

**A NARANCSSÁRGA KAROTENOID KÖTŐ FEHÉRJE (ORANGE  
CAROTENOID PROTEIN) ÉS A PsbU FEHÉRJE SZEREPE A  
CIANOBAKTÉRIUMOK FÉNY ELLENI VÉDELMEBEN**

**PhD disszertáció összefoglaló**

**Leyla Abasova**

Témavezető: Dr. Vass Imre

Magyar Tudományos Akadémia  
Szegedi Biológiai Kutatóközpont  
Növénybiológiai Intézet  
Molekuláris Stressz- és Fotóbiológiai Csoport

**Szeged, 2011**

## BEVEZETŐ

A napenergia kémiai energiává való átalakításával a növények, algák és cianobaktériumok létfontosságú szerves szénvegyületekkel és oxigénnel látják el a Földet. Az átalakítás folyamatát oxigéntermelő fotoszintézisnek nevezzük. A fotoszintézis elsődleges reakciói a tilakoid membránba ágyazódott pigment-fehérje komplexekben, más néven a fotokémiai rendszerekben zajlanak (**PhotoSystem** II és **PhotoSystem** I, PSII és PSI). A cianobaktériumokban a fényt a fikobiliszómák (**PhycoBilisomes**, PBS) nyelik el, amelyek a tilakoid membránok külső felszínén helyezkednek el.

Ha a fotoszintézishez szükségesnél több fény éri a fotoszintetikus szerveget, akkor a reaktív oxigénformák képződése miatt ez káros lehet az illető szervezetre. A cianobaktériumok, a növényekhez és algákhoz hasonlóan, többféle fényvédelmi mechanizmussal rendelkeznek. Három fő élettani folyamat ismert, amelyek részt vesznek a fotoszintetikus apparátus változó fényviszonyokhoz való alkalmazkodásában: energia disszipációs hatékonysági állapot átmenet (state transition), a károsodott D1 fehérje kijavítása, és a nem fotokémiai fluoreszcencia-kioltás (**Non-Photochemical Quenching**, NPQ).

A narancssárga karotenoid kötő fehérje

A fölösleges fényenergia hőként való kibocsátását nem fotokémiai kioltásnak nevezik (NPQ). A *Synechocystis* sp. PCC6803 (a továbbiakban röviden *Synechocystis*) nevű cianobaktériumban a fotoszintetikus reakciókat telítő kék-zöld fény indukálja a fikobiliszómák által elnyelt fölösleges fényenergia hőként való kibocsátását, aminek következményeként a fikobiliszómák és a reakciócentrumok közti energiaátadás csökken. Ebben a folyamatban játszik szerepet a narancssárga karotenoid kötő fehérje (**Orange Carotenoid Protein**, OCP). OCP hiányában az erős fehér vagy kék fény által indukált fluoreszcencia-kioltás nem történik meg a fotoszintetizáló sejtekben. Olyan stressz körülmények közt, mint például a vashiány, a kék-zöld fény nagymértékű fluoreszcencia-kioltást okoz, ami sokkal jelentősebb mértékű, mint amit stresszmentes környezetben tapasztalunk. Kimutatták, hogy a nagymértékű fluoreszcencia-kioltás összefüggésbe hozható a magas OCP koncentrációval. Az OCP szerepét a fikobiliszómák hő kibocsátás által történő fényvédelmi mechanizmusában egyelőre csak *Synechocystis*-ben

vizsgálták, és nem ismert, hogy ez a fontos folyamat mennyire gyakori jelenség más cianobaktériumokban. A rendelkezésre álló cianobaktériális genom adatbázisokat átnézve a fikobiliszómát tartalmazó cianobaktériumok legtöbbszörében találtak olyan géneket, amelyek a *Synechocystis* OCP-vel homológ fehérjéket kódolnak. Ezek közül néhány baktériumtörzs nem hordozza a teljes génszekvenciát. Ilyen például a *Termosynechococcus elongatus*, amelynek genomja csak az OCP-t kódoló N- és C-terminális részeket tartalmazza.

Munkánk során azt vizsgáltuk, hogy milyen szerepe van az OCP-nek a kék fény által indukált nem fotokémiai fluoreszcencia-kioltásban vashiányos és vassal ellátott optimális környezetben. Ehhez a következő fotoszintetikus modellszervezeteket használtuk: *Arthrospira maxima* (*A. maxima*) és *Synechocystis*, amelyek tartalmazzák a teljes, OCP-t kódoló gént; *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (*S. elongatus*), amelyből hiányzik az OCP-t kódoló gén; és *Termosynechococcus elongatus* (*T. elongatus*), amely az OCP-t kódoló gén N- és C-terminális szakaszait tartalmazza.

