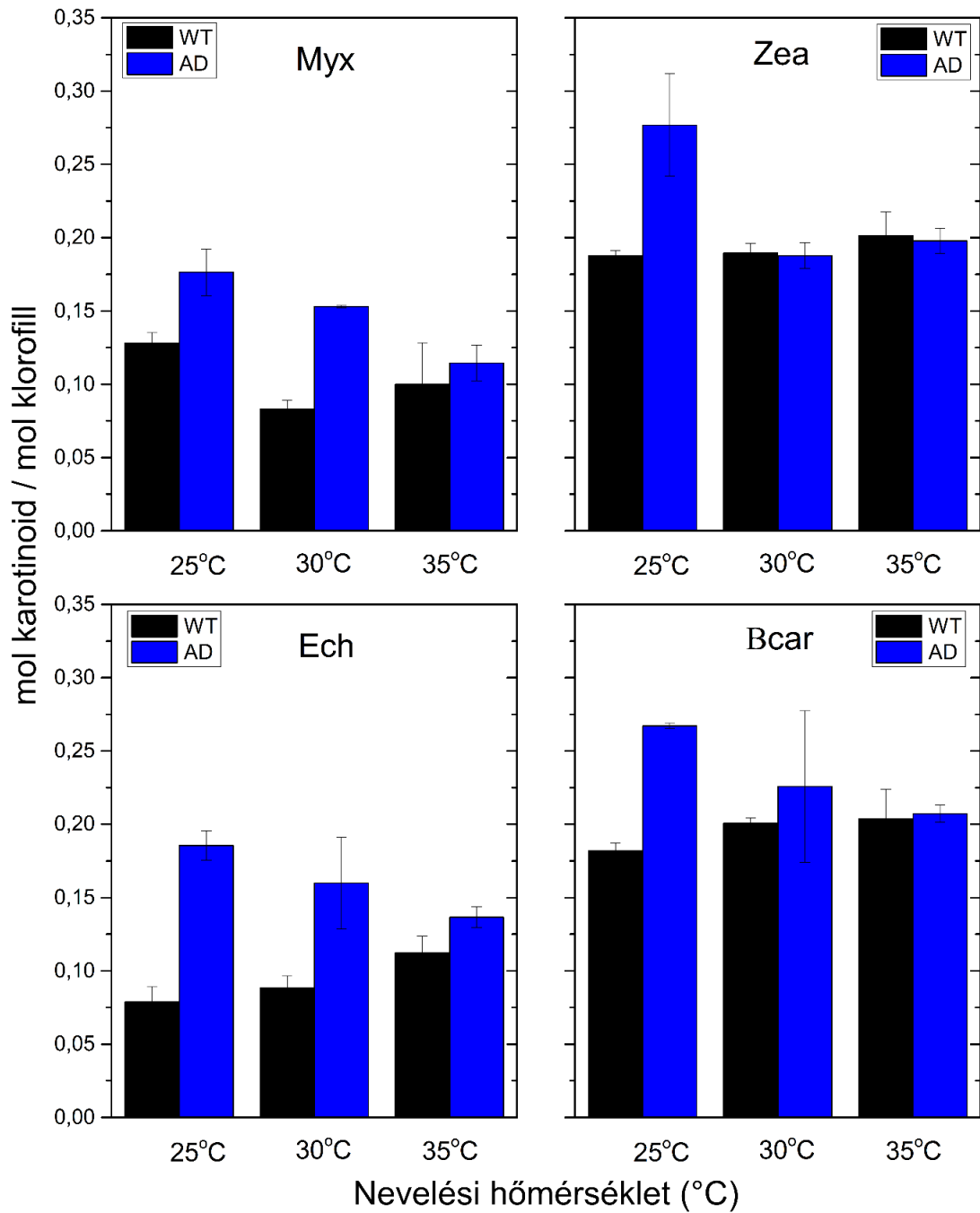
**3. táblázat: 25°C, 30°C és 35°C-on nevelt *Synechocystis* vad típusú (WT) és a többszörösen telítetlen lipid hiányos (AD) mutáns xantofill /  $\beta$ -karotin arányai.**

Hőmérséklet	Cianobaktérium törzs, Xantofill/ $\beta$ -karotin $\pm$ SD	
	WT $\pm$ SD	AD $\pm$ SD
25	2,24 $\pm$ 0,12	2,49 $\pm$ 0,06
30	1,8 $\pm$ 0,08	2,20 $\pm$ 0,36
35	1,91 $\pm$ 0,17	2,17 $\pm$ 0,13

Az SD értékek 3 független biológiai ismétlésből lettek kiszámítva.

Az optimális, MA és MM hőmérsékleten nevelt WT- és AD törzsek egyes Car tartalmait az **5. ábra** összegzi.



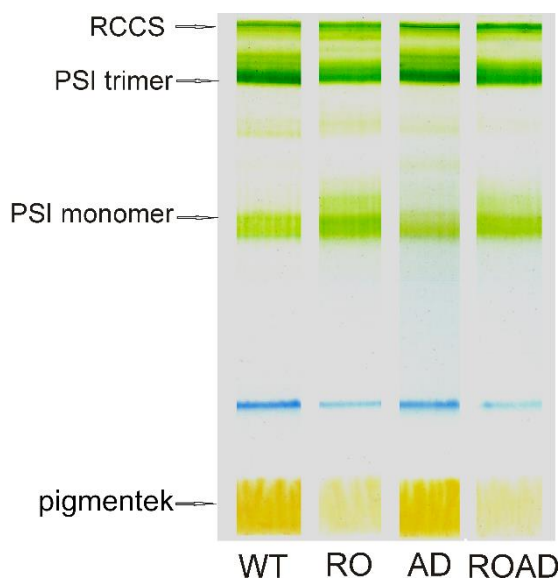


**5. ábra:** A 25°C-, 30°C- és 35°C-on nevelt *Synechocystis* vad típusú (WT) és AD sejtek egyéni Car-tartalmának változásai. Az értékeket három független biológiai reprodukció átlag±SD adatai alkotják.

A WT-hoz képest a Myx, a Zea, az Ech és a  $\beta$ -kar szintjeinek emelkedését figyeltük meg az a 25°C-on nevelt AD sejtekben. Ebben a törzsből a MM hőmérséklet csak kis mértékben növelte a Myx és Ech szintjeit a WT-hez viszonyítva (**5. ábra**).

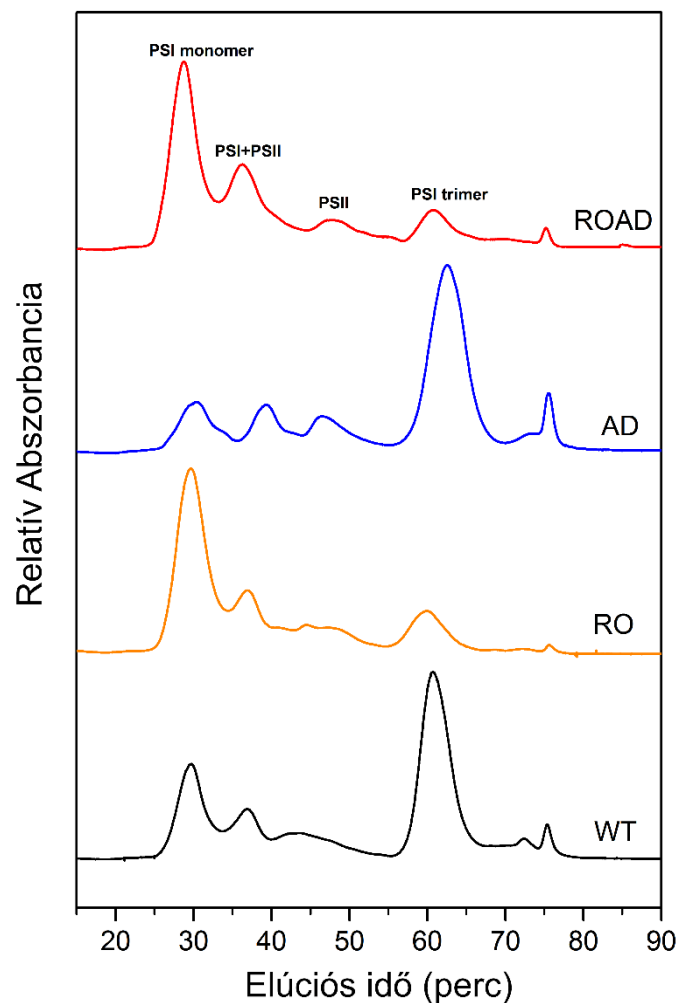
#### 5.1.4. Karotinoid és lipid hiány okozta strukturális változások a fotoszintetikus apparátusban

A WT-ban és mutáns törzsekben lévő PSI oligomer szintek összehasonlítása érdekében natív poliakrilamid gélelektroforézist (PAGE) végeztünk (**6. ábra**). Az RO és ROAD sejtekben a PSI trimerek mennyiségének csökkenését és a PSI monomerek mennyiségének növekedését figyeltük meg, míg az AD mutáns PSI trimer tartalma hasonló volt a WT-éhoz. A PSII-PSI szuperkomplexek (RCC-ok) szintje (Beckova *et al.*, 2017) nem változott a mutánsokban a WT-hoz képest.



**6. ábra:** 30°C-on nevelt *Synechocystis* vad típusú – (WT), RO, AD és ROAD sejtekből izolált fotoszintetikus komplexek natív gélje. A fő elválasztott komplexek a következők: RCCS (PSI trimer és PSII dimer szuperkomplexe), PSI trimer, PSI monomer.

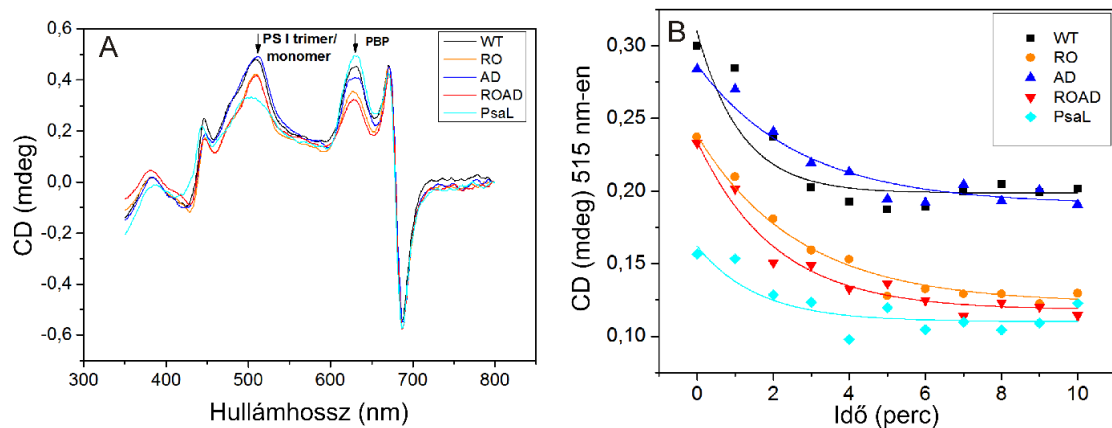
Azon megfigyelésünk megerősítésére, hogy xantofill hiányában a PSI-trimerek destabilizálódnak, a fő fotoszintetikus komplexet FPLC segítségével is analizáltuk. A **7. ábra** a WT és mutáns törzsek pigment-protein komplexeiből nyert FPLC kromatogramokat mutatja.



**7. ábra: A *Synechocystis* vad típusú (WT), RO, AD és ROAD FPLC által kimutatott fotoszintetikus komplexeinek oligomerjei.** A reprezentatív kromatogramok a fő elválasztott frakciókat mutatják, úgy mint: PSI monomerek, PSI + PSII (PSI és PSII komplexek keveréke), PSII és PSI trimerek.

A WT sejtek hasonló PSI trimer/monomer aránnyal rendelkeznek, mint azt már korábban leközltek (Klodawska *et al.*, 2015), viszont a xantofill mutánsokban a PSI trimerek és monomerek szintjeiben számottevő különbségekre lettem figyelmes, összehasonlítva ezek arányát a korábban natív PAGE által meghatározottakkal. Az RO és ROAD sejtek alacsonyabb PSI trimer/monomer arányt mutattak, szemben az AD sejtekkel, amik ugyanolyan vagy magasabb trimer/monomer aránnyal rendelkeznek, mint a WT. Úgy tűnik, hogy a PSI trimerek stabilitása függ a fotoszintetikus komplexek izolálásának módszereitől is. Ezért a PSI trimerek és monomerek arányát *in vivo* cirkuláris dikroizmus (CD) analízissel vizsgáltam tovább. A CD spektrumokat egész sejteken rögzítettem, így a PSI trimerek szintjét natív környezetükben, detergens kezelés

nélkül is meg tudtam határozni. A **8.A ábra** a WT- és AD sejtek, valamint az RO- és ROAD sejtek CD spektrumait mutatja. A PSI monomerek szintjének megjósolásához PSI trimermentes PsaL mutáns sejteket használtam kontrollként. Azt tapasztaltam, hogy a többszörösen telítetlen lipidhiány önmagában nem befolyásolja a PSI trimerek stabilitását. A xantofillok hiányában (RO és ROAD) azonban az 515nm-es csúcs jelentősen csökkent, ami kevesebb PSI trimer arányt jelent a monomerhez képest, mint a WT-ban. Ahogy azt már korábban le is közölték (Klodawska *et al.*, 2015), ez a különbség kisebb volt, mint amit a PsaL mutáns esetében tapasztaltam. A PSI komplexek hőstabilitására vonatkozó információk megszerzése érdekében hőkezelést végeztem 58°C-on, a **Kísérleti anyagok és módszerek**-című fejezetben leírtak alapján. A **8.B ábra** a PSI trimerek regresszív kinetikáját mutatja idő függvényében. Az RO és ROAD sejtekben található PSI trimerek instabilitása ezen az ábrán is megnyilvánul, viszont a WT és az AD PSI trimerek stabilabbnak bizonyultak az RO és az ROAD PSI trimereknél.



