

Szegedi Tudományegyetem  
Természettudományi és Informatikai Kar  
Biológia Doktori Iskola

HUN-REN  
Szegedi Biológiai Kutatóközpont  
Növénybiológiai Intézet

**Nem-kettősréteg lipidfázisokat alkotó szerkezeti  
egységek növényi tilakoidmembránokban**

Ph.D. értekezés

**Böde Kinga Ilona**

**HUN  
REN**



Témavezető: Dr. Garab Győző

Szeged

2024

# TARTALOMJEGYZÉK

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

<b>1</b>	<b>ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS</b> .....	<b>6</b>
<b>1.1</b>	<b>A fotoszintézis jelentősége</b> .....	<b>6</b>
<b>1.2</b>	<b>Fotoszintézis magasabb rendű növényekben</b> .....	<b>6</b>
<b>1.3</b>	<b>A tilakoidmembránok ultraszerveződése és energizációja</b> .....	<b>8</b>
<b>1.4</b>	<b>A tilakoidmembrán lipidmátrixa; nem-kettősréteg lipidfázisok</b> .....	<b>11</b>
<b>1.5</b>	<b>Membránmodellek</b> .....	<b>13</b>
<b>1.6</b>	<b>Lipidpolimorfizmus a tilakoidmembránban</b> .....	<b>17</b>
<b>1.7</b>	<b>Membránfúzió in vitro és in vivo</b> .....	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>CÉLKITŰZÉSEK</b> .....	<b>24</b>
<b>3</b>	<b>ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</b> .....	<b>26</b>
<b>3.1</b>	<b>Növényi minták preparálása, főbb jellemzői és kezelései</b> .....	<b>26</b>
3.1.1	Tilakoidmembrán izolálása .....	26
3.1.2	II. fotokémiai rendszerben dús membránpárok (BBY) izolálása .....	26
3.1.3	Marginális régió izolálása.....	27
3.1.4	Klorofilltartalom meghatározása .....	28
3.1.5	Fehérje/lipid arány meghatározása FTIR spektroszkópiával .....	28
3.1.6	TM kezelése glutáraldehiddel (GA) és NaSCN-tal .....	29
3.1.7	BBY membránok enzimkezelése WGL-lel .....	29
3.1.8	BBY membránok szonikálása .....	30
<b>3.2</b>	<b>A lipidfázisok karakterizálása <sup>31</sup>P-nmr spektroszkópiával</b> .....	<b>30</b>
<b>3.3</b>	<b>A tm-ok jellemzése kisszögű szórással</b> .....	<b>31</b>
3.3.1	Kisszögű neutronszerzés (SANS) .....	31
3.3.2	Kisszögű röntgenszerzés (SAXS) .....	31
<b>3.4</b>	<b>A bby morfológiai és biofizikai jellemzése</b> .....	<b>32</b>
3.4.1	Szukróz sűrűséggradiens (SDG).....	32
3.4.2	Mágneses lineáris dikroizmus (LD) spektroszkópia .....	32
3.4.3	Pásztázó elektronmikroszkópia (SEM) .....	33
3.4.4	Gyors klorofill-a fluoreszcencia tranziens mérések .....	33
3.4.5	Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia .....	33
3.4.6	Natív gélelektroforézis (CN-PAGE) .....	34
3.4.7	Denaturáló gélelektroforézis (SDS-PAGE).....	34

3.4.8	1,6-Difenil-1,3,5-hexatrién (DPH) fluoreszcencia élettartam mérések.....	34
<b>4</b>	<b>EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK.....</b>	<b>36</b>
<b>4.1</b>	<b>Az izotróp fázis szerepe a psii membránok fúziójában .....</b>	<b>36</b>
4.1.1	A BBY lipidpolimorfizmusa .....	36
4.1.2	A BBY membránlapok WGL-indukált szétesése.....	43
4.1.3	A BBY lipid-mikrokörnyezeteinek jellemzése és WGL-érzékenységük.....	49
4.1.4	Következtetések.....	52
<b>4.2</b>	<b>Membránkötött fehérjék és a tm lipidpolimorfizmus kapcsolata .....</b>	<b>54</b>
4.2.1	CURT1 proteinben gazdag marginális régió lipidfázisának jellemzői.....	54
4.2.2	Az inverz hexagonális fázishoz kötött proteinek.....	56
4.2.3	Következtetések.....	60
<b>5</b>	<b>ÁLTALÁNOS MEGVITATÁS ÉS KITEKINTÉS.....</b>	<b>62</b>
<b>6</b>	<b>SAJÁT KÖZLEMÉNYEK .....</b>	<b>65</b>
<b>7</b>	<b>KONFERENCIA ELŐADÁSOK ÉS POSZTEREK .....</b>	<b>66</b>
<b>8</b>	<b>ÖSSZEFOGLALÁS .....</b>	<b>68</b>
<b>9</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>71</b>
<b>10</b>	<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....</b>	<b>74</b>
<b>11</b>	<b>FÜGGELÉK .....</b>	<b>77</b>
<b>12</b>	<b>IRODALOMJEGYZÉK.....</b>	<b>81</b>

# RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ATP	Adenozin-trifoszfát
BBY	II. fotokémiai rendszerben dús tapadt membránpárok alkotta partikulum
CD	Cirkuláris dikroizmus
Cit	Citokróm
CN-PAGE	Natív poliakrilamid gélelektroforézis
CURT1	<i>Curvature Thylakoid1</i> protein
CL	<i>Cardiolipin</i> , kardiolipin
DEM	<i>Dynamic Exchange Model</i> , dinamikus kicserélődési modell
DGDG	Digalaktozil-diacilglicerol
DPH	1,6-difenil-1,3,5-hexatrién
Fd	Ferredoxin
Feo	Feofitin
FSM	<i>Flexible Surface Model</i> , rugalmas felszín modell
FTIR	Fourier Transform Infrared, fourier-transzformációs infravörös
GA	Glutáraldehid
H <sub>II</sub>	Inverz hexagonális [lipidfázis]
I	Izotróp
Kl	Klorofill
L	Lamelláris, kettősréteg szerkezetű [lipidfázis]
LD	Lineáris Dikroizmus
LHCI	<i>Light Harvesting Complex I</i> , a PSI fénybegyűjtő proteinkomplexe
LHCII	<i>Light Harvesting Complex II</i> , aPSII fénybegyűjtő proteinkomplexe
LPM	<i>Lateral pressure model</i> , laterális nyomási modell
MGDG	Monogalaktozil-diacilglicerol
MR	Marginális régió
NADP	Nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NaSCN	Nátrium-tiocianát
OJIP	Gyors klorofill-a fluoreszcencia indukció

P <sub>680</sub>	II. fotokémiai rendszer elsődleges elektrondonora
P <sub>700</sub>	I. fotokémiai rendszer elsődleges elektrondonora
PC	Plasztocianin
PG	Foszfatidil-glicerol
PI	Pixelintenzitás
pmf	Proton-motoros erő
<sup>31</sup> P-NMR	Foszfor mágneses magrezonancia
PQ	Plasztokinon
PSI / PSII	<i>Photosystem I / II</i> , I. / II. fotokémiai rendszer
Q <sub>A/B</sub>	A PSII elsődleges/másodlagos plasztokinon elektron akceptora
<i>r</i>	<i>steady-state</i> anizotrópia
RD	<i>Repeat distance</i> , ismétlődési távolság
RF	Rádiófrekvencia
SANS	Kisszögű neutronszerzés
SAXS	Kisszögű röntgenszerzés
SD	Standard deviáció, szórás
SDG	<i>Sucrose density gradient</i> , szukróz sűrűséggrádiens
SDS-PAGE	Nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis
SEM	<i>Scanning electron microscopy</i> , pásztázó elektronmikroszkópia
ST	Szaturáció transzfer
SQDG	Szulfokinofozil-diacilglicerol
TM	Tilakoidmembrán
VDE	Violaxantin de-epoxidáz
WGL	<i>Wheat Germ Lipase</i> , Búzacsíra lipáz

# 1 ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS

---

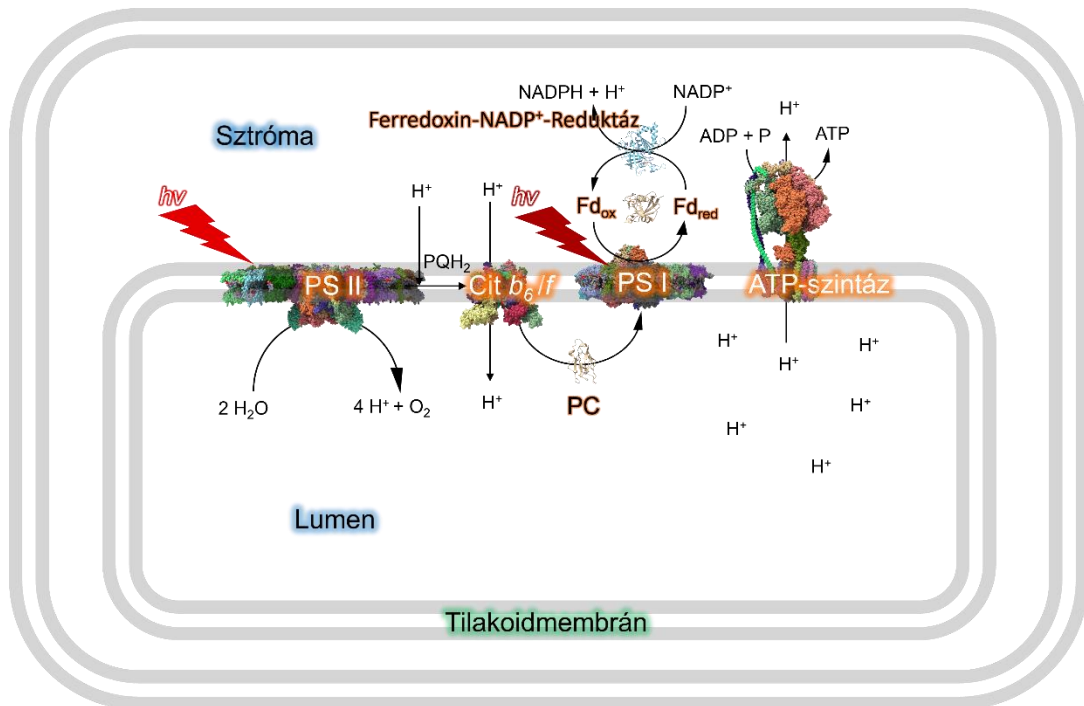
## 1.1 A FOTOSZINTÉZIS JELENTŐSÉGE

Az oxigéntermelő fotoszintetikus folyamatok körülbelül 2,4 milliárd évvel ezelőtt jelentek meg, az első cianobaktériumok evolúciójával. Ezek az organizmusok hosszú távon befolyásolták légkörünket azáltal, hogy jelentősen növelték a légköri oxigénszintet (Blankenship 1992), ezzel előidézve a Nagy Oxigén Katasztrófát. Ez nemcsak Földünk éghajlatát formálta át, hanem az evolúciós folyamatoknak is új irányt szabott. Napjainkban a cianobaktériumok mellett a magasabb rendű növények (*Tracheophyták*) és a színesmoszatok (*Chromisták*) is képesek a napenergiát hasznosítani, azt glükóz és más szerves vegyületek formájában eltárolni. Az eukarióta fotoszintetikus szervezetekben ez a folyamat lencse formájú sejtszervecskében, a kloroplasztisban játszódik le (Austin és Staehelin 2011), ahol a pigment-protein komplexek klorofillban gazdag fénybegyűjtő komplexei elnyelik a napfényt. Az elnyelt fényenergia kémiai energiává alakul: CO<sub>2</sub> és víz felhasználásával glükóz szintetizálódik, miközben melléktermékként oxigén képződik (Blankenship 2021). A fotoszintézis elsődleges energiaforrásként szolgál a növények számára és az oxigéntermelés révén a Föld légkörének létfontosságú összetevőjét szolgáltatja, ami elengedhetetlen a legtöbb életforma fennmaradásához. A fotoszintézissel kapcsolatos ismereteink nemcsak az alapkutatókat, de a gazdasági folyamatok szempontjából is jelentőséggel bírnak. A mezőgazdaságban a fotoszintézis hatékonyságának fokozása a termés hozam növekedéséhez és az élelmezésbiztonság javulásához vezethet, amely kiemelkedően fontos korunkban, amikor a népességnövekedés és az éghajlatváltozás egyre nagyobb kihívást jelent. Az energiaágazatban a megnövekedett biomasza-termelés bioüzemanyagként hasznosítható, ami a fosszilis tüzelőanyagok fenntartható alternatíváját jelentheti.

## 1.2 FOTOSZINTÉZIS MAGASABB RENDŰ NÖVÉNYEKBEN

A fotoszintézis két, egymással összefüggő szakaszra osztható: a fényfüggő reakciókat magában foglaló fényszakaszból és a sötétben is zajló sötétszakaszból. A fényreakciók a kloroplasztis tilakoidmembránjában (TM) zajlanak, és – ahogy a neve is mutatja – fényfüggőek. Ebben a fázisban a klorofillt (Kl) és más pigmentmolekulákat

tartalmazó fénybegyűjtő komplexek (LHCI, LHCII, *light harvesting complex I, II*) fogják be a fényenergiát. A fényelnyelés nagy hatékonyságát a *macromolecular crowding* is segíti, ami lehetővé teszi a lipidekhez képesti magas, fehérjékhez kötött pigmentsűrűséget (Kirchhoff 2008). Az elnyelt fényenergia a II. fotokémiai rendszer (PSII, *photosystem II*) és az I. fotokémiai rendszer (PSI, *photosystem I*) reakciócentrumai felé áramlik. A PSII-ben az elnyelt fény a reakciócentrum P<sub>680</sub>-nak nevezett elsődleges elektrondonorát gerjeszti, ami a legerősebb ismert biológiai oxidálószer. Ezt a P<sub>680</sub><sup>+</sup>Feo<sup>-</sup> töltésszétválasztás követi, ahol a feofitin (Feo) az elsődleges elektronakceptor. Az elektrondonor helyén képződő elektronhiányt vízbontásból származó elektronok pótolják, amelyet Tirozin Z közvetítésével a vízbontó komplex katalizál. A víz oxidációjával egyúttal protonok szabadulnak fel a lumenben és párhuzamosan O<sub>2</sub> képződik melléktermékként. A PSII akceptor oldalán a Feo-ból származó elektron először az elsődleges (Q<sub>A</sub>), majd a másodlagos plasztokinon elektronakceptort (Q<sub>B</sub>) redukálja. A Q<sub>B</sub>, miután protonokat kap a sztrómából, protonálódik és plasztohidrokinont (PQH<sub>2</sub>) képez, amely két elektront és protont szállít a TM hidrofób részén keresztül a citokróm (Cit) *b<sub>6</sub>/f* komplexhez. Itt felszabadítja protonjait a lumenbe, ezáltal tovább csökkenti annak pH-értékét. Eközben az elektronok átáramlanak a Cit *b<sub>6</sub>/f*-en és a vízben oldódó elektronhordozó plasztocianinhoz (PC) kötődnek. A fényelnyelésből származó energia a PSI-ben erősen redukált állapotot idéz elő. A PSI elsődleges elektrondonora, a P<sub>700</sub>, reaktív gyökpárt képez az elsődleges elektronakceptorral, az A<sub>0</sub>-val (P<sub>700</sub><sup>+</sup>A<sub>0</sub><sup>-</sup>). A P<sub>700</sub><sup>+</sup>-t a PC-ből származó elektron redukálja. Az A<sub>0</sub>-ból származó elektron több intermedieren keresztül jut el a ferredoxinhoz (Fd) a TM sztróma felőli oldalán, végül a ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-reduktázhoz (FNR), amely a NADP<sup>+</sup> (nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát) NADPH-vá történő redukcióját katalizálja. A fényreakció végére kialakul egy transzmembrán protongrádiens és elektromos potenciálgrádiens, amelyek elektrokémiai potenciálgrádienset vagy más néven proton-motoros erőt (pmf, *proton motive force*) alkotnak, amely ATP (adenozin-trifoszfát) termelésére fordítódik (1. ábra). Az ATP, illetve a NADPH molekulák energiahordozóként, illetve redukáló erőként is szolgálnak az ezt követő sötét reakciókhoz, amelynek során CO<sub>2</sub> és víz felhasználásával cukrok képződnek (Nelson és Yocum 2006; Ort és Yocum 1996).

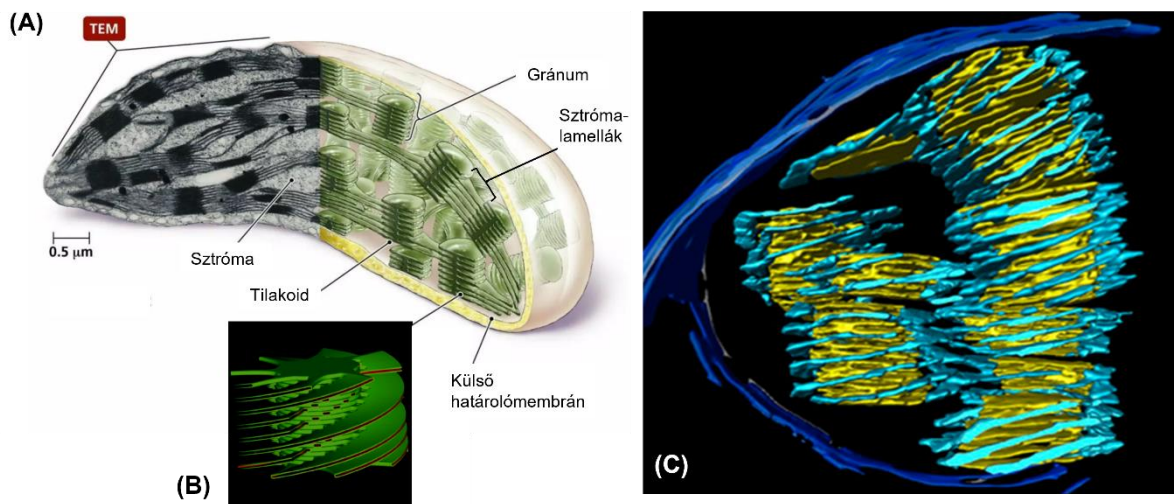


**1. ábra:** A fotoszintetikus elektrontranszportlánc felépítése és szerveződése a TM-ban (Garab és mtsai (2022) nyomán). A protonkapcsolt elektrontranszport a fotoszintetikus apparátus fehérjekomplexein keresztül (PSII (PDB # 5MDX), PSI (PDB # 6IGZ), Cit  $b_6/f$  dimer (PDB # 6RQF)) valósul meg, a mobilis elektronszállító plasztokinon/plasztokinol (PQ), plasztocianin (PDB # 1AG6) és ferredoxin (PDB # 5AUI) molekulák közreműködésével. A transzportfolyamatok révén kialakuló elektrokémiai potenciálgrádienszt az ATP-szintáz (PDB # 6VMB) használja fel az ATP szintézisére.

### 1.3 A TILAKOIDMEMBRÁNOK ULTRASZERVEZŐDÉSE ÉS ENERGIZÁCIÓJA

Az edényes növények TM-jában egyértelmű szerkezeti differenciálódás figyelhető meg. A gránum szorosan egymásra halmozott lapított membránhólyagocskákból áll, ezzel szemben a sztróma lamellák egy kevésbé rendezett, lazább szerveződésű struktúrát alkotva fonják körbe a gránum vezikulumokat (2A, B ábra) (Kouřil és mtsai, 2011; Mustárdy és Garab 2003). Ez a szerkezeti elrendeződés egy komplex háromdimenziós hálózatot hoz létre, amelyben az összefüggő membránrendszer egy belső, lumenális vizes fázist zár magába (Mustárdy és Garab 2003). Ezt a kiterjedt vezikuláris hálózatot számos membránkapcsolat és membránfúzió jellemzi, amelyek elősegítik a molekulák különböző kompartmenteken keresztüli mozgását (2C ábra) (Bussi és mtsai, 2019).





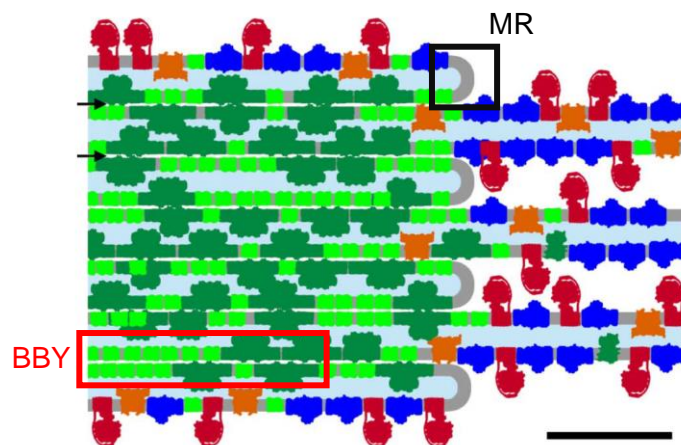
**2. ábra:** Növényi kloroplasztisz és a benne található TM jellegzetes strukturális szerveződése magasabb rendű növényekben. A kloroplasztisz metszetének transzmissziós elektronmikroszkópos és sematikus ábrája (Pearson Education, Inc., Benjamin Cummings) (A), illetve a sztróma tilakoidok gránum körüli helikális elrendeződését mutató számítógépes modell (Mustárdy és Garab 2003) (B); valamint a TM kiterjedt, fúziókban gazdag vezikuláris hálózatának fókuszált ionnyalábos pásztázó elektronmikroszkópos tomográfia felvételekből rekonstruált 3D modellje; sárga: gránum vezikulumok, világoskék: sztróma lamellák, kék: belső és külső burkolómembránok (Bussi és mtsai, 2019) (C).

Az említett két membránterület közötti szerkezeti különbség fehérjeszinten is megfigyelhető (3. ábra). Nevezetesen, a PSII és az LHCII a gránum régiókba ágyazódik (Andersson és Anderson 1980; van Bezouwen és mtsai, 2017), a PSI és az LHCI, valamint az ATP-szintáz pedig jellemzően a sztróma lamellákban található (Pribil és mtsai, 2014). A Cit *b<sub>6</sub>f* komplexek eloszlása egyenletes a membrán régiók között. A két fő, morfológiailag és fehérjeösszetételben is nagy eltéréseket mutató alegységeken kívül további karakterisztikus doméneket is találunk a TM-ban.

A gránum TM-ok szélén található a marginális régió (MR) vagy görbületi zóna, amely digitoninos preparálás során nyerhető ki és a kb. 130 000 x g-s centrifugálás „*loose pellet*”-jeként, azaz „laza üledék”-eként azonosítanak (Koochak és mtsai, 2019). A terület erőteljes görbületének kialakításáért korábban úgy gondolták, hogy az itt feldúsuló nem-kettősréteg lipidek a felelősek (Murphy 1982). Később beigazolódott, – habár a területen nem találunk fényenergia-átalakító pigment-protein komplexeket – az itt megtalálható CURVATURE THYLAKOID1 (CURT1) protein az, amelyik szerepet játszik a nagyfokú görbület (és így a szűk lumen) létrehozásában (Armbruster és mtsai, 2013; Puthiyaveetil és mtsai, 2014; Trotta és mtsai, 2019).

A gránum legbelső régiójából olyan szerkezeti egységeket tudunk szelektíven kinyerni, amelyekből hiányoznak az említett marginális és a gránum végmembrán ATP-

szintázban gazdag területei. Ezek az egyégek pusztán PSII szuperkomplexek membrán „foltjait” tartalmazzák, amelyeket PSII-ben dús membránpároknak vagy más néven BBY szubkloroplasztisz partikulumnak (röviden BBY-nak) nevezünk (a strukturális egységet először izoláló kutatók után) (Berthold és mtsai, 1981). Ezek a „foltok” izolálás után összeolvadnak, fuzionálnak egymással és kiterjedt, több tíz  $\mu\text{m}$ -es membránlapokat alkotnak (Dunahay és mtsai, 1984). A BBY membránokat széles körben használják a PSII szerkezetének és működésének tanulmányozására. A TM-ok frakcionálása detergenssekkel (digitonin és Triton X-100) általánosan alkalmazott módszer a gránum sztróma lamelláktól való elkülönítésére (Dunahay és mtsai, 1984); a Triton X-100 hatékonyabbnak bizonyult (a digitoninhoz képest) az aktív PSII membránok kinyerésében (Yamamoto és mtsai, 2011).



**3. ábra:** A fehérjekomplexek laterális heterogenitásának sematikus ábrája (Dekker és Boekema 2005), amelyben feltüntettem a dolgozatban előforduló szerkezeti elemeket is. Sötétzöld: PSII-LHCII szuperkomplexek és PSII monomerek; világoszöld: LHCII trimerek; sötétkék: PSI; narancssárga: citokróm  $b_6/f$  dimerek; piros: ATP-szintáz. A piros téglalapon a PSII-ben dús tapadt membránpár látható, amely a kiterjedt BBY partikulum szerkezeti egysége; a fekete négyzetben a TM marginális régiója látható; nyilak: a gránum ismétlődő távolsága (RD); lépték: 50 nm.

Ahogy a fentiekben már említettem, a fényreakció közben elektron- és protonátviteli folyamatok zajlanak. Ahogy a lumenális kompartmentben felhalmozódnak a protonok, pmf keletkezik, amely az ATP-szintázon keresztül hajtja a protonokat, katalizálva az ADP és a szervetlen foszfát ATP-vé alakulását Mitchell (1966) kemiozmotikus elméletének megfelelően. Ennek a mechanizmusnak a létrejöttét az biztosítja, hogy a *bulk* lipidmolekulák kettősréteg szerkezetbe rendeződnek, amely megakadályozza a membránon keresztüli víz, ionok és a vízben oldódó vegyületek átáramlását a két vizes kompartment között (Singer és Nicolson 1972). A *bulk* fázist azok

a lipidek alkotják, amelyek nem sorolhatók sem a membránproteinek közvetlen közelében található, és ezért mozgásukban jelentősen korlátozott ún. annuláris vagy héj (*shell*) lipidek közé, sem pedig a membránproteinek strukturális lipidmolekulái közé; ezek általában összefüggő szerkezeteket alkotnak, amelyeken belül a lipidek jelentős szabadsági fokkal rendelkeznek. (Az angol *bulk* helyett zöm vagy zömrész lenne használható, ami azonban nem honosodott meg, ahogy egyelőre a *balk* magyaros átírás sem.)

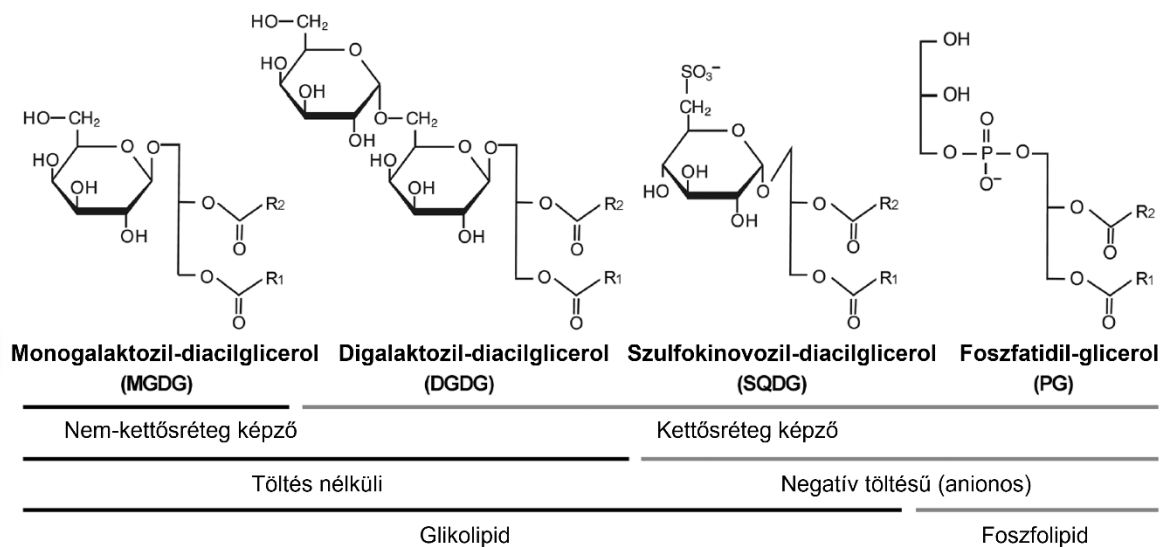
## 1.4 A TILAKOIDMEMBRÁN LIPIDMÁTRIXA; NEM-KETTŐSRÉTEG

### LIPIDFÁZISOK

A TM-ban található lipidmolekulák különböző módon kategorizálhatók alakjuk, fiziko-kémiai jellemzőik vagy a fehérjekomplexekkel való kölcsönhatásuk alapján. A nem-annuláris (vagy strukturális, *non-annular*) lipidek a membránfehérjékbe épülve, mint szerkezeti alkotóelemek, gyakran részt vesznek a fehérjék aktivitásának módosításában vagy konformációs változásaikban (Magyar és mtsai, 2024; Medina-Carmona és mtsai, 2020; Palsdottir és Hunte 2004). Az annuláris (gyűrűs vagy héj) lipidek közvetlenül kapcsolódnak, mintegy gyűrűszerűen körbeveszik a membránfehérjéket, így befolyásolva azok funkcionális és szerkezeti jellemzőit (Páli és mtsai, 2003). Ezzel szemben a *bulk* lipidek nem kapcsolódnak közvetlenül a fehérjékhez; a membrán fő mátrixát alkotják egy rendkívül dinamikus környezetet teremtve. Ezek a lipidek alakítják a membrán számos alapvető fizikai tulajdonságát, mint például a fluiditást, rugalmasságot és permeabilitást, amelyek kulcsfontosságúak a TM-ok integritásának és zavartalan működésének fenntartásához (Siegenthaler és Murata 1998). A laterális heterogenitást mutató fehérjekomplexekkel ellentétben a *bulk* lipidek egyenletes eloszlást mutatnak a különböző membránterületeken (Duchene és Siegenthaler 2000).

A TM lipidek amfipatikus molekulaszervezetét a 4. ábra illusztrálja. A fő vázat egy glicerín molekula adja, amely az *sn-1* és *sn-2* pozíciókban zsírsav oldalláncokkal észterezett. A glicerín harmadik szénatomjához kapcsolódó molekulák szolgáltatják a poláros fejcsoporti régiót: vagy cukor kapcsolódik hozzá, mint a monogalaktozil-diacilglicerol (MGDG), a digalaktozil-diacilglicerol (DGDG) és a szulfokinovozil-diacilglicerol (SQDG) esetében, vagy mint a foszfatidil-glicerolban (PG) egy másik

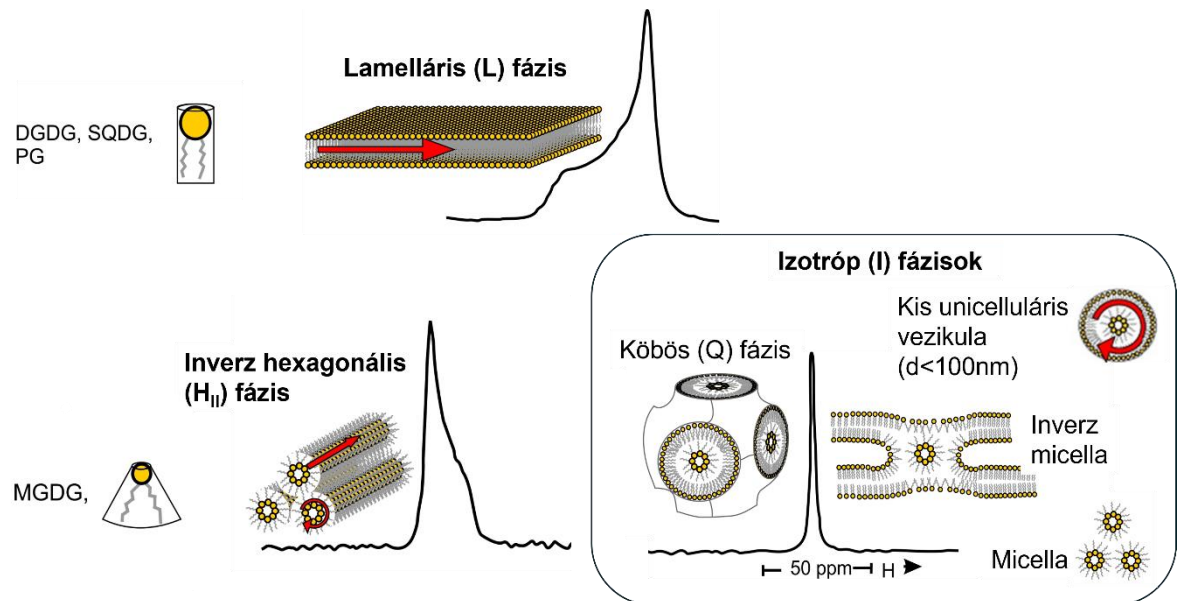
glicerinnel a foszfomonoszteron keresztül (Li-Beisson és mtsai, 2016). A lipidek alakját a fejcsoport mérete, az észterezett zsírsavláncok száma és telítettségük mértéke határozza meg, amely alapján megkülönböztethetünk hengeres alakú kettősréteg-képző vagy lamelláris, és kúpos alakú nem-kettősréteg-képző vagy nem-lamelláris lipideket (Israelachvili és mtsai, 2009).



**4. ábra:** A TM-okban található négy lipidtípus molekulászerkezete, fejcsoportjaik és biofizikai tulajdonságaik szerint kategorizálva (Kobayashi és mtsai (2016) nyomán).

A TM lipidmolekuláinak legnagyobb részét a töltés nélküli MGDG (~50%) és DGDG (~30%) teszi ki. Az MGDG többek között felelős a PSII dimerizációjáért, a két fotokémiai rendszer membránba ágyazódásáért (Garab és mtsai, 2016; Kobayashi 2016), továbbá közrejátszik az ATP-szintáz aktivitásában (Siegenthaler és Murata 1998) és szerves része a Cit *b<sub>6</sub>/f* komplexnek (Georgiev és mtsai, 2012). A fennmaradó lipidek a negatív töltésű SQDG és PG, amelyek mindegyike körülbelül 5-12%-ot tesz ki (Douce és Joyard 1996; Harwood 1998). Az említett lipidek közül az MGDG abból a szempontból kiemelkedő, hogy jellemzően nem képez kettősréteg struktúrát, hanem kúpszerű alakja miatt inkább nem-lamelláris vagy nem-kettősréteg struktúrákba szerveződik (Graham Shipley és mtsai, 1973). Az MGDG lipidek egyrészt más, hasonló geometriával rendelkező lipidekkel együtt néhány nanométertől több száz nanométerig terjedő rendezett mezofázisokat alkotnak (Conn és Seddon 2014); másrészt gyakran önszerveződnek nem-lamelláris, például inverz hexagonális (H<sub>II</sub>), izotróp (I) és köbös fázisokká (Q) (Epanand 1998; Gounaris és mtsai, 1986; Williams 1998). Ez az

önszerveződés olyan lipidkeverékekre is jellemző, amelyek hasonlóan erős nem-kettősréteg-képző tendenciát mutatnak. Foszfolipidek vagy foszfolipideket tartalmazó lipidkeverékek polimorfizmusa  $^{31}\text{P}$ -NMR technikával azonosítható (5. ábra) (Cullis és de Kruijff 1979; Watts 2013). Jelen tudásunk szerint minden biológiai membránban találhatóak nem-lamelláris lipidek; ugyanakkor a membránok felépítését általánosan lamelláris, azaz kettősréteg szerkezetben írják le (Erand 1998; van den Brink-van der Laan és mtsai, 2004).