**8. ábra:** A 30°C-on nevelt *Synechocystis* vad típusú (WT), RO, AD és ROAD törzsek CD spektrumai (A) és az 58°C-os hőkezelés hatása az 515 nm-es csúcsra WT- és mutáns sejtekben (B).

## 5.2. PSI oligomerizáció meghatározása különböző cianobakteriális fajokban non-invazív módszerekkel

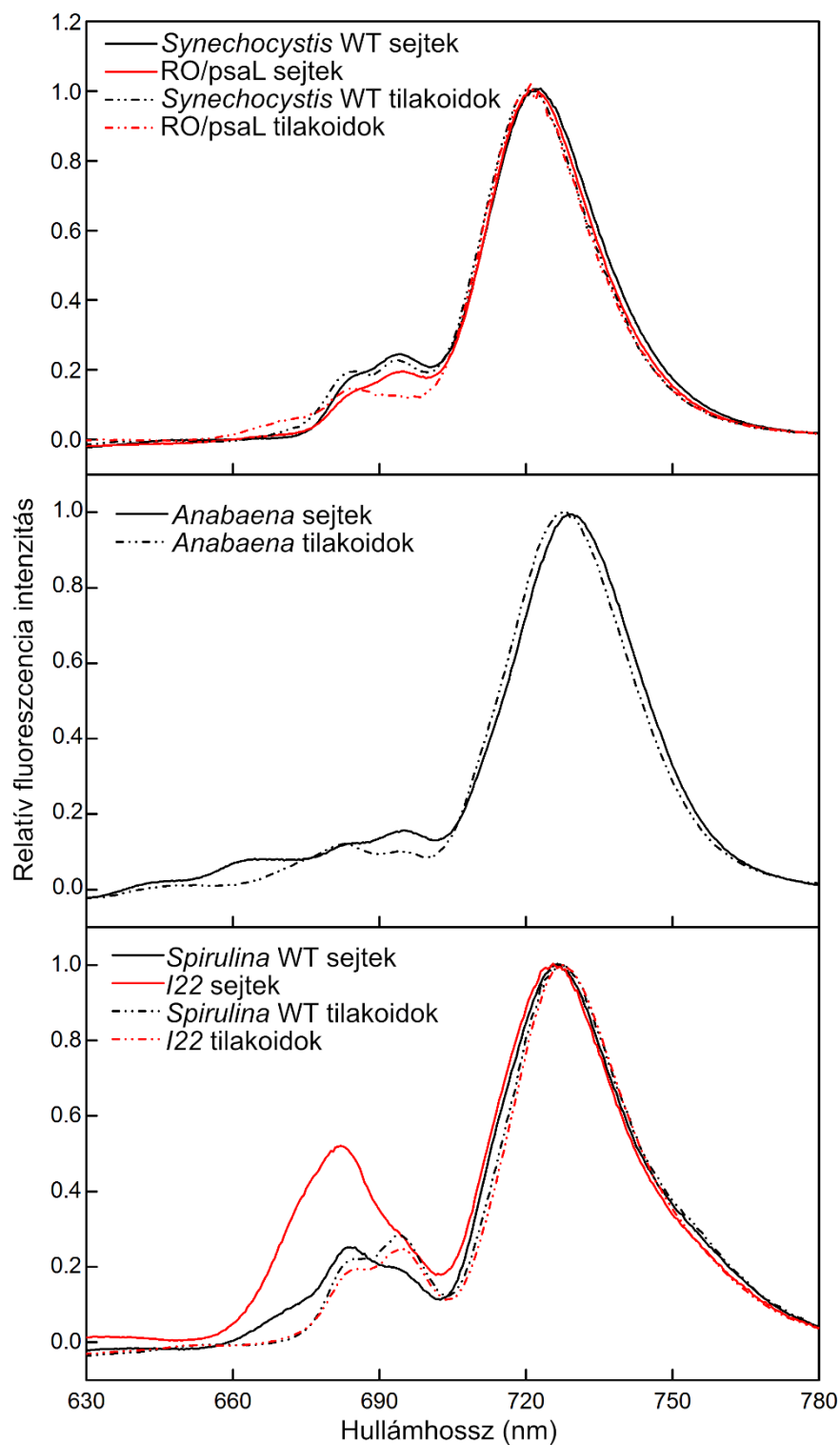
### 5.2.1. PSI oligomerizáció nyomonkövetése mélyhőmérsékletű fluoreszcencia emissziós spektroszkópiával

A PSI trimer *in vivo* szerveződését különböző cianobakteriális törzsekben, mint a *Synechocystis*, *Anabaena* és *Spirulina*, nagy hullámhosszú klorofill (NHK) tartalmuk alapján teszteltem. Ezen WT vonalakon kívül még a xantofill- és PSI trimer hiányos

(PsaL fehérje mentes) *Synechocystis* mutánst és a  $\gamma$ -linolénsav mentes *Spirulina platensis* (I22) mutánst is megvizsgáltam.

A PSI trimerek szerveződését *in vivo* spektroszkópiás módszerrel vizsgáltam élő sejtekben és izolált TM-okban. Annak ellenére, hogy a NHK csak kis mennyiségben járul hozzá a teljes fényelnyeléshez, a fluoreszcencia tulajdonságaira gyakorolt hatásuk a PSI trimer vizsgálata közben nem elhanyagolható, tekintve, hogy a pigment-pigment kölcsönhatások miatt nagyobb mennyiségben vannak jelen a trimerekben, mint a monomerekben. A NHK-k tartalma és a PSI trimerekben/monomerekben betöltött spektrális jellemzői fajspecifikusak. A különböző cianobaktériumok PSI antennája 5-10%-os NHK-t tartalmaz a 710-750 nm-es elnyelési tartományban (Karapetyan *et al.*, 1999).

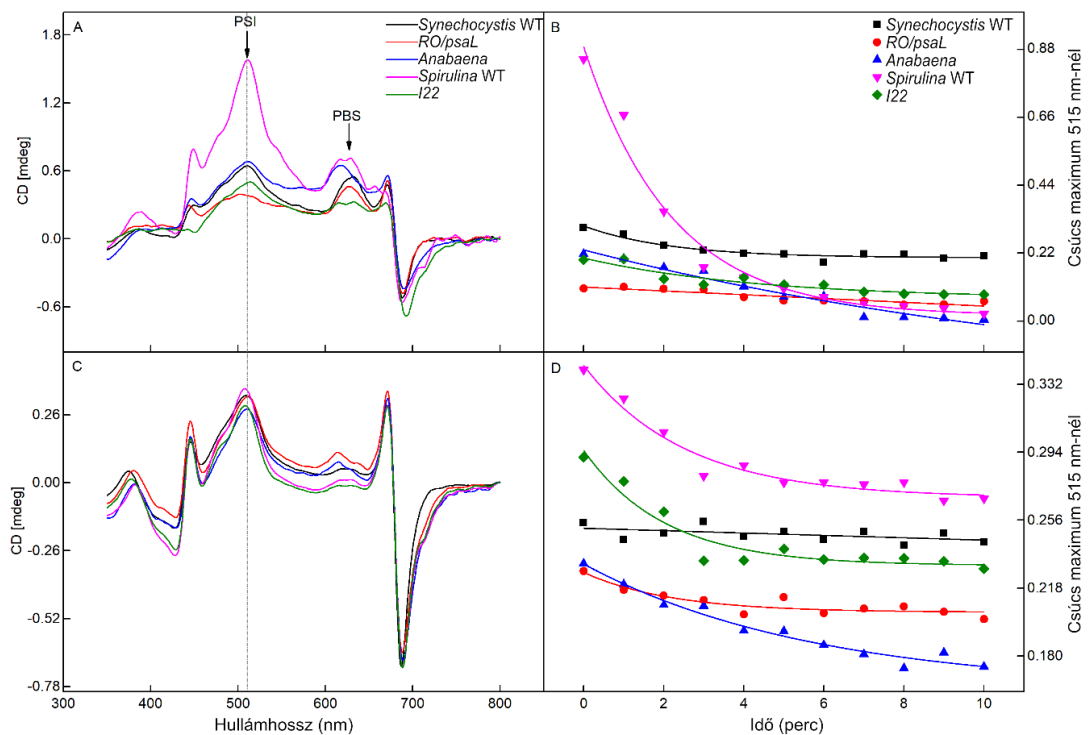
A RO/psaL kimutatható csökkenést mutatott a NHK-k mennyiségében a *Synechocystis* WT-hoz képest (**9. ábra**), míg a WT és a RO/psaL mutáns izolált tilakoidjaiban a NHK-k mennyisége csaknem azonos volt. A *Spirulina* I22-es mutánsban a NHK-k mennyisége csak elhanyagolható mennyiségben csökkent a *Spirulina* WT-hoz képest. Fontos megemlítenem, hogy a *Synechocystis* és *Anabaena* törzsek izolált tilakoidjainak NHK tartalma nagy mértékben csökkent a *Spirulina* törzsekhez képest. Mindhárom faj izolált TM-jai egyértelmű Chl/PSI csúcs eltolódást és különböző, PSI-hez tartozó fluoreszcencia tulajdonságokat mutatott.



**9. ábra:** A *Synechocystis* vad típusú (WT), RO/psaL, *Anabaena*, *Spirulina* WT és I22 mutáns sejtek és izolált tilakoidjaik mélyhőmérsékletű fluoreszcencia emissziós spektrumai.

### 5.2.2. PSI oligomerizáció nyomonkövetése CD spektroszkópia segítségével

Kíváncsi voltam a PSI szerkezetének eltéréseire különböző cianobakteriális törzsekben. A PSI tetramerek, trimerek és monomerek arányát intakt sejtekben *in vivo* CD spektroszkópiával vizsgáltam meg. Korábban már megfigyelték, hogy a PSI trimernek tipikus “ujjlenyomata” van CD spektrumon, amely a komplexen belüli specifikus pigment-fehérje kölcsönhatásokon alapul (Klodawska *et al.*, 2015). A CD spektrumokat mind a teljes, mind az izolált tilakoidok szintjén rögzítettem. A PSI oligomereket natív környezetükben, detergens kezelés nélkül határoztam meg. A PSI-hez tartozó CD spektrum csúcs maximális szintje 515 nm körül található, ezt Chl abszorpcióval normalizáltam 680 nm-en. A **10.A ábra** a *Synechocystis* WT, RO/psaL, *Anabaena*, *Spirulina* WT és I22 sejtek CD spektrumát mutatja 30°C-on.



**10. ábra:** A *Synechocystis* WT, RO/psaL, *Anabaena*, *Spirulina* WT, I22 sejtek (A) és izolált tilakoidjaik (C) CD spektroszkópiai analízise. 58°C-(B) és 50°C-os (D) kezelések hatása az említett cianobakteriális sejtek és TM-ok 515nm-es sávjaira. A fő csúcsok (nyilakkal jelöltek): PSI trimer/monomer és Fikobiliszóma (PBS) csúcs.

Minden mintát egyenlő Chl tartalom szerint készítettem el. A PSI monomerek mennyiségének előrejelzésére a xantofill és PSI trimer mentes RO/psaL mutáns sejteket használtam. Azt tapasztaltam, hogy a *Spirulina* WT sejtjeinek volt a legmagasabb 515

nm-en mért CD intenzitása, összehasonlítva a többi vizsgált cianobakteriális törzsszel. Azt feltételezem, hogy a *Spirulina* WT PSI szerkezete hatékonyabban stabilizálódik és többnyire trimerként van jelen, illetve, a fonalas cianobaktérium spirális formájának köszönhetően egyfajta multi-oligomerizációs jelként detektálódik a CD spektrumon. A  $\gamma$ -linolénsav hiányos *Spirulina* I22 törzs PSI oligomerizációs szintje a RO/psaL szintjéhez volt hasonló. Az *Anabaena* törzs PSI RC-i dimereként és tetramerként is szerveződhetnek (Watanabe *et al.*, 2014). Ezek a különbségek a CD spektrumon is megnyilvánulnak, mint emelkedet PSI csúcs a *Synechocystis* WT-hoz képest.

A PSI hőstabilitásának nyomonkövetéséhez az intakt sejteket 58°C-on hőkezelttem. Az izolált tilakoidok hőkezelését 50°C-on végeztem, mivel ezek sokkal érzékenyebbek a magas hőmérsékletre, mint az egész sejtek. Két féle alapvonalat alkalmaztam, annak megfelelően, hogy melyik törzs, milyen tápoldatban lett felnevelve: BG-11 médiumot használtam *Synechocystis* WT, RO/psaL és *Anabaena* esetében, illetve SOT-médiumot használtam *Spirulina* WT és I22 mutánsa esetében. A tilakoidokat részben azért is vizsgáltam meg, hogy elkerüljem a PBS szétesés során keletkező spektrális zajokat, illetve hogy minden vizsgált mintához egyféle oldatot (tilakoid izolációs puffert) használhassak alapvonalként. Így könnyebb volt összehasonlítani a minták spektrumait.

Az izolált tilakoid spektrumaiban elhanyagolható különbségeket figyeltem meg (**10.C ábra**), minden csúcs, a csak monomereket tartalmazó RO/psaL szintjére csökkent. A *Spirulina* WT-ből izolált tilakoidok spektruma rendelkezett a legnagyobb 515nm-en mért amplitúdóval. Az összes vizsgált törzs közül az *Anabaena* izolált tilakoidjainak volt a legalacsonyabb amplitúdója 515 nm-en.

Az **10.B és D ábra** a PSI trimer/monomer csúcsmaximumának regressziós kinetikáját mutatja hőmérséklet és inkubációs idő függvényében. A leginstabilabbnak az *Anabaena*-ban és a *Spirulina* I22 mutánsban található PSI oligomerek bizonyultak. A hőkezelés hatására bekövetkezett legjelentősebb változásokat a *Spirulina* WT sejtei és az azokból izolált tilakoidok mutatták. A GLS-mentes, I22-es mutáns izolált tilakoidjai mutatták a második, magas hőmérsékletre adott legérzékenyebb választ. Az *Anabaena* sejteinek és izolált tilakoidjainak 515nm-nél mért értékeit a 10. percben találtam a legalacsonyabbnak a többi törzshöz viszonyítva.



## 6. Az eredmények megvitatása

A Car-ok védő funkcióit és a lipid telítetlenség jelentőségét a fotoszintézisben már alaposan tanulmányozták, ezen tényezők kooperatív hatásait azonban még nem tisztázták. Munkám során megvizsgáltam a lipidek, Car-ok és a fotoszintetikus apparátus fehérjei közti együttműködést. Készítettünk egy mutánst, a *Synechocystis* ROAD-t, amely xantofill és többszörösen telítetlen lipid hiányos. Ezt a törzset a *Synechocystis* sejtekben lejátszódó, biokémiai és fiziológiai folyamatokban részt vevő xantofilok és többszörösen telítetlen lipidek kombinált hatásának tanulmányozására használtam fel. Vizsgálataim során az RO (csak xantofill hiányos) és AD (csak többszörösen telítetlen lipid hiányos) mutáns törzsek referenciaként szolgáltak, segítve az említett komplex kooperatív hatások értelmezését.

### 6.1.1. A xantofilok és a többszörösen telítetlen lipidek meghatározzák a sejt- és membránstruktúrákat

A xantofill és a többszörösen telítetlen lipidek hiánya sejtnövekedést és kisebb változást eredményezett a sejt belsejében lévő membránszerkezetekben (**1. ábra**). Érdekes módon a celluláris burokmembránok felületi rétegei, az S-rétegek (Smarda *et al.*, 2002) hiányoznak a xantofill hiányos RO és ROAD mutánsokban (**1.A ábra**). A *Synechocystis* S-rétegbeli fehérjét egy hemolizin-szerű fehérjeként azonosították, amelyet az sll1951 gén kódol (Sakiyama *et al.*, 2006, Trautner és Vermaas, 2013).

Ez egy 158 kD-os glikoprotein, mely önszerveződésre képes hatszögletű p6-os szimmetriával rendelkező rácyszerkezet formájában a sejt körül, a külső membrán poliszacharidjaival van összekötve (Smarda *et al.*, 2002). Az S-réteg fehérjéinek szintézisét és összeszerelődését, valamint a külső membránba történő szekréciónak és kihorgonyzását még nem vizsgálták. Korábban Mohamed és munkatársai leírták az S-réteg hiányát egy  $\zeta$ -karotin-deszaturáz-inaktivált, ezért Car mentes *Synechocystis* mutánsban (Mohamed *et al.*, 2005). Az a tény, hogy a RO és ROAD mutánsok szintén S-réteg mentesek, azt az elképzelést támasztják alá, hogy a xantofilok képesek lehetnek megfelelő környezetet biztosítani az S-réteg fehérjéinek lipopoliszacharidokhoz való rögzítéséhez a külső membránban. Ezek a morfológiai eredmények arra engednek következtetni, hogy mind a többszörösen telítetlen lipidek, mind a xantofilok meghatározó szerepet játszhatnak a sejt- és membránstruktúrákban, valamint a membránba ágyazott fehérjék funkcióinak biztosításában.

### 6.1.2. A xantofill- és a többszörösen telítetlen lipid hiány lipid átformálódást indukál

A teljes lipidkivonatok MS-vizsgálata kimutatta, hogy az MGDG a legelterjedtebb lipid a *Synechocystis* WT-ban és az összes vizsgált mutánsban egyaránt. Ezt követi második leggyakoribb lipidként a DGDG, majd két anionos lipid, az SQDG és PG. Meglepő módon az összes mutáns relatív MGDG-tartalma 10%-kal csökkent a WT értékéhez képest. Az MGDG-nek az RO- és ROAD mutánsban bekövetkező csökkenését az egyéb lipidosztályok arányainak növekedése ellensúlyozta. Az RO mutáns MGDG szint csökkenését a DGDG szint növelésével ellensúlyozta, míg az AD és az ROAD esetében nem csak a DGDG, hanem az SQDG és a PG-tartalom is lényegesen megemelkedett az MGDG veszteségének kompenzálására (**2. ábra**). A lipidosztály-eloszlásban bekövetkező változások azt sugallják, hogy a TM-ok, válaszul a xantofillok és / vagy többszörösen telítetlen lipidek hiányára, különbözőképpen formálódnak újra. Az optimális növekedési hőmérsékleten megfigyelt újraformálódás mellett (**2.B ábra**) a lipidosztályok további finomhangolása MA és MM hőmérsékleten (**2.A és C ábra**) történik. Úgy tűnik, hogy ezen körülmények, különösen az MA hőmérséklet, az PG és az SQDG szintjének emelkedését eredményezték, amely többszörösen telítetlen lipidek hiányában döntő szerepet játszhat.

Az MGDG a tilakoid egyetlen NKK-lipidje, ezért az átformálódás jelentős változást eredményezett az NKK/KK lipid arányokban (**1. táblázat**). Az ROAD sejtekben az NKK/KK lipid arány körülbelül 60%-ra csökkent a WT-hoz képest. Hasonló NKK/KK lipid arányokat lehetett megfigyelni, ha csak a xantofillok vagy a többszörösen telítetlen lipidek hiányoztak. Az AD mutáns (WT-hez képest hasonló hőmérsékleten) a NKK-lipidjeinek 20-25%-os csökkenésével alkalmazkodik az MA hőmérséklethez. Ezzel párhuzamosan a KK lipidek szintje észrevehetően nőtt az NKK fajok elvesztésének ellensúlyozása érdekében. Az ilyen kompenzációs szabályozó mechanizmusok biztosítják a TM-ok környezeti stressz körülményekre való alkalmazkodását. A többszörösen telítetlen lipid- és xantofill hiányos mutánsokban a KK lipidek biztosítják a membránszerkezet védelmét és stabilitását, amelyek a fotoszintetikus funkciók fenntartásához és stressz-rezisztenciájához szükségesek. Az NKK/KK arány módosítása a sejtek létfontosságú adaptív válaszreakciója. Eredményeink megegyeznek a korábbi

megfigyelésekkel, miszerint az NKK/KK arányok a membránfunktionalitás meghatározó elemei (Israelachvili *et al.*, 1980).

Az átformálódás nemcsak a lipidosztályok szintjén történt, hanem a lipidfajták arányainak és telítési szintjének finomhangolásával is (**3. ábra**). A többszörösen telítetlen, hosszú szénláncú MGDG és DGDG fajták a xantofillok hiányában különleges szerepet játszanak. Magas arányban jelentek meg ritka zsírsav tartalmú fajták xantofillok és többszörösen telítetlen lipidek hiányában. Ezek az MGDG és DGDG 36:2 fajták valószínűleg stressz-lipidként hatnak.

Meglepő módon az összes lipid teljes telítettségi szintje nem módosul jelentősen xantofillok hiányában, nem úgy, mint a többszörösen telítetlen lipid hiányos mutánsoknál, melyekben a teljes telítettségi szint a WT 65%-a (Zakar *et al.*, 2017). A különböző lipidosztályokban a telítettségi szintek összehasonlítása közben lényeges különbségeket véltünk felfedezni a xantofill és a többszörösen telítetlen lipid mutánsok közötti lipidtartalom újraformálódási módjaiban. WT sejtekben az SQDG és a PG telítetlenségi szintje az MGDG és a DGDG értékeivel összehasonlítva mintegy 80%-kal és 40%-kal csökkent (Murata *et al.*, 1992, Plohnke *et al.*, 2015). Ezzel szemben az RO mutánsban az SQDG telítetlenségi szintje körülbelül kétszerese a WT szintjének, amíg az AD mutáns PG telítetlenségi szintje változatlan maradt. Stresszhatások esetén PG és SQDG fajták emelkedett telítetlenségi szintje döntő fontosságúnak bizonyul a sejtek túlélése szempontjából.

Az alacsony hőmérséklet a glicerolipidek telítési szintjére gyakorolt hatását eddig intenzíven tanulmányozták, úgy cianobaktériumokban, mint növényekben. Az MA és MM hőmérsékleten nevelt sejtek vizsgálatával létrejött eredményeink alátámasztják (Zakar *et al.*, 2017) azt a tényt, hogy nem csak szélsőséges, hanem kismértékű nevelési hőmérsékletbeli változások is képesek indukálni a lipid-tartalom átrendeződését, különösen az SQDG és a PG esetében. Az átformálódás a TM-okat rendkívül rugalmassá és a stressz-körülményekhez alkalmazkodóvá alakítja. A lipid átformálódás eredményei azt mutatják, hogy a lipidek és a Car-ok együttműködhetnek ebben a folyamatban.

### **6.1.3 A xantofill- és többszörösen telítetlen lipid hiány karotinoid összetétel változásokat okoz a membránban**

A sejtek képesek kompenzálni a reaktív oxigén származékoktól védő xantofillok hiányát a  $\beta$ -karotin szintjének növelésével (Kusama *et al.*, 2015). Többszörösen telítetlen lipidek hiányában az adaptív válasz során nemcsak a  $\beta$ -karotin, hanem a xantofillok is

újraszerveződtek (**4. ábra**). Nyilvánvaló, hogy többszörösen telítetlen lipidek hiányában a sejtek még az optimális nevelési hőmérsékleten is érzékenyekké válnak, emiatt növelték a Myx és Ech tartalmukat.

Hőstressznek való kitétel során a MA hőmérséklet erősebb hatást gyakorol a Car tartalom átrendeződésére, mint a MM hőmérséklet. Az többszörösen telítetlen lipid hiányos mutánsnál az MA hőmérséklet nemcsak a Myx és Ech tartalom növekedését okozta, hanem a Zea felhalmozódását is (**5. ábra**). Eredményeink által bizonyítást nyert, hogy mind a lipidekre, mind a Car-okra együttesen van szükség a TM-ban.

#### **6.1.4. Az egyszeresen telítetlen zsírsavak és a xantofillok stabilizálják a PSI-trimereket**

A xantofillok hiánya a PSI trimerek disszociációját eredményezte, melyet natív PAGE és FPLC analízis használatával mutattunk ki (**6. és 7. ábra**). A PSI oligomerek destabilizációját az RO mutánsban mások fluoreszcens módszerekkel (Tóth *et al.*, 2015) vizsgálták. A különböző fehérje-pigment komplexek azonosításához használt FPLC analízis és natív elektroforézis olyan *in vitro* technikák, amelyek detergens kezelést igényelnek. A fotoszintetikus komplexek aggregációjának *in vivo* tanulmányozásához CD spektroszkópiát használtam (**8. ábra**). A Car-indukált CD-jel lehetővé teszi a PSI monomer és trimer formáinak megkülönböztetését. Ezzel a módszerrel olyan trimer/monomer arányt kaptam, amely az *in vitro* módszereknél kapott eredményekhez hasonlónak bizonyult. Eredményeim azt sugallják, hogy a fotoszintetikus reakcióközpontok összeszereléséhez optimális környezetet biztosítanak a xantofillok. Meglepő módon az AD mutánsban minden módszer (FPLC, natív PAGE és CD spektroszkópia) emelkedett PSI trimer tartalmat mutatott. Az AD mutáció növelheti a sejtek fény- és MA hőmérséklet érzékenységét, ennél fogva a trimerikus PSI előnyösebbnek bizonyul ilyen stresszkörülmények között. Korábban már kimutatták, hogy a lipidek közül a PG-nek szerepe van a PSI oligomerek kialakulásában (Domonkos *et al.*, 2004). A többszörösen telítetlen lipidek hiányában jelenkező trimerikus PSI felhalmozódás az egyszeresen- és többszörösen telítetlen lipidek térbeli követelményei közötti különbséggel magyarázható. A telített és egyszeresen telítetlen lipidek zsírsavláncai egyenesebbek és szorosabbak, mint a többszörösen telítetleneké, ezek zsírsavlánca ugyanis nagyobb térigénnyel rendelkezik. Az ROAD esetében a PSI monomer szintjének emelkedését észleltem, az RO törzshöz viszonyítva. Ez a lipidek és

a Car-ok együttes szerepét sugallja a PSI trimerek stabilizálásában, amelyben a xantofilok jelentősebb hatást fejtenek ki a többszörösen telítetlen lipidekhez képest.

### **6.2.1. A mélyhőmérsékletű fluoreszcencia emissziós spektroszkópia kiváló módszer a PSI és PSII tanulmányozásához**

Ez a technika azonban alig észrevehető különbségeket mutatott a fluoreszcencia emissziós spektrumokban és számomra nem szolgáltatott elegendő információt a sejtek PSI szerkezeteiben végbemenő változásokról, valamint a trimerek és monomerek szintjéről (**9. ábra**) (Zakar *et al.*, 2018).

### **6.2.2. A CD spektroszkópia kézenfekvő non-invazív módszer a különböző cianobakteriális törzsek PSI oligomerizációjának nyomonkövetésére**

A többszörösen telítetlen lipidek hiánya a *Spirulina*  $\gamma$ -linolénsav mentes I22-es mutánsában PSI monomerizációt eredményezett. Az I22 egyenes fonál alakja szintén befolyásolhatta a PSI trimer/monomer CD csúcs maximumát. A *Spirulina* WT PSI RC-ai lényegesen stabilabbak a többi vizsgált törzshöz képest. Ezzel szemben az *Anabaena* PSI stabilitása minden vizsgált törzs közül a leggyengébb (**10. ábra**). Hőkezelés hatására az *Anabaena* törzs dimerjei és tetramerjei esnek szét a leggyorsabban (Zakar *et al.*, 2018).

## 7. Összefoglalás

I. A xantofill és a többszörösen telítetlen lipidek hiánya sejtnövekedést eredményezett az RO, AD és ROAD sejteknél. Meglepő módon a celluláris burokmembránok felületi rétegei, az S-rétegek hiányoznak a xantofill hiányos RO és ROAD mutánsokban. Ezek a morfológiai eredmények arra engednek következtetni, hogy mind a többszörösen telítetlen lipidek, mind a xantofillok meghatározó szerepet játszhatalnak a sejt- és membránstruktúrák felépítésében, valamint a membránba ágyazott fehérjék funkcióinak biztosításában.