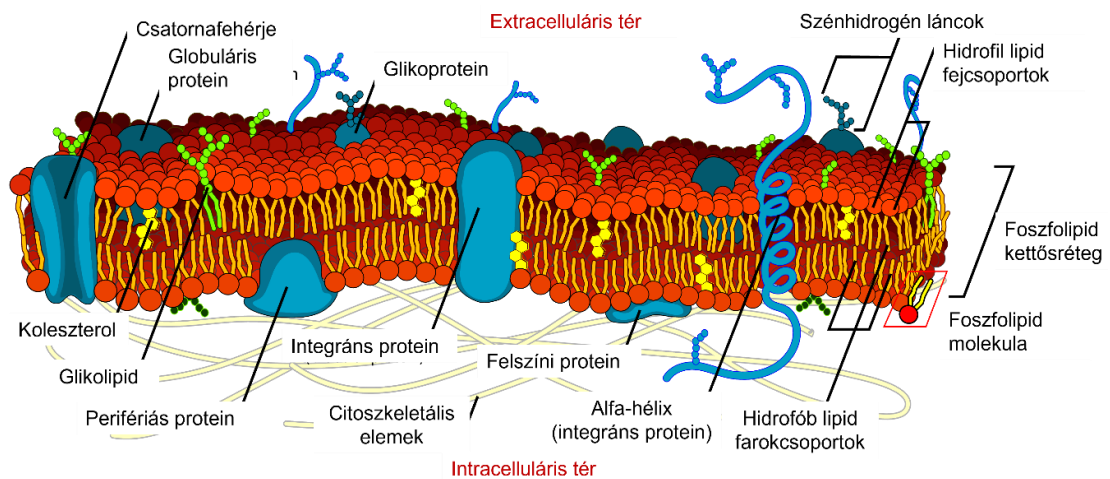


**5. ábra:** A TM-ban található jellegzetes alakú lipidmolekulák (balra) és a lipidekből vizes közegben képződő lipidfázisok sematikus ábrája, valamint  $^{31}\text{P}$ -NMR sávjai (jobbra)(Cullis és de Kruijff (1979); Garab és mtsai (2016) nyomán). A nyilak a lipidek jellegzetes  $^{31}\text{P}$ -NMR technikával követhető mozgását jelzik a  $10^3$ - $10^6$  s-os időtartományban (Watts 2013).

## 1.5 MEMBRÁNMODELLEK

A sejtmembránok alapszerkezetét leíró fluid-mozaik membránmodell Singer és Nicholson (1972) javasolta. Ez a „standard” membránmodell egy 2D-s lipidmátrixon alapul, amelybe fehérjék ágyazódnak vagy perifériásan kötődnek hozzá (6. ábra). A lipidmátrix lehetővé teszi a fehérjék membránon belüli laterális diffúzióját, amely szerepet játszik a sejt szignalizációs, apoptotikus és sejtosztódási folyamataiban. Az egyik legfontosabb funkciója, hogy félig átteresztő membránként elválasztja a sejt intra- és extracelluláris kompartmentjét, így szabályozva a sejtbe bejutó és az abból kijutó anyagok áramlását. A *bulk* lipidmolekulák kettősrétegbe rendeződésével a fluid-mozaik membránmodell – a kettősréteg szerkezet nagyfokú vízzel és ionokkal szembeni

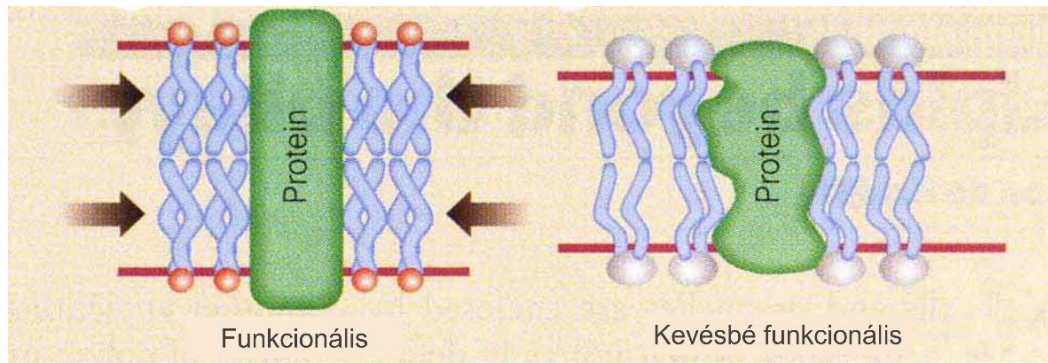
impermeabilitása révén – biztosítja a fotoszintetikus elektrontranszport működését, a pmf felépülését és kemiozmotikus hasznosulását az ATP szintézis során. Ez a modell nem veszi azonban figyelembe a nem-kettősréteg lipidek jelenlétét, amelyek a TM-ok fő lipidfajtái, és nem enged teret a nem-kettősréteg lipidfázisok kialakulásának sem. Ez azért is különös, mivel kimutatták, hogy különböző hidratáltságú lipidrendszerek változatos lipidfázisokba rendeződnek (Gounaris és mtsai, 1986; Luzzati és Spegt 1967; Luzzati és Tardieu 1974; Seddon és Templer 1995b; Williams 1998), illetve egy szigorúan kettősrétegbe rendezett membránrendszer nem tud magyarázattal szolgálni olyan folyamatokra, mint pl. a membránfúziók kialakulása, az ún. frusztrált állapot vagy membrán görbületek létrejötte. Ezt orvosolandó, az elmúlt évtizedekben számos próbálkozás történt a „standard” modell kiegészítésére.



**6. ábra:** A *fluid-mozaik membránmodell* (Singer és Nicholson (1972) nyomán. ([https://en.wikipedia.org/wiki/Fluid\\_mosaic\\_model](https://en.wikipedia.org/wiki/Fluid_mosaic_model) alapján)

A „*Lateral Pressure Model*” (LPM) szerint a kúp alakú, nem-kettősréteg lipidek erős laterális irányú nyomást gyakorolnak a membrán hidrofób régiójára és az abba ágyazódó fehérjékre (7. ábra). Ezt a nyomást az LPM döntő fontosságúnak írja le a fehérjék funkcionális állapotának megőrzésében; a nyomás nélkül a fehérjék kevésbé hatékonyak vagy egyenesen működésképtelenné válhatnak (de Kruijff 1997).

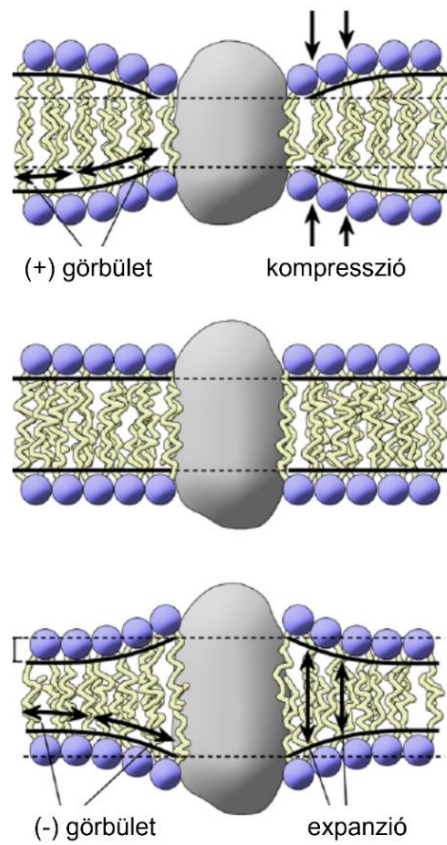




7. **ábra:** A nem-kettősréteg lipidek szerepének sematikus illusztrálása a laterális nyomáskülönbségekre alapozott modellben (LPM). A nem-kettősréteg-képző lipidek oldalirányú nyomást (nyilakkal jelezve) gyakorolnak a membránfehérjékre, ami funkcionális állapotban tartja őket, ellentétben a tisztán lamelláris lipidkörnyezettel (de Kruijff (1997) nyomán).

A „Flexible Surface Model” (FSM) (8. ábra) szerint a membrán lipidek nem-kettősréteg-képző hajloma modulálja a fehérjék energetikáját a rugalmas görbületi energia változásai révén (Brown 2012).

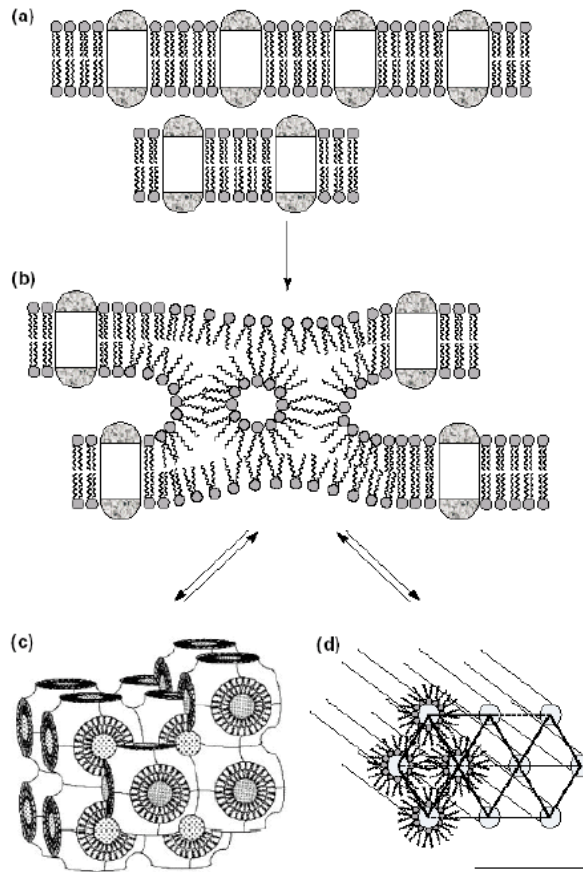
Az LPM és FSM modellek a nem-kettősréteg lipideket és az azok által létrehozott lipidfázisokat pusztán lokális és átmeneti jellegűnek tekintik (van den Brink-van der Laan és mtsai, 2004), azaz nem számolnak ezen lipidfázisok tartós előfordulásával biológiai membránrendszerekben.



**8. ábra:** A lipid-fehérje határfelületen fellépő pozitív, nulla és negatív membrángörbületi erők ábrázolása (fentről lefelé) a rugalmas felületi görbületekre építő modellben (FSM). Az FSM összefüggést feltételez a lipidpolimorfizusból fakadó görbületi feszültség és a fehérje funkciók között. Szürke: fehérje; lila gömbök és halványsárga görbék: a lipidszférikulák hidrofíli és hidrofób részei (Brown 2012).

Ezekkel a modellekkel ellentétben a „*Dynamic Exchange Modell*” (DEM) a kettősréteg és a nem-kettősréteg lipidfázisok dinamikus egyensúlyban való együttes jelenlétét feltételezi; ezt a modellt energiaátalakító membránokra javasolták, amelyekben a nem-lamelláris lipidek jelenléte meghatározó (Garab és mtsai, 2000; Garab és mtsai, 2016). A DEM a nem-kettősréteg lipidek Janus arcán alapul. Kimutatták, hogy ha izolált MGDG-hez LHCII-t adnak, akkor a lipidek kettősréteg szerkezetbe kényszerülnek, kiterjedt LHCII:MGDG lamelláris aggregátumokat képeznek (Simidjiev és mtsai, 2000). Ismert volt az is, hogy amikor erős nem-kettősréteg-képző hajlammal rendelkező lipidkeverék alkotta membránokban nagyobb méretű fehérjementes foltok alakulnak ki, a lipidek tranzienstruktúrákat alkotva szegregálódnak a kettősrétegből (9. ábra) (Seddon és Templer 1995b; Williams 1998).





**9. ábra:** Kettősrétegű és nem-kettősrétegű lipidfázisok dinamikus lipidkicserélését feltételező modell (DEM) sémája. A DEM szerint „normál” körülmények között a fehérjék szoros elrendeződése gátolja a nem-kettősréteg struktúrák kialakulását (a). A membrán fehérjetartalmának csökkenésekor nagyobb lipid foltok alakulhatnak ki, amelyek vizes környezetben intermediereket képezve (b), köbös (c) vagy inverz hexagonális (d) fázisok reverzibilis kialakulásához vezetnek (Garab és mtsai, 2000; Garab és mtsai, 2016).

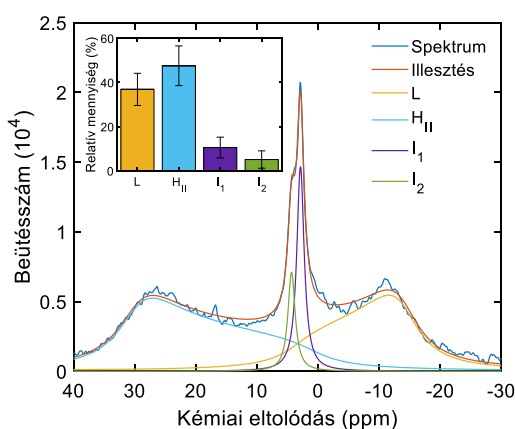
A DEM szerint a nem-kettősréteg-képző lipidek önszabályozó szerepet játszanak a TM-ok és a belső mitokondriális membránok homeosztázisának szabályozásában, biztosítva a magas (~75:25) fehérje-lipid arányt ezekben az alapvető energia-átalakító biológiai membránokban (Garab és mtsai, 2000; Garab és mtsai, 2022). A DEM alkalmazhatóságát számos  $^{31}\text{P}$ -NMR spektroszkópiai kísérlet megerősítette. Lamelláris és nem-lamelláris fázisok párhuzamos jelenlétét funkcionális növényi TM-okban elsőként Krumova és mtsai (2008a) mutatták ki.

## 1.6 LIPIDPOLIMORFIZMUS A TILAKOIDMEMBRÁNBAN

A  $^{31}\text{P}$ -NMR spektroszkópia a foszfolipidek fázisviselkedésének egyik legfontosabb vizsgálati módszere természetes és mesterséges membránokban egyaránt (Cullis és de Kruijff 1979; Schiller és mtsai, 2007; Watts 2013). TM-ok esetében – habár csak egy

foszfolipid típus áll rendelkezésre (PG) – a *bulk* PG molekulák lipidmátrixban való egyenletes eloszlásuk miatt jó indikátorai a lipidfázisok viselkedésének (Duchene és Siegenthaler 2000; Harańczyk és mtsai, 1985; Harańczyk és mtsai, 1995; Krumova és mtsai, 2008a; van Eerden és mtsai, 2015).

Az elmúlt években – magasabb rendű növények leveleiből izolált, funkcionális TM-ok felhasználásával végzett kísérleteknek köszönhetően – tisztázódott, hogy a kettősréteg, vagy lamelláris (L) fázison kívül (legalább) három különböző, nem-lamelláris lipidfázis van jelen: egy inverz hexagonális ( $H_{II}$ ) fázis, és (legalább) két izotróp (I) fázis (Garab és mtsai, 2017; Garab és mtsai, 2022). Szisztematikus kísérletsorozatok és analízisek eredményeként megállapították, hogy a *bulk* lipidek körülbelül 40-40%-a kettősrétegben és  $H_{II}$  fázisban, a fennmaradó 20%-uk pedig I fázisokban található (Dlouhý és mtsai, 2021a). Ezeket az értékeket saját kísérleteim is igazolták (10. ábra). Korábbi kísérletek tanúsága szerint a TM alegységei, a gránum és a sztróma lamellák, az intakt TM-okhoz hasonló lipidpolimorfizmust mutatnak, ami azt jelzi, hogy a membránok fehérje összetétele nem befolyásolja számottevően a TM-ok lipidfázis-viselkedését (Dlouhý és mtsai, 2021a).



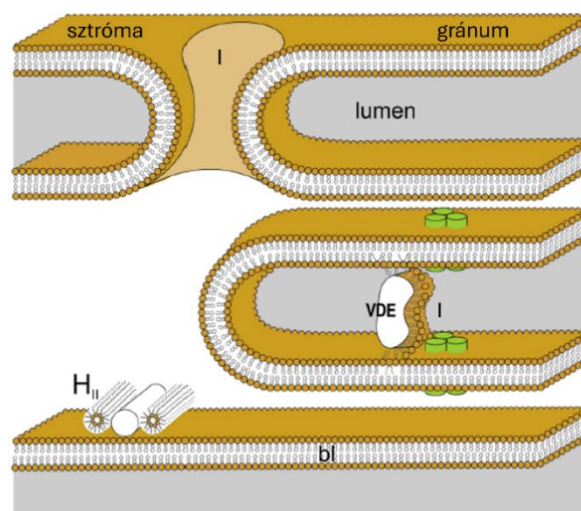
**10. ábra:** A TM  $^{31}\text{P}$ -NMR spektruma és matematikai dekonvolúciója. A spektrumot 10 biológiai ismétlésből átlagoltam, miután azonos KI-koncentrációra ( $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ) és azonos szken számra (1600) normalizáltam; az oszlopdiagram a különböző spektrális komponensek átlagolt relatív hozzájárulásait ábrázolja  $\pm$  szórás. A lipidfázisok relatív megoszlása:  $L = 36,9 \pm 7,3\%$ ;  $H_{II} = 47,6 \pm 9,0\%$ ;  $I_1 = 10,5 \pm 4,7\%$ ;  $I_2 = 5,1 \pm 3,9\%$ . Az eredmények nagyon hasonlóak a korábban közzétett adatokhoz (Dlouhý és mtsai, 2021a).

A TM lipidek mikrokozonyzetének vizsgálata fluoereszcens Merocyanine-540 próba alkalmazásával szintén kimutatta a *bulk* lipidek fiziko-kémiai környezetének heterogenitását; összhangban a  $^{31}\text{P}$ -NMR spektroszkópiával azonosított polimorf fázisviselkedésükkel (Garab és mtsai, 2017; Krumova és mtsai, 2008a). A fázisviselkedést befolyásolja többek között a pufferkörnyezet pH-ja, ionerőssége és a

minta hőmérséklete (Kotakis és mtsai, 2018; Ughy és mtsai, 2019), továbbá a lipidek zsírsavláncainak telítettségi foka is (Garab és mtsai, 2017). Az *Ulva lactuca* nevű zöldsárgában a TM szerkezeti dinamikájának fenntartása érdekében a lamelláris és nem-lamelláris glikolipidek ellentétes hőfüggő viselkedését is megfigyelték megemelt hőmérsékleti viszonyok között (Kostetsky és mtsai, 2018). Továbbá, Demé és mtsai (2014) kimutatták, hogy az MGDG/DGDG arány finomhangolása is befolyással van a lamelláris és nem-lamelláris fázisok közötti reverzibilis átmenetekre, biztosítva a TM nagymértékű flexibilitását.

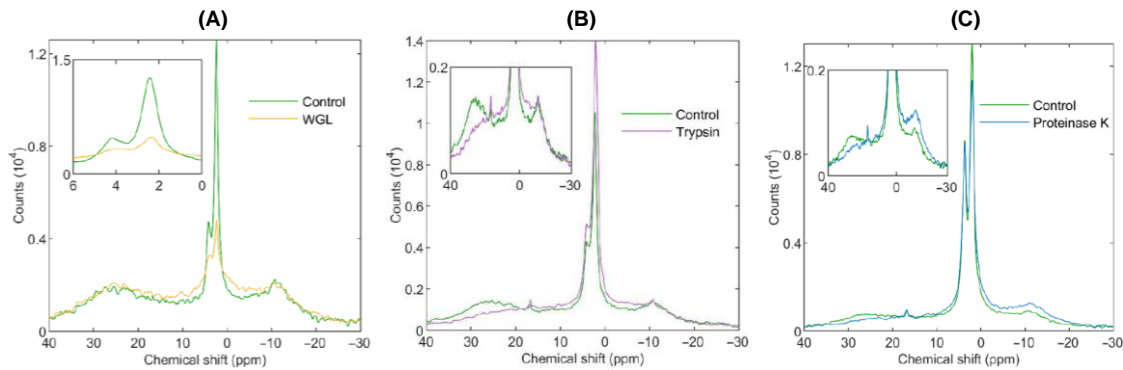
Korábban kimutatták azt is, hogy a TM egy I fázisának alacsony pH és magas hőmérséklet indukálta növekedése szorosan kapcsolódik a vízdékony violaxantin de-epoxidáz (VDE) enzim fényvédő mechanizmusaihoz (Dlouhý és mtsai, 2020). Ezek a natív, fotokémiaiaktív TM-okon kapott eredmények jó összhangban vannak azokkal a modellmembránokon nyert adatokkal, amelyek azt mutatták, hogy a nem-lamelláris lipidfázisok kulcsfontosságúak a VDE aktivitásában (Goss és Latowski 2020; Latowski és mtsai, 2004; Latowski és mtsai, 2002).

A TM-ban azonosított másik I fázist illetően Garab és mtsai (2017) feltételezték, hogy az membránfúziók létrehozásában játszik fontos szerepet; míg a H<sub>II</sub> fázisról azt tartották, hogy azt a TM-ból szegregálódott lipidek hozzák létre, amelyek valamilyen módon még a membrán közelében maradnak (11. ábra).



**11. ábra:** Magasabb rendű növények TM lipidpolimorfizmusának sematikus modellje a DEM alapján; bl: kettősréteg vagy lamelláris fázis; I: izotróp fázisok, amelyek a gránum és a sztróma fúziójához, valamint a VDE-hez és/vagy más lipokalinhoz kapcsolódnak; H<sub>II</sub>: inverz hexagonális fázis a sztrómában - valószínűleg a membránhoz kapcsolódó és lazán kötött membránfehérjékkel kölcsönhatásban; zöld hengerek: a VDE-vel kölcsönható LHCII trimer fehérjék (Garab és mtsai, 2017).

Ezekkel a feltételezésekkel összhangban – különböző enzimkezelésekkel végzett kísérleteink révén – megállapítható volt, hogy ezek a fázisok a fényreakciókért felelős szuperkomplexeket tartalmazó TM doménektől jól elkülönülő szerkezeti egységekben találhatóak (Dlouhý és mtsai, 2022). Ezekben a kísérletekben már én is részt vettem; de a disszertációban – a dolgozat, ill. a kérdéskör tárgyalásának egységes szerkezete érdekében – munkám irodalmi előzményeként mutatom be. Búzacsíra lipáz (WGL) enzimkezelések segítségével megmutattuk, hogy a lipáz szelektíven elnyomta az I fázisokat (12. ábra), miközben nem gyakorolt jelentős hatást egyetlen megfigyelt szerkezeti (membrán permeabilitás, a proteinkomplexek makroorganizációja) vagy funkcionális (PSII fotokémiai aktivitás) paraméterre sem. A H<sub>II</sub> fázisra vonatkozóan pedig azt a meglepő eredményt kaptuk, hogy ez a fázis nagy érzékenységet mutatott proteázokra, nevezetesen a tripszinre és proteináz-K-ra, ami azt jelezte, hogy ez a fázis lipidek sztróma oldali fehérjékkel vagy polipeptidekkel alkotott asszociátumaiból ered, pl. azokat beburkolja (12. ábra) (Dlouhý és mtsai, 2022). Ilyen fehérjeként szóba jöhet a CURT1, amely rendelkezik egy tripszinérzékeny sztróma oldali doménnel (Armbruster és mtsai, 2013), ami azt sugallja, hogy a CURT1-t tartalmazó TM-ok marginális területei H<sub>II</sub> geometriájú lipidfázisokat mutathatnak. További lehetséges jelöltek között a sztróma oldali lipokalin zeaxantin-epoxidáz (Grzyb és mtsai, 2006), a PSI sztrómába nyúló alegységeit (Mazor és mtsai, 2017), a ferredoxin-NADP<sup>+</sup> oxidoreduktázt (Matthijs és mtsai, 1986; Mulo 2011) és a NADPH-dehidrogenázt (Lennon és mtsai, 2003) soroltuk föl (Dlouhý és mtsai, 2022). Érdekes megjegyezni, hogy mitokondriumhoz kötődő kísérletekben kardiolipint (*cardiolipin*, CL) tartalmazó liposzómák felhasználásával kimutatták, hogy a C<sub>it</sub> c H<sub>II</sub> fázis és inverz micellák kialakulását indukálja (de Kruijff és Cullis 1980). Gasanov és mtsai (2018) azt is bizonyították, hogy a mitokondriumok belső membránjában a nem-lamelláris fázisok kialakulása összefügg az ATP-szintáz aktivitásával. Mások a CL szerepét igazolták az ATP-szintáz stabilizálásában, illetve a C-gyűrű forgásának és a protontranszfer elősegítésében (Duncan és mtsai, 2016).



**12. ábra:** Különböző enzimkezelések hatása a TM lipidpolimorfizmusára, amint azt a  $^{31}\text{P}$ -NMR spektrumok változásai mutatják. Kontroll (zöld) és WGL-lel kezelt (sárga) (A), kontroll (zöld) és tripszinnel kezelt (lila) (B) valamint kontroll (zöld) és proteináz K-val kezelt TM minták (C) (Dlouhý és mtsai, 2022).

## 1.7 MEMBRÁNFÚZIÓ IN VITRO ÉS IN VIVO

Mint ahogy azt az 1.3 paragrafusban említettem, a TM kiterjedt vezikuláris hálózatát nagyban meghatározzák a membrán alegységek között kialakuló összeköttetések és fúziók. Ezek a folyamatok többek között a membránrendszer éréséhez valamint a strukturális dinamika és optimális működés megőrzéséhez járulnak hozzá (Ostermeier és mtsai, 2024). A TM-ok szerkezete jelentős reorganizáción mehet keresztül különböző stresszhatások, illetve rövid és hosszútávú környezeti adaptálódás következtében. A gránum egységek emelkedett hőmérséklet hatására (35 °C - 45 °C között) fellazulnak, a membránkapcsolatok átalakulnak. A TM-ok 45 °C fölött vezikularizálódnak és a lipidek a membránból történő szegregációt követően  $\text{H}_{\text{II}}$  fázisokat alakítanak ki (Gounaris és mtsai, 1984). *Arabidopsis thaliana*-ban mérsékelt, ám hosszantartó hőstressz hatására a lipidek szaturáltsági szintje is lecsökken, miközben a DGDG/MGDG arány megnövekszik (Tang és mtsai, 2016), amely a nem-kettősréteg fázisok kialakulása ellen hathat. Megemelkedett hőmérséklet ellen cukrok vagy más ozmotikumok (trehalóz, betain) is védelmet nyújthatnak, amint azt a PSII megnövekedett hőstabilitása is jelzi (Kotakis és mtsai, 2018; Williams és mtsai, 1992). Ilyen ozmotikumok magas koncentrációban a lipidek membránból való szegregálását eredményezik, amelyek  $\text{H}_{\text{II}}$  fázisokat alkotnak. A változó fényviszonyokhoz való alkalmazkodási stratégia részeként alakult ki az állapot átmenet (*state transition*), amely a fotoszintetikus apparátus gyors alkalmazkodását teszi lehetővé. A folyamat során a TM-ban fellépő szerkezeti átrendeződésben elengedhetetlen a membránok között meglévő kapcsolatok felbomlása, illetve azok fúziója, különös tekintettel a gránum és a sztróma

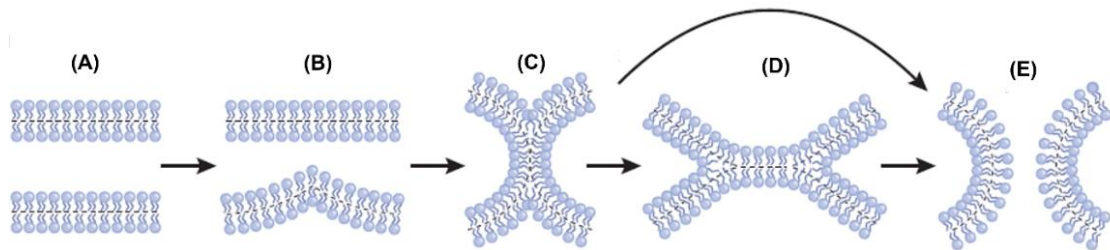
lamellák közötti határfelületen (Chuartzman és mtsai, 2008). A gránum rétegek elmozdulásai feltehetően követik ezeket a lokális eseményeket, ami végül a teljes membránhálózat makroszkopikus átrendeződéséhez vezet. Összességében tehát elmondhatjuk, hogy ezek a jelenségek nagy eséllyel más olyan adaptációs vagy membránérési folyamatokra is jellemzők, amelyek a TM-ok szerkezeti átrendeződésével járnak együtt. Ezek pontos mechanizmusa még nem tisztázott.

A membránfúzió megértése nem csak a TM szempontjából fontos, de alapvető jelentőséggel bír a legtöbb sejtfolyamat szempontjából is (Rast és mtsai, 2015; Stefan és mtsai, 2017). Az intenzív kutatások ellenére a biológiai membránok fúziójának molekuláris és fizikai mechanizmusa(i) messze nem tisztázott(ak) (Brukman és mtsai, 2019). Mindazonáltal elmondható, hogy a membránok lipidösszetétele rendkívül fontos tényező, amely befolyásolja többek között a membrándinamikát, hatással van a hidratációs erőkre, a membrángörbület kialakulására, valamint a lipidek és fehérjék közötti kölcsönhatásokra (Meher és Chakraborty 2019; Pabst és mtsai, 2014).

A kutatások elsősorban a fehérjék által közvetített fúziós eseményekre összpontosítanak; ezek a munkák vírus eredetű fúziós fehérjékre, például a HIV gp41-re, az influenza hemagglutininra, valamint a SNARE fehérjékre fókuszálnak (Risselada és Grubmüller 2012). A TM-ban azonosított fúziós fehérjeként megemlíthetjük a 30 kDa-os belső membránhoz kapcsolódó fehérjét (IM30), amelyet plasztisz vezikula-indukáló fehérje 1-ként (vipp1) is ismernek, és amely létfontosságú a TM biogeneziséhez és életképességéhez (Gao és Xu 2009; Heidrich és mtsai, 2017; Siebenaller és Schneider 2023), valamint a fényvédelemben fontos Fzl-t, amely szintén részt vesz fúziós folyamatok elősegítésében (Findinier és mtsai, 2019; Siebenaller és mtsai, 2019). Fontos megjegyeznünk azonban, hogy a membránfúzió végbemehet dedikált fehérjék hiányában is (Chernomordik és Kozlov 2003). TM-ból izolált gránum és sztróma alegységek elektrontomográfias vizsgálatai is megmutatták, hogy ezek a partikulumok izolálásukat követően önmagukkal fuzionálnak, vezikuláris szerkezeteket alkotnak (Dlouhý és mtsai, 2021b), ami erőteljesen utal a TM-ok spontán fúziójának lehetőségére.

A nem-lamelláris szerkezeteket formáló lipidek jelentős szerepet játszanak a fúzió indukálásában és stabilizálásában. Ezek az folyamatok egy erősen görbült, úgynevezett köztes struktúrán, hemifúzió keresztül valósulnak meg (13. ábra) (Akimov és mtsai, 2020; Chernomordik és Kozlov 2008; Joardar és mtsai, 2022; Marrink és mtsai, 2009; Yaghmur és mtsai, 2014), amelyet fúziós *stalk*nak is neveznek. Ez az intermedier elem

szintűgy megfigyelhető a lamelláris fázis  $H_{II}$  fázisba való átalakulás során (Kozlov és mtsai, 1989; Siegel és Epanand 1997; van Eerden és mtsai, 2015). Az a tény, hogy mind a fehérje által közvetített, mind a tisztán lipid alapú fúziós események hemifúzió keresztül valósulnak meg, arra utal, hogy a folyamat mögött álló alapvető mechanizmust túlnyomórészt a lipidszinterhatások szabályozzák (Chernomordik és Kozlov 2003).



**13. ábra:** A lipid kettősrétegmembrán fúziója hemifúziós intermediereken keresztül (Chernomordik és Kozlov 2008). Fúzió előtti érintkezés (A); egy pontszerű membránnyúlvány minimalizálja a közvetlen érintkezésbe kerülő membránrétegek között fellépő repulzív erőket (B); hemifúziós stalk kialakulása a membránok összeolvadásával (C); a stalk kiterjedése, ami kialakítja a hemifúziós diafragmát (D); a hemifúziós membránból vagy közvetlenül a stalkból fúziós pórus alakul ki (E). A szaggatott vonalak a monorétegek hidrofób felületeinek határait mutatják.

## 2 CÉLKITŰZÉSEK

---

Doktoranduszi munkám a nem-kettősréteg lipidfázisok eredetének tisztázására irányul és szerepük megállapítására magasabb rendű növények tilakoidmembránjainak önszerveződésében és szerkezeti rugalmasságában. Kutatásaim megkezdése előtt – elsősorban  $^{31}\text{P}$ -NMR spektroszkópia alkalmazásával – már azonosították ezeket a nem-lamelláris fázisokat intakt, funkcionálisan aktív TM-okban, és a lipidek fázisviselkedését befolyásoló környezeti és funkcionális tényezőket is feltártak.

Ahogy erre az 1.6 részben utaltam, ebbe, a nemzetközi együttműködés keretében folyó projektbe különböző lipáz és proteáz enzimek TM lipidpolimorfizmusára gyakorolt hatásainak vizsgálatával kapcsolódtam be. A WGL TM lipidpolimorfizmusra gyakorolt hatásának vizsgálata során azt találtuk, hogy ez a lipáz szelektíven roncsolta az I fázis(oka)t, miközben a membrán permeabilitást, valamint a pigment-protein komplexek szerkezetét és funkcióját nem károsította. Ez arra utalt, hogy a WGL-érzékeny I fázis(ok) a fotoszintetikus szuperkomplexeket beágyazó kettősrétegektől elkülönült domén(ek)ből ered(nek); összhangban azzal a korábban publikált hipotézissel, hogy a TM-ok fúziójában az I fázis(ok) fontos szerepet játszik (játszanak). Ugyanezen vizsgálatsorozat során derítettünk fényt arra, hogy a  $\text{H}_{\text{II}}$  fázis érzékeny proteázokra, ami arra engedett következtetni, hogy ez a fázis sztróma oldali fehérjék (vagy oldalláncok) és lipidek asszociációjából ered; ennek természetére több lehetséges proteint is számba vettünk. Ezen tények és feltételezések birtokában kezdtem meg szisztematikus kutatásaimat az I fázis membránfúzióban betöltött szerepére és a  $\text{H}_{\text{II}}$  fázis eredetére vonatkozóan. Ennek megfelelően célkitűzéseimet két részre és az azokhoz kapcsolódó alfeladatokra bontottam.

### *1. Bizonyítani az I fázis szerepét a membránfúzióban.*

A cél elérése érdekében egy olyan membránrendszert kerestünk, amely viszonylag kevés komponensből áll, kevés szerkezeti elemet tartalmaz – így könnyebben kezelhető és alkalmas lehet jövőbeli részletesebb szerkezeti és molekuláris dinamikai vizsgálatokra is. Ezen feltételek alapján választottuk a BBY membránokat, amelyek kiterjedt, összeolvadt membránlapokat formálnak, és amelyekről úgy gondoltuk, hogy a fúzió csak lipid-mediált lehet. A következő részfeladatok megoldását láttam szükségesnek:



- 1/a  $^{31}\text{P}$ -NMR spektroszkópia segítségével jellemezni a BBY membránok lipidpolimorfizmusát, validálni a spektrális komponenseket szaturáció transzfer kísérletek és matematikai dekonvolúció alkalmazásával;
- 1/b bizonyítani az I fázis WGL-érékenységet, és morfológiai és biofizikai vizsgálatokkal megmutatni ennek a fázisnak a szerepét a kiterjedt membránlapokat alkotó BBY fúziójában; valamint
- 1/c független módszerrel, a DPH lipofil festékmolekula fluoreszcencia élettartamának analizisével bizonyítékot szolgáltatni arra, hogy a BBY (és a TM-ok) *bulk* lipidmolekulái valóban heterogén fiziko-kémiai környezetben található; továbbá megmutatni a WGL-hatás szelektivitását.

2. Azonosítani  $H_{II}$  fázist befolyásoló tényezőket.

A  $H_{II}$  fázis kialakításában résztvevő sztróma oldali fehérjék közül még nem vizsgáltuk a marginális régióban elhelyezkedő tripszinérzékeny CURT1 proteinek lehetséges szerepét. Irodalmi adatok utalnak arra is, hogy a lipidek fázisviselkedését a rendszer hidratáltsági szintje erősen befolyásolja. Ennek megfelelően célul tűztem ki a következő két feladat megoldását:

- 2/a a marginális régió lipidpolimorfizmusának jellemzése  $^{31}\text{P}$ -NMR spektroszkópia segítségével, különös tekintettel az ott található CURT1 protein lehetséges hozzájárulására a  $H_{II}$  fázishoz;
- 2/b a fehérjék szolvatációs burkát befolyásoló kaotróp Hofmeister-só, a NaSCN, hatásának vizsgálata a TM-ok  $H_{II}$  fázisára ill. lipidpolimorfizmusára.

## 3 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

---

### 3.1 NÖVÉNYI MINTÁK PREPARÁLÁSA, FŐBB JELLEMZŐI ÉS KEZELÉSEI

A spenót leveleket a piacról szereztem be, majd ezt követően mindig 4 °C-on, sötétben tároltam kb. 24 órát, majd preparálás előtt jéghideg ioncserélt vízben átmostam és papírtörőn szárítottam. A minták preparálása jégen történt, 4 °C-os pufferekkel és alacsony fényintenzitáson. A centrifugálási lépések szintén 4 °C-on történtek.

#### 3.1.1 Tilakoidmembrán izolálása

TM preparáláshoz Lambrev és mtsai (2007) által leírt protokollt követtem. Körülbelül 100 g spenót levelet homogenizáltam 200 mL A pufferben (1. táblázat) konyhai botmixerrel. A homogenizálás rövid impulzusokból állt, hogy elkerüljem a szuszpenzió túlmelegedését. Ezután a homogenizált keveréket 2 réteg finom nylon anyagon szűrtem át és 500 × g-vel 2 percig centrifugáltam. Az így kapott felülúszót centrifugacsövekbe öntöttem és 6 000 × g-vel 10 percig centrifugáltam. A kloroplasztiszokat tartalmazó csapadékot 10 másodperces ozmotikus sokknak vettem alá, amikor 10 mL hipotóniás B pufferben (1. táblázat) ecsettel felszuszpendáltam, majd azonnal azonos térfogatú, kétszeres ozmotikus koncentrációjú 2A puffert adtam hozzá. Ezt a szuszpenziót 6 500 × g-vel, 10 percig centrifugáltam. Végül a TM-t tartalmazó üledéket kis mennyiségű A pufferben szuszpendáltam fel.

1. táblázat: TM izoláláshoz használt pufferek összetétele

A puffer	50 mM tricín, pH 7,5, 0,4 M szorbitol, 5 mM MgCl <sub>2</sub> , 5 mM KCl
B puffer	50 mM tricín, pH 7,5, 5 mM MgCl <sub>2</sub> , 5 mM KCl
2A puffer	50 mM tricín, pH 7,5, 0,8 M szorbitol, 5 mM MgCl <sub>2</sub> , 5 mM KCl

#### 3.1.2 II. fotokémiai rendszerben dús membránpárok (BBY) izolálása

A BBY izolálás során a Yamamoto és mtsai (2011) által leírt protokollt követtem lépésről-lépésre. A körülbelül 100-150 g tömegű spenótleveleket 300 mL BBY1 oldattal (2. táblázat) homogenizáltam hasonlóan a fentebb leírtakhoz, átszűrtem, majd 6 000 × g-vel 10 percig centrifugáltam. A felülúszót leöntöttem és az üledéket 80 mL BBY1 oldatban ecset segítségével óvatosan újra szuszpendáltam, majd 400 × g-vel 30 másodpercig centrifugáltam. A következő lépésben a felülúszót 35 000 × g-vel, 7 percig

centrifugáltam, majd az üledéket 40 mL BBY2 oldatban szuszpendáltam fel és az előző paraméterekkel ismét lecentrifugáltam. Ezután körülbelül 7 mL BBY3 oldatban felvettem a pelletet, és megmértem a keverék végső térfogatát ( $a$  mL). Meghatároztam a szuszpenzió KI-koncentrációját ( $b$  mg KI mL<sup>-1</sup>), majd 2,5 mg KI mL<sup>-1</sup>-re állítottam be úgy, hogy hozzáadtam  $((a \times b / 2.5) - a)$  mL BBY3 oldatot. Ezután a szuszpenzió  $\frac{1}{4}$  térfogatát adtam hozzá BBY3-T oldatból ügyelve a habosodás elkerülésére. Ezzel a folyamattal 2 mg KI mL<sup>-1</sup> végső KI-koncentrációt értem el, a Triton-X-100 és KI súlyarányának 14:1 arányban. A keveréket ezután 10 percig óvatosan kevertetem mágneses keverővel, majd a szuszpenziót  $35\,000 \times g$ -vel 15 percig centrifugáltam. Az üledéket 40 mL BBY3 oldatban felvettem és  $3\,000 \times g$ -vel 3 percig centrifugáltam. Ezután a felülúszót vittem tovább és  $35\,000 \times g$ -vel, 20 percig centrifugáltam. Végül kis mennyiségű BBY3 oldatban felsuszpendáltam a pelletet és megmértem a KI-koncentrációját. A frissen izolált BBY mintát vagy jégen tároltam, és még aznap elvégeztük a méréseket, vagy  $-80\text{ °C}$ -on tároltam több napig vagy hétig; olykor a frissen előkészített mintát fagyasztás-kiolvadás ciklusoknak vetettük alá. A tárolási módtól függetlenül a minták következetes eredményeket mutattak minden kísérlet során.

2. táblázat: BBY izoláláshoz használt pufferek összetétele

BBY1	20 mM tricin–NaOH, pH 8,0, 0,4 M NaCl, 0,2% BSA, 2 mM MgCl <sub>2</sub>
BBY2	20 mM tricin–NaOH, pH 8,0, 0,15 M NaCl, 0,2% (w/w) BSA (borjúszérum albumin), 5 mM MgCl <sub>2</sub>
BBY3	40 mM MES–NaOH, pH 6,5, 0,4 M szukróz, 10 mM NaCl, 5 mM MgCl <sub>2</sub>
BBY3-T	14% (w/v) Triton X-100 B3-ban

### 3.1.3 Marginális régió izolálása

Az MR izolálásához a Suorsa és mtsai (2015) által leírt protokollt követtem lépésről-lépésre. A spenótleveleket ugyanúgy előkezelttem, mint az előbbieken, majd körülbelül 150-200 gramm levelet homogenizáltam 200 mL jéghideg LP1 pufferben (3. táblázat), majd két réteg nylon anyagon átszűrtem, ezt követően pedig  $5\,000 \times g$ -vel  $4\text{ °C}$ -on 4 percig centrifugáltam. Ezután a kapott üledéket 30-40 mL LP2 pufferben felsuszpendáltam és ismét lecentrifugáltam  $5\,000 \times g$ -vel 4 percig. Az üledéket 30-40 mL LP4 pufferben felsuszpendáltam, amit egy újabb centrifugálás követett ugyanazon paraméterekkel, majd az üledéket kis mennyiségű LP4 pufferben szuszpendáltam fel. A

térfogatot LP3 pufferrel beállítottam 0,5 mg Kl mL<sup>-1</sup>-re és digitonint (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA) adtam hozzá 0,4% (w/v) végső koncentrációban. A szuszpenziót 8 percig kevertetem mágneses keverővel szobahőmérsékleten, majd 1000 × g-vel 3 percig centrifugáltam. Ezután a felülúszót centrifugáltam 30 percig 10 000 × g-vel a gránum elkülönítéséhez. Az így kapott felülúszót további 30 percig 40 000 × g-vel centrifugáltam, majd a felülúszót további 1 órán át 144 000 × g-vel centrifugáltam a sztróma lamellák (kemény üledék) és a membrán görbületi (MR) frakció (laza üledék) elkülönítésére. A laza pelletet kiszívtam a csőből egy fecskendővel, Eppendorf-csőbe gyűjtöttem és Amicon Ultra szűrőegységekkel bekonzentráltam, végül megmértem a minta Kl-koncentrációját és -80 °C-on tároltam felhasználásig.

3. táblázat: MR izolálásához használt pufferek összetétele

LP1 puffer	50 mM HEPES/KOH (pH 7,5), 330 mM szorbitol, 5 mM MgCl <sub>2</sub> , 2,5 mM aszkorbát, 0,05% (w/v) BSA
LP2 puffer	50 mM HEPES/KOH (pH 7,5), 5 mM szorbitol, 5 mM MgCl <sub>2</sub>
LP3 puffer	15 mM Tricin (pH 7,8), 100 mM szorbitol, 10 mM NaCl, 5 mM MgCl <sub>2</sub>
LP4 puffer	50 mM HEPES/KOH (pH 7,5), 100 mM szorbitol, 5 mM MgCl <sub>2</sub>

### 3.1.4 Klorofilltartalom meghatározása

Az izolátumok Kl-koncentrációjának meghatározásához 5 µL mintát adtam 2 mL 80%-os acetonhoz (v/v %), 2 percig vortexszel kevertetem, majd 2 percig 10 000 × g-vel centrifugáltam. Az abszorbanciát 646,6 nm-en és 663,6 nm-en mértem egy 1 cm-es optikai úthosszúságú küvettában kétsugaras spektrofotométerrel. A Kl-koncentrációt Porra és mtsai (1989) egyenletei alapján számoltam ki:

$$\text{Kl-a (mg/mL)} = (12,25 A_{663,6} - 2,55 A_{646,6}) \times \text{hígítási faktor}$$

$$\text{Kl-b (mg/mL)} = (20,31 A_{646,6} - 4,91 A_{663,6}) \times \text{hígítási faktor}$$

$$\text{Kl a+b (mg/mL)} = (7,34 A_{663,6} + 17,76 A_{646,6}) \times \text{hígítási faktor}$$

### 3.1.5 Fehérje/lipid arány meghatározása FTIR spektroszkópiával

Az FTIR mérésekhez 100 µL TM vagy BBY szuszpenziót 4-5 mg Kl mL<sup>-1</sup> mennyiségben 1 mL D<sub>2</sub>O alapú PBS oldatban hígítottam, majd 2 percig 10 000 × g-n centrifugáltam (PBS, foszfát pufferelt sóoldat). A felülúszó kiöntése után a pelletet ismét

D<sub>2</sub>O-alapú PBS-oldatban szuszpendáltam. Ezeket a lépéseket háromszor ismételtem a teljes H<sub>2</sub>O - D<sub>2</sub>O csere érdekében. Az utolsó centrifugálás után kinyert üledéket alumínium távtartóval elválasztott CaF<sub>2</sub> ablakok közé rétegeltem, majd a Bruker Vertex70 FTIR spektrométer hőmérséklet-szabályozott mintatartójába helyeztem. Minden spektrumhoz 512 interferogramot rögzítettem 4 000 és 900 cm<sup>-1</sup> között, 2 cm<sup>-1</sup> spektrális felbontással. A minták infravörös abszorpciós spektrumát a Bruker Opus szoftver beépített parancssor alapján rögzítette, miután a levegőn mért háttérrel kivonta az egyes minták mért spektrumából.

A fehérje/lipid arány meghatározására (Szalontai és mtsai, 2000) a zsírsavakból eredő észter C=O, és a fehérjékből eredő amid I spektrális régiót használtam, amelyet a tézisben „észter+amid I” régiónak nevezek 1800 és 1595 cm<sup>-1</sup> között. Az említett régióra 3. rendű polinom függvényt illesztettem és levontam az alapvonal korrekciójához. Az „észter+amid I” régióban az 1750 és 1700 cm<sup>-1</sup> közötti C=O és az 1700 és 1600 cm<sup>-1</sup> közötti amid I sávok relatív intenzitásának meghatározásához *Skew-Gaussian* illesztést alkalmaztam (Zucchelli és mtsai, 1990). Az amid I és C=O régiók görbe alatti területeinek meghatározása után a kettő arányából számoltam ki a fehérje/lipid arányt. Az adatelemzést a MATLAB beépített függvényeinek használatával végeztem.

### **3.1.6 TM kezelése glutáraldehiddel (GA) és NaSCN-tal**

Az izolált TM-kat A puffer alapú NaSCN-törzsoldattal kezeltem 0,5 M végkoncentrációban szobahőmérsékleten. A kezelést minden esetben közvetlen a mérések előtt kezdtem meg. A GA előkezelt mintáknál a NaSCN-kezelés előtt 5 percig inkubáltam a mintát 2%-os végkoncentrációban GA-dal, majd hozzáadtam 0,5 M végkoncentrációban a NaSCN-törzsoldatot.

### **3.1.7 BBY membránok enzimkezelése WGL-lel**

Az izolált BBY membránokat WGL emésztésnek vetettük alá; a WGL egy szubsztrát nem specifikus általános tri-, di- és monoglicerid hidroláz/lipáz (Kublicki és mtsai, 2021). A WGL-t (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA) 5-50 U mL<sup>-1</sup> koncentráció tartományban alkalmaztuk; a kezeléseket 5 °C-on, illetve szobahőmérsékleten végeztük. Korábban vékonyréteg-kromatográfiával igazolták, hogy a WGL emésztí a fő TM-lipidet, az MGDG-t (Dlouhý és mtsai, 2022).

### 3.1.8 BBY membránok szonikálása

A BBY-minták szonikálását jégen végeztem egy 3 mm átmérőjű szondaheggyel felszerelt Vibracell Model VCX 750 (Sonics and Materials, Danbury, CT, USA) segítségével. Az eljárás  $3 \times 15$  másodperces szonikálási periódusból állt 20%-os impulzuserősséggel, amelyeket egy-egy egyperces pihenő intervallum választott el egymástól.

## 3.2 A LIPIDFÁZISOK KARAKTERIZÁLÁSA $^{31}\text{P}$ -NMR SPEKTROSKÓPIÁVAL

A  $^{31}\text{P}$ -NMR spektroszkópiai méréseket egy Avance Neo 600 MHz-es NMR spektrométeren (Bruker, Billerica, MA, USA) végeztük BBFO SmartProbe szondával felszerelve, amelyet a Dlouhý és mtsai (2021a) által leírtak szerint a foszfor atommag frekvenciájára hangoltak. Körülbelül 700  $\mu\text{L}$  koncentrált mintát (KI-koncentráció 8-10  $\text{mg mL}^{-1}$ ) töltöttünk 5 mm átmérőjű NMR-csővekbe, és a jel/zaj arányt figyelembe véve mértük meg adott szkennelészámmal. Meggyőződünk arról, hogy a BBY membránokat már  $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$  KI-koncentrációjú szuszpenzióban sem tudjuk mágneses térben orientálni, ami körülbelül négyszer alacsonyabb koncentráció a  $^{31}\text{P}$ -NMR spektroszkópiában jellemzően használt értéknél (Dlouhý és mtsai, 2022); ez nyilvánvalóan a részecskék véletlenszerű koagulációjának köszönhető, ami akadályozza a részecskék mágneses térben való rendeződését. Ez a megállapítás összhangban van a korábbi megfigyelésekkel, ahol a TM szuszpenzió keverése nem befolyásolta a  $^{31}\text{P}$ -NMR spektrumok jellemzőit (Krumova és mtsai, 2008a).

A spektrumok felvételéhez  $40^\circ$ -os rádiófrekvencia (RF) impulzusokat alkalmaztunk 0,5 mp impulzusok közötti idővel,  $^1\text{H}$ -decoupling nélkül (Krumova és mtsai, 2008a). Mérési referenciaként 85%-os (v/v)  $\text{H}_3\text{PO}_4$  oldatot használtunk.

A különböző lipidfázisok spektrális alakjának meghatározására és a  $^{31}\text{P}$ -NMR spektrumok matematikai dekonvolúciójához szaturáció transzfer (ST) kísérleteket végeztünk (Dlouhý és mtsai, 2021a; Krumova és mtsai, 2008a). Ennek során alacsony teljesítményű RF-impulzusokat alkalmaztunk a különböző lipidfázisokra jellemző frekvenciákon 0,3 mp-ig, amit 0,2 mp-es  $40^\circ$  impulzusok követtek 0,5 mp-es ismétlési idővel. Az impulzus pre-szaturációs intenzitását a telített csúcs intenzitása alapján állítottuk be, a térerősséget pedig 80 és 40 Hz-ben határoztuk meg lamelláris és az I fázisok esetében. A  $^{31}\text{P}$ -NMR spektrumokat a KI-tartalom és a mérési idő alapján

normalizáltuk, amelyeket a jel/zaj arány javítása érdekében átlagoltunk. A  $^{31}\text{P}$ -NMR adatok feldolgozásához a TopSpin szoftvert (Bruker, Billerica, MA, USA) használtuk; a spektrumok matematikai dekonvolúcióját a DMfit szoftverrel (Dominique Massiot, Orléans, Franciaország) végeztük (Massiot és mtsai, 2002), amely a különböző lipidfázisokra jellemző spektrális profilokat mutatott (Cullis és de Kruijff 1979; Watts 2013). Az adatokat a MATLAB R2020b (MathWorks, Inc., Portola Valley, CA, USA) és a spektroszkópai adatelemzésre szolgáló Spectr-O-Matic eszköztár (Dr. Petar H. Lambrev, HUN-REN SZBK) segítségével ábrázoltuk.

### **3.3 A TM-OK JELLEMZÉSE KISSZÖGŰ SZÓRÁSSAL**

#### **3.3.1 Kisszögű neutronsóráás (SANS)**

A SANS méréseket a Budapesti Neutron Center (BNC, Budapest) „Yellow Submarine” műszerével végeztük. A mérés hideg forrásban moderált, monokromatizált neutronokkal történt ( $\lambda = 8,11 \text{ \AA}$ ), a mintáról szóródott neutronokat pedig  $\text{BF}_3$  detektorral regisztráltuk (minta-detektor távolság: 5,34 m). A SANS mérésekhez a mintákat a kontraszt növelése érdekében  $\text{D}_2\text{O}$ -alapú pufferben felszuszpendáltuk a korábban leírtak szerint (Nagy és mtsai, 2011). Az  $\sim 1 \text{ mg mL}^{-1}$  KI-koncentrációjú TM szuszpenziót 2 mm-es úthosszúságú kvarc küvettába töltöttük és  $\sim 0,7 \text{ T}$  elektromágneses térben orientáltuk, növelve a Bragg-helyzetben lévő TM-ok számát, ezáltal javítva a mérés jel/zaj arányát. Az adatokat a beeső neutronok számára normalizáltuk, az üres küvettából és a Cd-blokkolt neutronsugárból kapott hátttereket kivontuk, majd detektorhatásfokra korrigáltuk. A minták 1D-s szóráprofilját, a 2D-s szóráprofilok radiális átlagolásával kaptuk, amelyet a direkt nyaláb középpontja körüli két  $45^\circ$ -os szektorban végeztünk el (Nagy és mtsai, 2013). Az adatok kiértékelésére a BerSANS programot használtuk (Keiderling 2002).

#### **3.3.2 Kisszögű röntgensóráás (SAXS)**

A SAXS méréseket a CREDO (Wacha és mtsai, 2014), egy transzmissziós geometriájú, berendezéssel végeztük (HUN-REN, Természettudományi Kutatóközpont, Budapest). A TM mintákat vékonyfalú, átlagosan 1,2 mm külső átmérőjű kvarc kapillárisokba töltöttük. A kapillárisokat légmentesen lezártuk és alumínium mintatartóba helyeztük a mintakamrába, amelyet a mérések idejére vákuum alá helyeztünk. A méréseket monokromatizált és kollimált  $\text{Cu K}_\alpha$  sugárzással (0,1542 nm hullámhossz)

végeztük, a szórásmintázatot a  $0,02 - 5 \text{ nm}^{-1}$  tartományban rögzítettük, megkapva ezzel a  $q$  szórásváltozó függvényében mért intenzitás spektrumokat ( $q = (4\pi/\lambda)\sin\Theta$ , ahol  $2\Theta$  a szórásszög és  $\lambda$  a röntgensugárzás hullámhossza). A minták mérési ideje  $\sim 1,5$  óra volt. Annak érdekében, hogy a kísérlet során értékelni lehessen a minta és a műszer stabilitását, az expozíciókat 5 perces egységekben végeztük. Az adatokat a mintára eső nyalábintenzitás, a geometriai hatások, a röntgenfotonok mintán való elnyelődése és a berendezés geometriájából származó háttérjel, valamint a szórásváltozó ( $q, \text{nm}^{-1}$ ) és a differenciális szórási hatás-keresztmetszet fizikai egységeire (abszolút intenzitás,  $\text{cm}^{-1} \times \text{sr}^{-1}$ ) (Wacha és mtsai, 2014) korrigáltuk. A korrigált és kalibrált 2D-s szórásprofilokat azimutális irányban átlagoltuk, hogy 1D-s szórásgörbéket kapjunk.

### **3.4 A BBY MORFOLÓGIAI ÉS BIOFIZIKAI JELLEMZÉSE**

#### **3.4.1 Szukróz sűrűséggrádiens (SDG)**

A kezeletlen, enzimkezelt és szonikált minták méretváltozásának megállapításához a mintákat SDG oszlopon centrifugáltam. Az SDG csövek elkészítéséhez centrifugacsövekbe rétegeztem alulról fölfelé 1,5, 1,3, 1,1, 0,9, 0,7 és 0,5 M szukróz koncentrációjú pufferoldatot (50 mM Tricin, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM KCl, pH 7,5), majd  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ -on, lengőfejes rotorban 10 percig  $3\ 000 \times g$ -vel centrifugáltam. A centrifugálás után a minták közötti méreteloszlás változásának szemikvantitatív meghatározásához a csöveket lefényképeztem és 8 bites szürkeárnyalatos képpé alakítottam ImageJ szoftver (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) segítségével. A cső mentén tíz egyenlő nagyságú régiót választottam ki, mint „érdeklődési területet” (ROI, *region of interest*). Minden ROI-ban meghatároztam a pixelintenzitás (PI) átlagos értékét, amely 0 és 255 (=  $\text{PI}_{\text{max}}$ ) közé esett. Ezáltal a  $\text{PI}_{\text{max}} - \text{PI}$  a kiválasztott térfogat optikai sűrűségére jellemző érték.

#### **3.4.2 Mágneses lineáris dikroizmus (LD) spektroszkópia**

Az LD-t a kezeletlen és a WGL-kezelt mintákról JASCO J-815 spektropolariméterrel (Jasco, Tokió, Japán) mértem 400 és 750 nm közötti hullámhossztartományban, 100 nm/perc szkennelési sebességgel. A méréseket szobahőmérsékleten végeztem 2 nm-es sáv szélességgel és 1 nm-es adattávolsággal. A minták KI-koncentrációját  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ -re állítottam be és 1 cm optikai úthosszúságú kvarcküvetében mértem. A különböző enzimkoncentrációjú enzimkezeléseket



közvetlenül a küvetták 0,7 T mágneses térerősséget biztosító mágneses mintatartóba helyezése előtt kezdtem (Kiss és mtsai, 1986). A külső mágneses tér a membránokat a mezővektorra merőleges síkjukkal igazította, így biztosítva a membránok élükkel rendezett (*edge-aligned*) helyzetét (Garab és van Amerongen 2009).

### 3.4.3 Pásztázó elektronmikroszkópia (SEM)

A kontroll és a WGL-kezelt membránfrakciókat 2,5%-os glutáraldehidben fixáltuk, külső mágneses térben a felszínnel párhuzamosan orientáltuk, és 1 órán keresztül poli-L-lizin bevonatú polikarbonát filteren ülepítettük. Az 1%-os OsO<sub>4</sub>-ban történő 50 perces posztfixálás után a mintákat növekvő etanol-koncentrációjú vizes oldatokban dehidratáltuk, kritikus ponton szárítottuk, 5 nm-es arannyal fedtük be Quorum Q150TES (Quorum Technologies, Lewes, UK) porlasztással, majd JEOL JSM-7100F/LV pásztázó elektronmikroszkópban (JEOL, Tokió, Japán) figyeltük meg.

### 3.4.4 Gyors klorofill-a fluoreszcencia tranziens mérések

A gyors klorofill-a fluoreszcencia (OJIP) tranzienseket a 20 µg mL<sup>-1</sup> Kl-koncentrációjú mintákon mértem Handy-PEA fluoriméterrel (Hansatech Instruments Ltd., Pentney, Egyesült Királyság). A mintákat 10 percig sötétben adaptáltam, majd vörös fényel világítottam 3 másodpercig, 1500 µmol foton m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> fotonfluxus sűrűséggel. A tranzienseket a maximumra normalizáltam. A PSII fotokémiai aktivitását és szerkezeti dinamikáját jellemző  $F_v/F_m$  arányt (Sipka és mtsai, 2021) a következőképpen számoltam ki:  $(F_m - F_o)/F_m$ , ahol  $F_m$  és  $F_o$  a maximális, illetve minimális fluoreszcencia szintek.

### 3.4.5 Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia

A kezeletlen és a WGL-kezelt minták CD spektrumait JASCO J-815 spektropolariméterrel (Jasco, Tokió, Japán) 400 és 750 nm között, 100 nm/perc szkennelési sebességgel rögzítettem. A méréseket szobahőmérsékleten végeztem, 2 nm-es sávszélességgel és 1 nm-es adattávolsággal. A minták Kl-koncentrációját 30 µg mL<sup>-1</sup>-re állítottam be, és 1 cm optikai úthosszúságú kvarcküvettában mértem. A CD-spektrumokat a 680 nm körüli abszorbancia-maximumokra normalizáltam, 750 nm referencia hullámhosszal. A különböző koncentrációjú enzimkezeléseket közvetlenül a küvetták mintatartóba helyezése előtt kezdtem el.

#### **3.4.6 Natív gélelektroforézis (CN-PAGE)**

A natív gélelektroforézist Karlický és mtsai (2016) nyomán végeztük el, kisebb módosításokkal (Karlický és mtsai, 2021). A kezeletlen és WGL-kezelt BBY mintát enyhe n-dodecil- $\alpha$ -D-maltoziddal ( $\alpha$ -DM) szolubilizáltuk 35:1  $\alpha$ -DM:KI arányban 10 percig, 4 °C-on, majd  $21,000 \times g$ -vel, 10 percen keresztül centrifugáltuk. A minták felülúszójából (ami a szolubilizált pigment-protein komplexeket tartalmazza) 10  $\mu$ g KI-t tartalmazó alikvotokat mértünk a zsebekbe (4,5-11,5%-os gradiens poliakrilamid gél), majd 3,5 órán keresztül, 4 °C-on futtattuk sötétben folyamatosan emelkedő feszültség alatt, 75-től 200 V-ig.

#### **3.4.7 Denaturáló gélelektroforézis (SDS-PAGE)**

A BBY preparátumokból a fehérjéket (Pavlovič és mtsai, 2016) munkája nyomán extraháltuk. Az SDS-PAGE-et 8,5%-os gyűjtő és 12%-os szeparáló poliakrilamid géllal végeztük, amely 0,1% nátrium-dodecil-szulfátot (SDS, Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA) tartalmazott. A BBY szuszpenziókból 10 mg teljes KI-tartalomnak megfelelő mennyiséget mértünk be, majd 90 percig 120 V-on futtattuk.

#### **3.4.8 1,6-Difenil-1,3,5-hexatrién (DPH) fluoreszcencia élettartam mérések**

A DPH (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA) az egyik leggyakrabban használt lipofil fluoreszcens próba a lipidmembránok dinamikai és szerkezeti tulajdonságainak vizsgálatára. A DPH fluoreszcencia-élettartamának változását WGL-kezelés hatására a próba különböző (mikro)környezetben való mozgási tulajdonságainak felmérése érdekében Fluorolog-3 (FL3-222) spektrofluorométerrel (Horiba, Jobin Yvon, Kiotó, Japán) mértem. A 0,2 mM DPH törzsoldatot THF-ben (tetrahydrofuran, Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA) oldva készítettem el és sötétben tároltam -20 °C-on. A mérések előtt a DPH-t 10  $\mu$ g KI mL<sup>-1</sup> végkoncentrációjú TM és BBY szuszpenzióhoz adtam 3  $\mu$ M végkoncentrációban és 15 percig szobahőmérsékleten inkubáltam. A DPH emissziós spektrum felvételéhez a mintákat  $\lambda_{exc} = 370$  nm-en gerjesztettem, 5 nm-es résszélességgel és  $\lambda_{em} = 385$  és 625 nm között detektáltam, 7 nm-es résszélességgel. Az anizotrópia méréseket Dobrikova és mtsai (1997) és Yamamoto és mtsai (2013) szerint végeztem kisebb módosításokkal.

A gerjesztési és emissziós hullámhosszok  $\lambda_{\text{exc}} = 370$  és  $\lambda_{\text{em}} = 460$  nm voltak, 5 és 12 nm-es résszélességgel. A *steady-state* anizotrópia ( $r$ ) értékeket a

$$r = \frac{I_{vv} - I_{vh}}{I_{vv} + 2I_{vh}}$$

egyenlet alapján számoltam ki (Lakowicz 2006), ahol  $I$  a fluoreszcencia intenzitás, a „ $v$ ” és „ $h$ ” pedig a gerjesztési és emissziós polarizátorok vertikális és horizontális beállításaira utalnak. A fluoreszcencia élettartam meghatározásához a mintákat  $\lambda_{\text{exc}} = 371$  nm-es csúcsintenzitású NanoLED-370 lézerrel, 1,2 ns-os impulzusokkal gerjesztettem és 5 nm-es résszélességgel  $\lambda_{\text{em}} = 440$  nm-en detektáltam. Fényszóró közegként vízben szuszpendált, 0,01%-os Ludox AS30-at (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA) használtam a műszer válaszfüggvényének előállításához. A fluoreszcencia lecsengési görbéket időkorrelált fotonzámláló spektrométerrel, 0 – 150 ns közötti időintervallumban, 10 000 beütésszámig rögzítettem DataStation v2.2. szoftverrel. A lecsengési kinetikákat a DAS6 (Horiba Ltd., Kiotó, Japán) szoftver segítségével, az alábbi egyenlet alapján, 3 exponenciális függvénnyel illeszttem. Ezek minőségét a  $\chi^2$  érték ( $\sim 1,2$ ) alapján ítélt meg.

$$F(t) = B + A_1 \times e^{(-t/\tau_1)} + A_2 \times e^{(-t/\tau_2)} + A_3 \times e^{(-t/\tau_3)}$$

## 4 EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

---

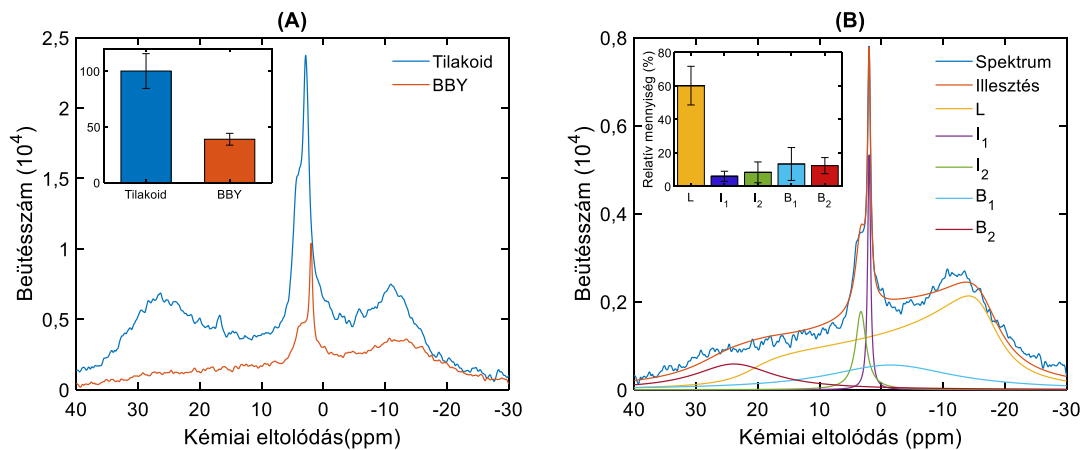
### 4.1 AZ IZOTRÓP FÁZIS SZEREPE A PSII MEMBRÁNOK FÚZIÓJÁBAN

#### 4.1.1 A BBY lipidpolimorfizmusa

Ahogy az 1.7-es paragrafusban kitértem rá, a TM-ban kialakult kiterjedt vezikuláris hálózat és szerkezeti dinamika létrejötte többek között attól is függ, hogy a membránok mennyiben képesek fúziókat és elágazásokat létrehozni (Bussi és mtsai, 2019; Garab és mtsai, 2022). Ugyancsak említettem az izolált gránum és sztróma membránok fúziós hajlamát (Dlouhý és mtsai, 2021b). Annak érdekében, hogy közvetlen kísérleti bizonyítékot szerezzünk az I fázis(ok) membránfúzióban való szerepéről, PSII-ben dús tapadt membránpárokat (BBY membránokat) használtunk, amelyek a gránum belső régiójából származó, összetapadt membránfragmentumokból állnak (a gránum végmembránok és a MR nélkül); ezek átmérője kb. 300 - 500 nm, és hajlamosak kiterjedt membrán lemezek kialakítására, amit a membránfragmentumok laterális fúziója okoz (Dunahay és mtsai, 1984).