II. Kimutattuk, hogy a xantofill- és a többszörösen telítetlen lipidhiány a lipidek átformálódását indukálja. A lipid átformálódás következtében a NKK-KK lipid arányok lényegesen módosulnak a membránokban. A xantofillok eltávolítása elsősorban a DGDG szintjén fokozódik, míg a többszörösen telítetlen lipid hiány jelentős PG- és SQDG felhalmozódást eredményez. A KK lipidek nélkülözhetetlenek a kiegyensúlyozatlan és védtelen membránok stabilizálásában (Zakar *et al.*, 2017).

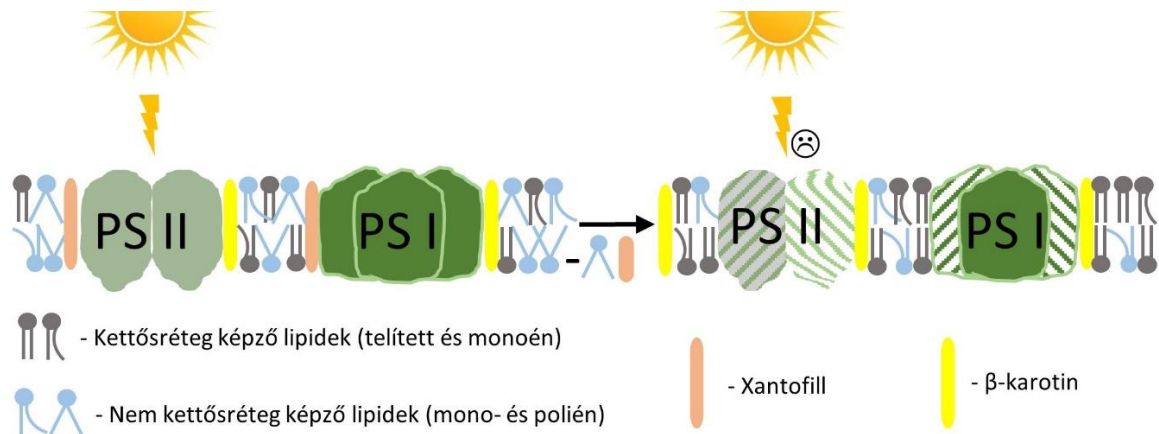
III. A többszörösen telítetlen lipidek eltávolítása a xantofill tartalom átszerveződését eredményezte, növelve a xantofill-t a  $\beta$ -karotin aránnyal szemben. Kimutattuk, hogy a lipidek és a Car-ok együttműködnek a membránszerkezetek fenntartásában és védelmében (Zakar *et al.*, 2017).

IV. Egy nem invazív, *in vivo* biofizikai módszer (CD) alkalmazásával kimutattam, hogy mind a telítetlen zsírsavak, mind a xantofillok hiánya destabilizálja a PSI trimereket. A xantofillok hiánya ebben az esetben sokkal hangsúlyosabb volt. A fotoszintetikus komplexek xantofilljainak pontos helyzete továbbra is ismeretlen a tudomány számára, ezért a jövőben érdemes lesz ezt a területet kutatni (Zakar *et al.*, 2017).

IV. A CD spektroszkópia segítségével számos cianobakteriális törzsre jellemző PSI strukturális változást nyomon tudtam követni. Az 515 nm-es, PSI trimer/monomer arányt jelző érték a *Spirulina* WT esetében volt a legmagasabb, azonban, a tetramereket és dimereket tartalmazó *Anabaena* sejtek nem mutattak jelentős változást a *Synechocystis* WT-hoz képest. Lehetséges, hogy az *Anabaena*-ban a tetramer/dimer arány a dimer irányában van eltolódva. Egy többszörösen telítetlen lipid, a  $\gamma$ -linolénsav hiánya PSI monomerizációt és a spirális forma hiányát okozta a *Spirulina* I22 mutánsnál. Mind a mélyhőmérsékletű fluoreszcencia emissziós spektroszkópia, mind a CD spektroszkópia

ajánlott módszerek a fotoszintetikus komplexekben végbemenő változások nyomon követése érdekében (Zakar *et al.*, 2018).

Összességében az eredmények azt mutatják, hogy mind a telítetlen lipidek, mind a xantofillok együttesen szükségesek a hatékony stresszvédelem strukturális és élettani alapjainak biztosításához.



**Grafikus összefoglaló az II-III pontokhoz: *Synechocystis* vad típusú (WT) és ROAD (xantofill és többszörösen telítetlen lipid hiányos) mutáns sejtekben található TM-szerkezetek vázlatos ábrája (Zakar *et al.*, 2017). A xantofillok és a többszörösen telítetlen lipidek hiányának következtében a PSI trimerek és a PSII dimerek destabilizálódnak és a fotoszintetikus komplexek stressz tűrőképessége csökken.**

## 8. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Dr.Vass Imrének azt,hogy lehetővé tette, hogy a Növényi Lipid Funkció és Szerkezet Csoportban folytathassam a doktori kutatásaimat.

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Dr. Gombos Zoltánnak, hogy lehetőséget adott és folyamatos támogatást nyújtott, hogy kutatócsoportjában dolgozhassak, tanulhassak és szakmai tapasztalatot szerezhsek. Külön köszönöm, hogy támogatta tudományos konferenciákon való részvételemet, melyeken értékes tapasztalatokat szerezhettem.

Hálás vagyok Dr. Laczkó-Dobos Hajnalka és Herman Éva munkatársaimnak szakmai téren nyújtott segítségükért. Köszönöm nekik, hogy számtalan gyakorlati és elméleti, technikai és szakmai ismeretre tehettem szert a közösen elvégzett kísérletek során.

Köszönettel tartozom a kutatócsoportunk minden tagjának. Köszönet Dr. Domonkos Ildikónak, Dr. Kis Mihálynak, Dr. Ughy Bettinának, Dr. Sindhuja Vajravelnek, Kóbori Ottíliának, Lénárt Zsófiának és Kovács Teréziának segítségükért, kedvességükért. Külön köszönet illeti hajdani és jelenlegi laboránsainkat Kunné Sallai Annát és Kiri Istvánt Ildikót.

Hálával tartozom a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Növénybiológiai Intézetének munkatársainak.

Szeretném kifejezni hálámat családomnak, Zakar Máriának, Zakar Vincének és ifj. Zakar Vincének. Szeretném megköszönni párom, Farkas B. Angelina lelki támogatását, tanácsait és a kézirat megírásában és átolvasásában nyújtott segítségét.

Köszönetemet szeretném kifejezni „szegedi” barátaimnak: Németh Editnek, Bakacsy Lászlónak, Bernula Péternek, a Fotszintetikus membrán csoport tagjainak, valamint Kaltenecker Péternek, Kazár Ádámnak és a felvidéki barátaimnak is, hogy mellettem álltak a PhD-s évek megpróbáltatásai alatt.

A dolgozat elkészítéséhez anyagi támogatást nyújtottak a GINOP-2.3.2-15-2016-00001, a PD108551 és a K108411 OTKA pályázatok.



## 9. Közlemények

### A disszertáció alapjául szolgáló közlemények:

**Zakar T**, Herman E, Vajravel S, *et al.* Lipid and carotenoid cooperation-driven adaptation to light and temperature stress in *Synechocystis* sp. PCC6803. *Biochimica et biophysica acta*. 2017;1858(5):337-350. doi:10.1016/j.bbabi.2017.02.002. **IF:4.280**

**Zakar T**, Kovács L, Vajravel S, *et al.* Determination of PSI oligomerisation in various cyanobacterial strains and mutants by non-invasive methods. *Photosynthetica*. 2018; 56. 10.1007/s11099-018-0795-7. **IF: 1.740**

### Egyéb közlemények:

Kóbori T O, Uzumaki T, Kis M, Kovács L, Domonkos I, Itoh S, Krynická V, Kuppusamy S GK, **Zakar T**, Dean J, Szilák L, Komenda J, Gombos Z, Ughy B. Phosphatidylglycerol is implicated in divisome formation and metabolic processes of cyanobacteria. *Journal of Plant Physiology*. 2018; Volume 223.Pages 96-104.ISSN 0176-1617. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.02.008>. **IF:2.833**

Petrova N, Todinova S, Laczko-Dobos H, **Zakar T**, Vajravel S, Taneva S *et al.* Structural integrity of *Synechocystis* sp. PCC 6803 phycobilisomes evaluated by means of differential scanning calorimetry. *Photosynthesis Research*. 2018 Jan 10;1-10. DOI: 10.1007/s11120-018-0481-4 **IF:3.091**

**Review: Zakar T**, Laczko-Dobos H, Toth TN, Gombos Z. Carotenoids Assist in Cyanobacterial Photosystem II Assembly and Function. *Frontiers in Plant Science*. 2016;7:295. doi:10.3389/fpls.2016.00295. **IF:3.678**

## 10.1. A Ph.D. értekezés összefoglalója

A lipidek, mint a fotoszintetikus membránok fontos elemei, kulcsszerepet játszanak a dinamikus kettősréteg kialakításában (Nevo *et al.*, 2010). Cianobaktériumokban a domináns membránstruktúra az ún. tilakoid, melynek lipid összetétele nagy mértékben hasonlít a teljes sejt membránjához (Sakurai *et al.*, 2006). A tilakoidok a cianobaktériumok és a növények fotoszintézisének színterei, melyek lipid összetétele egyedülálló és nagy mértékben konzerválódott (Demé *et al.*, 2014, van Eerden *et al.*, 2015). Főleg galaktolipideket, úgy, mint MGDG-t és DGDG-t, valamint szulfolipidként SQDG-t és foszfolipidként, PG-t tartalmaznak. Cianobaktériumokban az MGDG bioszintetikus prekursora az MGlkDG is jelen van (Sato, 2015), melyet egy epimeráz enzim alakít át MGDG-né (Awai *et al.*, 2014).

A különböző lipidosztályok fizikai tulajdonságait a fejcsoport szerkezete határozza meg. Az MGDG és a DGDG a MGlkDG-nel együtt semleges fejcsoporttal rendelkezik, míg az SQDG és az PG anionos, negatív töltést hordozó lipidek (van Eerden *et al.*, 2015). Az MGDG, a tilakoidokban leggyakrabban előforduló galaktolipid és az MGlkDG mind tipikusan nem kettősréteg képző (NKK) lipidek. Kúp-szerű alakkal, kis fejcsoporttal és hosszú, többszörösen telítetlen zsírsavlánccal rendelkeznek, amelyek vizes közegben képesek az inverz hexagonális fázis, azaz ún. hexagonális II-es fázis létrehozására (Shipley *et al.*, 1973). A többi lipidosztály (DGDG, SQDG és PG) tipikus lamelláris kettősréteg-képző (KK) lipid, nagyobb fejcsoporttal és henger alakkal (Jouhet, 2013). Az NKK-KK lipidek aránya döntő fontosságú a funkcionális membránok esetében (Israelachvili *et al.*, 1980). Az MGDG/DGDG arány szabályozás hatására a TM-ok dinamikussá és rugalmassá válnak. Ennek köszönhetően képesek megbírkózni a különböző környezeti stressztényezőkkel (Demé *et al.*, 2014). A fotoszintetikus membránok viszonylag magas NKK lipidtartalma – összehasonlítva pl. a növényi mitokondrium membránjaival (Sadre és Frentzen, 2010) – nélkülözhetetlen a viszonylag magas fehérjetartalom befogadására. A tilakoidok magas fehérje-lipid aránya (Szalontai *et al.*, 2000) a fotoszintetikus apparátus nagyméretű fehérje komplexeinek tulajdoníthatók, amelyek segítik a fotoszintetikus elektron transzportot.

A lipidek viselkedése nem csak a fejcsoport tulajdonságaitól, hanem a zsírsavlánccok telítettségi szintjétől is függ (van Eerden *et al.*, 2015). Cianobaktériumoknál a zsírsavak 14-18 szénatom hosszúságúak (C14-C18), a kettős

kötések száma egytől négyig terjedhet, így eredményezve telített, egyszeresen telítetlen és többszörösen telítetlen zsírsavakat (Murata *et al.*, 1992). Cianobaktériumokban a zsírsav csoportok észterezésének erős fajlagossága a glicerín-gerinc sn-helyzetéhez igazodik. A C18-as láncokkal rendelkező telített- és cisz-telítetlen zsírsavak elsősorban az sn-1pozíciónál észteresítődnek, míg C16-os láncok az sn-2 pozíciónál történő észteresítést részesítik előnyben (Sato és Wada, 2010, Murata *et al.*, 1992).

A növekedési hőmérséklet változása képes befolyásolni a membrán lipidek telítetlenségi szintjét, lehetővé téve a cianobaktériumok fotoszintetikus működéséhez szükséges fluiditás szabályozását (Nishida és Murata, 1996, Los *et al.*, 2013). Ha a membrán fluiditás hőmérséklet csökkenés által módosul, a növények és cianobaktériumok fenntartják a membrán homeosztázisát a glicerolipidekben lévő kettős kötések számának növelésével (Nishida és Murata, 1996).

Röntgen-krisztallográfia segítségével lokalizálni tudták a membránlipideket a főbb fotoszintetikus komplexekben (PSI és PSII) és azok körül (Jordan *et al.*, 2001, Guskov *et al.*, 2009, Umena *et al.*, 2011). Ezek a komplexek a lipid kettős rétegbe ágyazódnak, ezért a specifikus lipid-fehérje kölcsönhatások rendkívül fontosak a megfelelő struktúra és funkció fenntartásához (Domonkos *et al.*, 2008). A tilakoid lipidjei fontos szerepet töltenek be az PSII és az PSI szerkezetének fenntartásában, valamint az elektrontranszport és a kloroplasztisz létrejöttében részt vevő folyamatok megfelelő működésének biztosításában (Mizusawa és Wada, 2012, Kobayashi *et al.*, 2015). A többszörösen telítetlen lipidek megvédhetik a fotoszintetikus apparátust az alacsony hőmérsékleten bekövetkező fotoinhibíciótól (Gombos *et al.*, 1994b). A lipidek telítetlensége stabilizálhatja a hőmérsékleti stressznek kitett fotoszintetikus komplexeket (Gombos *et al.*, 1994a). A többszörösen telítetlen zsírsavak fontosak a fotoszintetikus komplexek sóstressz elleni védelme során (Allakhverdiev *et al.*, 1999). A TM-ok lipidtartalmának átrendeződése, újraszerveződése elengedhetetlen a cianobaktériumok túléléséhez különböző stresszkörülmények között. Korábbi kísérletek igazolták, hogy a *Synechocystis* sejtek képesek exogén úton hozzáadott mesterséges lipidek átalakítására fiziológiás igényeiknek megfelelően (Laczko-Dobos *et al.*, 2010).