A BBY membránok lipidpolimorfizmusának meghatározására  $^{31}\text{P}$ -NMR spektroszkópiát alkalmaztunk. Amint azt a 14. ábra mutatja, a frissen izolált BBY membránok  $^{31}\text{P}$ -NMR spektruma nagyban hasonlít a TM spektrumához, bár néhány jól meghatározott különbség is felfedezhető.

A TM-hoz képest a BBY spektrumainak integrált jelintenzitása jelentősen alacsonyabb volt ( $38,8 \pm 5,3\%$ -a (14A ábrabetét)), mint a TM-ban mért és hasonló körülmények között izolált mintáké. Ezek az adatok összhangban vannak korábbi tanulmányokkal, amelyek szerint a BBY részecskék lipidtartalma, valószínűleg a detergens használata miatt jelentősen alacsonyabb, mint a mechanikai fragmentálással nyert gránum TM-oké (Haferkamp és Kirchhoff 2008) és az intakt TM-oké (Kirchhoff és mtsai, 2002). Mindemellett fontos megjegyezni, hogy a BBY partikulumokban vizsgált lipidprofil számottevően nem különbözik a TM-okban azonosítottaktól (Depalo és mtsai 2004, Ventrella és mtsai 2007). A BBY alacsonyabb lipidtartalmát FTIR spektroszkópiai méréseink is megerősítették (F1. ábra – Függelék). A BBY részecskék lipidpolimorfizmusában megfigyelhető másik jelentős különbség TM-okhoz képest a  $\text{H}_{\text{II}}$  fázis, azaz a 25 ppm körüli széles aszimmetrikus sáv (Garab és mtsai, 2022) hiánya.



**14. ábra:** Frissen izolált BBY és TM preparátumok  $^{31}\text{P}$ -NMR spektrumai (A) és a BBY spektrum matematikai dekonvolúciója (B). A spektrumokat 12 (BBY) és 10 (TM) biológiai ismétlésből átlagoltam, miután azonos  $\text{Kl}$ -koncentrációra ( $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ) és azonos szken számra (1600) normalizáltam. Az oszlopdiagramok a görbe alatti területek relatív értékeit mutatják  $\pm$  szórás (SD); az (A) ill. (B) panelben a TM spektrumának integrált területét, ill. a BBY spektrális komponenseinek összegét tekintetem 100%-nak.

Ahogy azt a 1.6-os szekcióban ismertettem, a  $\text{H}_{\text{II}}$  fázis szerepe a TM-okban a sztróma oldali fehérjékkel vagy polipeptidekkel kapcsolatban merült fel (Dlouhý és mtsai, 2022). A BBY membránok azonban nem rendelkeznek sztrómával érintkező doménnel – amely magyarázatot ad a  $\text{H}_{\text{II}}$  fázis hiányára. Továbbá, enyhe tripszinkezelés – amely megszünteti az  $\text{H}_{\text{II}}$  fázist a TM-okban (Dlouhý és mtsai, 2022) – nem gyakorolt hatást a BBY részecskék  $^{31}\text{P}$ -NMR spektrumára (F2. ábra – Függelék).

Hasonlóan a TM-okhoz, a BBY membránokban is azonosítottam a L fázis jellegzetesen széles, -10 ppm körül található spektrális komponensét. Ezenkívül az I fázisokhoz tartozó éles csúcsokat is detektáltunk 0 és 5 ppm között, hasonló paraméterekkel, mint a TM-okban. Ezt az átlagolt ( $n = 12$ )  $^{31}\text{P}$ -NMR spektrumok matematikai dekonvolúciója is megerősítette, amely a L fázist és két éles I csúcsot ( $I_1$  és  $I_2$ ) is azonosított, körülbelül 2 és 3,5 ppm-es pozíciókkal (14. ábra). A L fázis a teljes intenzitás  $60,2 \pm 11,6\%$ -ért felelős, 12 minta átlagolt spektrumának dekonvolúciója alapján. Az  $I_1$  és  $I_2$  fázisok intenzitása  $5,9 \pm 3,0\%$  és  $8,3 \pm 6,2\%$  volt. Érdeemes megjegyezni, hogy az I fázisok relatív hozzájárulása a BBY-ban ( $\sim 14\%$ ) nem különbözik jelentősen a TM-okban találhatóától ( $\sim 16\%$ ) (10. ábra).

A BBY-ban a ST kísérletek (F3. ábra – Függelék) és az azon alapuló matematikai dekonvolúció két további komponens jelenlétét mutatták ( $B_1$  és  $B_2$ ), 0 és 20 ppm körüli széles szimmetrikus sávokkal,  $13,3 \pm 9,6\%$  és  $12,3 \pm 4,8\%$  intenzitásokkal, ami sokkal összetettebb spektrális összetételre utal, mint amire számítottunk. Fontos megjegyezni, hogy a jel/zaj arány, különösen a  $B_2$  esetében, nem teszi lehetővé, hogy a spektrális

eloszlásáról biztos megállapításokat tegyünk. Mindazonáltal, további jellemzésük érdekes lehet, mivel úgy tűnik, hogy a BBY membránok lipidfázis-viselkedése eltér az intakt TM-okétól.

Az I fázisokkal kapcsolatban szeretném megjegyezni, hogy „izotróp átlagolt spektrális komponenseket” („*isotropic averaging spectral components*”) már megfigyeltek korábban különféle biológiai és modellmembránokban (de Kruijff és mtsai, 1980). Ezért azok megjelenése TM-okban és BBY-ban nem igazán váratlan – tekintettel ezen membránok magas MGDG tartalmára. Ahogy korábban beszámoltak róla, a TM-okban az I fázisok csúcspozíciói viszonylag széles intervallumban mozognak a hőmérséklet és a pH változásaival (Dlouhý és mtsai, 2020) – ezek a nagyrészt reverzibilis változások arra utalnak, hogy az I fázisok csúcspozíciói és relatív amplitúdói a lipidek fiziko-kémiai környezetétől függenek. A TM lipid környezetének heterogenitására a lipofil fluoreszcencia festék, a Merocyanin-540 használatával végzett időfelbontású fluoreszcencia spektroszkópia is utal, amely érzékeny a helyi dielektromos állandóra (Garab és mtsai, 2017; Kotakis és mtsai, 2018; Krumova és mtsai, 2008b).

Az I lipidfázisok spektrális jellemzői alapján megállapítható, hogy ezek kis kiterjedésű, gyorsan mozgó doménekből származnak. Megjelenésük a BBY-ban nem meglepő, hiszen korábbi szisztematikus tanulmányaink alapján, hasonló tulajdonságú lipidfázisok találhatóak minden optimálisan funkcionáló TM és szubkloroplasztisz membrán preparátumokban. Felmerülhet a gyanú, hogy a detektált <sup>31</sup>P-NMR spektrum valójában lipidcseppek jelenlétét jelzi. Habár a TM-ban jelen vannak zsírsavban gazdag „plasztoglobulusok”, amelyek a kloroplasztiszban dinamikus kapcsolatban állnak a TM-nal (Shivaiah és mtsai, 2022); ezek hozzájárulását a TM-okban megfigyelt polimorfizmushoz korábban kizártuk (Dlouhý és mtsai, 2022). Más típusú lipidcseppek is felhalmozódhatnak a kloroplasztiszokban, például erős fényviszonyoknak kitett *Chlamydomonas* esetében (Goold és mtsai, 2016). Bár a TM-okban a lipidcseppek előfordulását nem lehet kizárni, nagyon valószínűtlen, hogy jelentős mértékben hozzájárulnának a TM-ok lipidpolimorfizmusához, amely konzisztensen, minden TM izolátumban megfigyelhető, beleértve a fiatal, érett és öregedő borsó levelekből izolált TM-okat is (Dlouhý és mtsai, 2022). Továbbá, olyan irodalmi adatok, amelyek a TM-hoz képest lipidhiányos BBY-ban lipidcseppek jelenlétére utalnak, nem ismertek.

A B<sub>1</sub> és B<sub>2</sub> komponensek megjelenésével kapcsolatban fontos megjegyezni, hogy sem az intakt TM-okban, sem a gránum és sztróma preparátumokban nem találtak hasonló

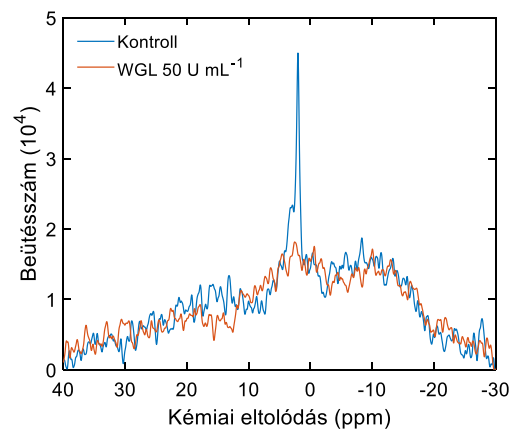
komponenseket (Dlouhý és mtsai, 2021a; Garab és mtsai, 2022), így ezekre beazonosítatlan komponensként tekintünk. Ezek a fehérjekomplexeket körülvevő rigid (annuláris) lipidgyűrűkből detergens kezelés hatására fellazult lipidmolekulákból származhatnak, amelyek jelenlétét normális esetben a  $^{31}\text{P}$ -NMR nem érzékeli.

Az ismertetett adatok, a szakirodalmi adatokkal együttvéve, lehetővé teszik számunkra, hogy megbecsüljük a  $^{31}\text{P}$ -NMR-rel detektálható *bulk* lipidmolekulák mennyiségét és eloszlását a különböző lipidfázisok között. Mindez azért lehetséges, mivel korábban kimutatták, hogy a PG homogén módon oszlik el a *bulk* fázisban (Duchene és Siegenthaler 2000; van Eerden és mtsai, 2015). Azonban fontos leszögezni, hogy ez a heterogenitás nem jellemző a fehérjekomplexekhez kötődő lipidmolekulákra (Hözl és Dörmann 2019; Yoshihara és Kobayashi 2022); ezek az úgynevezett szerkezeti (nem-annuláris) lipidmolekulák nem járulnak hozzá a mért spektrumokhoz. Általánosan elfogadott, hogy a gránum tilakoidok átlagos fehérjelefedettsége körülbelül a felület 70%-át teszi ki (Haferkamp és Kirchhoff 2008), így 30% marad a lipideknek. Valóban, a Boekema és mtsai (2000) által közölt tanulmány elektronmikroszkópos felvételeken alapuló 5. ábrájának képfeldolgozásával, vagyis a PSII gránumban elfoglalt elrendeződésével kapcsolatban azt találtuk, hogy a lipidek részaránya 30,4% az összterületből (F4. ábra – Függelék).

A következő elemi számítások segítségével megpróbáltam megbecsülni az I fázis alkotta gyűrű vastagságát a BBY kerületén. Megközelítésünkben, egy átlagos gránumot vettünk alapul, amelynek átmérője 500 nm (Mazur és mtsai, 2020). A fenti értékek alapján kiszámítottam, hogy egy gránum membrán teljes felülete  $196\,350\text{ nm}^2$ ; és hogy ebből a lipidek  $59\,690\text{ nm}^2$  területet foglalnak el. Becslések szerint, amelyek alapján a lipidek 60%-a tartozik a *bulk* lipidfázishoz és 40%-uk a fehérje körüli rigid lipidgyűrűhöz (Kirchhoff és mtsai, 2002; Páli és mtsai, 2003), megkapjuk, hogy a *bulk* lipidek  $35\,814\text{ nm}^2$  területet foglalnak el. Az I ( $I_1 + I_2$ ) hozzájárulásuk 14,2%-ának felhasználásával kapunk egy  $5\,086\text{ nm}^2$  területet, ami (egyenletes eloszlást feltételezve) egy vékony ( $\sim 3,3$  nm széles) szegélyt képezhet. Nyilvánvalóan egzakt számokról nem beszélhetünk ebben az esetben, hiszen a lipidek térkitöltéséből, geometriájából fakadó hibatarományok miatt csak durva becsléseket tehetünk. Mindazonáltal a becsült értékek megengedik hemifúziós csatornák kialakulását, amelyeket gyorsan mozgó lipidmolekulák alkotnak; ezek vélhetően nincsenek „bezárva” a PSII szuperkomplexek közötti kis kettősréteg foltok területére.

### Az I fázis szelektív roncsolása WGL-lel

Korábban kimutattuk, hogy a WGL koncentrációfüggő módon szelektíven roncsolja a TM I fázisait (Dlouhý és mtsai, 2022), ahogy a gránum- és sztróma tilakoidokban detektált I fázisokat is (Dlouhý és mtsai, 2021a). Ahogyan várható volt, a WGL elnyomta a BBY I fázis jelintenzitását, míg a L fázisra számottevő hatást nem gyakorolt (15. ábra). A WGL-hatás erőssége koncentrációfüggőnek bizonyult, bár az érzékenység mintáról-mintára változott (F5. ábra – Függelék).



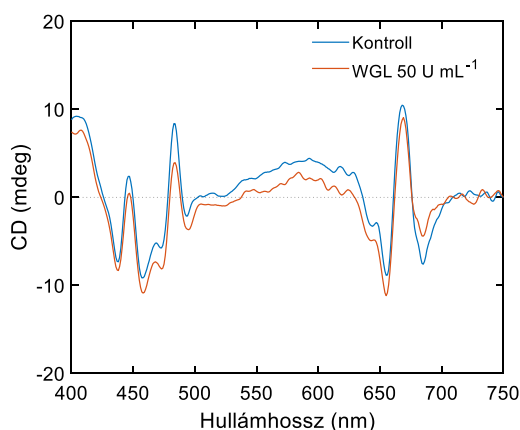
**15. ábra:** Kezeletlen és WGL-kezelt BBY partikulumok  $^{31}\text{P}$ -NMR spektrumai. Három független biológiai ismétlés spektrumát átlagoltam. Szkenelések száma ismétléseként kezeletlen és kezelt minták esetén: 6 400.

Korábbi, TM, gránum- és sztróma membrán preparátumokon szerzett adatainkkal összhangban a WGL nem gyakorolt hatást a PSII szuperkomplexek molekuláris szerveződésére és fotokémiai aktivitására. Ezt a WGL-kezelések előtt és után rögzített CD-spektrumok (16. ábra) és az OJIP görbék összehasonlítása alapján állapítottam meg (17. ábra).

Az exciton CD-sávokból információt nyerünk a pigmentmolekulák rövidtávú exciton kölcsönhatásairól. Az ehhez tartozó sávok a vörösben (-)650 és (+)668 nm, a Soret-régióban pedig (+)448, (-)460 és (+)484 nm környékén detektálhatók – jó összhangban Miloslavina és mtsai (2012) adataival. TM-okban erre szuperponálódhat a nagyméretű, királisan rendezett rendszerekben azonosítható psi-típusú CD (+)690 nm-en és (-)674 nm-en és (+)506 nm-en, amely a PSII és LHCII fehérjekomplexeinek hosszútávú rendezettségéből fakad (Garab és van Amerongen 2009). A mért spektrumokon megfigyelhető (16. ábra) a Soret-sávok kisebb torzulása, miközben az alapvető karakterisztikájuk megőrződik. A változások legjelentősebb része az enzim

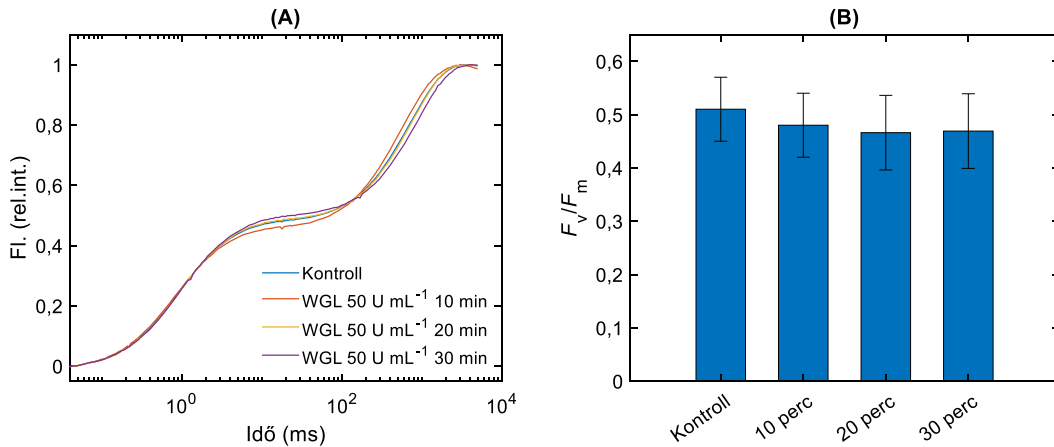


növekvő koncentrációja által okozott fényszórásnak tudható be, amely a fényszórás hullámhossz-függése miatt jobban torzítja a Soret-régió sávjait, mint a vörös tartomány sávjait. A preparátumok egy részében gyenge psi-típusú CD jelenléte is kimutatható volt (+)690 nm-nél; ez azonban a WGL-emésztést követően eltűnt, mivel a BBY által alkotott membránlapok felbomlanak. Lényeges változást az exciton sávok szerkezetében ezeken a mintákon sem tapasztaltam; összesen 4 különböző preparátumot vizsgáltam.



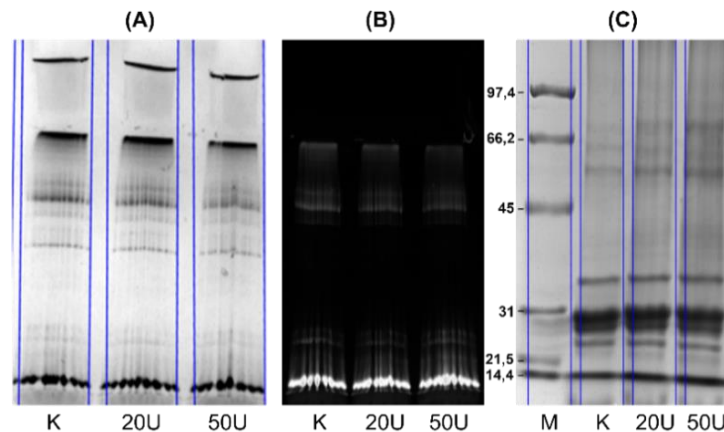
**16. ábra:** Kezeletlen és 50 U mL<sup>-1</sup> WGL-kezelt BBY partikulumok reprezentatív CD spektrumai. A WGL-kezelés hatására a mért spektrumokon megfigyelhető a Soret-sávok kisebb torzulása, miközben az alapvető karakterisztikájuk megőrződik.

Az OJIP görbe a fotoszintetikus elektrontranszportlánc állapotába nyújt betekintést (Strasserf és mtsai, 1995). A telítő fényimpulzus hatására kiváltott fluoreszcencia görbe kezdeti (O-fázis) szakaszán minden reakciócentrum nyitva van (Q<sub>A</sub> oxidált, F<sub>o</sub>). TM-ban a fluoreszcencia emelkedésének különböző fázisai (OJ, JI és IP) a PSI-t is magába foglaló elektrontranszportlánc redukciójának különböző lépéseire köthetők. A BBY-ban megfigyelhető tranziensek természete a PSI hiánya miatt a TM-hoz képest egyszerűbb (17A ábra); a görbe telítődése (P állapot, F<sub>m</sub>) azt jelzi, hogy a reakciócentrumok bezáródnak és a PQ-pool redukált állapotba kerül. A két végállapot egymáshoz viszonyított aránya, az F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> paraméter, információt nyújt a PSII fotokémia aktivitásáról és a fény által kiváltott konformációs változásokról/dielektromos relaxációs folyamatokról (Sipka és mtsai, 2021) (F<sub>v</sub>=F<sub>m</sub>-F<sub>o</sub>). Méréseimben a WGL-kezelés hatására nem látható számottevő változás a BBY-ból mért OJIP görbe különböző fázisain, amelyet a származtatott F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> értékek (17B ábra) is megerősítettek: nem mutattak statisztikailag szignifikáns változást WGL-kezelés hatására.



**17. ábra:** Kezeletlen (Kontroll) és WGL-kezelt BBY partikulumok KI-a fluoreszcencia (OJIP) tranziensei (A), ill. az  $50 \text{ U mL}^{-1}$  WGL-kezelt minta  $F_v/F_m$  paraméter értékei  $\pm SD$  a kezelést megelőzően és azt követően három biológiai ismétlésből átlagolva (B). A kezelt minták értékei nem mutattak szignifikáns különbséget a kontroll mintához képest (ANOVA,  $p > 0,05$ ).

A WGL-kezelés szintén nem okozott észrevehető változást a pigment-protein komplexek szerveződésében, amint azt a CN-PAGE és SDS-PAGE kísérletek is mutatják (18. ábra).



**18. ábra:** Kezeletlen (K) és  $20 \text{ U mL}^{-1}$ , illetve  $50 \text{ U mL}^{-1}$  WGL-kezelt BBY partikulumok CN (A, B) és SDS-PAGE (C) gélképei, M: molekulásúly marker.

Ezek a megfigyelések tehát megerősítették korábbi következtetésünket (Dlouhý és mtsai, 2022), miszerint az I fázisok a fehérjében gazdag régiókon kívül, azaz (BBY-ban) a PSII szuperkomplexeket beágyazó kettősréteg régiókon kívül helyezkednek el. Ezek az adatok arra is rámutatnak, hogy a WGL elsődleges célpontja, vagyis az erre a lipázra leginkább érzékeny szerkezeti entitás a TM-ok egy olyan aldóménje, amely nagyszámú, rendkívül mobilis lipidmolekulát tartalmaz (ami éles I fázist mutat). Úgy tűnik, hogy ez az aldómén jobban hozzáférhető az enzim számára, és így a WGL

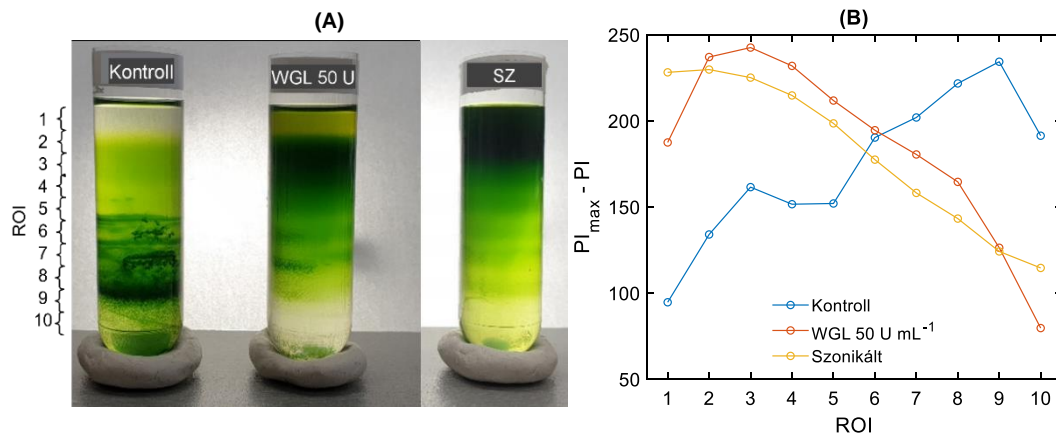
könnyebben hidrolizálja a nem kettősrétegben található lipideket, mint azokban a doméneknél, ahol a pigment-protein komplexek sztérikus gátlása zavarhatja a lipáz aktivitását. Az ilyen, a fotoszintetikus apparátus fehérjéit nem tartalmazó lipidfázisok szerepet játszhatnak a gránum és a sztróma membránok kapcsolódásában, illetve azokon a területeken, ahol a szomszédos sztróma lamellák összeolvadnak (Bussi és mtsai, 2019; Garab és mtsai, 2022). Amint arra a bevezető 1.7-es szakaszában rámutattam, a nem-kettősrétegű lipidek indukálják és stabilizálják a fúziós *stalk*ot. Ezek az izotróp jellemzőkkel rendelkező, nem-kettősrétegű fázisok (lásd például a 7F-H ábrát (van Eerden és mtsai, 2015) közleményében) kulcsfontosságú komponensek, intermediér struktúrák a membránfúziókban (Chernomordik és Kozlov 2008; Joardar és mtsai, 2022; Seddon és Templer 1995a). Mindez arra enged következtetni, hogy az I fázis részt vehet a néhány száz nanométer méretű PSII membránok nagyméretű, akár több tíz mikrométer átmérőjű lapokká történő fúziójában (Dunahay és mtsai, 1984). Ennek a hipotézisnek a tesztelésére megvizsgáltuk az I fázisok WGL-indukált elroncsolódásának hatását a membránlemezek méreteloszlására.

#### **4.1.2 A BBY membránlapok WGL-indukált szétesése**

##### *A membránlemezek méreteloszlásának követése – SDG*

A szukróz sűrűséggrádiens (SDG) egy olyan technika, amelyet a részecskék méretük, alakjuk és sűrűségük alapján történő elválasztására használnak (D'Amici és mtsai, 2009). A lényegében csak PSII szuperkomplexeket tartalmazó homogén minták esetében, mint a BBY, a részecskék grádiens menti eloszlását a részecskék mérete határozza meg. Amint az a 19A ábrán látható, a kezeletlen részecskék a magas szukrózkoncentrációjú alacsonyabb régiókban halmozódtak föl, jelezve a nagy membránrészecskék jelenlétét a mintában. 50 U mL<sup>-1</sup> WGL-kezelés után 5 °C-on 30 percen keresztül a minta nagy része az alacsony szukrózkoncentrációjú oszlop tetején jelent meg (19A ábra), ami kisebb részecskeméretet jelez. A kezeletlen és kezelt minták méreteloszlásának meghatározását a kiválasztott térfogatok optikai sűrűségére jellemző, azaz a KI-koncentrációval arányos PI<sub>max</sub> - PI értékek ábrázolásával végeztem el. Meg kell jegyezni, hogy kalibrálás nélkül ez a diagram csak félkvantitatív információt ad. Ennek ellenére a 19B ábra jól mutatja a BBY részecskék méret szerinti átrendeződését a WGL-lel kezelt mintában és a kisebb méretű részecskék felhalmozódását. A BBY membránok szétbontását enyhe ultrahangos kezeléssel is

elvégeztem, amely megerősítette, hogy a részecskék WGL által kiváltott átrendeződése valóban a nagy lapok kisebb egységekre való szétesésének tulajdonítható (19A és B ábra).

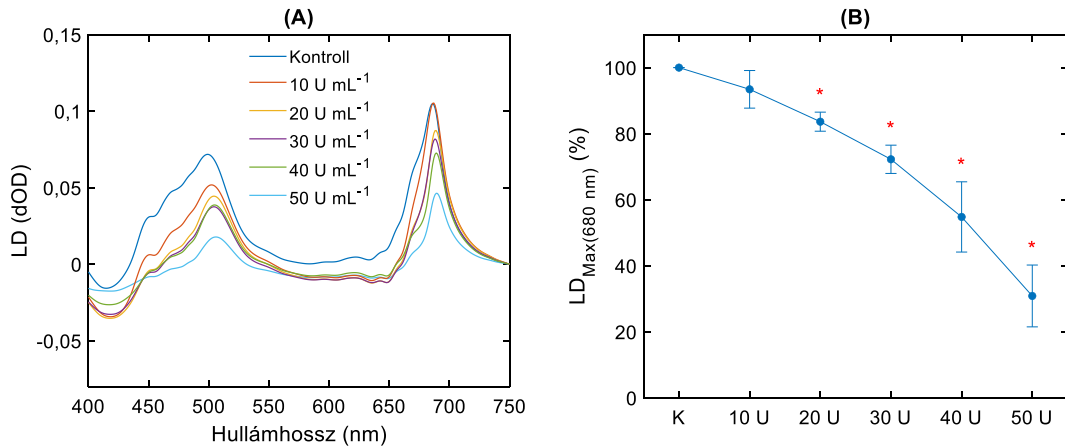


**19. ábra:** Kezeletlen (Kontroll), WGL-kezelt ( $50 \text{ U mL}^{-1}$ ) és szonikált (SZ) BBY partikulumok eloszlása szukróz sűrűséggradiensben (A) és a csövek denzitometriás analízise a cső mentén fentről lefelé (B).

#### *A membránpárok mágneses orientálhatósága – LD spektroszkópia*

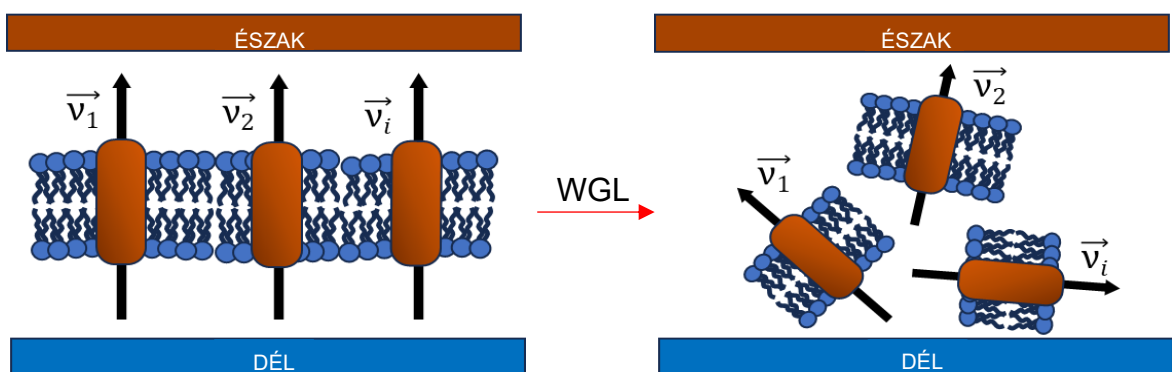
Az LD mérések információt szolgáltatnak a minta abszorpciós átmeneti dipólusainak anizotrópiájáról. Az LD nagysága a membránok orientálhatóságának hatékonyságától függ. Mágneses orientáció esetén azonos térerősség és homogén minta esetén nagymértékben függ a részecske méretétől, ami meghatározza a részecske összegzett diamágneses anizotrópia (eredő) vektorának nagyságát (Barzda és mtsai, 1994; Kiss és mtsai, 1986).

Amikor a laterálisan fuzionált BBY részecskék kiterjedt membránlemezeit  $0,7 \text{ T}$  mágneses térerősségnek vettem alá, hogy orientálódjanak, jellegzetes alakú LD görbéket figyelhettem meg  $690$  és  $500 \text{ nm}$  körüli maximális értékekkel (20A ábra). Ez a spektrum jól egyezik a szakirodalomban publikáltakkal (Tapie és mtsai, 1982).



**20. ábra:** BBY membránok lineáris dikroizmus spektruma WGL-kezelés előtt és fokozatosan növekvő WGL-koncentráció (10-50 U mL<sup>-1</sup>) jelenlétében (A), valamint az LD<sub>max</sub> a WGL-aktivitás függvényében a vörös spektrális régióban; a kezeletlen minták maximális LD értékét 100%-nak vettem; három független biológiai ismétlésből kapott átlagértékek ± SD. A kezelt mintákból a 10 U mL<sup>-1</sup>-es kezelés kivételével mind szignifikáns különbséget mutatott a kontroll mintához képest (T-próba, Bonferroni-korrekcióval,  $p < 0,05$ ) (B).

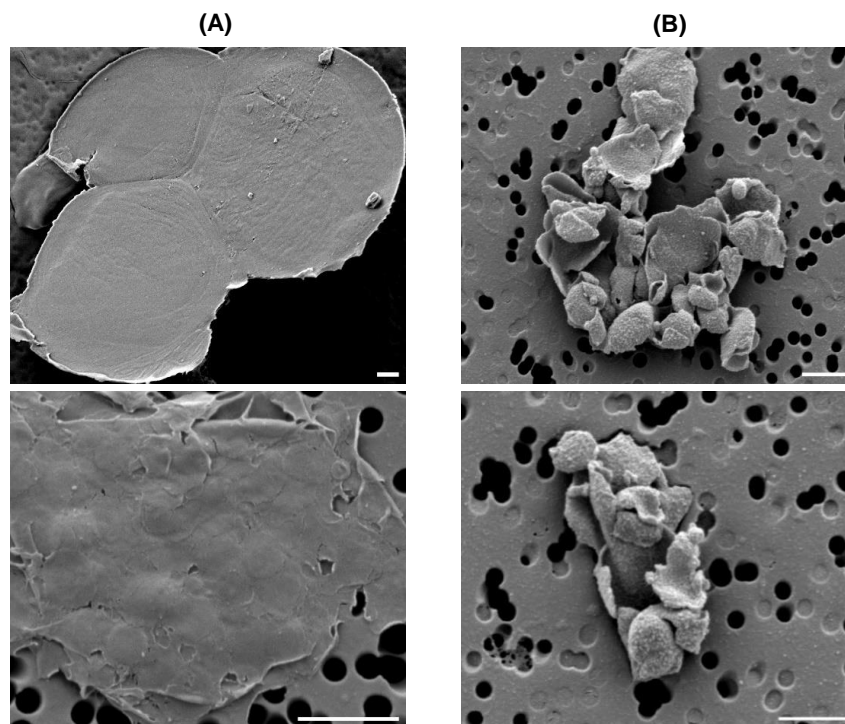
Amikor a membránokat különböző koncentrációjú WGL-lel kezeltem, a 10 U-tól 50 U mL<sup>-1</sup>-ig terjedő tartományban, az LD görbék fokozatos csökkenése volt megfigyelhető; a kezeletlen minták maximális LD értékét 100%-nak véve a következő értékeket kaptam:  $93,42 \pm 5,69$ ;  $83,63 \pm 2,89$ ;  $72,24 \pm 4,28$ ;  $54,78 \pm 10,64$ ;  $30,86 \pm 9,36$  a 10 U mL<sup>-1</sup>, 20 U mL<sup>-1</sup>, 30 U mL<sup>-1</sup>, 40 U mL<sup>-1</sup> és 50 U mL<sup>-1</sup> WGL-koncentráció alkalmazásával (20B ábra). Ez a részecskeméret fokozatos csökkenésének tudható be. A javasolt mechanizmust sematikusán a 21. ábra mutatja be.



**21. ábra:** Sematikus ábra, amely azt szemlélteti, hogy a laterálisan összeolvadt PSII (BBY) membránok WGL-kiváltotta szétesése hogyan vezet a minta diamágneses anizotrópiájának jelentős csökkenéséhez. A nagy lapok vektorösszege kellően nagy ahhoz, hogy jelentős LD-t detektáljunk a 0,7 T erősségű mágneses térben, ez viszont nem igaz az alkotóegységekre, amelyek ezért nem, vagy csak kisebb mértékben orientálódnak.

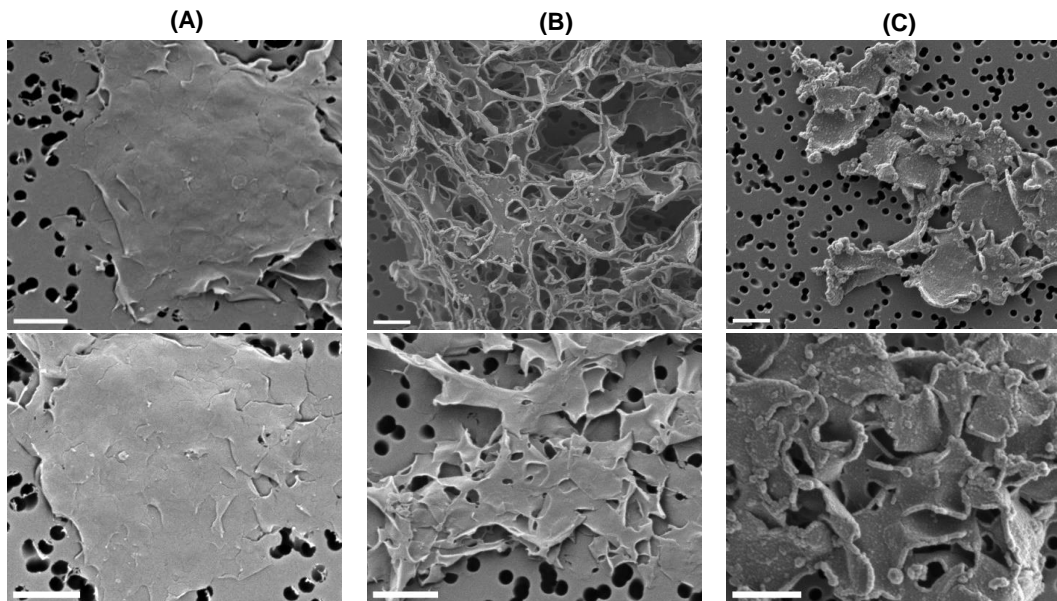
### *A szétesett membránpárok vizualizációja – SEM*

SEM segítségével vizualizáltuk a WGL-kezelés hatását a laterálisan fuzionált BBY részecskékre. A 22A ábrán egy tipikus SEM-képpár látható, ami megerősíti, hogy a BBY részecskék 10  $\mu\text{m}$ -nél nagyobb átmérőjű, nagyméretű lapokba olvadtak össze, tökéletes összhangban a Dunahay és mtsai (1984) által közölt eredményekkel. Ahogy az várható volt, a WGL-kezelt minták kisebb méretű, gyakran összecsapzódott részecskéket tartalmaztak, jellemzően pár száz nanométeres átmérővel – hasonlóan a gránumból izolált alkotóegységekhez (22B ábra).



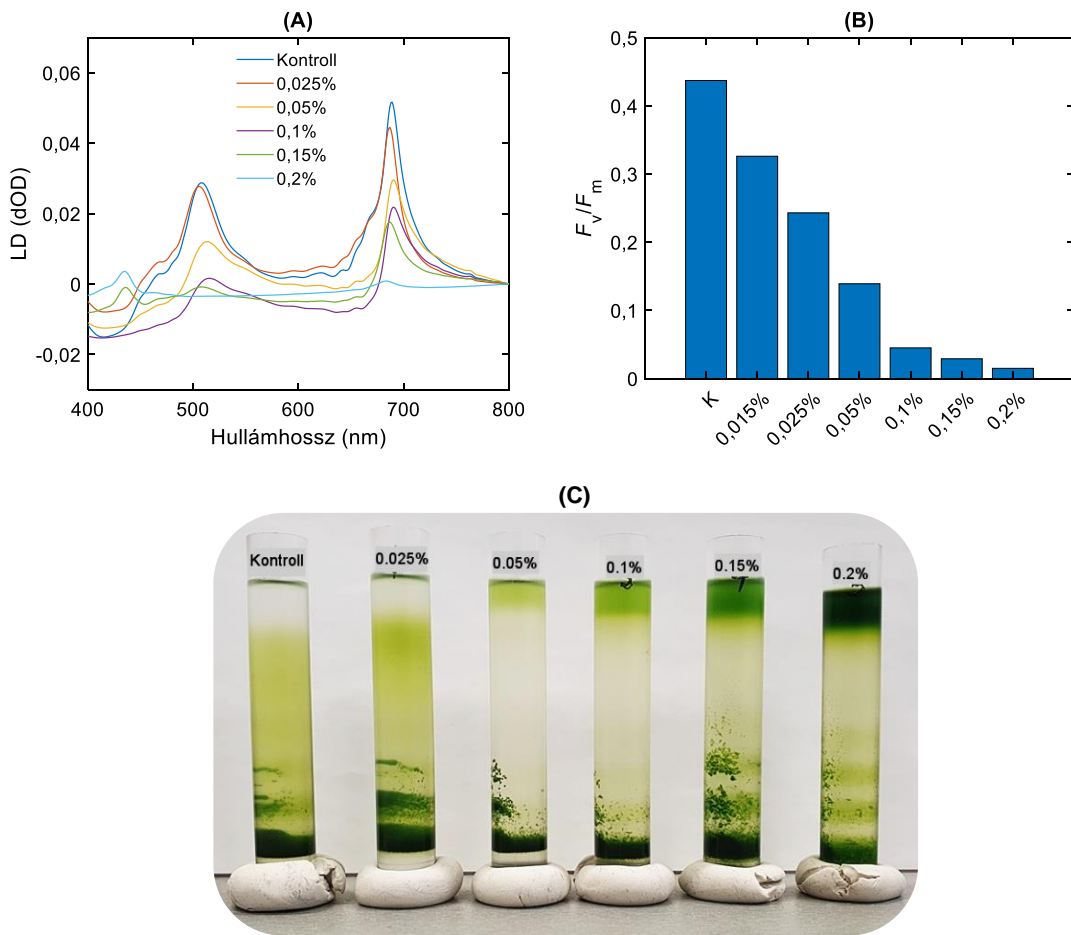
**22. ábra:** Pásztázó elektronmikroszkópos felvételek kezeletlen (A) és WGL-kezelt (B) ( $50 \text{ U mL}^{-1}$ ) BBY-partikulumokról. Lépték: 1  $\mu\text{m}$ .

SEM kísérleteink során szonikálásnak és WGL-kezelésnek is kitettük a BBY membránokat, hogy összehasonlíthassuk a membránlapok szétesésének mechanizmusait. Ahogy a 23. ábrán látható, a szonikálás a membránlemezeket összefonódó, jellegtelen struktúrákra bontta szét. Ezzel szemben a WGL-kezelés után a gránum foltok még mindig felismerhetők voltak – megerősítve azt a következtetést, hogy a WGL a BBY részecskéket az összeolvadt membránpár egységek között elhelyezkedő lipidek hidrolízisével bontja le.



**23. ábra:** Pásztázó elektronmikroszkóp felvételek kezeletlen (A), szonikált (B) és WGL-kezelt ( $50 \text{ U mL}^{-1}$ ) (C) BBY-partikulumokról. Lépték:  $1 \mu\text{m}$ .

Mivel a BBY izolálási procedúra Triton-X100 felhasználásával történt, felmerült a kérdés, hogy közrejátszhatott-e a reziduális detergens jelenléte a gránum foltok fúziójában. A kérdés nem triviális, hiszen ahogyan korábban már említettem, a digitonin felhasználásával kinyert gránum és sztróma alegységek izolálásukat követően önmagukkal fuzionálnak (Dlouhý és mtsai, 2021b). Ennek ellenőrzésére emelkedő (0,015 - 0,2%) Triton-X100 koncentráció mellett teszteltük a detergenshatást a BBY minták LD spektrumára, fotoszintetikus aktivitására, illetve SDG-profiljára. Ahogy azt a 24A ábra mutatja, az LD spektrum intenzitása koncentrációfüggő módon csökkent; 0,025% Triton-X100 elegendő volt ahhoz, hogy a karakterisztikus sávokat letörje. A fotoszintetikus aktivitást fémjelző és PSII szerkezeti dinamikára jellemző  $F_v/F_m$  értékek már 0,015% detergens jelenlétében számottevően csökkentek (24B ábra). A 24C ábrán bemutatott SDG oszlopon továbbá jól látható, ahogyan a detergens koncentráció emelkedésével a membránok egyre nagyobb mennyiségben jelennek meg az alacsony szukrózkoncentrációjú, „könnyebb” régiókban.



**24. ábra:** A BBY LD spektrumai (A),  $F_v/F_m$  értékei (B) és SDG-profiljai (C) a kezeletlen (Kontroll) és növekvő Triton-X100 (0,015 - 0,2%) koncentrációk mellett. A 0,025% koncentráció már kifejti hatását a BBY LD spektrumára, illetve az SDG-oszlopon való eloszlásra, míg a fotoszintetikus aktivitásra és a PSII szerkezeti dinamikára jellemző  $F_v/F_m$  érték már 0,015% koncentrációra érzékeny. Ebből az következik, hogy a reziduális Triton-X100 koncentráció az izolált BBY-ban mindenképpen 0,015% alatt van.

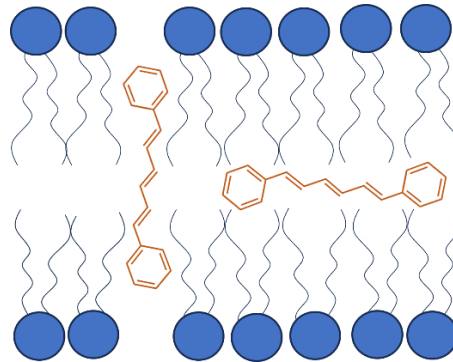
A kapott eredmények rávilágítanak arra, hogy a BBY lapok fúziójában a Triton-X100 semmiképpen sem játszhat szerepet. Az eredmények tükrében elmondható, hogy a detergens hatása a membránpartikulumok szétesésében, illetve a fotoszintetikus aktivitás drasztikus csökkenésében nyilvánul meg, már 0,025%-os koncentráció jelenlétében. Mindez bizonyítja, hogy az izolálás során használt max. 0,035% Triton-X100 koncentráció a kész BBY preparátumban csak nyomokban fellelhető, hiszen az alkalmazott meglehetősen alacsony koncentrációk már elegendőnek bizonyultak a BBY-lapok szétbontására LD és SDG kísérletek alapján (24A, B ábra). A K1-a fluoreszcencia mérések tanúsága szerint a maradék Triton-X100 jelenléte a BBY-ban nem haladja meg a 0,015%-ot.



#### 4.1.3 A BBY lipid-mikrokörnyezeteinek jellemzése és WGL-érzékenységük

A BBY partikulumban a lipidek mikrokörnyezetét és azok WGL hatására bekövetkező változásait DPH anizotrópia és fluoreszcencia élettartam mérésekkel is jellemeztem.

A DPH vízben igen gyenge, de a lipid zsírsavláncok közé beépülve (25. ábra) erős fluoreszcenciát mutat (Lentz 1989). A próbákból detektált stacionárius (*steady-state*) anizotrópia és a fluoreszcencia élettartam függ a biológiai membránokban található lipidmolekulák viselkedésétől és környezetétől (Demchenko és mtsai, 2009; Lakowicz 2006), ezáltal betekintést nyújt a lipidréteg szerkezeti és dinamikai sajátosságaiba (Klymchenko és Kreder 2014). A DPH gerjesztőfény által emittált fluoreszcencia anizotrópia ( $r$ ) egy olyan paraméter, amely a membrán mikroviszkozitásáról illetve fluiditásáról hordoz információt.

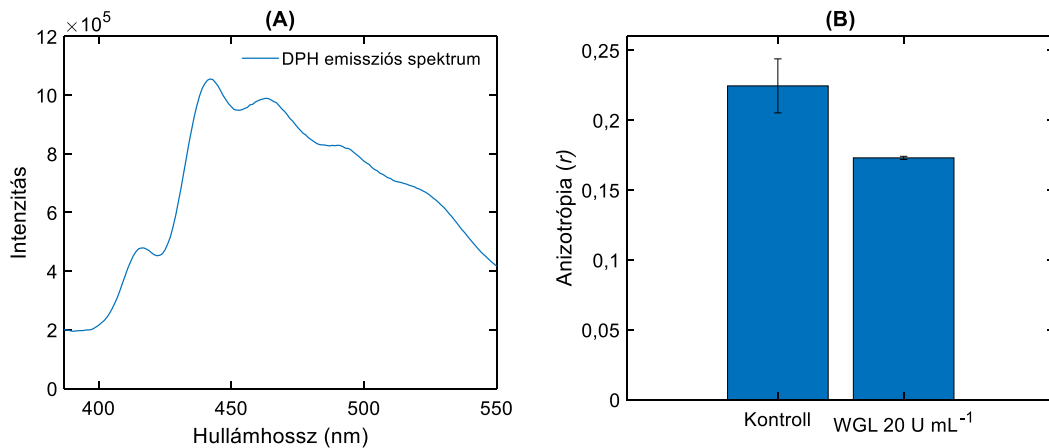


25. ábra: DPH (narancssárga) fluoreszcens próba lehetséges orientációi a lipidmembránban (kör: lipid fejcsoportok, vonalak: zsírsav láncok).

Az anizotrópia mérés során a fluorofort vertikálisan és horizontálisan polarizált fényvel gerjesztjük. A fluoroforok azon populációja, amelynek orientációjából fakadóan dipólusmomentuma egybeesik a gerjesztő fény elektromos vektorával, gerjesztődni fog (fotoszelekció). Mivel a gerjesztett fluorofor fotonemissziója sokkal hosszabb időbe telik, mint az abszorpció, a fluorofor gyakran átorientálódhat, mielőtt az emisszió bekövetkezik (Lentz 1989). Minél nagyobb a fluorofor reorientációjának a mértéke a gerjesztett állapot időtartama alatt – tehát minél fluidabb a lipidkörnyezet –, annál kisebb a mért anizotrópia érték (Török és mtsai, 2001).

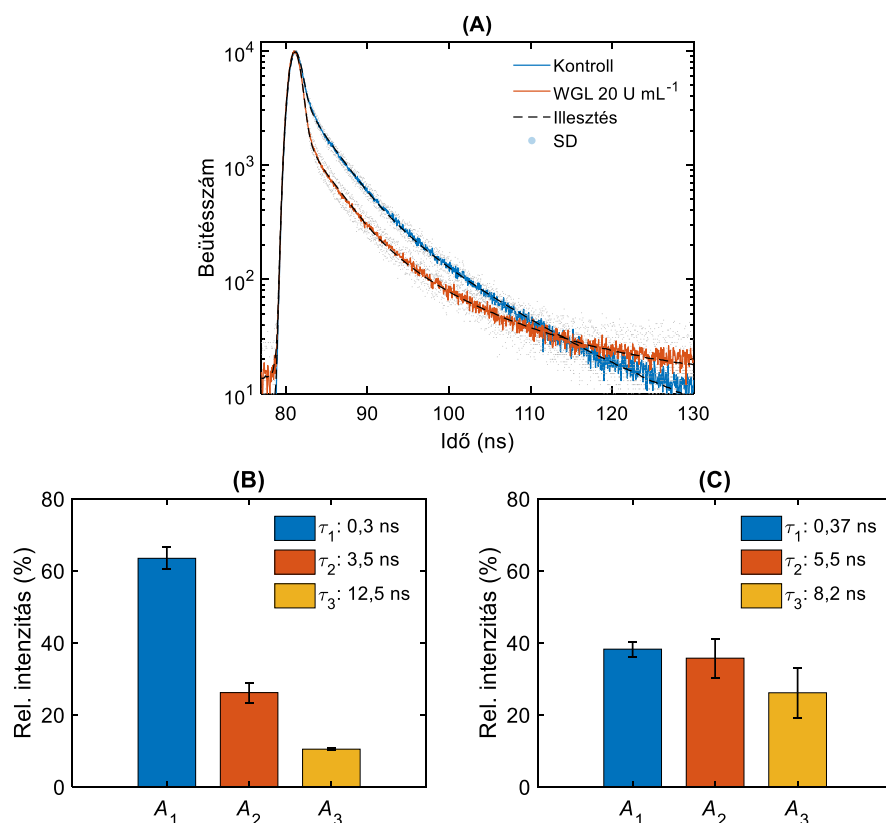
A 26A ábrán a DPH próba fluoreszcencia emissziós spektruma látható, amely a BBY membránba épülve jellegzetes három sávú spektrumot mutat (Barkhade és mtsai, 2019). A membrán mikroviszkozitásáról számot adó  $r$  érték, a 26B ábra szerint WGL-

kezelés hatására lecsökken. A megfigyelt csökkenés eredetének meghatározása érdekében fluoreszcencia élettartam méréseket végeztem. A fluoreszcencia lecsengési kinetikák, és azok feltételezhetően összetett jellegük révén, részletesebb betekintést nyújthatnak a lipidkörnyezet esetleges heterogenitásába, ezáltal lehetővé téve akár a fluorofor alpopulációk feloldását (Litman és Barenholz 1982), ahogyan arra Paloncýová és mtsai (2019) és Osella és mtsai (2020) is rámutattak a közelmúltban. Ezért a mért lecsengési kinetikákat matematikai analízisnek vettem alá.



**26. ábra:** BBY membránba épült DPH fluoreszcencia emissziós spektruma (A) és fluoreszcencia anizotrópia értékei  $\pm$  SD kezeletlen (Kontroll) és 20 U mL<sup>-1</sup> WGL-kezelés hatására, három biológiai ismétlésből átlagolva (T-próba,  $p > 0,05$ ) (B).

A BBY-on mért DPH fluoreszcencia lecsengési kinetika (27A ábra) WGL-kezelés hatására jelentősen változott. A kezeletlen BBY-ba ágyazódó próba gyorsabb lecsengést mutatott, míg a WGL-lel kezelt minta lecsengése lassabb, elnyújtottabb volt. A lecsengési kinetikákat három exponenciálissal tudtuk kielégítően illeszteni ( $\chi^2 = \sim 1,2$ ), azaz három élettartam-komponenst kaptunk:  $\tau_1$ ,  $\tau_2$ ,  $\tau_3$ , a hozzátartozó  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$  relatív amplitúdókkal (27B ábra). (Az illesztés minősége háromnál kevesebb komponens alkalmazásával nem volt kielégítő, míg háromnál több komponens használata már nem járt az illesztés minőségének számottevő javulásával.) Ez azt jelzi, hogy a lipidmolekulák mikrokörnyezete a BBY-ban nagyfokú heterogenitást mutat; ami jó összhangban van a partikulumok lipidpolimorfizmusát feltáró <sup>31</sup>P-NMR spektroszkópiai adatainkkal.



**27. ábra:** BBY-ba integrálódott DPH próba fluoreszcencia lecsengési görbéi kezeletlen (Kontroll) és WGL-kezelt ( $20 \text{ U mL}^{-1}$ ) mintákon, három biológiai ismétlésből átlagolva (A). Az illesztett élettartó-komponensek és azok relatív intenzitása  $\pm$  SD oszlopdiagramon ábrázolva kezeletlen (B) és WGL-kezelt minták esetében (C). A  $\tau_1$ -élettartó komponens intenzitása a WGL-emésztés következtében szignifikáns különbséget mutatott a kezeletlen mintához képest ( $t$ -próba,  $p < 0,05$ ), míg a  $\tau_2$ -es és  $\tau_3$ -as élettartók amplitúdó változásai nem voltak szignifikánsak ( $p > 0,05$ ).

Az egyes élettartam-komponensek és a hozzájuk tartozó amplitúdók a 27B és C ábrán láthatók WGL-kezelés előtt és azt követően. Látható, hogy a kontroll minta esetében kapott  $\tau_1 = 0,31 \pm 0,01 \text{ ns}$ ,  $\tau_2 = 3,49 \pm 0,26 \text{ ns}$  és  $\tau_3 = 12,5 \pm 0,2 \text{ ns}$  élettartók a lipázkezelés hatására kisebb mértékben megváltoztak:  $\tau_1 = 0,37 \pm 0,02 \text{ ns}$ ,  $\tau_2 = 5,52 \pm 2,01 \text{ ns}$  és  $\tau_3 = 8,18 \pm 2,47 \text{ ns}$ . Ennél szembeűnőbb, hogy az egyes komponensek amplitúdója jelentősen megváltozott. A kontroll minta  $A_1 = 63,4 \pm 3,1$ ,  $A_2 = 26,1 \pm 2,8$ ,  $A_3 = 10,4 \pm 0,4$  amplitúdói a következőképpen módosultak WGL-kezelés hatására:  $A_1 = 38,2 \pm 2,1$ ,  $A_2 = 35,7 \pm 5,4$ ,  $A_3 = 26,1 \pm 7,0$ . A lipázkezelés hatására bekövetkező legmarkánsabb változás a  $\tau_1$  élettartamú komponens intenzitásának szignifikáns csökkenése volt, jelezve az ezért a kinetikai komponensért felelős lipidkörnyezet relatív mennyiségének csökkenését. Ezek az adatok megerősítik azt a korábbi,  $^{31}\text{P}$ -NMR spektroszkópiai adatokra alapozott következtetésünket, hogy ez a lipáz szelektív módon, egy adott lipidkörnyezeten belül hidrolizálja a lipideket.

A leggyorsabb lecsengési életidővel jellemezhető komponens – figyelembe véve a WGL lipidfázis specifikus hatását a DPH fluoreszcenciára és a  $^{31}\text{P}$ -NMR spektrumra – az I fázishoz rendelhető. Ezt a csökkenést a másik két, lassabb komponens relatív emelkedése kíséri, ami minden bizonnyal az eredetileg I fázist alkotó lipidek „megjelenésének” és fiziko-kémiai környezetük változásának tulajdonítható. (DPH élettartam méréseink alapján új populáció megjelenését nem tudtuk azonosítani; ezek megjelenését a lassabb komponensek élettartam változásai jelezhetik.) A kezeletlen mintában megfigyelt két lassabb komponens valószínűleg a kettősréteg szerkezetéhez és a részben fellazult annuláris lipidek halmazához köthető.

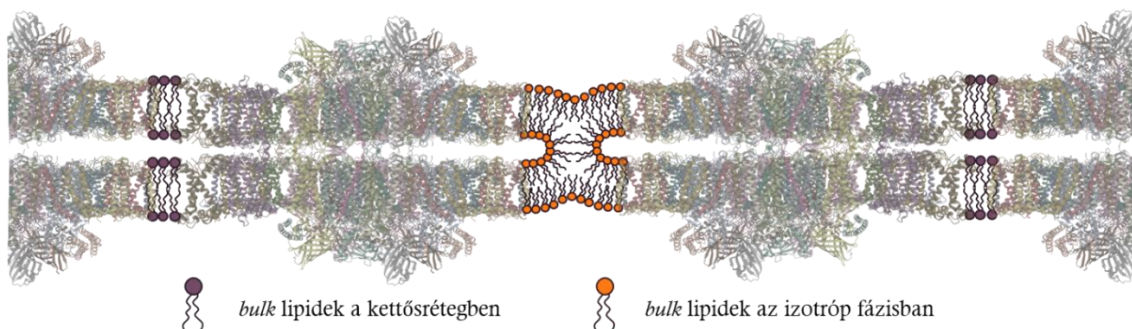
Érdekes megjegyezni, hogy – amint azt a Függelékben bemutatom – a DPH fluoreszcencia anizotrópia értékei és a lecsengési kinetikák heterogenitása TM-ban is megfigyelhető volt WGL hatására (F6. ábra). Továbbá, a WGL szelektív hatása is kimutatható volt – TM-ban is a leggyorsabb életidejű komponens volt a legérzékenyebb a WGL-kezelésre (F7. ábra). A TM-on DPH-val megfigyelhető hatások részletesebb elemzését nem végeztem el – ui. a WGL dezintegrációs hatása a TM-ra nem volt egyértelműen kimutatható; ami valószínűleg a TM-ok összetett szerkezetének és közismerten nagyfokú és random önaggregációs hajlamának tudható be. (Ez indokolta, hogy vizsgálatainkat az egyszerűbb szerkezetű, laterális fúziók révén kiterjedt membránlapokká összeálló BBY partikulumokra korlátozzuk.)

#### **4.1.4 Következtetések**

Összességében kimutattuk a nem-kettősrétegű, I fázis(ok) szerepét a PSII-ben gazdag összetapadt membránpárok, az úgynevezett BBY részecskék fúziójában. A tipikus BBY membránok nagy, akár több tíz mikrométeres méretű lapokat alkotnak, amelyek néhány száz nanométer átmérőjű gránumból származó membránpárokból állnak. Ezek a részecskék jellegzetes lipidpolimorfizmust mutatnak: a kettősrétegű (L-fázis) mellett gyorsan mozgó lipidmolekulákból származó I fázisokat is tartalmaznak, amelyek, adataink szerint, a fehérjékben gazdag kettősrétegű fázistól eltérő régiókban találhatóak. A WGL szelektíven elnyomja az I fázis(oka)t, ami a kiterjedt membránlemezek kisebb egységekre történő széteséséhez vezet. A lipidfázisok heterogenitását DPH fluoreszcencia élettartam méréseink is megerősítették, amelyek azt is egyértelműen megmutatták, hogy a WGL-érzékeny lipidek egy jól elkülöníthető, gyors DPH fluoreszcencia lecsengéssel karakterizálható fiziko-kémiai környezetben találhatóak –

összhangban azzal a korábbi következtetésünkkel, hogy ezek a lipidek a kettősrétegbe rendezett lipidektől elkülönült doménekben találhatóak.

Adataink alapján arra következtettünk, hogy a BBY membránok spontán fúzióját a membránpárok peremén található lipidek közvetítik. Ezek a gyorsan mozgó lipidmolekulák az I fázisba összeállva keskeny, néhány nanométer széles gyűrűt alkothatnak a membránegységek körül, és hemifúziós csatornákat képezve „összeragaszthatják” a szomszédos membránokat – amint azt a 28. ábra sematikus ábrázolja.



**28. ábra:** A PSII-ben dús összetapadt membránpárok spontán fúziójára javasolt mechanizmus sematikus illusztrációja, amely hangsúlyozza a nem-kettősrétegű lipid (I) fázis meghatározó szerepét; és egyúttal azt is mutatja, hogy a lipid kettősrétegek csupán kisebb szigeteket képeznek a superkomplexek között.

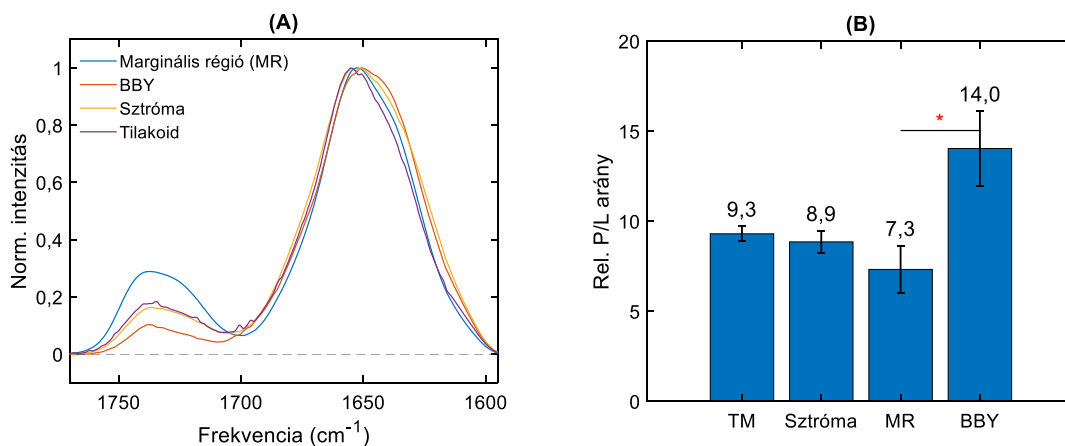
A nem-lamelláris, I mezofázisok pontos természete még meghatározásra vár – ebben valószínűleg nagy segítségre lesznek a molekuláris dinamikai szimulációk, valamint nagyfelbontású képalkotó és mikro-spektropolarimetriás technikák. Mindazonáltal, adataink erőteljesen azt sugallják, hogy a nem-lamelláris lipidek (az MGDG) és a nem-lamelláris lipidfázisok szerepet játszanak a TM-ok önszerveződésében és szerkezeti dinamikájában, összhangban a DEM-mel, azaz a dinamikus lipid kicserélődés modellel. Az itt felvázolt membránfúziós mechanizmus fuzogén fehérjék nélkül valósul meg, amelyek azonban – valószínűleg együttműködve a nem-lamelláris lipidfázisokkal –, fontos szerepet játszhatnak a kloroplasztiszok biogenezisében.

## 4.2 MEMBRÁNKÖTÖTT FEHÉRJÉK ÉS A TM LIPIDPOLIMORFIZMUS KAPCSOLATA

### 4.2.1 CURT1 proteinben gazdag marginális régió lipidfázisának jellemzői

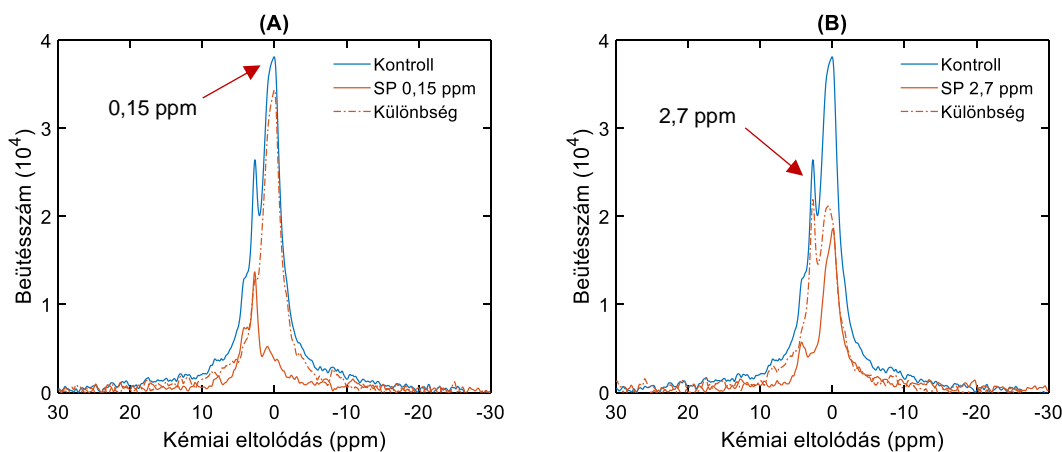
Mint ahogy azt korábbi vizsgálatok megmutatták, a nem-kettősréteggépző lipidek és lipidfázisok (Dlouhý és mtsai, 2020; Latowski és mtsai, 2004) meghatározó szerepet játszanak a TM fényvédelmi funkciójának kialakításában – a lipokalin-szerű, vízben oldódó VDE aktivitásának biztosítása révén (l. 1.6 fejezet).

Biofizikai vizsgálatok segítségével kimutatták, hogy a mitokondriális elektrontranszportlánc vízoldékony fehérje komponense, a Cit *c*, CL hozzáadásával nem-kettősréteg lipidfázisokba „burkolható” (Vladimirov és mtsai, 2018). Ahogy azt korábbiakban kimutattuk (Dlouhý és mtsai, 2022), a tripszin enzimkezelés szelektíven roncsolta a TM  $^{31}\text{P}$ -NMR detektálható  $\text{H}_{\text{II}}$  fázisát (l. 12. ábra), ami szintén arra utal, hogy ez a lipidfázis nagy valószínűséggel a TM sztróma vizes fázisában található fehérjékkel vagy reziduummokkal áll kapcsolatban. A gránum vezikulum nagyfokú görbületét lehetővé tevő MR-ban található CURT1 proteinek rendelkeznek tripszinérzékeny sztróma oldali oldalláncokkal, illetve ebben a régióban relatíve alacsonyabb protein/lipid arány detektálható a gránum és sztróma régiókhöz képest (Koochak és mtsai, 2019), amit saját kísérleteimben is alátámasztottam (29. ábra). A 29. ábrán az FTIR spektrum lipidekre jellemző 1750 és 1700  $\text{cm}^{-1}$  közötti „észter”-kötésekből fakadó rezonanciák, ill. a fehérjékre jellemző 1700 és 1600  $\text{cm}^{-1}$  közötti „amid” kötésekből fakadó régiók (29A ábra) görbe alatti területének összehasonlításával (29B ábra) nyilvánvaló, hogy a MR-ban a lipidek relatív mennyisége jelentősen nagyobb a teljes TM-hoz és a sztróma és a BBY régiókhöz képest. Mindezért kézenfekvőnek tűnt  $^{31}\text{P}$ -NMR-rel tesztelni a görbületi vagy marginális régiókra jellemző lipidpolimorfizmust.



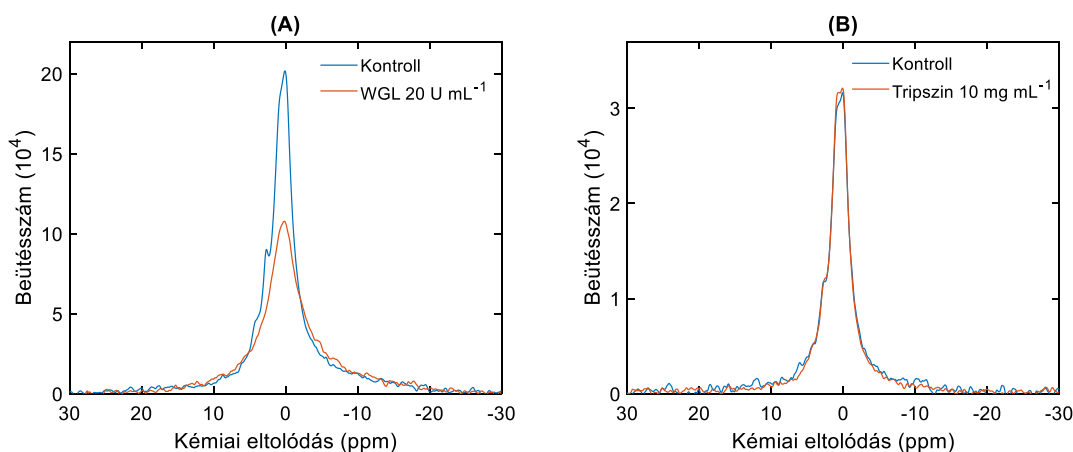
**29. ábra:** Izolált TM, sztróma lamella, marginális régió (MR) és BBY partikulumok FTIR-spektrumai az „amid I” és „észter” régiókban (A) és oszlopdiagram, ami az „amid I” (1700-1600 cm<sup>-1</sup>) és az „észter” régió (1750-1700 cm<sup>-1</sup>) integrált területeiből számolt fehérje/lipid (P/L) arányokat mutatja három biológiai ismétlésből ± SD. A statisztikai analízis alapján a BBY P/L aránya szignifikánsan különbözik a többi alegységből kapott értéktől (ANOVA,  $p < 0,05$ , Tukey-próba) (B).

A 30. ábrán bemutatott <sup>31</sup>P-NMR spektrumok tanúsága szerint a MR nem tartalmazza a karakterisztikus L és H<sub>II</sub> fázisokat; a spektrumokat jellegzetes izotróp fázisok dominálják 0,15 és 2,7 ppm körüli csúcspozíciókkal. Szaturáció transzfer kísérleteink megerősítették ennek a két, egymást erősen átfedő fázisnak a jelenlétét, jóllehet a sávszerkezetben más, kisebb amplitúdójú rezonanciák is fellelhetők.