A Car-ok hidrofób, semleges, lipidszerű molekulák, több konjugált kettős kötéssel, melyek a fotoszintetikus membránok szintén fontos összetevői (Gruszecki és Strzałka, 2005). Cianobaktériumokban a Car-oknak két fő formája van jelen: karotin ( $\beta$ -karotin) és ezeknek oxigenált származékai, a xantofillok (Takaichi és Mochimaru, 2007, Domonkos *et al.*, 2013, Kusama *et al.*, 2015, Tóth *et al.*, 2015). Ezek a lipid kettősréteg

részét képezik, valamint a fotoszintetikus komplexek fehérjéihez is kapcsolódnak. A hidrofób jelleg ellenére a Car-ok vízdékony frakciókat képesek létrehozni az ún. narancs-karotinoid-fehérjékkal (Kerfeld, 2004, Sedoud *et al.*, 2014), illetve a nemrégiben azonosított helikális-karotinoid-fehérjékkal (Melnicki *et al.*, 2016).

A Car-ok több funkcióval is rendelkeznek (Zakar *et al.*, 2016). Részt vesznek a fénybegyűjtési folyamatokban (Stamatakis *et al.*, 2014) és a PSII fotoszintetikus komplex összeszerelésében (Sozer *et al.*, 2010), modulálják a membránstruktúrákat és megvédik azokat a környezeti stressztényezőktől (Domonkos *et al.*, 2009). Továbbá, a PSII dimerizációja és a PSI trimerizációja során (*Synechocystis* esetében) is szükség van rájuk (Tóth *et al.*, 2015). Nemcsak a Car-ok, hanem a megemelkedett hőmérséklet is stabilizálhatja a PSI trimereket (Klodawska *et al.*, 2015). Míg a növényekben a PSI csak monomer formában létezik (Chitnis, 1996), addig a cianobaktériumokban a monomer forma mellett PSI trimerek formában is jelen van (Grotjohann és Fromme, 2005). Néhány termofil cianobaktériumban tetramerek, illetve dimerek is megtalálhatók (Li *et al.*, 2014). Egy nemrégiben leközölt tanulmány szerint a PSI tetramereket Car-ok vagy lipidek stabilizálhatják (Semchonok *et al.*, 2016). A Car-ok befolyásolhatják a PBS-k szerkezetét és működését (Tóth *et al.*, 2015, Vajravel *et al.*, 2016, Zakar *et al.*, 2016). A Car-ok létfontosságúak a PSII működéséhez is (Zakar *et al.*, 2016). A *ΔcrtRO* xantofill hiányos *Synechocystis* mutáns fokozott érzékenységet mutatott erős fény hatására (Schäfer *et al.*, 2005). E mutánson végzett legutóbbi vizsgálatok kiemelik a zeaxantin és az echinenon szerepét a PSII védelmében a magas fényintenzitás hatására kiváltott fotoinhibícióval szemben, különösen a helyreállítási folyamatok során (Kusama *et al.*, 2015). Egy friss tanulmány azt sugallja, hogy a mérsékelt hőstressz növelheti a fotoinhibíciónak kitett PSII helyreállítását (Ueno *et al.*, 2016).

A lipid- és Car-összetétel változásának sejtmorfológiára gyakorolt hatását TEM és SEM használatával tanulmányoztuk.

Az egész sejtek lipid összetételét lipidomikai megközelítéssel tanulmányoztuk. Az alkalmazott tandem MS-s módszer lehetővé tette többszörösen telítetlen lipidek és xantofilok hiányában, a membrán lipid összetételben bekövetkező változások nyomonkövetését.

A xantofill- és a többszörösen telítetlen lipidihiány következtében fellépő Car összetétel változásának kimutatására HPLC analízist alkalmaztunk.

A WT-ban és mutáns törzsekben lévő PSI oligomer szintek összehasonlítása érdekében két *in vitro* (natív PAGE, FPLC) és két *in vivo* (mélyhőmérsékletű fluoreszcens emissziós spektroszkópia, CD spektroszkópia) módszert alkalmaztam.

A glicerolipidek a Car-okkal együtt a PSI és a PSII szerkezeti- és funkcionális szempontból fontos helyein vannak jelen és meghatározó szerepet töltenek be ezekben a pigment-fehérje komplexekben (Sozer *et al.*, 2011). Ezért a lipid-karotinoid-fehérje interakciók vizsgálata a fotoszintetikus membránokban egy ígéretes kutatási terület. A létrehozott többszörös *Synechocystis* mutáns (ROAD) xantofill- és többszörösen telítetlen lipid hiányos (Zakar *et al.*, 2017). Ez a törzs hatékony eszköznek bizonyult a lipidek és a Car-ok közötti együttműködés alapját adó biokémiai háttér vizsgálatára. A mutáns sejtek által megfigyelhettem a lipidek újraformálódását és a Car tartalom változását. A NKK-KK lipid arány a mutánsban szignifikánsan csökkent a WT értékéhez képest. Az ROAD és WT sejtek a lipid fajták eltérő tartalmait és arányait mutatták. A xantofillok és a  $\beta$ -karotin aránya lényegesen megváltozott. Eredményeimből arra következtetek, hogy környezeti stresszhelyzetekben a lipidek átformálódása és a Car tartalom változtatása, szükséges a membránszerkezet stabilizálásához a fotoszintetikus apparátus optimális működésének biztosítása érdekében. Eredményeim azt is jelzik, hogy a telített és a monoén lipidek szerepet játszhatnak a PSI-trimerek stabilizálásában. Jelen munkámban kiemelem a xantofillok és a többszörösen telítetlen lipidek kooperatív szerepét. Bizonyos esetekben a xantofilloknak és a többszörösen telítetlen lipideknek akár további szinergikus hatásuk is lehet a mérsékelten alacsony (MA) és a mérsékelten magas (MM) hőmérsékletű stresszhatások elleni védelemben.

Egy nem invazív, *in vivo* biofizikai módszer (CD) alkalmazásával kimutattam, hogy mind a telítetlen zsírsavak, mind a xantofillok hiánya destabilizálja a PSI trimereket. A xantofillok hiánya ebben az esetben sokkal hangsúlyosabb volt. A fotoszintetikus komplexek xantofilljainak pontos helyzete továbbra is ismeretlen a tudomány számára, ezért a jövőben érdemes lesz ezt a területet kutatni.

Jelen munkát a Magyar Nemzetgazdasági Minisztérium, a GINOP-2.3.2-15-2016-0001 pályázat keretein belül támogatta.

## 10.2. Summary of the Ph.D. thesis

Lipids, as important constituents of photosynthetic membranes, are key actors in forming dynamic bilayers (Liberton és Pakrasi 2008; Nevo *et al.* 2009). In cyanobacteria thylakoids are dominant membrane structures, therefore their lipid composition is similar to that of the total cellular membranes (Sakurai *et al.* 2006). Thylakoids are the sites of oxygenic photosynthesis in cyanobacteria and plants and their lipid composition is unique and highly conserved (Deme *et al.* 2014; van Eerden *et al.* 2015). They include mainly galactolipids, such as monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) and digalactosyldiacylglycerol (DGDG), a sulfolipid, sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG), and the phospholipid phosphatidylglycerol (PG). In cyanobacteria the MGDG biosynthetic precursor monoglucosyldiacylglycerol (MGlcDG) is also present (Sato 2015). An epimerase can convert glucolipids to galactolipids, and this enzyme has recently been identified in cyanobacteria (Awai *et al.* 2014).

The physical properties of different membrane lipid classes is determined by their head group structure. MGDG and DGDG, together with MGlcDG, have neutral head groups, while SQDG and PG are anionic lipids, bearing one negative charge (van Eerden *et al.* 2015). Interestingly, MGDG, the most abundant galactolipid of thylakoids, and MGlcDG are typical non-bilayer-forming (NBL) lipids. They have a cone-like shape, having small head group and long polyunsaturated tails, which are able to form in aqueous medium an inverted hexagonal structure known as hexagonal II phase (Shipley *et al.* 1973). The other lipid classes (DGDG, SQDG and PG) are typical lamellar bilayer-forming (BL) lipids, having bigger head group and more cylindrical shape (Jouhet 2013). A certain ratio of NBL to BL lipids is crucial for functional membranes (Israelachvili *et al.* 1980). Fine tuning of the MGDG/DGDG ratio makes thylakoid membranes extremely dynamic and flexible to cope with various environmental stress factors (Dème *et al.* 2014). The relatively high NB lipid content in photosynthetic membranes, compared to for example plant mitochondrial membranes (Sadre and Frentzen 2009), is needed to accommodate their relatively high protein content. The high protein to lipid ratios of thylakoids (Szalontai *et al.* 2000) can be attributed to extremely large protein complexes of the photosynthetic apparatus, which assist in photosynthetic electron transport.

Properties of lipids depend not only on their head groups but also on the saturation level of their fatty acid tails (van Eerden *et al.* 2015). In cyanobacteria the fatty acyl chain length varies from 14 to 18 carbon atoms (C14–C18), the number of double bonds also

varies from one to four, leading to saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids (Murata *et al.* 1992). In cyanobacteria there is a strong specificity of the fatty acyl group esterification to the sn-positions of the glycerol backbone. Saturated and cis-unsaturated fatty acids with chains of C18 are mainly esterified to the sn-1 position, while the sn-2 position is strongly preferred by C16 esterification (Sato and Wada 2009; Murata *et al.* 1992).

The level of membrane lipid unsaturation is influenced by changes in the growth temperature, allowing regulation of the fluidity that is necessary for the photosynthetic functions of cyanobacteria (Nishida and Murata 1996; Los and Zinchenko 2009). When the fluidity of the membrane is modified by decreased temperature, plants and cyanobacteria maintain membrane homeostasis by increasing the number of double bonds in the glycerolipids (Nishida and Murata 1996).

X-ray crystallography revealed the localization of membrane lipids around and within the main photosynthetic complexes, Photosystem I (PSI) and Photosystem II (PSII) (Jordan *et al.* 2001; Guskov *et al.* 2009; Umena *et al.* 2011). These complexes are embedded in the lipid bilayer, therefore specific lipid-protein interactions are very important for maintaining their proper structure and function (Domonkos *et al.* 2008). Thylakoid lipids have important roles in maintaining the structures of PSII and PSI, they ensure the proper functioning of the electron transport and chloroplast biogenesis processes as well (Mizusawa and Wada 2012; Kobayashi 2016). Polyunsaturated lipids can protect the photosynthetic machinery from low temperature photoinhibition (Gombos *et al.* 1994b). It has been suggested that lipid unsaturation can stabilize heat stress exposed photosynthetic complexes (Gombos *et al.* 1994a). Polyunsaturated fatty acids are also important in protecting the photosynthetic machinery against salt stress (Allakhverdiev *et al.* 1999). Remodelling and reorganization of the lipid content in thylakoid membranes is essential for the survival of cyanobacteria under various stress conditions. It has been demonstrated that *Synechocystis* cells are capable of retailoring an exogenously added artificial lipid to suit their physiological demands (Laczko-Dobos *et al.* 2010).

Carotenoids (Cars), the other key components of photosynthetic membranes, are also hydrophobic, neutral, lipid-like molecules with multiple conjugated double bonds (Gruszecki and Strzalka 2005). In cyanobacteria two main forms are present: carotene ( $\beta$ -carotene) and its oxygenated derivatives, xanthophylls (Takaichi and Mochimaru 2007; Domonkos *et al.* 2013; Kusama *et al.* 2015; Toth *et al.* 2015). They are parts of the lipid bilayers, and are also associated with proteins in the main photosynthetic complexes.

Despite their hydrophobic character, Cars can form water soluble fractions when associated with the so-called orange carotenoid proteins (Kerfeld 2004; Sedoud *et al.* 2014), or the very recently identified helical carotenoid proteins (Melnicki *et al.* 2016).

Cars are multi-functional (Zakar *et al.* 2016). They take part in the light-harvesting processes (Stamatakis *et al.* 2014) and the assembly of the PSII photosynthetic complex (Sozer *et al.* 2010), they modulate membrane structures and protect them from environmental stress factors (Varkonyi *et al.* 2002; Domonkos *et al.* 2009). They are also required for PSII dimerization and PSI trimerization in *Synechocystis* (Toth *et al.* 2015). Not only Cars but also elevated temperature can stabilize PSI trimers (Klodawska *et al.* 2015). Whereas in plants, PSI exists only in monomeric form (Chitnis 1996), in cyanobacteria PSI trimers are also present (Grotjohann and Fromme 2005). In some thermophilic cyanobacteria tetramers could be found (Li *et al.* 2014). A recent study of tetrameric PSI suggests that these supercomplexes may be stabilized by Cars or lipids (Semchonok *et al.* 2016). Carotenes may also influence the structure and function of phycobilisomes (Vajravel *et al.* 2016; Toth *et al.* 2015; Zakar *et al.* 2016). Cars are also vital for the PSII function (Zakar *et al.* 2016). The  $\Delta crtRO$  xanthophyll-deficient *Synechocystis* shows increased sensitivity to high light (Schafer *et al.* 2005). A recent study of this mutant highlights the role of zeaxanthin and echinenon in the protection of PSII against high-light-induced photoinhibition, especially during the recovery processes (Kusama *et al.* 2015). A recent paper suggests that moderate heat stress might also enhance the repair of PSII affected by photoinhibition (Ueno *et al.* 2016).