**30. ábra:** MR kontroll, 0,15 ppm-nél (A), ill. 2,7 ppm-nél (B) alkalmazott szaturáció pulzussal (SP) kezelt <sup>31</sup>P-NMR spektrumok. A spektrumok két szaturáció transzfer kísérlet alapján készültek, két biológiai ismétlésből. Szkenelések száma 12 800 ismétlésenként és szaturációs impulzusonként.

A lipidfázisokból eredő rezonanciasávok érzékenyek voltak WGL-emésztésre, hasonlóan az előzőekben bemutatott BBY-hoz és a korábban közölt TM-okhoz (31A ábra). Mindemellett a tripszinkezelés nem váltott ki számottevő hatást (31B ábra).



**31. ábra:** Kezeletlen (Kontroll) és  $20 \text{ U mL}^{-1}$  WGL-kezelt (szken szám: 25 600) (A) és  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  tripszinkezelt (szken szám: 19 200) (B) MR minták  $^{31}\text{P}$ -NMR spektrumai. A spektrumokat két-két biológiai ismétlésből átlagoltam a kezeletlen és a kezelt minták esetében.

Kísérleteink tehát a CURT1 proteinben gazdag MR-ban jelentős mennyiségű nem-kettősréteg fázisállapotú lipid jelenlétét mutatták ki, amely azonban nem volt érzékeny tripszinkezelésre. Ugyanakkor  $H_{II}$  karakterisztikával jellemezhető lipidfázis sem volt jelen. Ezek tükrében a CURT1 protein szerepe a  $H_{II}$  fázis kialakításában nem tűnik valószínűnek. Mindemellett eredményeink megmutatták azt is, hogy a MR-ban található *bulk* lipidek – nagy valószínűséggel a natív membránban is – nem-kettősréteg szerkezetbe rendeződnek. Korábban – legjobb tudomásom szerint – ennek a szerkezeti egységnek a fázisviselkedésére nézve nem voltak adatok.

Nem zárható ki, hogy a MR-ban megfigyelt I fázisok a detergenst alkalmazó izolálás hatásának tudhatók be, de ezek megfeleltethetők a TM-ban is megfigyelt fázisoknak. Ez utóbbi megállapítást erősítendő, érdemes felidézni, hogy az ugyanilyen detergens kezelést követően kinyert gránum és sztróma TM-ok lipidfázis-viselkedése nem tér el lényegesen az intakt TM-ok viselkedésétől (Dlouhý és mtsai, 2021a), és a BBY is megőrzi a szerkezeti egységre jellemző L és I fázisokat (l. 4.1.1 fejezet). Ennek fényében valószínűsíthetjük, hogy a CURT1 protein körül a TM-ban is, annak MR régiójában I fázis van jelen.

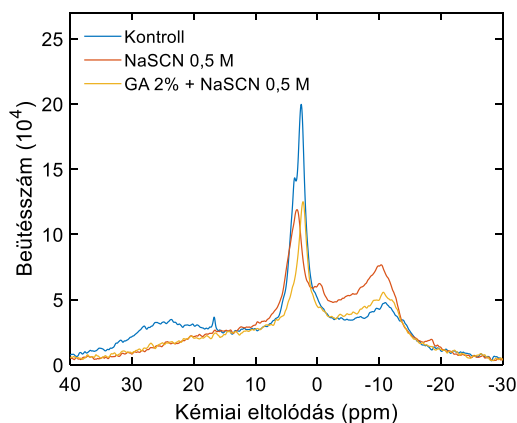
#### 4.2.2 Az inverz hexagonális fázishoz kötött proteinek

A Hofmeister-sók hatással vannak a víz H-kötésszerkezetére; a kaotróp sók a fehérje-víz határfelületén fellépő feszültség csökkenését, a kozmotrópok annak növekedését idézik elő (Bogár és mtsai, 2014); a kétféle só a fehérjék nyitott vagy zárt konformációját stabilizálja (Dér és mtsai, 2007; Násztor és mtsai, 2016).



Bebizonyosodott, hogy a kaotróp NaSCN jelentősen dezorganizálja a TM ultrastruktúráját és a pigment-protein komplexek makroorganizációját – hangsúlyozva a hidratációs erők jelentőségét (Zsiros és mtsai, 2020). Figyelembe véve a hidratációs állapotok szerepét a nem-kettősréteg struktúrák kialakulásában (Seddon és Templer 1995a; Yang és Huang 2002; Yang és mtsai, 2017) fontosnak tartottuk megvizsgálni a NaSCN hatását a TM lipidpolimorfizmusára.

Zsiros és mtsai (2020) munkája nyomán tudjuk, hogy 0,5 M NaSCN-kezelés már egy perc után megbontja a borsóból izolált TM membrán struktúráját; 5 perc kezelés hatására szétesik a gránum szerkezete, miközben a szorosan tapadt kettősréteg membránok még jól azonosíthatók. Izolált sponót TM-okon végzett  $^{31}\text{P}$ -NMR spektroszkópai méréseink feltárták, hogy NaSCN-kezelés hatására a  $\text{H}_{\text{II}}$  fázisból eredeztethető sáv eltűnik (32. ábra). Mindazonáltal az L és I fázisok változásai arra utaltak, hogy a TM korábban kimutatott reorganizációi (Zsiros és mtsai, 2020) hatással vannak valamennyi lipidfázisra. Ez magyarázhatja az I és L fázisok – jöllehet a  $\text{H}_{\text{II}}$  fázishoz képest kevésbé hangsúlyos – érzékenységét. Annak érdekében, hogy kiderítsük, hogy az L fázison megfigyelhető markáns növekedést egy valós komponens megjelenése okozza, vagy a sókezelés hatására képződő aggregátumból eredő sáv ül rá az alapvonalra, a mintákat a sókezelés előtt glutáraldehiddel (GA) kezeltük. A GA fehérje-keresztkötő hatása révén jó eséllyel kompenzálja a NaSCN membrán dezorganizáló hatását. A 32. ábrán megfigyelhetjük, hogy a GA előkezelés valóban megakadályozta az L fázis  $^{31}\text{P}$ -NMR jelével átfedő szerkezetek kialakulását. Ugyanakkor a NaSCN  $\text{H}_{\text{II}}$  fázisra gyakorolt hatása változatlan maradt. (A GA önmagában nem okozott változást – ezt itt nem mutatom.) A  $\text{H}_{\text{II}}$  fázis érzékenységét a kaotróp Hofmeister-sókra a fehérjék solvatációs burkának perturbációja magyarázhatja (Lo Nostro és Ninham 2012; Násztor és mtsai, 2017). Ez jó összhangba hozható azokkal a korábbi adatainkkal, amelyek a  $\text{H}_{\text{II}}$  fázist sztróma oldali fehérjékkel hozták kapcsolatba (Dlouhý és mtsai, 2022).

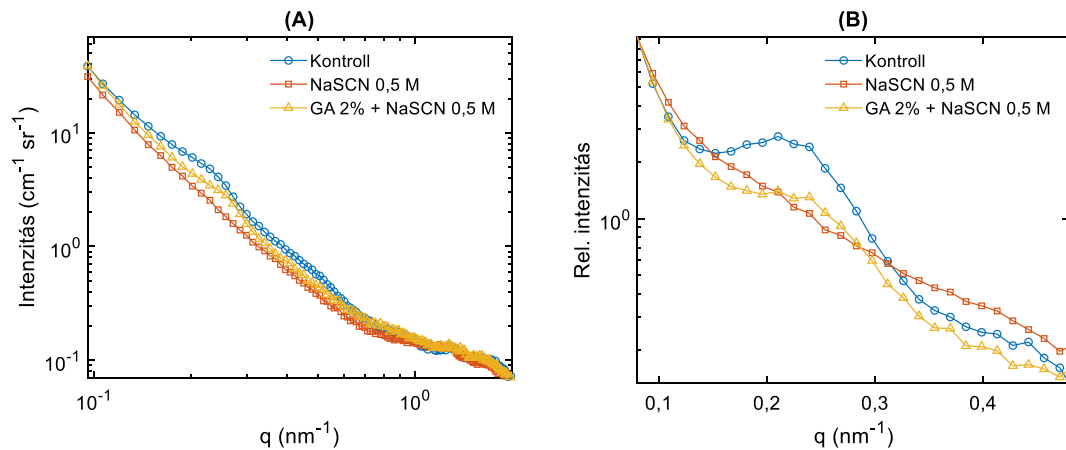


**32. ábra:** Kezeletlen (Kontroll) és 0,5 M NaSCN-sóoldattal, ill. a NaSCN-kezelés előtt 2% GA-del kezelt TM  $^{31}\text{P}$ -NMR spektrumai. A spektrumokat három biológiai ismétlésből átlagoltam. Szkennelések száma 12 800 ismétlésenként.

A TM multilamelláris szerkezetében bekövetkező változásokat, ill. azok GA-gátlását kisszögű röntgen- (SAXS) és neutronszórásos (SANS) kísérletekkel is teszteltük (Nagy és Garab 2021; Turner és Gruner 1992). A kis szögben szóródó röntgen ill. neutron sugarat régóta használják lágú anyagok szerkezeti jellemzőinek mezoszkópikus (1-100 nm) skálán történő tanulmányozására; ezek a technikák információt nyújtanak többek között az oldatban lévő makromolekulák és molekulaegyüttesek alakjáról és méretéről, valamint a fibrilláris és lamelláris struktúrák morfológiájáról (Neylon 2008), beleértve a fotoszintetikus szervezetek membrán struktúráit is. Az említett spektroszkópai technikákkal detektálható diffrakciós, vagy más néven Bragg-csúcs ( $q^*$ ) megjelenése a membránok periodikus szerveződéséből adódik. Abban az esetben, ha a neutronsugár, annak hullámhosszával összevethető távolságban lévő periodikus rétegekről szóródik, konstruktív interferencia lép fel, amely diffrakciós csúcsokat eredményez. Ebből az ún. Bragg-egyenlet alapján megbecsülhető a tilakoidmembrán RD ismétlődési távolsága,  $RD = 2\pi/q^*$  (Nagy és mtsai, 2014). Az elsőrendű Bragg-csúcs általában  $0,02$  és  $0,03 \text{ nm}^{-1}$  között figyelhető meg izolált TM-okban, ami hozzávetőlegesen  $20$  és  $30 \text{ nm}$  közötti RD-nek felel meg (Ünnep és mtsai, 2014).

Ahogy az a 33. ábrán megfigyelhető, a SAXS (33A ábra) és a SANS (33B ábra) szórásprofilokban jelentős különbségek mutatkoznak a kezeletlen és a NaSCN-kezelt TM minták között. A SANS és SAXS mérésekkel azonosítható Bragg-csúcsok eltűnése, illetve intenzitásának nagymértékű csökkenése  $\sim 0,2 \text{ nm}^{-1}$  körül a membránorganizáció megváltozására utal. Ezek az adatok, amik jó egyezést mutatnak Zsiros és mtsai (2020) SANS mérési eredményeivel, a membránszerkezet bizonyos mértékű szétesését, a

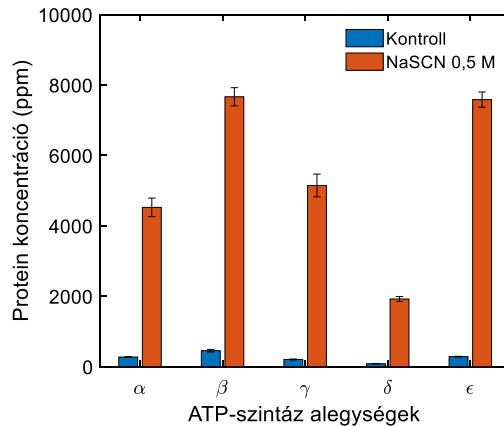
membránlamellák periodicitásának elvesztését jelzik. GA kezelés hatására a Bragg-cúcsok – habár helyzetük elcsúszott, és intenzitásuk is valamelyest csökkent – a membránperiodicitás megtartását jelzik; miközben, ahogy azt fentebb megmutattam, a  $H_{II}$  fázis szétroncsolódik.



**33. ábra:** Kezeletlen (Kontroll), 0,5 M NaSCN-sóoldattal kezelt és 2% GA-val + 0,5 M NaSCN-sóoldattal kezelt TM-ok SAXS (A) és SANS (B) spektrumai. A mérésekhez két biológiai ismétlést használtunk.

Jelenleg is folyó kísérleteinkben próbáljuk azonosítani a fehérjé(ke)t, amely(ek) a NaSCN-kezelés következtében kiszakadhat(nak) a  $H_{II}$  fázissal alkotott asszociátumból. Ehhez a kezeletlen és NaSCN-kezelt TM-okat, illetve felülúszójukat SDS-gélelektroforézissel vizsgáltuk. Előzetes SDS-PAGE és proteomikai eredményeink alapján két olyan, ~55 és ~62 kDa-os gélcsíkot azonosítottunk, amelyek denzitása a NaSCN-kezelést követően a TM-ban jelentősen csökkent: a 62 kDa méretű fehérjesáv teljesen eltűnt, míg az 55 kDa-os sáv enyhébb intenzitással, de jelen volt. Ez a két sáv 0,5 M-os NaSCN-kezelés hatására megjelent a felülúszóban (ill. a ~55 kDa-s sáv jelentősen erősödött). A CEITEC-ben (Masaryk Egyetem, Brno, Csehország) elvégzett proteomikai analízis eredményeink azt mutatják, hogy a NaSCN-kezelésre legérzékenyebb proteinek az ATP-szintáz  $\alpha$  és  $\beta$  alegységei.

A NaSCN-kezelés hatására a felülúszóban feldúsuló proteinek teljes proteomikai analízise (34. ábra) is azt mutatja, hogy a  $H_{II}$  fázis elroncsolása együtt jár az ATP-szintáz alegységeinek leválásával a TM-ról. Az ATP-szintáz  $\alpha$  és  $\beta$  alegységén kívül  $\gamma$ ,  $\delta$  és  $\epsilon$  alegységek is azonosíthatók voltak.



34. ábra: A kezeletlen (Kontroll) és a 0,5 M NaSCN-sóoldattal kezelt TM felülűszójából detektált fehérjekomponensek relatív megoszlása  $\pm$  SD.

#### 4.2.3 Következtetések

Korábbi, a TM-ok tripszinemésztéssel végzett kísérleteink alapján megállapítottuk, hogy a H<sub>II</sub> lipidfázis sztróma oldali fehérjékkel vagy polipeptidekkel áll kapcsolatban (Dlouhý és mtsai, 2022). Ezt követő kísérleteink arra irányultak, hogy azonosítsuk azokat a sztróma oldali fehérjé(ke)t vagy a sztróma oldali vizes fázisba benyúló polipeptid(ek)et, amely(ek) a TM lipidekkel kölcsönhatásba lépve felelős(ek) lehet(nek) a megfigyelt H<sub>II</sub> fázis kialakulásáért.

A 4.2.1 fejezetben leírtak alapján, eredeti hipotézisünkkel szemben, a CURT1 protein szerepe nem tűnik valószínűnek. A marginális vagy görbületi régió (MR) fázisviselkedését vizsgálva megállapítottuk, hogy az izolált MR (laza üledék) nem tartalmaz H<sub>II</sub> fázis jelenlétére utaló <sup>31</sup>P-NMR spektrális ujjlenyomatot. Az izolált MR lipidjei a CURT1 protein körül I fázist képeznek – ezek a lipidek valószínűleg hasonló fázist alkotnak az intakt TM MR-jában is.

A NaSCN-kezelés hatására szétroncsolt H<sub>III</sub> fázis ill. ennek kapcsolata az ATP-szintáz sztróma oldali alegységeivel azért érdekes, mivel a szakirodalmi adatok alapján a nem-kettősréteg CL befolyásolja a mitokondriális ATP-szintáz működését (Acehan és mtsai, 2011; Duncan és mtsai, 2016); a CL szerepet játszik az ATP-szintáz stabilizálásában, a kriszták laterális szerveződésében, továbbá segítséget nyújt a C-gyűrű forgásában, annak mintegy kenőanyagot szolgáltatva segíti a proton transzfert. Gasanov és mtsai (2016) pedig a nem-kettősréteg fázisok szerepét hozták összefüggésbe a mitokondriális ATP-szintáz működésével. Mindezen adatokkal összhangban és saját eredményeink tükrében azt feltételezzük, hogy a H<sub>II</sub> fázis kapcsolatban áll az ATP-

szintázzal – legnagyobb valószínűséggel annak  $\gamma$  és  $\varepsilon$  alegységeivel, hiszen térben ezek állnak legközelebb a kettősréteg membránhoz.

## 5 ÁLTALÁNOS MEGVITATÁS ÉS KITEKINTÉS

---

Munkacsoportunk vizsgálatai korábban már igazolták a kettősréteg és nem-kettősréteg lipidfázisok jelenlétét növényi TM-okban, azonban a nem-kettősréteg fázisok szerepét a membránszerkezet fenntartásában (mint pl. membránfúziók) – habár feltételezték – empirikusan eddig még nem bizonyították.

Az értekezésemben bemutatott eredmények azt igazolták, hogy a nem-kettősréteg I fázis szerepet játszik a PSII-ben dús tapadt membránparók, a BBY partikulumok összeolvadásában. A  $^{31}\text{P}$ -NMR technikával kimutatható I fázis szelektív eliminációja együtt jár a laterálisan összeolvadt BBY partikulumok kisebb alkotóegységeikre történő szétesésével, miközben a pigment-protein komplexek molekuláris szerkezete és a PSII funkcionális aktivitása nem sérül jelentősen.

A BBY membránokon végzett  $^{31}\text{P}$ -NMR kísérleteink alapján megbecsülhetjük azt is, hogy a WGL-emésztés által nem érintett, L fázisban lévő *bulk* lipidek mekkora „zárványokban” található a pigment-protein komplexek között. A DEM alapvető feltételezéseinek megfelelően a PSII-LHCII szuperkomplexek közé zárt lipidfoltok átlagos méretét a TM lipidek – nem-lamelláris hajlamából eredő – szegregációs képessége határozza meg. (A DEM dinamikus kicserélődési membrán modellt és a lipid:protein arány homeosztatisz szabályozásának javasolt mechanizmusát az 5.1 fejezetben ismertettem.)

A lipidfoltok átlagos méretét a 4.1.1 bekezdésben ismertetett számítások kiterjesztésével végeztem el. Ezek szerint egy átlagos 500 nm átmérőjű ( $196\,350\text{ nm}^2$  területű) gránumban a *bulk* + *shell* lipidek  $59\,690\text{ nm}^2$  területet foglalnak el. Dekonvolúciós analízisünk alapján ennek 60,2%-a az L fázisban található, ami  $35\,934\text{ nm}^2$ -t jelent. Felhasználva a képfeldolgozásból kapott 69,6%-os fehérjelefedettséget, a fehérjék  $136\,660\text{ nm}^2$  területet foglalnak el. Amennyiben a spenótban megtalálható PSII-LHCII szuperkomplex  $\sim 500\text{ nm}^2$  területével számolunk (Boekema és mtsai, 2000) 273 db szuperkomplexet kapunk a gránum területén, amelyek között a megbecsült lipid „zárványok” átlagos területe  $\sim 132\text{ nm}^2$ , ami a kettősréteg szerkezetet mutató TM régióban lipidrétegenként 200-300 lipidmolekulának felel meg, függően az átlagos lipidterülettől, ami 0,45 és  $0,65\text{ nm}^2$  közötti értéknek vehető (Nagle és Tristram-Nagle 2000; Simidjiev és mtsai, 2000). Érdekes megjegyezni, hogy Boekema és mtsai (2000) felvételein

kiterjedt, protein-mentes lipidmezők nem fedezhetők fel; az egymással összekötött kettősréteg foltok méreteloszlása egyenletesnek tűnik; így a fenti átlagértéket jellemzőnek tekinthetjük.

A BBY partikulumokban és TM-ban található lipid-heterogenitás karakterizálása során három lipid-mikrokörnyezetet detektáltam. Általánosságban a DPH fluoreszcencia anizotrópia lecsengés jó indikátora a lipid zsírsavláncok rendezetlenségi fokának, illetve eszközt ad a folyadékkristályos és gél állapotátmenetek tanulmányozására (Ford és mtsai, 1982; Osella és mtsai, 2020; Paloncýová és mtsai, 2019), továbbá lehetőséget ad a lamelláris és nem-lamelláris átmenetek detektálására. Chen és mtsai (1990) a DPH anizotrópia heterogenitását olyan lipidkeverékekben mutatték ki, amelyek L és H<sub>II</sub> fázisátalakuláson mentek keresztül. Az átmenet során a laterális diffúziós állandó jelentősen megnőtt a H<sub>II</sub> fázisátmenet során, amely a nem-kettősréteg fázis dinamikusabb természetét tükrözi. Bár méréseink a DPH próba fluoreszcencia lecsengési kinetikát és nem az anizotrópia lecsengést vizsgálták, az általunk megfigyelt rövidebb élettartamok összhangban lehetnek a lipidek gyorsabb laterális és rotációs diffúziójával a nem-kettősréteg lipidfázisokban, ahol a lipidmolekulák mozgása a kettősréteghez képest kevésbé korlátozott. Azt is megállapítottam, hogy a WGL-hatás szelektív, a membránba integrálódott fluoreszcens próbából rögzített lecsengés leggyorsabb komponensének relatív amplitúdóját csökkenti, amely nagy valószínűséggel a legdinamikusabb lipidkörnyezet, az I fázis roncsolásával függ össze.

Jelen vizsgálataink közvetlen adatokat nem szolgáltatnak TM-ok fúziójára intakt rendszerekben. Erre vonatkozóan a jövőben további erőfeszítéseket teszünk – korábban nem használt lipáz enzimek és mutánsok vagy a membránszerkezetet részben megbontó vagy gyengítő kezelések alkalmazásával és morfológiai vizsgálatokkal.

Mivel a kísérleteimben pusztán a lipidfázisok szerepére összpontosítottam, nem vizsgáltam kitüntetett proteinek szerepét, amelyek közrejátszhatnak a fúzió kialakulásában. A jövőbeli kísérletekben mindenképpen nagyobb hangsúlyt szeretnék fektetni a lipidek és a TM-ok fúziójában feltételezhetően szerepet játszó fehérjék kölcsönhatására is. Emellett érdemes lehet kiterjeszteni a kutatásokat más fotoszintetikus organizmusok, pl. zöldalgák, cianobaktériumok körére.

Nagy felbontású képalkotó módszerek (atomi erőmikroszkópia, STORM-mikroszkópia), illetve lézercsipesz alkalmazásával további betekintést kaphatunk a

membránlapok összeköttetéseiről, azok szerkezetéről. A későbbiekben tervezzük a *bulk* TM lipidfázisok modellezését a kettősrétegű lipidfázisokra már megalkotott Matryoshka-modell (Bicout és mtsai, 2021; Cisse és mtsai, 2022; Matsuo és mtsai, 2022) kiterjesztésével kvázi-elasztikus neutronszereléses kísérletekkel, amelyet – széles körű nemzetközi együttműködés keretein belül – molekuláris dinamika szimulációval, továbbá SAXS és SANS mérésekkel tervezünk kiegészíteni.

A marginális régióban (MR) tisztán izotróp jellegű rezonanciasávok jelenlétét igazoltam. Habár a korábbi feltételezések a MR-ra jellemző nagyfokú görbület kialakítását exkluzívan a nem-kettősréteg lipideknek tulajdonították (Murphy 1982), később kiderült, hogy a CURT1 proteinek stabilizálják annak kialakulását (Armbruster és mtsai, 2013). Mivel a CURT1 protein N-terminális sztróma oldalra kinyúló alegysége tripszinérzékeny, így a MR-ról azt feltételeztük, hogy az közreműködik a H<sub>II</sub> fázis kialakulásában. Az itt bemutatott eredményeim nem mutattak erre utaló jelet. Mindazonáltal ennek a szerkezeti egységnek a lipidfázis-viselkedése és a lipidek kölcsönhatása a CURT1 proteinnel fontos szerepet játszhat a TM szerkezet kialakulásában.

A hidratációs állapotokat és a fehérjék szolvatációs burkát markánsan befolyásoló kaotróp NaSCN-tal végzett kísérletek azt igazolták, hogy a TM-ban a kezelés indukálta H<sub>II</sub> fázis letörése együtt jár az ATP-szintáz alegységeinek membránból való felszabadulásával. Amint azt a fentiekben kifejtettem, ez magyarázhatja a H<sub>II</sub> fázis megjelenését; mindazonáltal, ezt nem tekinthetjük bizonyítottnak. A NaSCN-tal kezelt TM-ról szerzett eredmények tükrében a jövőben az ATP-szintázban gazdag TM terület, a sztróma lamellák vizsgálata is szükséges. Korábbi eredmények alapján a sztróma régióban is megtalálható az L, H<sub>II</sub> és I fázisok (Dlouhý és mtsai, 2021a).

A kísérleteim során kapott adatok jól illeszkednek a DEM keretrendszerébe, amely a kettősréteg és nem-kettősréteg lipidfázisok dinamikus egyensúlyban működő, együttes jelenlétét feltételezi a membránokban. Habár tudásunk továbbra is korlátozott a nem-kettősréteg lipidfázisok működését illetően, az I fázis fúzióban betöltött szerepe is jól példázza azok jelentőségét, így a hagyományos membránmodell (fluid-mozaik membránmodell) újragondolását, ill. kiegészítését.



## 6 SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

---

A dolgozat alapjául szolgáló közlemények:

**Böde K**, Javornik U, Dlouhý O, Zsíros O, Biswas A, Domonkos I, Šket P, Karlický V, Ughy B, Lambrev PH, Špunda V, Plavec J, Garab G. Role of isotropic lipid phase in the fusion of photosystem II membranes. *Photosynth Res.* 2024 Apr 25. doi: 10.1007/s11120-024-01097-3. IF<sub>2024</sub>: 2,9

Dlouhý O, Karlický V, Javornik U, Kurasová I, Zsíros O, Šket P, Kanna SD, **Böde K**, Večeřová K, Urban O, Gasanoff ES, Plavec J, Špunda V, Ughy B, Garab G. Structural Entities Associated with Different Lipid Phases of Plant Thylakoid Membranes-Selective Susceptibilities to Different Lipases and Proteases. *Cells.* 2022 Aug 28;11(17):2681. doi: 10.3390/cells11172681. IF<sub>2022</sub>: 6,7

Egyéb közlemény:

Kanna SD, Domonkos I, Kóbori TO, Dergez Á, **Böde K**, Nagyapáti S, Zsíros O, Ünneper R, Nagy G, Garab G, Szilák L, Solymosi K, Kovács L, Ughy B. Salt Stress Induces Paramylon Accumulation and Fine-Tuning of the Macro-Organization of Thylakoid Membranes in *Euglena gracilis* Cells. *Front Plant Sci.* 2021 Nov 16;12:725699. doi:10.3389/fpls.2021.725699. IF<sub>2024</sub>: 5,6

## 7 KONFERENCIA ELŐADÁSOK ÉS POSZTEREK

---

### Dolgozathoz kapcsolódó előadások:

„Lipid polymorphism in photosynthetic membranes. The fusion of photosystem-II enriched membrane pairs, assisted by isotropic lipid phase”, European Joint Theory/Experiment Meeting on Membranes (EJTEMM2024), Debrecen, Magyarország, 2024.06.12. – 14.

„Role of Isotropic Lipid Phases in the Fusion of Thylakoid Membranes, International workshop on the „Structural Dynamics of Lipid Model Systems and Thylakoid Membranes, Ostrava, Csehország, 2024.02.21. – 23.

„The Role of isotropic lipid phase in the fusion of photosystem II membranes”, Workshop on the Structure and Dynamics of Thylakoid Membranes as Reflected by Scattering Experiments and Computer Simulations, Budapest, Magyarország, 2023.12.08.

„Lipid polymorphism of photosystem II membranes – evidence of the role of isotropic lipid phase in membrane fusions”, Magyar Biofizikai Társaság (MBFT) XXIX. Kongresszusa, Budapest, Magyarország, 2023.08.28. – 31.

„Evidence for the role of isotropic lipid phase in the fusion of photosystem II membranes" 11th International Conference of Photosynthesis and Hydrogen Energy Research for Sustainability, Isztambul, Törökország, 2023.07.03. – 09.

### Dolgozathoz kapcsolódó poszterprezentációk:

„Lipid polymorphism in photosystem II membranes – evidence of the role of isotropic lipid phase in membrane fusions”, Straub Napok 2023 – SZBK, Szeged, Magyarország, 2023.05.25. – 26.

„Origin of the isotropic lipid phases in plant thylakoid and photosystem II membranes”,  
„Structural and functional units associated with non-bilayer lipid phases of plant  
thylakoid membranes”, Regional Biophysics Conference (RBC2022), Pécs,  
Magyarország, 2022.08.22. – 26.

„Lipid polymorphism of plant thylakoid membranes. Structural and functional units  
associated with non-bilayer phases”, 21st European Bioenergetics Conference  
(EBEC2022), Aix-en-Provence, Franciaország, 2022.08.20. – 25.

Egyéb poszterprezentációk:

„Bacterial growth phases in *Synechococcus elongatus* PCC7942", Straub Napok 2022 –  
SZBK, Szeged, Magyarország, 2022.05.25. – 27.

„Bacterial growth phases in *Synechococcus elongatus* PCC7942", ProSynFest2020,  
Córdoba, Spanyolország, 2022.03.16. – 19.

„Characterization of growth of microalgae”, AlgaEurope2020, Róma, Olaszország,  
2020.12.01. – 03.

„Microalgae as immunostimulants in fish farming”, AlgaEurope2019, Párizs,  
Franciaország, 2019.12.03. – 05.

„Macro-organization of the photosynthetic membranes in isolated microalgal strains",  
Nemzetközi Mikroalga Szimpózium/ 9th Symposium on “Microalgae and Seaweed  
Products in Plant/Soil-Systems”, Mosonmagyaróvár, Magyarország, 2019.06.24. – 25.

„Effect of salt treatments on biotechnologically important microalgal strains", Straub  
Napok 2019 – SZBK, Szeged, Magyarország, 2019.05.29. – 30.

## 8 ÖSSZEFOGLALÁS

---

A biológia membránok fiziológiásan releváns formájának a lipid kettősréteg szerkezetet tekintik. TM-okban a proton-motoros erő létrejöttéhez a növényi TM belső (lumenális) és külső (sztóma oldali) vizes fázisa között szükséges, hogy a vezikula membránja alapvetően impermeábilis legyen a víz és a töltéssel rendelkező ionok / protonok és molekulák számára; ez megköveteli a *bulk* lipidmolekulák kettősréteg szerkezetbe rendeződését. Tudjuk azonban, hogy a TM fő lipiddömeget a nem-kettősréteg-képző lipidfajta, a monogalaktozil-diacilglicerol adja. Nem-kettősréteg-képző lipidek jelentős mennyiségben megtalálhatók más energiaátalakító membránokban is, és valószínűleg minden ismert biológiai membránban jelen vannak. Ez fontos kérdéseket vet föl ezen lipidek szerkezeti és funkcionális szerepéről.

Az elmúlt közel két évtized során Munkacsoportunk – főként  $^{31}\text{P}$ -NMR spektroszkópia alkalmazásával elért – eredményei megmutatták, hogy izolált, funkcionális növényi TM-okban a túlnyomó többségében kettősrétegnek hitt membránorganizáció mellett, nem-kettősréteg struktúrák is megtalálhatók; a lamelláris fázis (L, ~40%) mellett, inverz hexagonális ( $\text{H}_{\text{II}}$ , ~40%) és legalább két izotróp (I, ~20%) fázist azonosítottak. Kiderült az is, hogy az egyik I fázis olyan lipidmolekulákból származik, amelyek a lumenben található vízzeloldható violaxantin de-epoxidáz (VDE) fényvédő enzimmel vannak kölcsönhatásban. A többi nem-kettősréteg fázis szerkezeti és funkcionális jelentőségéről TM-okban ekkor még csak feltételezéseink voltak.

Célul tűztem ki, hogy azonosítsam és jellemezzem a TM azon szerkezeti egységeit, amelyek nem-kettősréteg lipidfázisokat alkotnak. Az I fázis membránfúzióban betöltött szerepének tanulmányozására egy egyszerűsített rendszert, az úgynevezett BBY membránt választottam; ezek oldalirányban összeolvadt, PSII-ben dús tapadt membránpárok, amelyek több mikronos kiterjedt lapokká fuzionálnak. Kísérleteim feltárták, hogy a BBY *bulk* lipid molekulái a kettősréteg (L) szerkezet mellett jelentős mennyiségben I fázisú szerkezetekben találhatóak.

Megállapítottuk, hogy a búzacsíra lipáz (WGL) szelektíven célozza a BBY partikulumok I fázisát, amivel aegységeire bontotta az összeolvadt membránlapokat anélkül, hogy a fotoszintetikus apparátus szerkezeti és funkcionális integritását megbontaná. A WGL-kezelés hatását cirkuláris dikroizmus és mágneses lineáris dikroizmus spektroszkópiával, szukróz sűrűséggrádiens kísérlettel, gyors klorofill-a

fluoreszcens tranziensekkel és pásztázó elektronmikroszkópiával jellemeztem. Tudomásom szerint ez az első eset, hogy egy biológiai membránban tisztán lipid-mediált membránfúzió azonosítható. A nem-kettősrétegű (I) fázis kulcsfontosságú szerepe a membránfúzióban azt valószínűsíti, hogy ennek a lipidfázisnak jelentős szerepe van a növények összefonódó TM-hálózatának önszerveződésében.

Megvizsgáltam a CURT1 proteinben gazdag görbületi régió (marginális régió) lipidpolimorfizmusát – és cáfoltam azt a korábbi feltételezésünket, miszerint a tripszinszenzitív oldalláncokkal rendelkező CURT1 protein lipidekkel kölcsönhatva H<sub>II</sub> fázist alkot. Méréseim során izotróp karakterisztikájú rezonanciasávokat detektáltam, amelyek WGL-kezelésre szintén érzékenyek voltak, de tripszinérzékenységet nem mutattak.

Jelenleg is folyó, a hidratációs állapotok szerepének tisztázására elvégzett Hofmeister-sókat alkalmazó kísérleteink alapján kiderült, hogy a kaotróp NaSCN megszünteti a TM-ok H<sub>II</sub>-fázisát anélkül, hogy az L fázis NMR-sávját számottevően befolyásolná. Előzetes SDS-PAGE kísérleteink azt mutatják, hogy NaSCN-tal kezelt spenót TM felülűszójában jelen van egy ~60 kDa méretű egység, amelyet (CEITEC, Brno, Csehország) az ATP-szintáz alegységeiként azonosítottak; a felülűszóban további kisebb alegységek, a komplex TM felszínhez közeli  $\gamma$  és  $\varepsilon$  alegységei is jelentős mértékben jelen vannak. Ezért feltételezzük, hogy a H<sub>II</sub>-fázis (legalábbis részben) a lipidek és (egy vagy több) ATP-szintáz alegység asszociációjából származik. Ennek bizonyítása vagy cáfolása további kísérleteket igényel.

Eredményeimet a célkitűzéseknek megfelelően rendezett tézispontokban tárgyalom:

1/a <sup>31</sup>P-NMR spektroszkópiai módszerek segítségével és a spektrumok dekonvolúciós analízisével karakterizáltam a BBY membránok lipidpolimorfizmusát. Megmutattam, hogy a BBY membránokban H<sub>II</sub> fázis nem azonosítható; az L fázis mellett I fázis mutatható ki.

1/b Megállapítottam, hogy az I fázis(ok) érzékeny(ek) WGL-kezelésre, és az(ok) a lipid kettősrétegtől jól elkülönülő domén(ek)ben helyezkedik (helyezkednek) el. Az I fázis(ok) roncsolásával a BBY membránlapok felbomlanak, ezáltal

bizonyítottam, hogy az I fázis(ok) meghatározó szerepet játszik (játszanak) a BBY membránlapok fúziójában.

- 1/c Független technika alkalmazásával – lipofil festékmolekula fluoreszcencia élettartam mérésekkel – megerősítettem, hogy a BBY *bulk* lipidmolekulái heterogén fiziko-kémiai környezetben találhatóak és hogy ezek egyike, a  $^{31}\text{P}$ -NMR spektroszkópiával azonosított I fázishoz hasonlóan, szelektíven roncsolható WGL enzimmal.
- 2/a Karakterizáltam a TM marginális régiójának lipidpolimorfizmusát. A korábban feltételezett  $\text{H}_{\text{II}}$  fázis helyett, I fázisok jelenlétét mutattam ki. Ezzel nagy valószínűséggel kizártam a CURT1 protein szerepét a TM  $\text{H}_{\text{II}}$  fázisának kialakításában.
- 2/b A membránrendszer hidratáltsági állapotát befolyásoló kaotróp Hofmeister-só, NaSCN használatával megerősítettem azt a hipotézist, miszerint a  $\text{H}_{\text{II}}$  fázis egy vagy több sztróma oldali TM fehérjével asszociálódik; ez(ek) nagy valószínűséggel az ATP-szintáz  $\gamma$  vagy(/és)  $\varepsilon$  alegysége(i) lehet(nek).

*Összegezve:*

*1. Elsőként szolgáltatam bizonyítékot funkcionáló biológiai membránban tisztán lipid-mediált fúzióra: a második fotokémiai rendszer tapadt membránpárjainak kiterjedt laterális fúzióját a nem-kettősréteg, izotróp lipidfázis biztosítja.*

*2. A tilakoidmembránok inverz hexagonális lipidfázisának kialakításában szerepet játszó lehetséges fehérjék közül nagy valószínűséggel kizárhatónak találtam a CURT1 proteint; előzetes adataink azt valószínűsítik, hogy ennek a fázisnak a kialakításában az ATP-szintáz  $\gamma$  és/vagy  $\varepsilon$  alegysége vesz részt.*

## 9 SUMMARY

---

The functioning of plant thylakoid membranes (TMs) relies on their impermeability to water-soluble compounds, ions and protons, in particular – allowing the build-up and utilization of the proton motive force generated by the photosynthetic light reactions. Impermeability of membranes is warranted by a bilayer organization of their bulk lipid molecules. However, it is well known that the main lipid species of TMs is the monogalactosyl-diacylglycerol, a non-bilayer-forming lipid. Non-bilayer lipids are the dominant lipid molecules of all energy-converting membranes.

In the past two decades, using mainly  $^{31}\text{P}$ -NMR spectroscopy, it has been revealed that, isolated functional plant TMs possess non-bilayer lipid assemblies in large quantities; in addition to the bilayer or lamellar phase (L, ~40%), an inverted hexagonal ( $\text{H}_{\text{II}}$ , ~40%) and at least two isotropic (I, ~20%) phases have been identified. An I phase had been shown to arise from lipid molecules surrounding the water-soluble, luminal photoprotective enzyme VDE. However, the structural and functional significance of non-bilayer structures in TMs remained elusive.

The overall goal of my PhD work was to further characterize and identify the structural entities of TMs that give rise to the different  $^{31}\text{P}$ -NMR detectable non-bilayer lipid phases.

To study the putative role of the I phase in membrane fusion, we chose a simplified system, the so-called BBY membranes, which are laterally fused stacked photosystem II membrane pairs that form extended sheets. We determined the lipid polymorphism of BBY, and showed that similarly to TMs, wheat germ lipase (WGL) selectively targeted the I phase and that WGL disassembled the extended membrane sheets into their constituent units without compromising the structural and functional integrity of the photosynthetic apparatus. I characterized the effect of WGL treatment by circular dichroism and magnetic linear dichroism spectroscopy, sucrose-density gradient experiment, fast chlorophyll-a fluorescence transients and scanning electron microscopy. We provided evidence, to our knowledge, for the first time for purely lipid-mediated membrane fusion and demonstrated the key role of a non-bilayer (I) phase, implying its significance in the self-assembly of the interwoven TM network of plants.

By characterizing the lipid polymorphism of the CURT1 protein-rich curvature region (marginal region, MR), we disproved the hypothesis that CURT1 protein, with

trypsin sensitive side chains, participates in the formation of the H<sub>II</sub> phase in TMs. As shown by our <sup>31</sup>P-NMR spectroscopy measurements, in isolated MR preparations the bulk lipids are assembled into isotropically arranged, WGL-sensitive and trypsin-insensitive structures.

Our ongoing experiments – aimed to clarify the role of hydration state in the lipid phase behavior using Hofmeister salts – have shown that the chaotropic salt, NaSCN eliminates the H<sub>II</sub> phase of TMs without significant effect on the L phase. Preliminary SDS-PAGE experiments show that a ~60 kDa band, identified as ATP synthase subunits (CEITEC, Brno, Czech Republic), is present in the spinach TM supernatant treated with NaSCN; additional smaller subunits,  $\gamma$  and  $\epsilon$ , which are close to the TM surface, are also present in significant amounts in the supernatant. Thus, we suggest that the H<sub>II</sub> phase is likely to originate (at least in part) from association of lipids the  $\gamma$  and/or  $\epsilon$  subunit(s) of the ATP synthase. However, further experiments are required to reach solid conclusions.

The thesis points of my PhD dissertation are as follows:

- 1/a Using <sup>31</sup>P-NMR spectroscopy and deconvolution analysis of the spectra, I have characterized the lipid polymorphism of BBY membranes and have shown the absence of an H<sub>III</sub> phase; instead, the bulk lipids were mainly found in the bilayer (L phase) of the PSII membranes, and the particles contained two sharp I phases.
- 1/b In BBY, WGL treatment selectively destroys the I phase(s), without affecting the L phase and the molecular organization and photochemical activity of PSII – showing that the lipid molecules constituting the I phase(s) are found in (a) domain(s) distinct from the bilayer membrane; destroying the I phase(s) by WGL leads to disintegration of membrane sheets, thereby proving that their fusion is mediated by I phase lipids.
- 1/c Using fluorescence lifetime analysis of a lipophilic dye, I confirmed that the bulk lipid molecules of BBY are found in heterogeneous physico-chemical environments, and that one of the lifetime components was selectively suppressed by WGL, parallel with the destruction of the I phase by this lipase.



2/a I characterized the lipid polymorphism of the marginal region (MR) of TMs. Instead of the previously hypothesized HII phase, an I phase was found, showing that the bulk lipids of MR are assembled in an isotropic structure. This renders the participation of CURT1 protein in the HII phase highly unlikely.

2/b Using the chaotropic Hofmeister-salt, NaSCN, which influences the hydration state of the membrane system, I confirmed the hypothesis that the HII phase associates with one or more stromal-side TM proteins; and, as shown by preliminary data, this (these) protein(s) is (are) most probably the  $\gamma$  and/or  $\epsilon$  subunit(s) of the ATP synthase.

*In summary:*

*1. I provided evidence for the first time of purely lipid-mediated fusion in a functioning biological membrane: the extensive lateral fusion of the photosystem II membrane pairs is enabled by an isotropic lipid phase.*

*2. Among the proteins potentially involved in the formation of the inverse hexagonal lipid phase of the thylakoid membranes, I found that the contributions of CURT1 is highly unlikely; preliminary data suggest the participation of the  $\gamma$  and/or  $\epsilon$  subunit(s) of the ATP synthase in the formation of this phase.*

## 10 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

---

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Garab Győzőnek, aki doktori tanulmányaim utolsó éveiben szakmai útmutatásával, lelkesedésével, megértésével, türelmével, szeretetével és véget nem érő bátorításával visszahozta a kutatás iránt érzett szeretetemet és lelkesedésemet. Köszönöm a számos lehetőséget, konferenciárésztvételt, a motivációs „tréningeket” és a folyamatos csokoládé utánpótlást.

Szeretném megköszönni Dr. Lambrev H. Petarnak, a Foszintetikus Membrán Csoport csoportvezetőjének és Dr. Vass Imrének, a Növénybiológiai Intézet igazgatójának, aki kutatási témámat befogadta és biztosította a kísérletekhez szükséges feltételeket.

Köszönöm Dr. Zsiros Ottónak, aki a mintapreparáláson kívül, számos spektroszkópai mérésben is részt vett és készségesen megosztotta velem szakmai tudását és tapasztalatát.

Köszönöm Dr. Magyar Melindának, akihez bármiért fordulhattam segítségért, útmutatásért vagy egy kardigánért.

Hálával tartozom Biswas Avratanunak, aki bevezetett a kódsorok világába és rengeteg segítséget nyújtott a MATLAB elsajátításában. Köszönöm a véget nem érő támogatást és szeretetet, amit az évek során kaptam tőled, illetve, hogy megmutattad, nem szabad csöndben maradni.

Köszönöm Dr. Szalontai Balázsnak az FTIR elsajátításában nyújtott rengeteg segítséget és kritikai észrevételt. Hálás vagyok a jó hangulatú és hosszúra nyúló órákért, amiket az adatelemzés és az elméleti háttér átbeszélésével töltöttünk. És köszönöm a csodálatos házikenyeret.

Köszönöm Dr. Páli Tibornak és Dr. Sebőkné-Nagy Krisztinának a DPH-mérésekben nyújtott szakmai segítséget, türelmet és a rendkívül hasznos megbeszéléseket.

Köszönet illeti Dr. Steinbach Gábort a 3D nyomtatott mágneses mintatartóért, amelyet a SEM minták orientálásánál használtunk, illetve – habár ebbe a dolgozatba nem került bele – a fluoreszcens mikroszkópos felvételek készítésében nyújtott segítségért.

Köszönöm Dr. Domonkos Ildikónak a SEM felvételek elkészítését és a nagyon kellemes kávészüneteket, receptötleteket.

Köszönöm Dr. Ughy Bettinának, Nagyapáti Saroltának és Dr. Sai Divya Kannának a közös munkát, valamint a csoport összes jelenlegi és volt tagjának, akiket esetleg kifelejtettem, de valamilyen módon hozzájárultak a disszertáció létrejöttéhez.

Köszönöm az Ostrava Egyetem, Biofizika Csoportnak és a csoportvezető Prof. Špunda Vladimírnak, hogy kiküldetésem alkalmával egy jókedélyű, támogató és elfogadó közösségben dolgozhattam.

Külön szeretném kifejezni hálámat Dr. Dlouhý Ondřejnek, aki folyamatos szakmai és baráti támogatásával, végtelen türelmével és humorával a legfeszültebb pillanatokban tette elviselhetővé.

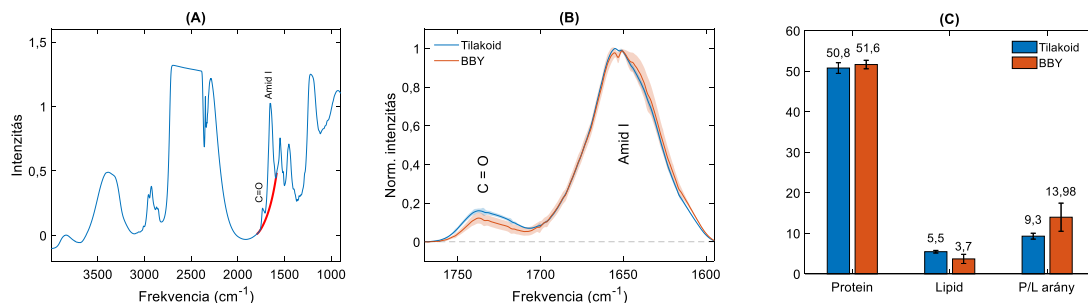
Hálás köszönet a ljubljana-i Nemzeti Kémiai Intézet munkatársainak. Első sorban Javornik Urošnak, aki hihetetlen szakmai felkészültséggel végezte a  $^{31}\text{P}$ -NMR méréseket, és még több türelemmel viseltetett kérdéseim és kéréseim iránt. Köszönet illeti Dr. Šket Primožt, akihez bármilyen *last minute* kéréssel fordulhattam. Külön köszönet illeti Prof. Plavec Janezt, aki befogadta projektünket és minden szakmai feltételt biztosított a kísérletek megvalósulásához.

Nem utolsó sorban rendkívül hálás vagyok a családomnak és a barátaimnak, akik végig mellettem álltak, hittek bennem és támogatásukkal erőt adtak a legnehezebb pillanatokban.

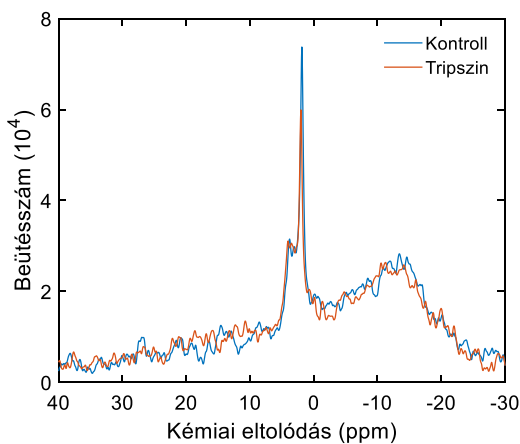
**Kutatásomat finanszírozták:**

- Magyar Állami PhD ösztöndíj
- Növénybiológiai Intézet által nyújtott predoktori ösztöndíj
- GAČR 23-07744S (Cseh Tudományos Alapítvány)
- Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alap: OTKA ANN 144012
- LERCO projekt, EU Just Transition Operatív Program (CZ.10.03.01/00/22\_003/0000003)
- Közép-európai Kutatási Infrastruktúra-konzorcium (CERIC-ERIC)

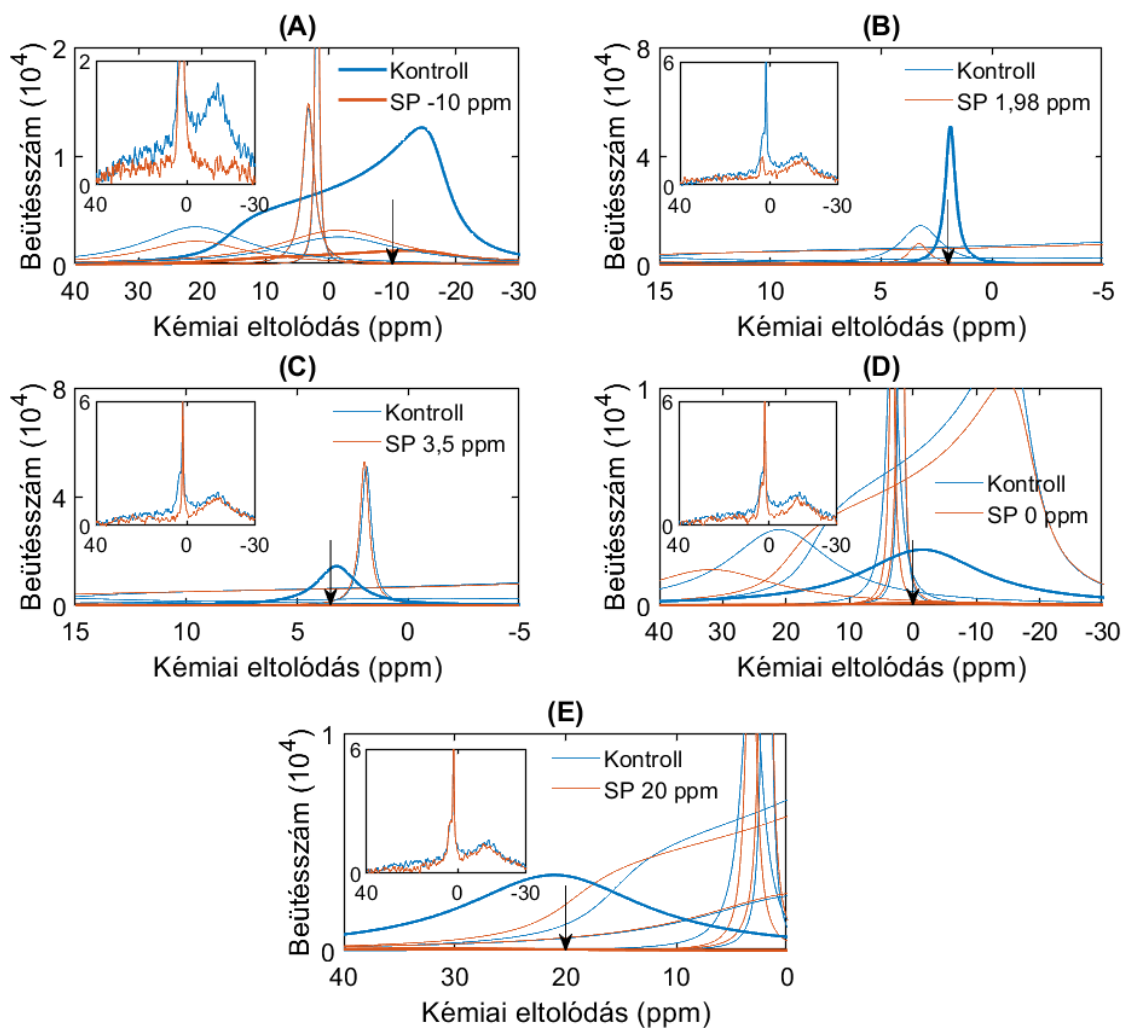
# 11 FÜGGELÉK



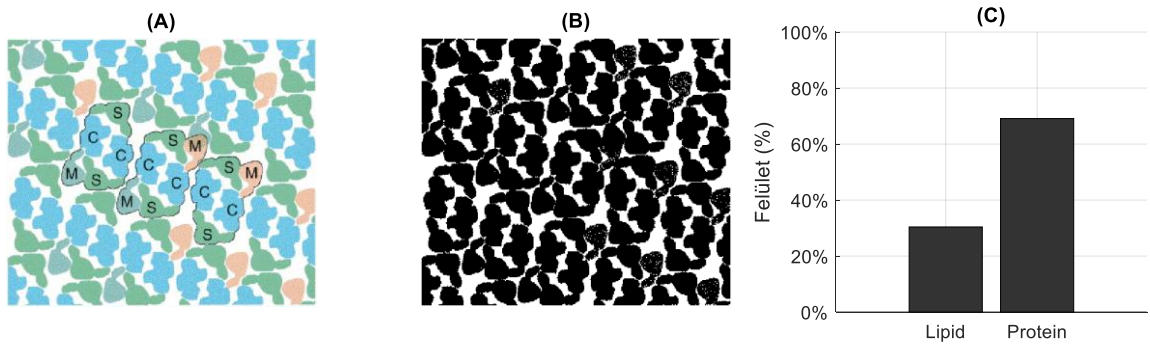
**F1. ábra:** Spenótból izolált TM és BBY membránok infravörös spektrális jellemzői. A piros vonal a 3. rendű polinom függvényt jelzi, amelyet alapvonalként illesztettem az „észter C=O + amid I” régióhoz (A). TM ( $n = 4$ ) és BBY membránok ( $n = 6$ ) átlagolt abszorpciós spektrumai az „észter C=O + amid I” régióból. A spektrumok körüli árnyékolt területek a szórást jelzik (B). Oszlopdiagram az „amid I” régió 1700-1600  $\text{cm}^{-1}$  közötti és az „észter” régió 1750-1700  $\text{cm}^{-1}$  közötti integrált területekről, valamint a fehérje/lipid (P/L) arányokról, amely statisztikailag szignifikáns különbséget mutatott a TM és BBY minták között (Független mintás T-próba,  $p < 0,05$ ) (C). Megjegyzendő, hogy a P/L arány jelentősen magasabb ( $13,98 \pm 3,46$ ) a BBY részecskéknél, mint a TM esetében ( $9,3 \pm 0,72$ ). Ezek az adatok összhangban vannak az irodalmi adatokkal, amelyek a BBY fehérjék sűrűségének növekedését írták le az intakt gránium membránokban mért 70%-ról körülbelül 80%-ra (Haferkamp és mtsai, 2010). Feltételezve a TM-ban lévő 70:30 %-os fehérje/lipid arányt, az átlagolt FTIR spektrumok alapján 77,9%-ot kapnánk BBY-ban.



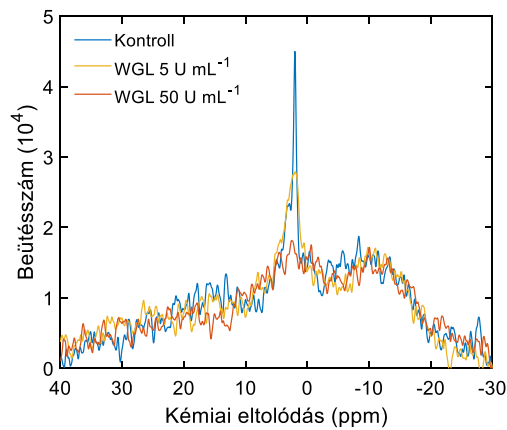
**F2. ábra:** Kezeletlen, kontroll (kék) és 5  $\text{mg mL}^{-1}$  tripszinkezelt (narancssárga) BBY partikulumok  $^{31}\text{P}$ -NMR spektrumai; szkennelés szám: 27 200. A BBY spektrum tripszin inszenzitivitása azt mutatja, hogy ezek a partikulumok nem tartalmaznak fehérjékkel asszociált lipidfázisokat.



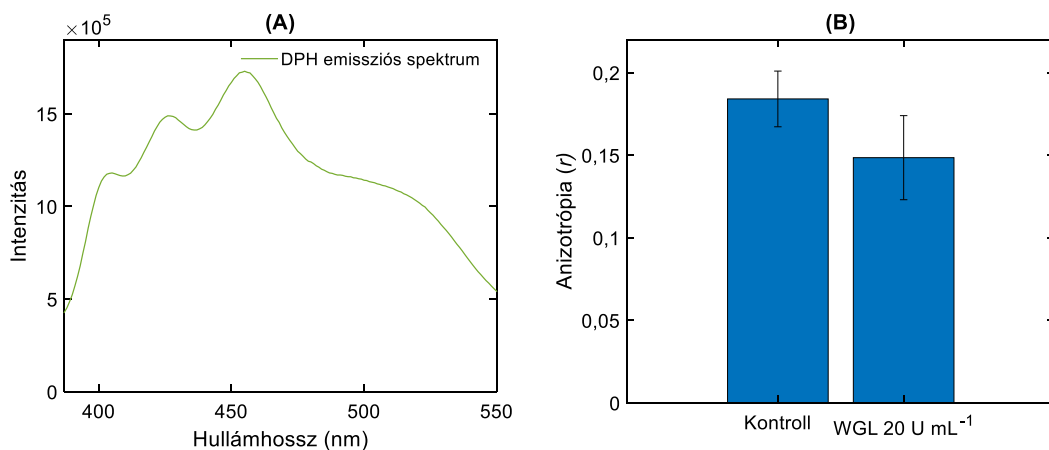
**F3. ábra:** BBY részecskék  $^{31}\text{P}$ -NMR spektruma különböző frekvenciákon alkalmazott szaturációs/telítési pulzusok (SP) hiányában (kontroll, kék görbék) és jelenlétükben (SP, piros görbék); SP -10 ppm (L fázisnak megfelelő) frekvencián (A), SP 1,98 ppm (I fázis közeli) frekvencián (B), SP 3,5 ppm (I fázis közeli) frekvencián (C), SP 0 ppm (I fázis közeli) frekvencián (D), SP 20 ppm ( $H_{II}$  fázisnak megfelelő) frekvencián (E). Ábrabetétek: a nyers spektrumok; az SP kísérletek alapján végrehajtott matematikai dekonvolúció után karakterisztikus spektrális komponenseket kaptunk.



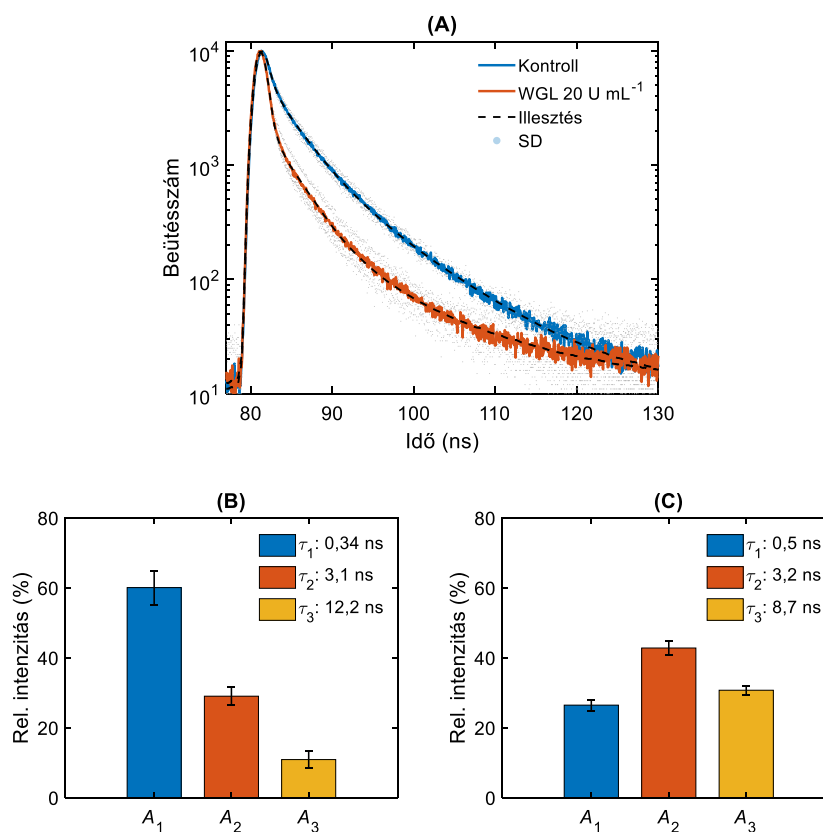
**F4. ábra:** Segédábrák a fehérjék és lipidek által elfoglalt területek meghatározására a gránumban. A képfeldolgozás alapjául szolgáló ábra (A) (az Academic Press engedélyével, (Boekema és mtsai, 2000)); A (B) panel a lipidekkel (fehér) és fehérjével (fekete) borított foltokat szemlélteti; az oszlopdiagram (C) pedig az elfoglalt területek megfelelő arányait mutatja: lipidterület 30,4%, fehérjeterület 69,6%.



**F5. ábra:** A BBY koncentrációfüggő WGL-érzékenysége 5 és 50 U mL<sup>-1</sup> enzimkezelések esetében (szkenelések száma: 6 400).



**F6. ábra:** TM-ba épült DPH fluoreszcencia emissziós spektruma (A) és fluoreszcencia anizotrópia értékei  $\pm$  SE kezeletlen (Kontroll) és 20 U mL<sup>-1</sup> WGL-kezelés hatására (T-próba,  $p > 0,05$ )(B).



**F7. ábra:** TM-ba integrálódott DPH próba fluoreszcencia lecsengési görbéi kezeletlen (Kontroll) és WGL-kezelt (20 U mL<sup>-1</sup>) mintákon három biológiai ismétlésből átlagolva (A). Az illesztett élettídkomponensek és azok relatív intenzitása  $\pm$ SD oszlopdiagrammon ábrázolva kezeletlen (B) és WGL-kezelt minták esetében (C). Kontroll minták élettídkomponensei és hozzátartozó amplitúdó értékei:  $\tau_1 = 0,34 \pm 0,004$  ns,  $\tau_2 = 3,1 \pm 0,06$  ns és  $\tau_3 = 12,2 \pm 1,78$  ns,  $A_1 = 60,07 \pm 4,88$ ,  $A_2 = 29,03 \pm 2,63$ ,  $A_3 = 10,90 \pm 2,53$ . WGL-kezelt minták élettídkomponensei és hozzátartozó amplitúdó értékei:  $\tau_1 = 0,5 \pm 0,04$  ns,  $\tau_2 = 3,2 \pm 0,18$  ns és  $\tau_3 = 8,7 \pm 0,24$  ns,  $A_1 = 26,47 \pm 1,56$ ,  $A_2 = 42,80 \pm 2,0$ ,  $A_3 = 30,73 \pm 1,32$ . A  $\tau_1$ ,  $\tau_2$  és  $\tau_3$  élettídkomponens intenzitása a WGL-emésztés következtében szignifikáns különbséget mutatott a kezeletlen mintához képest (T-próba,  $p < 0,05$ ).



## 12 IRODALOMJEGYZÉK

---

- Acehan, D., Malhotra, A., Xu, Y., Ren, M., Stokes, D. L., & Schlame, M. (2011). Cardiolipin affects the supramolecular organization of ATP synthase in mitochondria. *Biophysical Journal*, *100*(9), 2184-2192. doi:10.1016/j.bpj.2011.03.031
- Akimov, S. A., Molotkovsky, R. J., Kuzmin, P. I., Galimzyanov, T. R., & Batishchev, O. V. (2020). Continuum models of membrane fusion: Evolution of the theory. *Int J Mol Sci*, *21*(11), 3875.
- Andersson, B., & Anderson, J. M. (1980). Lateral heterogeneity in the distribution of chlorophyll-protein complexes of the thylakoid membranes of spinach-chloroplast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, *593*(2), 427-440. doi:10.1016/0005-2728(80)90078-x
- Armbruster, U., Labs, M., Pribil, M., Viola, S., Xu, W. T., Scharfenberg, M., . . . Leister, D. (2013). Arabidopsis CURVATURE THYLAKOID1 Proteins Modify Thylakoid Architecture by Inducing Membrane Curvature. *Plant Cell*, *25*(7), 2661-2678. doi:10.1105/tpc.113.113118
- Austin, J. R., II, & Staehelin, L. A. (2011). Three-Dimensional Architecture of Grana and Stroma Thylakoids of Higher Plants as Determined by Electron Tomography *Plant Physiology*, *155*(4), 1601-1611. doi:10.1104/pp.110.170647
- Barkhade, T., Mahapatra, S. K., & Banerjee, I. (2019). Study of mitochondrial swelling, membrane fluidity and ROS production induced by nano-TiO<sub>2</sub> and prevented by Fe incorporation. *Toxicology Research*, *8*(5), 711-722.
- Barzda, V., Mustardy, L., & Garab, G. (1994). Size dependency of circular dichroism in macroaggregates of photosynthetic pigment-protein complexes. *Biochemistry*, *33*(35), 10837-10841.
- Berthold, D. A., Babcock, G. T., & Yocum, C. F. (1981). A highly resolved, oxygen-evolving photosystem-II preparation from spinach thylakoid membranes - electron-paramagnetic-res and electron-transport properties. *FEBS Letters*, *134*(2), 231-234. doi:10.1016/0014-5793(81)80608-4

- Bicout, D. J., Cisse, A., Matsuo, T., & Peters, J. (2021). The dynamical Matryoshka model: 1. Incoherent neutron scattering functions for lipid dynamics in bilayers. *bioRxiv*, 2021.2009.2021.461198. doi:10.1101/2021.09.21.461198
- Blankenship, R. E. (1992). Origin and early evolution of photosynthesis. *Photosynth Res*, 33, 91-111.
- Blankenship, R. E. (2021). *Molecular Mechanisms of Photosynthesis* (3rd Edition ed.): Wiley.
- Boekema, E. J., van Breemen, J. F., van Roon, H., & Dekker, J. P. (2000). Arrangement of photosystem II supercomplexes in crystalline macrodomains within the thylakoid membrane of green plant chloroplasts. *Journal of Molecular Biology*, 301(5), 1123-1133.
- Bogár, F., Bartha, F., Násztor, Z., Fábrián, L., Leitgeb, B., & Dér, A. (2014). On the Hofmeister Effect: fluctuations at the protein–water interface and the surface tension. *The Journal of Physical Chemistry B*, 118(29), 8496-8504.
- Brown, M. F. (2012). Curvature Forces in Membrane Lipid-Protein Interactions. *Biochemistry*, 51(49), 9782-9795. doi:10.1021/bi301332v
- Brukman, N. G., Uygur, B., Podbilewicz, B., & Chernomordik, L. V. (2019). How cells fuse. *Journal of Cell Biology*, 218(5), 1436-1451.
- Bussi, Y., Shimoni, E., Weiner, A., Kapon, R., Charuvi, D., Nevo, R., . . . Reich, Z. (2019). Fundamental helical geometry consolidates the plant photosynthetic membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116(44), 22366-22375. doi:10.1073/pnas.1905994116
- Chen, S., Cheng, K., Van der Meer, B., & Beechem, J. (1990). Effects of lateral diffusion on the fluorescence anisotropy in hexagonal lipid phases. II. An experimental study. *Biophysical Journal*, 58(6), 1527-1537.
- Chernomordik, L. V., & Kozlov, M. M. (2003). Protein-lipid interplay in fusion and fission of biological membranes. *Annual review of biochemistry*, 72(1), 175-207.
- Chernomordik, L. V., & Kozlov, M. M. (2008). Mechanics of membrane fusion. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15(7), 675-683.
- Chuartzman, S. G., Nevo, R., Shimoni, E., Charuvi, D., Kiss, V., Ohad, I., . . . Reich, Z. (2008). Thylakoid membrane remodeling during state transitions in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 20(4), 1029-1039.