The effects of altered lipid and Car composition on cell morphology were studied by TEM and SEM.

I studied the lipid composition of whole cells using a lipidomic approach. The applied tandem mass spectrometric method allowed us to follow the changes in membrane lipid content induced by the absence of xanthophylls and polyunsaturated lipids.

HPLC analysis was used to detect changes in the Car composition resulting from xanthophyll- and polyunsaturated lipid-deficiency.

I performed two *in vitro* (clean native PAGE and FPLC) and two *in vivo* (low temperature fluorescence emission spectroscopy and CD spectroscopy) technique to compare how the level of PSI oligomers are altered in our mutants relative to the WT.

Glycerolipids, together with Cars, are present at structurally and functionally important sites of the PSI and PSII, and they have determining roles in these pigment-



protein complexes (Sozer *et al.* 2011). Therefore, investigating lipid-carotenoid-protein interactions in photosynthetic membranes is an intriguing new field of research. During the present study we constructed a multiple mutant of *Synechocystis*, designated ROAD, which is deficient not only in xanthophylls, but also in polyunsaturated lipids. This strain proved to be a powerful tool for investigating the biochemical background underlying the cooperation between the effects of lipids and Cars. In the mutant cells I could observe remodelling of lipids and reorganization of the Car content. The NBL to BL lipid ratio decreased significantly in the mutant compared to that of the WT. ROAD and WT cells showed distinct compositions and ratios of lipid species. Xanthophyll to  $\beta$ -carotene ratios changed substantially. I suggest that membrane dynamics, biochemical processes like remodelling of lipids and restructuring of Cars, are necessary to stabilize membrane structures in order to ensure optimal functioning of the photosynthetic apparatus, especially under environmental stress conditions. My results also highlight the possible role of saturated and monoene lipids in stabilizing PSI trimers. My results also point out the cooperative roles, in some cases additional or synergic effects, of xanthophylls and polyunsaturated lipids in moderate low (ML) and moderate high (MH) temperature stress effects.

By using a non-invasive biophysical technique (CD), I demonstrated that deficiencies in both unsaturated fatty acids and xanthophylls destabilize PSI trimers. This effect of the xanthophyll deficiency is much more pronounced, as was revealed by a multiple mutant lacking both of these lipid groups. The exact localization of xanthophylls in the photosynthetic complexes is yet to be determined.

The work was supported by Hungarian Ministry for National Economy (GINOP-2.3.2-15-2016-0001).

## 11. Irodalomjegyzék

- ALLAKHVERDIEV, S. I., NISHIYAMA, Y., SUZUKI, I., TASAKA, Y. & MURATA, N. 1999. Genetic engineering of the unsaturation of fatty acids in membrane lipids alters the tolerance of *Synechocystis* to salt stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 5862-5867.
- ALLEN, M. M. 1968. SIMPLE CONDITIONS FOR GROWTH OF UNICELLULAR BLUE-GREEN ALGAE ON PLATES(1, 2). *J Phycol*, 4, 1-4.
- ANDERSSON, M. X., STRIDH, M. H., LARSSON, K. E., LILJENBERG, C. & SANDELIUS, A. S. 2003. Phosphate-deficient oat replaces a major portion of the plasma membrane phospholipids with the galactolipid digalactosyldiacylglycerol. *FEBS Lett*, 537, 128-32.
- AOKI, M., SATO, N., MEGURO, A. & TSUZUKI, M. 2004. Differing involvement of sulfoquinovosyl diacylglycerol in photosystem II in two species of unicellular cyanobacteria. *Eur J Biochem*, 271, 685-93.
- AWAI, K., MARECHAL, E., BLOCK, M. A., BRUN, D., MASUDA, T., SHIMADA, H., TAKAMIYA, K., OHTA, H. & JOYARD, J. 2001. Two types of MGDG synthase genes, found widely in both 16:3 and 18:3 plants, differentially mediate galactolipid syntheses in photosynthetic and nonphotosynthetic tissues in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 10960-5.
- AWAI, K., OHTA, H. & SATO, N. 2014. Oxygenic photosynthesis without galactolipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, 13571-13575.
- B DEMMIG-ADAMS, A. & W W ADAMS, I. 1992. Photoprotection and Other Responses of Plants to High Light Stress. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43, 599-626.
- BALAJI, S., KALAIVANI, T. & RAJASEKARAN, C. 2014. Biosorption of Zinc and Nickel and Its Effect on Growth of Different Spirulina Strains. *CLEAN – Soil, Air, Water*, 42, 507-512.
- BALOGI, Z., TOROK, Z., BALOGH, G., JOSVAY, K., SHIGAPOVA, N., VIERLING, E., VIGH, L. & HORVATH, I. 2005. "Heat shock lipid" in cyanobacteria during heat/light-acclimation. *Arch Biochem Biophys*, 436, 346-54.
- BECKOVA, M., GARDIAN, Z., YU, J., KONIK, P., NIXON, P. J. & KOMENDA, J. 2017. Association of Psb28 and Psb27 Proteins with PSII-PSI Supercomplexes

- upon Exposure of *Synechocystis* sp. PCC 6803 to High Light. *Mol Plant*, 10, 62-72.
- BEN-SHEM, A., FROLOW, F. & NELSON, N. 2004. Light-harvesting features revealed by the structure of plant photosystem I. *Photosynth Res*, 81, 239-50.
- BEN-SHEM, A., NELSON, N. & FROLOW, F. 2003. Crystallization and initial X-ray diffraction studies of higher plant photosystem I. *Acta Crystallographica Section D*, 59, 1824-1827.
- BENNING, C. 1998. BIOSYNTHESIS AND FUNCTION OF THE SULFOLIPID SULFOQUINOVOSYL DIACYLGLYCEROL. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 49, 53-75.
- BIBBY, T. S., NIELD, J. & BARBER, J. 2001. Iron deficiency induces the formation of an antenna ring around trimeric photosystem I in cyanobacteria. *Nature*, 412, 743-5.
- BLANKENSHIP, R. E. 1992. Origin and early evolution of photosynthesis. *Photosynthesis Research*, 33, 91-111.
- BLOCK, M. A., DORNE, A. J., JOYARD, J. & DOUCE, R. 1983. Preparation and characterization of membrane fractions enriched in outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. II. Biochemical characterization. *J Biol Chem*, 258, 13281-6.
- BONE, R. A. & LANDRUM, J. T. 1984. Macular pigment in Henle fiber membranes: a model for Haidinger's brushes. *Vision Res*, 24, 103-8.
- BONE, R. A., LANDRUM, J. T. & CAINS, A. 1992. Optical density spectra of the macular pigment in vivo and in vitro. *Vision Res*, 32, 105-10.
- BORSODI, A. 2013. *Bevezetés a prokarióták világába*, Budapest, ELTE.
- BRITTON, G., LIAAEN-JENSEN, S. & PFANDER, H. 2004. *Carotenoids handbook*, Basel, Birkha\0308user.
- BRYANT, D. A. 1994. *The molecular biology of cyanobacteria*, Dordrecht ; London, Kluwer Academic.
- BURJA, A. M., BANAIGS, B., ABOU-MANSOUR, E., GRANT BURGESS, J. & WRIGHT, P. C. 2001. Marine cyanobacteria—a prolific source of natural products. *Tetrahedron*, 57, 9347-9377.
- CAPONE, D. G., BURNS, J. A., MONTOYA, J. P., SUBRAMANIAM, A., MAHAFFEY, C., GUNDERSON, T., MICHAELS, A. F. & CARPENTER, E. J. 2005. Nitrogen fixation by *Trichodesmium* spp.: An important source of new

- nitrogen to the tropical and subtropical North Atlantic Ocean. *Global Biogeochemical Cycles*, 19.
- CHITNIS, P. R. 1996. Photosystem I. *Plant Physiology*, 111, 661-669.
- CHITNIS, V. P. & CHITNIS, P. R. 1993. PsaL subunit is required for the formation of photosystem I trimers in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Lett*, 336, 330-4.
- CIFERRI, O. 1983. Spirulina, the edible microorganism. *Microbiological Reviews*, 47, 551-578.
- COGDELL, R. J. & GARDINER, A. T. 1993. [18] Functions of carotenoids in photosynthesis. *Methods in Enzymology*. Academic Press.
- COHEN, Y., JØRGENSEN, B. B., REVSBECH, N. P. & POPLAWSKI, R. 1986. Adaptation to Hydrogen Sulfide of Oxygenic and Anoxygenic Photosynthesis among Cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 51, 398-407.
- CROWLEY, P. B., DIAZ-QUINTANA, A., MOLINA-HEREDIA, F. P., NIETO, P., SUTTER, M., HAEHNEL, W., DE LA ROSA, M. A. & UBBINK, M. 2002. The interactions of cyanobacterial cytochrome c6 and cytochrome f, characterized by NMR. *J Biol Chem*, 277, 48685-9.
- DE LAS RIVAS, J., TELFER, A. & BARBER, J. 1993. Two coupled  $\beta$ -carotene molecules protect P680 from photodamage in isolated Photosystem II reaction centres. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1142, 155-164.
- DE MARAIS, D. J. 2000. Evolution. When did photosynthesis emerge on Earth? *Science*, 289, 1703-5.
- DEMÉ, B., CATAYE, C., BLOCK, M. A., MARÉCHAL, E. & JOUHET, J. 2014. Contribution of galactoglycerolipids to the 3-dimensional architecture of thylakoids. *The FASEB Journal*, 28, 3373-3383.
- DEXTER, J. & FU, P. 2009. Metabolic engineering of cyanobacteria for ethanol production. *Energy & Environmental Science*, 2, 857-864.
- DISMUKES, G. C., CARRIERI, D., BENNETTE, N., ANANYEV, G. M. & POSEWITZ, M. C. 2008. Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. *Current Opinion in Biotechnology*, 19, 235-240.
- DOBÁKOVÁ, M., SOBOTKA, R., TICHÝ, M. & KOMENDA, J. 2009. Psb28 Protein Is Involved in the Biogenesis of the Photosystem II Inner Antenna CP47 (PsbB) in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiology*, 149, 1076-1086.

- DOMONKOS, I. 2006. *A foszfatidil-glicerin szerepe az I. fotokémiai rendszer szerkezetében és funkciójában*. PhD, Szegedi Tudományegyetem.
- DOMONKOS, I., KIS, M., GOMBOS, Z. & UGHY, B. 2013. Carotenoids, versatile components of oxygenic photosynthesis. *Progress in Lipid Research*, 52, 539-561.
- DOMONKOS, I., LACZKÓ-DOBOS, H. & GOMBOS, Z. 2008. Lipid-assisted protein–protein interactions that support photosynthetic and other cellular activities. *Progress in Lipid Research*, 47, 422-435.
- DOMONKOS, I., MALEC, P., LACZKO-DOBOS, H., SOZER, O., KLODAWSKA, K., WADA, H., STRZALKA, K. & GOMBOS, Z. 2009. Phosphatidylglycerol Depletion Induces an Increase in Myxoxanthophyll Biosynthetic Activity in *Synechocystis* PCC6803 Cells. *Plant and Cell Physiology*, 50, 374-382.
- 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. 2004. Phosphatidylglycerol Is Essential for Oligomerization of Photosystem I Reaction Center. *Plant Physiology*, 134, 1471-1478.
- DORMANN, P. & BENNING, C. 2002. Galactolipids rule in seed plants. *Trends Plant Sci*, 7, 112-8.
- ESSIGMANN, B., GULER, S., NARANG, R. A., LINKE, D. & BENNING, C. 1998. Phosphate availability affects the thylakoid lipid composition and the expression of SQD1, a gene required for sulfolipid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 1950-5.
- FALCONE, D. L., OGAS, J. P. & SOMERVILLE, C. R. 2004. Regulation of membrane fatty acid composition by temperature in mutants of *Arabidopsis* with alterations in membrane lipid composition. *BMC Plant Biology*, 4, 17.
- FRANK, H. A. & COGDELL, R. J. 1996. Carotenoids in photosynthesis. *Photochem Photobiol*, 63, 257-264.
- FUJIMORI, E. & LIVINGSTON, R. 1957. Interactions of Chlorophyll in its Triplet State with Oxygen, Carotene, Etc. *Nature*, 180, 1036.
- FUJISAWA, T., NARIKAWA, R., OKAMOTO, S., EHIRA, S., YOSHIMURA, H., SUZUKI, I., MASUDA, T., MOCHIMARU, M., TAKAICHI, S., AWAI, K., SEKINE, M., HORIKAWA, H., YASHIRO, I., OMATA, S., TAKARADA, H., KATANO, Y., KOSUGI, H., TANIKAWA, S., OHMORI, K., SATO, N.,

- IKEUCHI, M., FUJITA, N. & OHMORI, M. 2010. Genomic Structure of an Economically Important Cyanobacterium, *Arthrospira (Spirulina) platensis* NIES-39. *DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes*, 17, 85-103.
- GAO, K. & MA, Z. 2008. Photosynthesis and growth of *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Cyanophyta) in response to solar UV radiation, with special reference to its minor variant. *Environmental and Experimental Botany*, 63, 123-129.
- GOMBOS, Z., KIS, M., PÁLI, T. & VIGH, L. 1987. Nitrate starvation induces homeoviscous regulation of lipids in the cell envelope of the blue-green alga, *Anacystis nidulans*. *European Journal of Biochemistry*, 165, 461-465.
- GOMBOS, Z., VARKONYI, Z., HAGIO, M., IWAKI, M., KOVACS, L., MASAMOTO, K., ITOH, S. & WADA, H. 2002. Phosphatidylglycerol requirement for the function of electron acceptor plastoquinone Q(B) in the photosystem II reaction center. *Biochemistry*, 41, 3796-802.
- GOMBOS, Z., WADA, H., HIDEG, E. & MURATA, N. 1994a. The Unsaturation of Membrane Lipids Stabilizes Photosynthesis against Heat Stress. *Plant Physiol*, 104, 563-567.
- GOMBOS, Z., WADA, H. & MURATA, N. 1994b. The recovery of photosynthesis from low-temperature photoinhibition is accelerated by the unsaturation of membrane lipids: a mechanism of chilling tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 8787-91.
- GOODWIN, T. W. 1988. *Plant pigments*, Academic.
- GROTJOHANN, I. & FROMME, P. 2005. Structure of cyanobacterial photosystem I. *Photosynth Res*, 85, 51-72.
- GRUSZECKI, W. I. & STRZAŁKA, K. 2005. Carotenoids as modulators of lipid membrane physical properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1740, 108-115.
- GUEDES, A. C., AMARO, H. M. & MALCATA, F. X. 2011. Microalgae as Sources of Carotenoids. *Marine Drugs*, 9.
- GULER, S., ESSIGMANN, B. & BENNING, C. 2000. A cyanobacterial gene, *sqdX*, required for biosynthesis of the sulfolipid sulfoquinovosyldiacylglycerol. *J Bacteriol*, 182, 543-5.
- GUSKOV, A., KERN, J., GABDULKHAKOV, A., BROSER, M., ZOUNI, A. & SAENGER, W. 2009. Cyanobacterial photosystem II at 2.9-Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride. *Nat Struct Mol Biol*, 16, 334-42.