- Cisse, A., Matsuo, T., Plazanet, M., Natali, F., Koza, M. M., Ollivier, J., . . . Peters, J. (2022). The dynamical Matryoshka model: 2. Modeling of local lipid dynamics at the sub-nanosecond timescale in phospholipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1864(9), 183950. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2022.183950>
- Conn, C. E., & Seddon, J. M. (2014). Nonlamellar lipid aggregates. In G. Pabst, N. Kučerka, M. Nieh, & J. Katsaras (Eds.), *Liposomes, Lipid Bilayers and Model Membranes: From Basic Research to Application* (pp. 31-47): CRC Press.
- Cullis, P. R., & de Kruijff, B. (1979). Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological-membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 559(4), 399-420. doi:10.1016/0304-4157(79)90012-1
- D'Amici, G. M., Huber, C. G., & Zolla, L. (2009). Separation of thylakoid membrane proteins by sucrose gradient ultracentrifugation or blue native-SDS-PAGE two-dimensional electrophoresis. *Membrane Proteomics: methods and protocols*, 60-70.
- de Kruijff, B. (1997). Biomembranes - Lipids beyond the bilayer. *Nature*, 386(6621), 129-130. doi:10.1038/386129a0
- de Kruijff, B., & Cullis, P. R. (1980). Cytochrome c specifically induces non-bilayer structures in cardiolipin-containing model membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 602(3), 477-490. doi:10.1016/0005-2736(80)90327-2
- de Kruijff, B., Cullis, P. R., & Verkleij, A. J. (1980). Non-bilayer lipid structures in model and biological membranes. *Trends in Biochemical Sciences*, 5(3), 79-81. doi:10.1016/0968-0004(80)90074-2
- Dekker, J. P., & Boekema, E. J. (2005). Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1706(1), 12-39. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2004.09.009>
- Demchenko, A. P., Mély, Y., Duportail, G., & Klymchenko, A. S. (2009). Monitoring biophysical properties of lipid membranes by environment-sensitive fluorescent probes. *Biophysical journal*, 96(9), 3461-3470.
- Demé, B., Cataye, C., Block, M. A., Maréchal, E., & Jouhet, J. (2014). Contribution of galactoglycerolipids to the 3-dimensional architecture of thylakoids. *The FASEB J*, 28(8), 3373-3383. doi:<https://doi.org/10.1096/fj.13-247395>

- Dér, A., Kelemen, L., Fábíán, L., Taneva, S., Fodor, E., Páli, T., . . . Ramsden, J. (2007). Interfacial water structure controls protein conformation. *The Journal of Physical Chemistry B*, *111*(19), 5344-5350.
- Dlouhý, O., Javorník, U., Zsiros, O., Šket, P., Karlický, V., Špunda, V., . . . Garab, G. (2021a). Lipid Polymorphism of the Subchloroplast—Granum and Stroma Thylakoid Membrane—Particles. I. 31P-NMR Spectroscopy. *Cells*, *10*(9), 2354.
- Dlouhý, O., Karlický, V., Arshad, R., Zsiros, O., Domonkos, I., Kurasová, I., . . . Garab, G. (2021b). Lipid Polymorphism of the Subchloroplast—Granum and Stroma Thylakoid Membrane—Particles. II. Structure and Functions. *Cells*, *10*(9), 2363.
- Dlouhý, O., Karlický, V., Javorník, U., Kurasová, I., Zsiros, O., Šket, P., . . . Garab, G. (2022). Structural Entities Associated with Different Lipid Phases of Plant Thylakoid Membranes - Selective Susceptibilities to Different Lipases and Proteases. *Cells*, *11*(17), 2681.
- Dlouhý, O., Kurasová, I., Karlický, V., Javorník, U., Šket, P., Petrova, N. Z., . . . Garab, G. (2020). Modulation of non-bilayer lipid phases and the structure and functions of thylakoid membranes: effects on the water-soluble enzyme violaxanthin de-epoxidase. *Scientific Reports*, *10*(1). doi:10.1038/s41598-020-68854-x
- Dobrikova, A., Tuparev, N. P., Zaharieva, I., Busheva, M., & Velitchkova, M. (1997). Artificial alterations of fluidity of pea thylakoid membranes and its effect on energy distribution between both photosystems. *Zeitschrift fur Naturforschung C*, *52*, 475-480.
- Douce, R., & Joyard, J. (1996). Biosynthesis of Thylakoid Membrane Lipids. In D. R. Ort, C. F. Yocum, & I. F. Heichel (Eds.), *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions* (pp. 69-101). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Duchene, S., & Siegenthaler, P. A. (2000). Do glycerolipids display lateral heterogeneity in the thylakoid membrane? *Lipids*, *35*(7), 739-744. doi:10.1007/s11745-000-0580-4
- Dunahay, T. G., Staehelin, L. A., Seibert, M., Ogilvie, P. D., & Berg, S. P. (1984). Structural, biochemical and biophysical characterization of four oxygen-evolving Photosystem II preparations from spinach. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *764*(2), 179-193. doi:[https://doi.org/10.1016/0005-2728\(84\)90027-6](https://doi.org/10.1016/0005-2728(84)90027-6)

- Duncan, A. L., Robinson, A. J., & Walker, J. E. (2016). Cardiolipin binds selectively but transiently to conserved lysine residues in the rotor of metazoan ATP synthases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *113*(31), 8687-8692. doi:10.1073/pnas.1608396113
- Eband, R. M. (1998). Lipid polymorphism and protein-lipid interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1376*(3), 353-368. doi:10.1016/s0304-4157(98)00015-x
- Findinier, J., Delevoeye, C., & Cohen, M. M. (2019). The dynamin-like protein Fzl promotes thylakoid fusion and resistance to light stress in *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLoS Genetics*, *15*(3), e1008047.
- Ford, R., Chapman, D., Barber, J., Pedersen, J., & Cox, R. (1982). Fluorescence polarization and spin-label studies of the fluidity of stromal and granal chloroplast membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, *681*(2), 145-151.
- Gao, H., & Xu, X. (2009). Depletion of Vipp1 in *Synechocystis* sp. PCC 6803 affects photosynthetic activity before the loss of thylakoid membranes. *FEMS microbiology letters*, *292*(1), 63-70.
- Garab, G., Lohner, K., Laggner, P., & Farkas, T. (2000). Self-regulation of the lipid content of membranes by non-bilayer lipids: a hypothesis. *Trends in Plant Science*, *5*(11), 489-494. doi:10.1016/s1360-1385(00)01767-2
- Garab, G., Ughy, B., de Waard, P., Akhtar, P., Javornik, U., Kotakis, C., . . . Lambrev, P. H. (2017). Lipid polymorphism in chloroplast thylakoid membranes - as revealed by P-31-NMR and timeresolved merocyanine fluorescence spectroscopy. *Scientific Reports*, *7*. doi:10.1038/s41598-017-13574-y
- Garab, G., Ughy, B., & Goss, R. (2016). Role of MGDG and Non-bilayer Lipid Phases in the Structure and Dynamics of Chloroplast Thylakoid Membranes. In Y. Nakamura & Y. Li-Beisson (Eds.), *Lipids in Plant and Algae Development* (pp. 127-157). Cham: Springer International Publishing.
- Garab, G., & van Amerongen, H. (2009). Linear dichroism and circular dichroism in photosynthesis research. *Photosynth Res*, *101*(2-3), 135-146. doi:10.1007/s11120-009-9424-4
- Garab, G., Yaguzhinsky, L. S., Dlouhý, O., Nesterov, S. V., Špunda, V., & Gasanoff, E. S. (2022). Structural and functional roles of non-bilayer lipid phases of chloroplast

- thylakoid membranes and mitochondrial inner membranes. *Progress in Lipid Research*, 86, 101163. doi:<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2022.101163>
- Gasanov, S. E., Kim, A. A., & Dagda, R. K. (2016). The Possible Role of Nonbilayer Structures in Regulating ATP Synthase Activity in Mitochondrial Membranes. *Biophysics*, 61(4), 596-600. doi:10.1134/S0006350916040084
- Gasanov, S. E., Kim, A. A., Yaguzhinsky, L. S., & Dagda, R. K. (2018). Non-bilayer structures in mitochondrial membranes regulate ATP synthase activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1860(2), 586-599. doi:10.1016/j.bbamem.2017.11.014
- Georgiev, G. A., Ivanova, S., Jordanova, A., Tsanova, A., Getov, V., Dimitrov, M., & Lalchev, Z. (2012). Interaction of monogalactosyldiacylglycerol with cytochrome b6f complex in surface films. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 419(4), 648-651.
- Goold, H. D., Cuiné, S., Légeret, B., Liang, Y., Brugière, S., Auroy, P., . . . Li-Beisson, Y. (2016). Saturating Light Induces Sustained Accumulation of Oil in Plastidal Lipid Droplets in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol*, 171(4), 2406-2417. doi:10.1104/pp.16.00718
- Goss, R., & Latowski, D. (2020). Lipid Dependence of Xanthophyll Cycling in Higher Plants and Algae. *Front Plant Sci*, 11, 455. doi:10.3389/fpls.2020.00455
- Gounaris, K., Barber, J., & Harwood, J. L. (1986). The thylakoid membranes of higher plant chloroplasts. *Biochem J*, 237(2), 313-326. doi:10.1042/bj2370313
- Gounaris, K., Brain, A., Quinn, P., & Williams, W. (1984). Structural reorganisation of chloroplast thylakoid membranes in response to heat-stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 766(1), 198-208.
- Graham Shipley, G., Green, J. P., & Nichols, B. W. (1973). The phase behavior of monogalactosyl, digalactosyl, and sulphoquinovosyl diglycerides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 311(4), 531-544. doi:[https://doi.org/10.1016/0005-2736\(73\)90128-4](https://doi.org/10.1016/0005-2736(73)90128-4)
- Grzyb, J., Latowski, D., & Strzalka, K. (2006). Lipocalins - a family portrait. *Journal of Plant Physiology*, 163(9), 895-915. doi:10.1016/j.jplph.2005.12.007
- Haferkamp, S., Haase, W., Pascal, A. A., van Amerongen, H., & Kirchhoff, H. (2010). Efficient Light Harvesting by Photosystem II Requires an Optimized Protein

- Packing Density in Grana Thylakoids. *Journal of Biological Chemistry*, 285(22), 17020-17028. doi:<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.077750>
- Haferkamp, S., & Kirchhoff, H. (2008). Significance of molecular crowding in grana membranes of higher plants for light harvesting by photosystem II. *Photosynthesis Research*, 95(2), 129-134. doi:10.1007/s11120-007-9253-2
- Harańczyk, H., Strzałka, K., Bayerl, T., Klose, G., & Blicharski, J. S. (1985). P-31 NMR measurements in photosynthetic membranes of wheat. *Photosynthetica*, 19(3), 414-416.
- Harańczyk, H., Strzałka, K., Dietrich, W., & Blicharski, J. S. (1995). 31P-NMR observation of the temperature and glycerol induced non-lamellar phase formation in wheat thylakoid membranes. *Journal of Biological Physics*, 21(2), 125-139. doi:10.1007/BF00705595
- Harwood, J. L. (1998). Involvement of Chloroplast Lipids in the Reaction of Plants Submitted to Stress. In P. A. Siegenthaler & N. Murata (Eds.), *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics* (pp. 287-302). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Heidrich, J., Thurotte, A., & Schneider, D. (2017). Specific interaction of IM30/Vipp1 with cyanobacterial and chloroplast membranes results in membrane remodeling and eventually in membrane fusion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1859(4), 537-549.
- Hölzl, G., & Dörmann, P. (2019). Chloroplast lipids and their biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 70, 51-81.
- Israelachvili, J. N., Marčelja, S., & Horn, R. G. (2009). Physical principles of membrane organization. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 13(2), 121-200. doi:10.1017/S0033583500001645
- Joardar, A., Pattnaik, G. P., & Chakraborty, H. (2022). Mechanism of membrane fusion: Interplay of lipid and peptide. *The Journal of Membrane Biology*, 255(2-3), 211-224.
- Karlický, V., Kmecová Materová, Z., Kurasová, I., Nezval, J., Štroch, M., Garab, G., & Špunda, V. (2021). Accumulation of geranylgeranylated chlorophylls in the pigment-protein complexes of *Arabidopsis thaliana* acclimated to green light: effects on the organization of light-harvesting complex II and photosystem II

- functions. *Photosynthesis Research*, 149(1), 233-252. doi:10.1007/s11120-021-00827-1
- Karlický, V., Kurasová, I., Ptáčková, B., Večeřová, K., Urban, O., & Špunda, V. (2016). Enhanced thermal stability of the thylakoid membranes from spruce. A comparison with selected angiosperms. *Photosynthesis Research*, 130(1), 357-371. doi:10.1007/s11120-016-0269-3
- Keiderling, U. (2002). The new 'BerSANS-PC' software for reduction and treatment of small angle neutron scattering data. *Applied physics A*, 74(Suppl 1), s1455-s1457.
- Kirchhoff, H. (2008). Molecular crowding and order in photosynthetic membranes. *Trends Plant Sci*, 13(5), 201-207. doi:10.1016/j.tplants.2008.03.001
- Kirchhoff, H., Mukherjee, U., & Galla, H. J. (2002). Molecular Architecture of the Thylakoid Membrane: Lipid Diffusion Space for Plastoquinone. *Biochemistry*, 41(15), 4872-4882. doi:10.1021/bi011650y
- Kiss, J., Garab, G. I., Tóth, Z. M., & Faludi-Dániel, Á. (1986). The light-harvesting chlorophyll a/b protein acts as a torque aligning chloroplasts in a magnetic field. *Photosynthesis Research*, 10, 217-222.
- Klymchenko, A. S., & Kreder, R. (2014). Fluorescent probes for lipid rafts: from model membranes to living cells. *Chemistry & biology*, 21(1), 97-113.
- Kobayashi, K. (2016). Role of membrane glycerolipids in photosynthesis, thylakoid biogenesis and chloroplast development. *Journal of Plant Research*, 129(4), 565-580. doi:10.1007/s10265-016-0827-y
- Koochak, H., Puthiyaveetil, S., Mullendore, D. L., Li, M., & Kirchhoff, H. (2019). The structural and functional domains of plant thylakoid membranes. *The Plant Journal*, 97(3), 412-429.
- Kostetsky, E., Chopenko, N., Barkina, M., Velansky, P., & Sanina, N. (2018). Fatty Acid Composition and Thermotropic Behavior of Glycolipids and Other Membrane Lipids of *Ulva lactuca* (Chlorophyta) Inhabiting Different Climatic Zones. *Mar Drugs*, 16(12). doi:10.3390/md16120494
- Kotakis, C., Akhtar, P., Zsiros, O., Garab, G., & Lambrev, P. H. (2018). Increased thermal stability of photosystem II and the macro-organization of thylakoid membranes, induced by co-solutes, associated with changes in the lipid-phase behaviour of thylakoid membranes. *Photosynthetica*, 56(1), 254-264. doi:10.1007/s11099-018-0782-z



- Kouřil, R., Oostergetel, G. T., & Boekema, E. J. (2011). Fine structure of granal thylakoid membrane organization using cryo electron tomography. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1807(3), 368-374. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.11.007>
- Kozlov, M., Leikin, S., Chernomordik, L., Markin, V., & Chizmadzhev, Y. A. (1989). Stalk mechanism of vesicle fusion: intermixing of aqueous contents. *European Biophysics Journal*, 17, 121-129.
- Krumova, S. B., Dijkema, C., de Waard, P., Van As, H., Garab, G., & van Amerongen, H. (2008a). Phase behaviour of phosphatidylglycerol in spinach thylakoid membranes as revealed by P-31-NMR. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1778(4), 997-1003. doi:10.1016/j.bbamem.2008.01.004
- Krumova, S. B., Koehorst, R. B. M., Bóta, A., Páli, T., van Hoek, A., Garab, G., & van Amerongen, H. (2008b). Temperature dependence of the lipid packing in thylakoid membranes studied by time- and spectrally resolved fluorescence of Merocyanine 540. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1778(12), 2823-2833. doi:10.1016/j.bbamem.2008.09.007
- Kublicki, M., Koszelewski, D., Brodzka, A., & Ostaszewski, R. (2021). Wheat germ lipase: isolation, purification and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*. doi:10.1080/07388551.2021.1939259
- Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of fluorescence spectroscopy*: Springer.
- Lambrev, P. H., Tsonev, T., Velikova, V., Georgieva, K., Lambreva, M. D., Yordanov, I., . . . Garab, G. (2007). Trapping of the quenched conformation associated with non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence at low temperature. *Photosynthesis Research*, 94(2), 321. doi:10.1007/s11120-007-9216-7
- 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(15), 4417-4420. doi:10.1021/bi049652g
- Latowski, D., Kruk, J., Burda, K., Skrzynecka-Jaskier, M., Kostecka-Gugała, A., & Strzalka, K. (2002). Kinetics of violaxanthin de-epoxidation by violaxanthin de-epoxidase, a xanthophyll cycle enzyme, is regulated by membrane fluidity in model lipid bilayers. *Eur J Biochem*, 269(18), 4656-4665. doi:10.1046/j.1432-1033.2002.03166.x

- Lennon, A. M., Prommeenate, P., & Nixon, P. J. (2003). Location, expression and orientation of the putative chlororespiratory enzymes, Ndh and IMMUTANS, in higher-plant plastids. *Planta*, *218*(2), 254-260. doi:10.1007/s00425-003-1111-7
- Lentz, B. R. (1989). Membrane “fluidity” as detected by diphenylhexatriene probes. *Chemistry and Physics of Lipids*, *50*(3-4), 171-190.
- Li-Beisson, Y., Nakamura, Y., & Harwood, J. (2016). Lipids: From Chemical Structures, Biosynthesis, and Analyses to Industrial Applications. In Y. Nakamura & Y. Li-Beisson (Eds.), *Lipids in Plant and Algae Development* (pp. 1-18). Cham: Springer International Publishing.
- Litman, B. J., & Barenholz, Y. (1982). [91] Fluorescent probe: Diphenylhexatriene *Methods in enzymology* (Vol. 81, pp. 678-685): Elsevier.
- Lo Nostro, P., & Ninham, B. W. (2012). Hofmeister phenomena: an update on ion specificity in biology. *Chemical reviews*, *112*(4), 2286-2322.
- Luzzati, V., & Spegt, P. A. (1967). Polymorphism of Lipids. *Nature*, *215*(5102), 701-704. doi:10.1038/215701a0
- Luzzati, V., & Tardieu, A. (1974). Lipid Phases: Structure and Structural Transitions. *Annual Review of Physical Chemistry*, *25*(1), 79-94. doi:10.1146/annurev.pc.25.100174.000455
- Magyar, M., Akhtar, P., Sipka, G., Domonkos, I., Han, W., Li, X., . . . Garab, G. (2024). Effects of lipids on the rate-limiting steps in the dark-to-light transition of Photosystem II core complex of *Thermotichus vulcanus*. *Frontiers in Plant Science*, *15*, 1381040.
- Marrink, S. J., De Vries, A. H., & Tieleman, D. P. (2009). Lipids on the move: simulations of membrane pores, domains, stalks and curves. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *1788*(1), 149-168.
- Massiot, D., Fayon, F., Capron, M., King, I., Le Calvé, S., Alonso, B., . . . Hoatson, G. (2002). Modelling one- and two-dimensional solid-state NMR spectra. *Magnetic Resonance in Chemistry*, *40*(1), 70-76. doi:<https://doi.org/10.1002/mrc.984>
- Matsuo, T., Cisse, A., Plazanet, M., Natali, F., Koza, M. M., Ollivier, J., . . . Peters, J. (2022). The dynamical Matryoshka model: 3. Diffusive nature of the atomic motions contained in a new dynamical model for deciphering local lipid dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1864*(9), 183949. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2022.183949>

- Matthijs, H. C., Coughlan, S. J., & Hind, G. (1986). Removal of ferredoxin:NADP<sup>+</sup> oxidoreductase from thylakoid membranes, rebinding to depleted membranes, and identification of the binding site. *Journal of Biological Chemistry*, 261(26), 12154-12158. doi:[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)67216-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)67216-3)
- Mazor, Y., Borovikova, A., Caspy, I., & Nelson, N. (2017). Structure of the plant photosystem I supercomplex at 2.6 Å resolution. *Nature Plants*, 3(3), 17014. doi:10.1038/nplants.2017.14
- Mazur, R., Gieczewska, K., Kowalewska, Ł., Kuta, A., Proboszcz, M., Gruszecki, W. I., . . . Garstka, M. (2020). Specific Composition of Lipid Phases Allows Retaining an Optimal Thylakoid Membrane Fluidity in Plant Response to Low-Temperature Treatment. *Frontiers in Plant Science*, 11. doi:10.3389/fpls.2020.00723
- Medina-Carmona, E., Varela, L., Hendry, A. C., Thompson, G. S., White, L. J., Boles, J. E., . . . Ortega-Roldan, J. L. (2020). A quantitative assay to study the lipid selectivity of membrane-associated systems using solution NMR. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 56(78), 11665-11668. doi:10.1039/d0cc03612a
- Meher, G., & Chakraborty, H. (2019). Membrane composition modulates fusion by altering membrane properties and fusion peptide structure. *The Journal of Membrane Biology*, 252(4-5), 261-272.
- Miloslavina, Y., Lambrev, P. H., Jávorfí, T., Várkonyi, Z., Karlický, V., Wall, J. S., . . . Garab, G. (2012). Anisotropic circular dichroism signatures of oriented thylakoid membranes and lamellar aggregates of LHCII. *Photosynthesis Research*, 111(1-2), 29-39. doi:10.1007/s11120-011-9664-y
- Mitchell, P. (1966). Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 41(3), 445-502. doi:10.1111/j.1469-185X.1966.tb01501.x
- Mulo, P. (2011). Chloroplast-targeted ferredoxin-NADP<sup>+</sup> oxidoreductase (FNR): Structure, function and location. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1807(8), 927-934. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.10.001>
- Murphy, D. J. (1982). The importance of non-planar bilayer regions in photosynthetic membranes and their stabilisation by galactolipids. *FEBS Letters*, 150(1), 19-26. doi:[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(82\)81297-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(82)81297-0)

- Mustárdy, L., & Garab, G. (2003). Granum revisited. A three-dimensional model - where things fall into place. *Trends in Plant Science*, 8(3), 117-122. doi:10.1016/s1360-1385(03)00015-3
- Nagle, J. F., & Tristram-Nagle, S. (2000). Structure of lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 1469(3), 159-195.
- Nagy, G., & Garab, G. (2021). Neutron scattering in photosynthesis research: recent advances and perspectives for testing crop plants. *Photosynthesis Research*, 150. doi:10.1007/s11120-020-00763-6
- Nagy, G., Garab, G., & Pieper, J. (2014). Neutron scattering in photosynthesis research contemporary problems of photosynthesis. In Allakhverdiev SI, Rubin AB, & S. VA (Eds.), *Contemporary Problems of Photosynthesis* (Vol. 1): Moscow-Izhevsk: Institute of Computer Science.
- Nagy, G., Kovács, L., Ünnep, R., Zsiros, O., Almásy, L., Rosta, L., . . . Garab, G. (2013). Kinetics of structural reorganizations in multilamellar photosynthetic membranes monitored by small-angle neutron scattering. *The European Physical Journal E*, 36, 1-12.
- Nagy, G., Posselt, D., Kovács, L., Holm, J. K., Szabó, M., Ughy, B., . . . Garab, G. (2011). Reversible membrane reorganizations during photosynthesis in vivo: revealed by small-angle neutron scattering. *Biochem J*, 436(2), 225-230. doi:10.1042/bj20110180
- Násztor, Z., Bogár, F., & Dér, A. (2016). The interfacial tension concept, as revealed by fluctuations. *Current opinion in colloid & interface science*, 23, 29-40.
- Násztor, Z., Dér, A., & Bogár, F. (2017). Ion-induced alterations of the local hydration environment elucidate Hofmeister effect in a simple classical model of Trp-cage miniprotein. *Journal of Molecular Modeling*, 23, 1-14.
- Nelson, N., & Yocum, C. F. (2006). Structure and function of photosystems I and II. *Annual Review of Plant Biology*, 57(1), 521-565. doi:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105350
- Neylon, C. (2008). Small angle neutron and X-ray scattering in structural biology: recent examples from the literature. *European Biophysics Journal*, 37, 531-541.
- Ort, D. R., & Yocum, C. F. (1996). Electron Transfer and Energy Transduction in Photosynthesis: An Overview. In D. R. Ort, C. F. Yocum, & I. F. Heichel (Eds.),

- Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions* (pp. 1-9). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Osella, S., Paloncýová, M., Sahi, M., & Knippenberg, S. (2020). Influence of Membrane Phase on the Optical Properties of DPH. *Molecules*, 25(18), 4264.
- Ostermeier, M., Garibay-Hernández, A., Holzer, V. J., Schroda, M., & Nickelsen, J. (2024). Structure, biogenesis and evolution of thylakoid membranes. *The Plant Cell*, koae102.
- Pabst, G., Kučerka, N., Nieh, M.-P., & Katsaras, J. (2014). *Liposomes, lipid bilayers and model membranes: from basic research to application*: CRC press.
- Páli, T., Garab, G., Horváth, L. I., & Kóta, Z. (2003). Functional significance of the lipid-protein interface in photosynthetic membranes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60(8), 1591-1606. doi:10.1007/s00018-003-3173-x
- Paloncýová, M., Ameloot, M., & Knippenberg, S. (2019). Orientational distribution of DPH in lipid membranes: a comparison of molecular dynamics calculations and experimental time-resolved anisotropy experiments. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 21(14), 7594-7604.
- Palsdottir, H., & Hunte, C. (2004). Lipids in membrane protein structures. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1666(1-2), 2-18.
- Pavlovič, A., Stolárik, T., Nosek, L., Kouřil, R., & Ilík, P. (2016). Light-induced gradual activation of photosystem II in dark-grown Norway spruce seedlings. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1857(6), 799-809. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.02.009>
- Porra, R. J., Thompson, W. A., & Kriedemann, P. E. (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 975(3), 384-394. doi:[https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(89\)80347-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(89)80347-0)
- Pribil, M., Labs, M., & Leister, D. (2014). Structure and dynamics of thylakoids in land plants. *Journal of Experimental Botany*, 65(8), 1955-1972. doi:10.1093/jxb/eru090
- Puthiyaveetil, S., Tsabari, O., Lowry, T., Lenhart, S., Lewis, R. R., Reich, Z., & Kirchhoff, H. (2014). Compartmentalization of the protein repair machinery in

- photosynthetic membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(44), 15839-15844.
- Rast, A., Heinz, S., & Nickelsen, J. (2015). Biogenesis of thylakoid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1847(9), 821-830.
- Risselada, H. J., & Grubmüller, H. (2012). How SNARE molecules mediate membrane fusion: recent insights from molecular simulations. *Current opinion in structural biology*, 22(2), 187-196.
- Schiller, J., Muller, M., Fuchs, B., Arnold, K., & Huster, D. (2007). 31P NMR Spectroscopy of Phospholipids: From Micelles to Membranes. *Current Analytical Chemistry*, 3, 283-301. doi:10.2174/157341107782109635
- Seddon, J. M., & Templer, R. H. (1995a). Chapter 3 - Polymorphism of Lipid-Water Systems. In R. Lipowsky & E. Sackmann (Eds.), *Handbook of Biological Physics* (Vol. 1, pp. 97-160): North-Holland.
- Seddon, J. M., & Templer, R. H. (1995b). Polymorphism of Lipid-Water Systems. In R. Lipowsky & E. Sackmann (Eds.), *Handbook of Biological Physics* (Vol. 1, pp. 97-160): North-Holland.
- Shivaiah, K. K., Susanto, F. A., Devadasu, E., & Lundquist, P. K. (2022). Plastoglobule Lipid Droplet Isolation from Plant Leaf Tissue and Cyanobacteria. *J Vis Exp*(188). doi:10.3791/64515
- Siebenaller, C., Junglas, B., & Schneider, D. (2019). Functional Implications of Multiple IM30 Oligomeric States. *Frontiers in Plant Science*, 10(1500). doi:10.3389/fpls.2019.01500
- Siebenaller, C., & Schneider, D. (2023). Cyanobacterial membrane dynamics in the light of eukaryotic principles. *Bioscience Reports*, 43(2). doi:10.1042/bsr20221269
- Siegel, D., & Eppand, R. (1997). The mechanism of lamellar-to-inverted hexagonal phase transitions in phosphatidylethanolamine: implications for membrane fusion mechanisms. *Biophysical Journal*, 73(6), 3089-3111.
- Siegenthaler, P.-A., & Murata, N. (1998). Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics.
- Simidjiev, I., Stoylova, S., Amenitsch, H., Javorfi, T., Mustárdy, L., Laggner, P., . . . Garab, G. (2000). Self-assembly of large, ordered lamellae from non-bilayer lipids and integral membrane proteins in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(4), 1473-1476. doi:10.1073/pnas.97.4.1473

- Singer, S. J., & Nicolson, G. L. (1972). The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science*, *175*(4023), 720-731. doi:10.1126/science.175.4023.720
- Sipka, G., Magyar, M., Mezzetti, A., Akhtar, P., Zhu, Q., Xiao, Y., . . . Garab, G. (2021). Light-adapted charge-separated state of photosystem II: structural and functional dynamics of the closed reaction center. *The Plant Cell*, *33*(4), 1286-1302. doi:10.1093/plcell/koab008
- Stefan, C. J., Trimble, W. S., Grinstein, S., Drin, G., Reinisch, K., De Camilli, P., . . . Levine, T. P. (2017). Membrane dynamics and organelle biogenesis—lipid pipelines and vesicular carriers. *BMC biology*, *15*, 1-24.
- Strasserf, R. J., Srivastava, A., & Govindjee. (1995). Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochemistry and Photobiology*, *61*(1), 32-42.
- Suorsa, M., Rantala, M., Mamedov, F., Lespinasse, M., Trotta, A., Grieco, M., . . . Aro, E. M. (2015). Light acclimation involves dynamic re-organization of the pigment–protein megacomplexes in non-appressed thylakoid domains. *The Plant Journal*, *84*(2), 360-373.
- 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*(1-2), 409-419.
- Tang, T., Liu, P., Zheng, G., & Li, W. (2016). Two phases of response to long-term moderate heat: Variation in thermotolerance between *Arabidopsis thaliana* and its relative *Arabis paniculata*. *Phytochemistry*, *122*, 81-90.
- Tapie, P., Haworth, P., Hervo, G., & Breton, J. (1982). Orientation of the pigments in the thylakoid membrane and in the isolated chlorophyll-protein complexes of higher plants. III. A quantitative comparison of the low-temperature linear dichroism spectra of thylakoids and isolated pigment-protein complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, *682*(3), 339-344.
- Török, Z., Goloubinoff, P., Horváth, I., Tsvetkova, N. M., Glatz, A., Balogh, G., . . . Crowe, J. H. (2001). *Synechocystis* HSP17 is an amphitropic protein that stabilizes heat-stressed membranes and binds denatured proteins for subsequent chaperone-mediated refolding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(6), 3098-3103.

- Trotta, A., Bajwa, A. A., Mancini, I., Paakkarinen, V., Pribil, M., & Aro, E.-M. (2019). The role of phosphorylation dynamics of CURVATURE THYLAKOID 1B in plant thylakoid membranes. *Plant Physiology*, *181*(4), 1615-1631.
- Turner, D. C., & Gruner, S. M. (1992). X-ray diffraction reconstruction of the inverted hexagonal (HII) phase in lipid-water systems. *Biochemistry*, *31*(5), 1340-1355. doi:10.1021/bi00120a009
- Ughy, B., Karlický, V., Dlouhý, O., Javornik, U., Materová, Z., Zsiros, O., . . . Garab, G. (2019). Lipid-polymorphism of plant thylakoid membranes. Enhanced non-bilayer lipid phases associated with increased membrane permeability. *Physiologia Plantarum*, *166*(1), 278-287. doi:10.1111/ppl.12929
- Ünnep, R., Zsiros, O., Solymosi, K., Kovács, L., Lambrev, P. H., Tóth, T., . . . Garab, G. (2014). The ultrastructure and flexibility of thylakoid membranes in leaves and isolated chloroplasts as revealed by small-angle neutron scattering. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1837*(9), 1572-1580. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2014.01.017>
- van Bezouwen, L. S., Caffarri, S., Kale, R. S., Kouřil, R., Thunnissen, A.-M. W. H., Oostergetel, G. T., & Boekema, E. J. (2017). Subunit and chlorophyll organization of the plant photosystem II supercomplex. *Nature Plants*, *3*(7), 17080. doi:10.1038/nplants.2017.80
- van den Brink-van der Laan, E., Killian, J. A., & de Kruijff, K. B. d. (2004). Nonbilayer lipids affect peripheral and integral membrane proteins via changes in the lateral pressure profile. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1666*(1), 275 - 288. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.06.010>
- 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) - Bioenergetics*, *1848*(6), 1319-1330. doi:10.1016/j.bbamem.2015.02.025
- Vladimirov, G. K., Vikulina, A. S., Volodkin, D., & Vladimirov, Y. A. (2018). Structure of the complex of cytochrome c with cardiolipin in non-polar environment. *Chem Phys Lipids*, *214*, 35-45. doi:10.1016/j.chemphyslip.2018.05.007
- Wacha, A., Varga, Z., & Bota, A. (2014). CREDO: a new general-purpose laboratory instrument for small-angle X-ray scattering. *Journal of Applied Crystallography*, *47*(5), 1749-1754. doi:10.1107/S1600576714019918



- Watts, A. (2013). NMR of Lipids. In G. C. K. Roberts (Ed.), *Encyclopedia of Biophysics* (pp. 1727-1738). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Williams, W. P. (1998). The Physical Properties of Thylakoid Membrane Lipids and Their Relation to Photosynthesis. In P. A. Siegenthaler & N. Murata (Eds.), *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics* (pp. 103-118). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Williams, W. P., Brain, A. P. R., & Dominy, P. J. (1992). Induction of non-bilayer lipid phase separations in chloroplast thylakoid membranes by compatible co-solutes and its relation to therthermal stability of Photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1099(2), 137-144. doi:[https://doi.org/10.1016/0005-2728\(92\)90210-S](https://doi.org/10.1016/0005-2728(92)90210-S)
- Yaghmur, A., Østergaard, J., Larsen, S. W., Jensen, H., Larsen, C., & Rappolt, M. (2014). Drug formulations based on self-assembled liquid crystalline nanostructures *Liposomes, Lipid Bilayers and Model Membranes: From Basic Research to Application* (pp. 341-360): CRC Press.
- Yamamoto, Y., Hori, H., Kai, S., Ishikawa, T., Ohnishi, A., Tsumura, N., & Morita, N. (2013). Quality control of Photosystem II: reversible and irreversible protein aggregation decides the fate of Photosystem II under excessive illumination. *Frontiers in Plant Science*, 4. doi:10.3389/fpls.2013.00433
- Yamamoto, Y., Leng, J., & Shen, J.-R. (2011). Isolation of photosystem II-enriched membranes and the oxygen-evolving complex subunit proteins from higher plants. *Photosynthesis research protocols*, 1-10.
- Yang, L., & Huang, H. W. (2002). Observation of a membrane fusion intermediate structure. *Science*, 297(5588), 1877-1879.
- Yang, Z., Gou, L., Chen, S., Li, N., Zhang, S., & Zhang, L. (2017). Membrane Fusion Involved in Neurotransmission: Glimpse from Electron Microscope and Molecular Simulation. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10(168). doi:10.3389/fnmol.2017.00168
- Yoshihara, A., & Kobayashi, K. (2022). Lipids in photosynthetic protein complexes in the thylakoid membrane of plants, algae, and cyanobacteria. *Journal of Experimental Botany*, 73(9), 2735-2750.
- Zucchelli, G., Jennings, R. C., & Garlaschi, F. M. (1990). The presence of long-wavelength chlorophyll a spectral forms in the light-harvesting chlorophyll a/b

protein complex II. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 6(4), 381-394.

Zsiros, O., Ünneper, R., Nagy, G., Almásy, L., Patai, R., Székely, N. K., . . . Kovács, L. (2020). Role of Protein-Water Interface in the Stacking Interactions of Granum Thylakoid Membranes—As Revealed by the Effects of Hofmeister Salts. *Frontiers in Plant Science*, 11. doi:10.3389/fpls.2020.01257