- HAGIO, M., GOMBOS, Z., VARKONYI, Z., MASAMOTO, K., SATO, N., TSUZUKI, M. & WADA, H. 2000. Direct evidence for requirement of phosphatidylglycerol in photosystem II of photosynthesis. *Plant Physiol*, 124, 795-804.
- HANKAMER, B., BARBER, J. & BOEKEMA, E. J. 1997. STRUCTURE AND MEMBRANE ORGANIZATION OF PHOTOSYSTEM II IN GREEN PLANTS. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 48, 641-671.
- HARTEL, H., LOKSTEIN, H., DORMANN, P., GRIMM, B. & BENNING, C. 1997. Changes in the Composition of the Photosynthetic Apparatus in the Galactolipid-Deficient *dgd1* Mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 115, 1175-1184.
- HÄRTEL, H., LOKSTEIN, H., DÖRMANN, P., TRETHERWEY, R. N. & BENNING, C. 1998. Photosynthetic light utilization and xanthophyll cycle activity in the galactolipid deficient *dgd1* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 36, 407-417.
- HASELKORN, R. 1998. How cyanobacteria count to 10. *Science*, 282, 891-2.
- HERRERO, A. & FLORES, E. 2008. *The cyanobacteria : molecular biology, genomics, and evolution*, Norfolk, UK, Caister Academic Press.
- HIPPLER, M., DREPPER, F., HAEHNEL, W. & ROCHAIX, J. D. 1998. The N-terminal domain of Psaf: precise recognition site for binding and fast electron transfer from cytochrome *c6* and plastocyanin to photosystem I of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 7339-44.
- HIPPLER, M., REICHERT, J., SUTTER, M., ZAK, E., ALTSCHMIED, L., SCHRÖER, U., HERRMANN, R. G. & HAEHNEL, W. 1996. The plastocyanin binding domain of photosystem I. *The EMBO Journal*, 15, 6374-6384.
- HUANG , G., FAN, Q., LECHNO-YOSSEF, S., WOJCIUCH, E., WOLK, C. P., KANEKO, T. & TABATA, S. 2005. Clustered Genes Required for the Synthesis of Heterocyst Envelope Polysaccharide in *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. *Journal of Bacteriology*, 187, 1114-1123.
- INABA, M., SAKAMOTO, A. & MURATA, N. 2001. Functional expression in *Escherichia coli* of low-affinity and high-affinity Na<sup>(+)</sup>(Li<sup>(+)</sup>)/H<sup>(+)</sup> antiporters of *Synechocystis*. *J Bacteriol*, 183, 1376-84.
- ISRAELACHVILI, J. N., MARCELJA, S. & HORN, R. G. 1980. Physical principles of membrane organization. *Q Rev Biophys*, 13, 121-200.

- JARVIS, P., DORMANN, P., PETO, C. A., LUTES, J., BENNING, C. & CHORY, J. 2000. Galactolipid deficiency and abnormal chloroplast development in the Arabidopsis MGD synthase 1 mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 8175-9.
- JORDAN, P., FROMME, P., WITT, H. T., KLUKAS, O., SAENGER, W. & KRAUSS, N. 2001. Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature*, 411, 909-17.
- JOUHET, J. 2013. Importance of the hexagonal lipid phase in biological membrane organization. *Frontiers in Plant Science*, 4.
- JOUHET, J., MARECHAL, E., BLIGNY, R., JOYARD, J. & BLOCK, M. A. 2003. Transient increase of phosphatidylcholine in plant cells in response to phosphate deprivation. *FEBS Lett*, 544, 63-8.
- JÜRGENS, U. J. & MÄNTELE, W. 1991. Orientation of carotenoids in the outer membrane of *Synechocystis* PCC 6714 (Cyanobacteria). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1067, 208-212.
- KARAPETYAN, N. V., HOLZSWARTH, A. R. & RÖGNER, M. 1999. The photosystem I trimer of cyanobacteria: molecular organization, excitation dynamics and physiological significance. *FEBS Letters*, 460, 395-400.
- KELLY, A. A., FROEHLICH, J. E. & DORMANN, P. 2003. Disruption of the two digalactosyldiacylglycerol synthase genes DGD1 and DGD2 in Arabidopsis reveals the existence of an additional enzyme of galactolipid synthesis. *Plant Cell*, 15, 2694-706.
- KERFELD, C. A. 2004. Water-soluble carotenoid proteins of cyanobacteria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 430, 2-9.
- KLODAWSKA, K., KOVACS, L., VARKONYI, Z., KIS, M., SOZER, O., LACZKODOBOS, H., KOBORI, O., DOMONKOS, I., STRZALKA, K., GOMBOS, Z. & MALEC, P. 2015. Elevated growth temperature can enhance photosystem I trimer formation and affects xanthophyll biosynthesis in *Cyanobacterium Synechocystis* sp. PCC6803 cells. *Plant Cell Physiol*, 56, 558-71.
- KOBAYASHI, K., FUJII, S., SATO, M., TOYOOKA, K. & WADA, H. 2015. Specific role of phosphatidylglycerol and functional overlaps with other thylakoid lipids in Arabidopsis chloroplast biogenesis. *Plant Cell Reports*, 34, 631-642.
- KOKSHAROVA, O. & WOLK, C. 2002. Genetic tools for cyanobacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58, 123-137.



- KOMENDA, J. & BARBER, J. 1995. Comparison of psbO and psbH deletion mutants of *Synechocystis* PCC 6803 indicates that degradation of D1 protein is regulated by the QB site and dependent on protein synthesis. *Biochemistry*, 34, 9625-9631.
- KOMENDA, J., KNOPPOVÁ, J., KOPEČNÁ, J., SOBOTKA, R., HALADA, P., YU, J., NICKELSEN, J., BOEHM, M. & NIXON, P. J. 2012. The Psb27 Assembly Factor Binds to the CP43 Complex of Photosystem II in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiology*, 158, 476-486.
- KOURIL, R., VAN OOSTERWIJK, N., YAKUSHEVSKA, A. E. & BOEKEMA, E. J. 2005. Photosystem I: a search for green plant trimers. *Photochem Photobiol Sci*, 4, 1091-4.
- KOVACSICS, B. 2011. *A karotinoidok szerepe a fotoszintetikus komplexek szerkezetének felépítésében*. MSc., Szegedi Tudományegyetem.
- KUSAMA, Y., INOUE, S., JIMBO, H., TAKAICHI, S., SONOIKE, K., HIHARA, Y. & NISHIYAMA, Y. 2015. Zeaxanthin and Echinenone Protect the Repair of Photosystem II from Inhibition by Singlet Oxygen in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant and Cell Physiology*, 56, 906-916.
- KUSTERS, R., BREUKINK, E., GALLUSSER, A., KUHN, A. & DE KRUIJFF, B. 1994. A dual role for phosphatidylglycerol in protein translocation across the *Escherichia coli* inner membrane. *J Biol Chem*, 269, 1560-3.
- LACZKO-DOBOS, H., FRYČÁK, P., UGHY, B., DOMONKOS, I., WADA, H., PROKAI, L. & GOMBOS, Z. 2010. Remodelling of phosphatidylglycerol in *Synechocystis* PCC6803. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1801, 163-170.
- LATOWSKI, D., AKERLUND, H. E. & STRZALKA, K. 2004. Violaxanthin de-epoxidase, the xanthophyll cycle enzyme, requires lipid inverted hexagonal structures for its activity. *Biochemistry*, 43, 4417-20.
- LAU, N. S., MATSUI, M. & ABDULLAH, A. A. 2015. Cyanobacteria: Photoautotrophic Microbial Factories for the Sustainable Synthesis of Industrial Products. *Biomed Res Int*, 2015, 754934.
- LI, M., SEMCHONOK, D. A., BOEKEMA, E. J. & BRUCE, B. D. 2014. Characterization and Evolution of Tetrameric Photosystem I from the Thermophilic Cyanobacterium *Chroococcidiopsis* sp TS-821. *The Plant Cell*, 26, 1230-1245.

- LOLL, B., KERN, J., SAENGER, W., ZOUNI, A. & BIESIADKA, J. 2005. Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II. *Nature*, 438, 1040.
- LOS, D. A., MIRONOV, K. S. & ALLAKHVERDIEV, S. I. 2013. Regulatory role of membrane fluidity in gene expression and physiological functions. *Photosynth Res*, 116, 489-509.
- LUNDE, C., JENSEN, P. E., HALDRUP, A., KNOETZEL, J. & SCHELLER, H. V. 2000. The PSI-H subunit of photosystem I is essential for state transitions in plant photosynthesis. *Nature*, 408, 613-5.
- MAEDA, S.-I., OKAMURA, M., KOBAYASHI, M. & OMATA, T. 1998. Nitrite-Specific Active Transport System of the Cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain PCC 7942. *Journal of Bacteriology*, 180, 6761-6763.
- MARTINEZ-FEREZ, I., FERNANDEZ-GONZALEZ, B., SANDMANN, G. & VIOQUE, A. 1994. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene coding for phytoene synthase from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Biochim Biophys Acta*, 1218, 145-52.
- MASUKAWA, H., NAKAMURA, K., MOCHIMARU, M. & SAKURAI, H. 2001. - Photobiological hydrogen production and nitrogenase activity in some heterocystous cyanobacteria. In: MIYAKE, J., MATSUNAGA, T. & PIETRO, A. S. (eds.) *Biohydrogen II*. Oxford: Pergamon.
- MEEKS, J. C. & CASTENHOLZ, R. W. 1971. Growth and photosynthesis in an extreme thermophile, *Synechococcus lividus* (Cyanophyta). *Arch Mikrobiol*, 78, 25-41.
- MELNICKI, M. R., LEVERENZ, R. L., SUTTER, M., LOPEZ-IGUAL, R., WILSON, A., PAWLOWSKI, E. G., PERREAU, F., KIRILOVSKY, D. & KERFELD, C. A. 2016. Structure, Diversity, and Evolution of a New Family of Soluble Carotenoid-Binding Proteins in Cyanobacteria. *Mol Plant*, 9, 1379-1394.
- MINODA, A., SATO, N., NOZAKI, H., OKADA, K., TAKAHASHI, H., SONOIKE, K. & TSUZUKI, M. 2002. Role of sulfoquinovosyl diacylglycerol for the maintenance of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur J Biochem*, 269, 2353-8.
- MIZUSAWA, N. & WADA, H. 2012. The role of lipids in photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1817, 194-208.
- MOHAMED, H. E., VAN DE MEENE, A. M. L., ROBERSON, R. W. & VERMAAS, W. F. J. 2005. Myxoxanthophyll Is Required for Normal Cell Wall Structure and

- Thylakoid Organization in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology*, 187, 6883-6892.
- MÜHLENHOFF, U., ZHAO, J. & BRYANT, D. A. 1996. Interaction between Photosystem I and Flavodoxin from the Cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 as Revealed by Chemical Cross-Linking. *European Journal of Biochemistry*, 235, 324-331.
- MURATA, N., WADA, H. & GOMBOS, Z. 1992. Modes of Fatty-Acid Desaturation in Cyanobacteria. *Plant and Cell Physiology*, 33, 933-941.
- NAOKI, S. & NORIO, M. 1982. Lipid biosynthesis in the blue-green alga, *Anabaena variabilis*: II. Fatty acids and lipid molecular species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 710, 279-289.
- NEVO, R., CHUARTZMAN, S. G., TSABARI, O., REICH, Z., CHARUVI, D. & SHIMONI, E. 2010. Architecture of Thylakoid Membrane Networks. In: WADA, H. & MURATA, N. (eds.) *Lipids in Photosynthesis: Essential and Regulatory Functions*. Dordrecht: Springer Netherlands.
- NISHIDA, I. & MURATA, N. 1996. CHILLING SENSITIVITY IN PLANTS AND CYANOBACTERIA: The Crucial Contribution of Membrane Lipids. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 47, 541-568.
- OGAWA, T. & TERUI, G. 1970. Studies on the Growth of *Spirulina platensis* : (I) On the Pure Culture of *Spirulina platensis*. *J. Ferment. Technol.*, 48, 361-367.
- OHTA, A., WAGGONER, K., RADOMINSKA-PYREK, A. & DOWHAN, W. 1981. Cloning of genes involved in membrane lipid synthesis: effects of amplification of phosphatidylglycerophosphate synthase in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 147, 552-562.
- PALOZZA, P. & KRINSKY, N. I. 1992. Antioxidant effects of carotenoids in vivo and in vitro: an overview. *Methods Enzymol*, 213, 403-20.
- PAULSEN, H., RUMLER, U. & RUDIGER, W. 1990. Reconstitution of pigment-containing complexes from light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein overexpressed in *Escherichia coli*. *Planta*, 181, 204-11.
- PLOHNKE, N., SEIDEL, T., KAHMANN, U., RÖGNER, M., SCHNEIDER, D. & REXROTH, S. 2015. The Proteome and Lipidome of *Synechocystis* sp. PCC 6803 Cells Grown under Light-Activated Heterotrophic Conditions. *Molecular & Cellular Proteomics*, 14, 572-584.

- PLUMLEY, F. G. & SCHMIDT, G. W. 1987. Reconstitution of chlorophyll a/b light-harvesting complexes: Xanthophyll-dependent assembly and energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 146-50.
- PRENTKI, P. & KRISCH, H. M. 1984. In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene*, 29, 303-313.
- PREPELITCHI, L., PUJADAS, J. M. & WISNIVESKY-COLLI, C. 2015. The effect of spirulina (*Arthrospira platensis*) (Oscillatoriales: Cyanobacteria) on the experimental breeding of *Pseudosuccinea columella* (Basommatophora: Lymnaeidae). *Revista de Biología Tropical*, 63, 479-489.
- REIFARTH, F., CHRISTEN, G., SEELIGER, A. G., DÖRMANN, P., BENNING, C. & RENGGER, G. 1997. Modification of the Water Oxidizing Complex in Leaves of the *dgd1* Mutant of *Arabidopsis thaliana* Deficient in the Galactolipid Digalactosyldiacylglycerol. *Biochemistry*, 36, 11769-11776.
- RIEKHOF, W. R., RUCKLE, M. E., LYDIC, T. A., SEARS, B. B. & BENNING, C. 2003. The sulfolipids 2'-O-acyl-sulfoquinovosyldiacylglycerol and sulfoquinovosyldiacylglycerol are absent from a *Chlamydomonas reinhardtii* mutant deleted in *SQD1*. *Plant Physiol*, 133, 864-74.
- ROGNER, M., NIXON, P. J. & DINER, B. A. 1990. Purification and characterization of photosystem I and photosystem II core complexes from wild-type and phycocyanin-deficient strains of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *J Biol Chem*, 265, 6189-96.
- SADRE, R. & FRENTZEN, M. 2010. Lipids in Plant Mitochondria. In: WADA, H. & MURATA, N. (eds.) *Lipids in Photosynthesis: Essential and Regulatory Functions*. Dordrecht: Springer Netherlands.
- SAKIYAMA, T., UENO, H., HOMMA, H., NUMATA, O. & KUWABARA, T. 2006. Purification and Characterization of a Hemolysin-Like Protein, Sll1951, a Nontoxic Member of the RTX Protein Family from the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology*, 188, 3535-3542.
- SAKURAI, I., SHEN, J.-R., LENG, J., OHASHI, S., KOBAYASHI, M. & WADA, H. 2006. Lipids in Oxygen-Evolving Photosystem II Complexes of Cyanobacteria and Higher Plants. *The Journal of Biochemistry*, 140, 201-209.
- SANDMANN, G., KUHN, M. & BÖGER, P. 1993. Carotenoids in photosynthesis: Protection of D1 degradation in the light. *Photosynthesis Research*, 35, 185-190.

- SATO, N. 2015. Is Monoglucosyldiacylglycerol a Precursor to Monogalactosyldiacylglycerol in All Cyanobacteria? *Plant and Cell Physiology*, 56, 1890-1899.
- SATO, N., TSUZUKI, M., MATSUDA, Y., EHARA, T., OSAFUNE, T. & KAWAGUCHI, A. 1995. Isolation and Characterization of Mutants Affected in Lipid Metabolism of *Chlamydomonas Reinhardtii*. *European Journal of Biochemistry*, 230, 987-993.
- SATO, N. & WADA, H. 2010. Lipid Biosynthesis and its Regulation in Cyanobacteria. *In: WADA, H. & MURATA, N. (eds.) Lipids in Photosynthesis: Essential and Regulatory Functions*. Dordrecht: Springer Netherlands.
- SCHÄFER, L., VIOQUE, A. & SANDMANN, G. 2005. Functional in situ evaluation of photosynthesis-protecting carotenoids in mutants of the cyanobacterium *Synechocystis PCC6803*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 78, 195-201.
- SCHUBERT, W.-D., KLUKAS, O., SAENGER, W., WITT, H. T., FROMME, P. & KRAUß, N. 1998. A common ancestor for oxygenic and anoxygenic photosynthetic systems: A comparison based on the structural model of photosystem II. Edited by R. Huber. *Journal of Molecular Biology*, 280, 297-314.
- SEDOUD, A., LOPEZ-IGUAL, R., UR REHMAN, A., WILSON, A., PERREAU, F., BOULAY, C., VASS, I., KRIEGER-LISZKAY, A. & KIRILOVSKY, D. 2014. The Cyanobacterial Photoactive Orange Carotenoid Protein Is an Excellent Singlet Oxygen Quencher. *Plant Cell*, 26, 1781-1791.
- SEMCHONOK, D. A., LI, M., BRUCE, B. D., OOSTERGETEL, G. T. & BOEKEMA, E. J. 2016. Cryo-EM structure of a tetrameric cyanobacterial photosystem I complex reveals novel subunit interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1857, 1619-1626.
- SHIPLEY, G. G., GREEN, J. P. & NICHOLS, B. W. 1973. The phase behavior of monogalactosyl, digalactosyl, and sulphoquinovosyl diglycerides. *Biochim Biophys Acta*, 311, 531-44.
- SMARDA, J., SMAJS, D., KOMRSKA, J. & KRZYZANEK, V. 2002. S-layers on cell walls of cyanobacteria. *Micron*, 33, 257-77.
- SOZER, O., KIS, M., GOMBOS, Z. & UGHY, B. 2011. Proteins, glycerolipids and carotenoids in the functional photosystem II architecture. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 16, 619-43.

- SOZER, O., KOMENDA, J., UGHY, B., DOMONKOS, I., LACZKÓ-DOBOS, H., MALEC, P., GOMBOS, Z. & KIS, M. 2010. Involvement of Carotenoids in the Synthesis and Assembly of Protein Subunits of Photosynthetic Reaction Centers of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant and Cell Physiology*, 51, 823-835.
- STAL, L. J. 1995. Physiological ecology of cyanobacteria in microbial mats and other communities. *New Phytologist*, 131, 1-32.
- STAL, L. J. & MOEZELAAR, R. 1997. Fermentation in cyanobacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 21, 179-211.
- STAMATAKIS, K., TSIMILLI-MICHAEL, M. & PAPAGEORGIOU, G. C. 2014. On the question of the light-harvesting role of  $\beta$ -carotene in photosystem II and photosystem I core complexes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 81, 121-127.
- STEFFEN, R., KELLY, A. A., HUYER, J., DORMANN, P. & RENGER, G. 2005. Investigations on the reaction pattern of photosystem II in leaves from *Arabidopsis thaliana* wild type plants and mutants with genetically modified lipid content. *Biochemistry*, 44, 3134-42.
- STRANSKY, H. & HAGER, A. 1970. [The carotenoid pattern and the occurrence of the light-induced xanthophyll cycle in various classes of algae. IV. Cyanophyceae and Rhodophyceae]. *Arch Mikrobiol*, 72, 84-96.
- SUZUKI, R. & FUJITA, Y. 1977. Carotenoid photobleaching induced by the action, of photosynthetic reaction center II: DGMU-sensitivity. *Plant and Cell Physiology*, 18, 625-631.
- SZALONTAI, B., NISHIYAMA, Y., GOMBOS, Z. & MURATA, N. 2000. Membrane dynamics as seen by Fourier transform infrared spectroscopy in a cyanobacterium, *Synechocystis* PCC 6803: The effects of lipid unsaturation and the protein-to-lipid ratio. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1509, 409-419.
- TAKAICHI, S., MAOKA, T. & MASAMOTO, K. 2001. Myxoxanthophyll in *Synechocystis* sp. PCC 6803 is myxol 2'-dimethyl-fucoside, (3R,2'S)-myxol 2'-(2,4-di-O-methyl-alpha-L-fucoside), not rhamnoside. *Plant Cell Physiol*, 42, 756-62.
- TAKAICHI, S. & MOCHIMARU, M. 2007. Carotenoids and carotenogenesis in cyanobacteria: unique ketocarotenoids and carotenoid glycosides. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 2607.
- TASAKA, Y., GOMBOS, Z., NISHIYAMA, Y., MOHANTY, P., OHBA, T., OHKI, K. & MURATA, N. 1996. Targeted mutagenesis of acyl-lipid desaturases in

- Synechocystis: evidence for the important roles of polyunsaturated membrane lipids in growth, respiration and photosynthesis. *The EMBO Journal*, 15, 6416-6425.
- TELFORD, W. G., MOSS, M. W., MORSEMAN, J. P. & ALLNUTT, F. C. T. 2001. Cyanobacterial stabilized phycobilisomes as fluorochromes for extracellular antigen detection by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 254, 13-30.
- TÓTH, T. N., CHUKHUTSINA, V., DOMONKOS, I., KNOPPOVÁ, J., KOMENDA, J., KIS, M., LÉNÁRT, Z., GARAB, G., KOVÁCS, L., GOMBOS, Z. & VAN AMERONGEN, H. 2015. Carotenoids are essential for the assembly of cyanobacterial photosynthetic complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1847, 1153-1165.
- TRAUTNER, C. & VERMAAS, W. F. J. 2013. The *sll1951* Gene Encodes the Surface Layer Protein of *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology*, 195, 5370-5380.
- TUVESON, R. W. & SANDMANN, G. 1993. [28] Protection by cloned carotenoid genes expressed in *Escherichia coli* against phototoxic molecules activated by near-ultraviolet light. *Methods in Enzymology*. Academic Press.
- UENO, M., SAE-TANG, P., KUSAMA, Y., HIHARA, Y., MATSUDA, M., HASUNUMA, T. & NISHIYAMA, Y. 2016. Moderate Heat Stress Stimulates Repair of Photosystem II During Photoinhibition in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant and Cell Physiology*, 57, 2417-2426.
- UMENA, Y., KAWAKAMI, K., SHEN, J.-R. & KAMIYA, N. 2011. Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å. *Nature*, 473, 55.
- VAJRAVEL, S., KIS, M., KLODAWSKA, K., LACZKO-DOBOS, H., MALEC, P., KOVACS, L., GOMBOS, Z. & TOTH, T. N. 2017. Zeaxanthin and echinenone modify the structure of photosystem I trimer in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochim Biophys Acta*, 1858, 510-518.
- VAJRAVEL, S., KOVÁCS, L., KIS, M., REHMAN, A. U., VASS, I., GOMBOS, Z. & TOTH, T. N. 2016.  $\beta$ -Carotene influences the phycobilisome antenna of cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photosynthesis Research*, 130, 403-415.

- VAN DE MEENE, A. M., HOHMANN-MARRIOTT, M. F., VERMAAS, W. F. & ROBERSON, R. W. 2006. The three-dimensional structure of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Arch Microbiol*, 184, 259-70.
- VAN EERDEN, F. J., DE JONG, D. H., DE VRIES, A. H., WASSENAAR, T. A. & MARRINK, S. J. 2015. Characterization of thylakoid lipid membranes from cyanobacteria and higher plants by molecular dynamics simulations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1848, 1319-1330.
- VAN EYKELENBURG, C. 1979. The ultrastructure of *Spirulina platensis* in relation to temperature and light intensity. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 45, 369-90.
- WADA, H. & MURATA, N. 1998. Membrane Lipids in Cyanobacteria. In: PAUL-ANDRÉ, S. & NORIO, M. (eds.) *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics*. Dordrecht: Springer Netherlands.
- WATANABE, M., SEMCHONOK, D. A., WEBBER-BIRUNGI, M. T., EHIRA, S., KONDO, K., NARIKAWA, R., OHMORI, M., BOEKEMA, E. J. & IKEUCHI, M. 2014. Attachment of phycobilisomes in an antenna-photosystem I supercomplex of cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 2512-7.
- WELTI, R., LI, W., LI, M., SANG, Y., BIESIADA, H., ZHOU, H. E., RAJASHEKAR, C. B., WILLIAMS, T. D. & WANG, X. 2002. Profiling membrane lipids in plant stress responses. Role of phospholipase D alpha in freezing-induced lipid changes in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 277, 31994-2002.
- WHITTON, B. A. & POTTS, M. 2000. *The ecology of cyanobacteria : their diversity in time and space*, Boston, Kluwer Academic.
- YAMAMOTO, H. Y. 1979. Biochemistry of the violaxanthin cycle in higher plants. *Pure and Applied Chemistry*.
- YU, B. & BENNING, C. 2003. Anionic lipids are required for chloroplast structure and function in *Arabidopsis*. *Plant J*, 36, 762-70.
- YU, B., XU, C. & BENNING, C. 2002. *Arabidopsis* disrupted in SQD2 encoding sulfolipid synthase is impaired in phosphate-limited growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 5732-5737.
- YURKOV, V., GAD'ON, N. & DREWS, G. 1993. The major part of polar carotenoids of the aerobic bacteria *Roseococcus thiosulfatophilus* RB3 and *Erythromicrobium ramosum* E5 is not bound to the bacteriochlorophyll a-complexes of the photosynthetic apparatus. *Archives of Microbiology*, 160, 372-376.



- ZAKAR, T., HERMAN, E., VAJRABEL, S., KOVACS, L., KNOPPOVÁ, J., KOMENDA, J., DOMONKOS, I., KIS, M., GOMBOS, Z. & LACZKO-DOBOS, H. 2017. Lipid and carotenoid cooperation-driven adaptation to light and temperature stress in *Synechocystis* sp. PCC6803. *Biochimica et biophysica acta*, 1858, 337-350.
- ZAKAR, T., KOVACS, L., VAJRABEL, S., HERMAN, E., KIS, M., LACZKO-DOBOS, H. & GOMBOS, Z. 2018. Determination of PS I oligomerisation in various cyanobacterial strains and mutants by non-invasive methods. *Photosynthetica*, 56, 294-299.
- ZAKAR, T., LACZKO-DOBOS, H., TOTH, T. N. & GOMBOS, Z. 2016. Carotenoids Assist in Cyanobacterial Photosystem II Assembly and Function. *Frontiers in Plant Science*, 7.