#### A PsbU fehérje szerepe

Az oxigénfejlesztő komplex (**O**xxygen **E**volving **C**omplex, OEC) a kettes fotokémiai rendszer (**P**hoto**S**ystem II, PSII) lumenális oldalán helyezkedik el és főként különböző oxidációs állapotban lévő Mn, valamint  $\text{Ca}^{2+}$  és  $\text{Cl}^-$  ionok alkotják. A közvetlen közelében elhelyezkedő perifériális membránfehérjék szerepe a  $\text{Ca}^{2+}$  és  $\text{Cl}^-$  ionok, mint létfontosságú kofaktorok optimális szinten való tartása a hatékony vízbontás érdekében. A cianobaktériális PSII komplexek 5 perifériális fehérjét tartalmaznak: PsbO, PsbP, PsbQ, PsbU, és PsbV. A PsbU fehérje a PSII 12 kDa nagyságú perifériális alegysége, amely kristályszerkezeti vizsgálatok szerint a PsbO és a PsbV között helyezkedik el, és a legtöbb érintkezési pontja ezekkel a fehérjékkel van. A PsbU szerepe a Mn-komplex, és a PSII szerkezeti stabilitásának fenntartása. Ezen alegység hiányában csökken a fotoszintetikus sejtek oxigéntermelése és jelentős fényérzékenység alakul ki. Magas hőmérsékletre való alkalmazkodás során a PsbU jelenléte hozzájárul az oxigéntermelő komplex hőstabilitásához. A fehérje eltávolítása nemcsak a lumenális oldalra, hanem a PSII sztróma felőli oldalára is hatással van. Kimutatták, hogy a PsbU hiánya változásokat okoz az elsődleges fotokémiai folyamatokban, miközben szabadfikobiliszóma felhalmozódás tapasztalható és csökken a fikobiliszómák és a PSII közti

energiaátadás. A közelmúltban kimutatták azt is, hogy a PsbU-val nem rendelkező *Synechococcus* PCC7942 sejtek magasabb érzékenységet mutatnak oxidatív stresszel szemben, mint a vad típusú sejtek.

A PsbU fehérje fényvédelemben betöltött szerepének tisztázásához a *Synechococcus* PCC7942 (*Synechococcus*) baktériumtörzs  $\Delta$ psbU deléciós mutánsát vizsgáltuk.

## CÉLKITŰZÉSEK

A munkánk fő céljai a kék fény által indukált nem fotokémiai fluoreszcencia-kioltás mechanizmusának jobb megismerése, valamint a cianobakteriális PSII PsbU alegysége szerepének feltérképezése voltak. A részletes célkitűzéseink a következők:

1. Az OCP jelenléte és a kék fény által indukált fluoreszcencia-kioltás közti korreláció vizsgálata.
2. A vaselvonás hatásainak feltérképezése a nem fotokémiai fluoreszcencia-kioltásra, valamint az állapot átmenetre (state transition), OCP-t kódoló génnel rendelkező, illetve azt részben vagy teljes egészében nélkülöző cianobaktériumokban.
3. A cianobakteriális PSII komplex PsbU perifériális fehérje szerepének tanulmányozása a fénykárosítás elleni védelemben *Synechococcus* PCC7942  $\Delta$ psbU deléciós mutánsa segítségével.

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Az irodalomban használt standard, illetve a disszertáció alapjául szolgáló publikációkban leírt módszerek:

- Cianobaktériumok nevelése
- $\text{Fe}^{2+}$  elvonás
- Abszorbancia mérések

- Klorofill tartalom meghatározása
- PAM fluoreszcencia mérések
- Fluoreszcencia spektrum 77 K-en
- Flash-indukált klorofill-fluoreszcencia lecsengés kinetikájának elemzése
- Termolumineszcencia mérések
- Oxigéntermelés mérése
- Fénykezelések

## EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

### OCP és fényvédelem különböző cianobaktériumokban

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk az OCP jelenléte és a kék fény által indukált fluoreszcencia-kioltás közti összefüggést, olyan cianobaktérium törzseket használtunk, amelyek vagy rendelkeztek OCP-t kódoló génnel, illetve annak egyes szakaszaival, vagy teljes egészében nélkülözték azt. A fluoreszcencia változások kinetikáját PAM fluoriméterrel követtük nyomon. Ha a sötétadaptált sejteket alacsony intenzitású, folyamatos kék-zöld fénnel világítottuk meg, akkor mind a négy baktériumtörzs esetében (*A. maxima*, *Synechocystis*, *S. elongatus*, *T. elongatus*) növekvő maximális fluoreszcencia ( $F_m'$ ) értékeket figyelhettünk meg a State2-State1 állapot változás miatt. Az OCP-t kódoló gént részben tartalmazó (*T. elongatus*), vagy teljes egészében nélkülöző (*S. elongatus*) sejtek esetében a sejtek fluoreszcenciája magas szinten maradt akkor is, ha nagy intenzitású folyamatos kék-zöld fénnel világítottuk meg őket. Ezekben az esetekben nem volt tapasztalható fluoreszcencia-kioltás, ami arra utal, hogy az OCP jelenléte nélkül ez a fajta kioltás nem indukálódik. Ezzel szemben, ha az OCP-t kódoló gént tartalmazó sejteket (*Synechocystis* and *A. maxima*) tettük ki nagy intenzitású kék-zöld fénynek, akkor fluoreszcencia-kioltást mérhettünk az NPQ folyamat indukciója miatt. A kék fény által indukált nem fotokémiai fluoreszcencia-kioltással ellentétben, az OCP hiánya nem befolyásolta az állapot átmenet (state transition) megjelenését egyik általunk vizsgált cianobaktériumban sem.

Az OCP-vel rendelkező sejtekben, vashiányos körülmények között is ugyanúgy indukálható volt a fluoreszcencia-kioltás intenzív kék-zöld fénnel, mint optimális körülmények között, miközben az  $F_0$  értékeik megemelkedtek. A huzamosan vashiányos környezetben nevelt,

OCP-t szintetizálni képes sejtekben (*Synechocystis*, *A. maxima*) megnövekedett az NPQ kapacitás mértéke, ellentétben a vassal ellátott környezetben nevelt sejtekkel. Az OCP-t szintetizálni képtelen sejtekben (*T. elongatus* and *S. elongatus*) nem mutatkozott NPQ indukció a tartósan vashiányos környezet hatására sem. Az OCP-vel rendelkező vizsgált sejtek azon képessége, hogy kék fény hatására fluoreszcencia-kioltás indukálódhat alátámasztja azt az elképzelést, miszerint ez a védekezési mechanizmus széles körben jelen van a cianobaktériumokban. Ezzel szemben, az OCP-t kódoló gén hiányában nem jelentkezik fluoreszcencia kioltás. Emellett vizsgálataink azt is kimutatták, hogy azok a törzsek, amelyek nem képesek kék fény által indukált fluoreszcencia-kioltásra, hajlamosabbak fotoinhibícióra, azaz fénykárosodást elszenvedni.

Vassal ellátott és vashiányos sejtek abszorpciós spektrumait hasonlítottuk össze az OCP-t kódoló génnel rendelkező, vagy azt nem tartalmazó törzsek esetén. Tartós vashiány mellett nevelt *Synechocystis* és *A. maxima* sejtek 77 K fluoreszcencia emissziós spektruma határozott csúcsot mutat 685 nm-nél (600 nm-nél történő gerjesztés esetén), ami erős fluoreszcenciát kibocsátó, szabad fikobiliszómák megjelenésére utal. Ezzel szemben az OCP-t kódoló génnel nem rendelkező sejtek esetében ez a jelenség nem volt megfigyelhető a fikobiliprotein tartalom gyors csökkenése miatt. Vashiányos környezetben, ha a cianobaktériumok nem képesek a kék fény által indukált NPQ segítségével csökkenteni a reakciócentrumokhoz eljutó energiát, akkor ahhoz, hogy ne halmozódjanak fel a potenciálisan veszélyes szabad fikobiliszómák, csökkentik a fikobiliprotein mennyiségüket.

#### A PsbU szerepe a PSII fénykárosításának megelőzésében

A PsbU szerepének vizsgálatához a *Synechococcus* cianobaktérium törzs vad típusú (WT) és psbU deléciós mutáns ( $\Delta$ PsbU) sejteinek fotoszintetikus elektrontranszportját követtük nyomon. A sejtek fényimpulzus által indukált klorofill-fluoreszcencia lecsengési kinetikáját tanulmányoztuk az elektrontranszport gátló 3-(3,4-diklorofenil)-1,1-dimetilurea (DCMU) jelenlétében és hiányában. Ezáltal rálátást nyertünk az akceptor oldali elektrontranszport kinetikájára illetve a redukált akceptor és az oxidált donor elemek közti töltésrekombinációs folyamatokra. A sötétadaptált sejtekben egy telítő fényfelvillanás redukálja a  $Q_A$  elektron akceptort az összes PSII komplexben, ami a változó fluoreszcencia hirtelen növekedéséhez

vezet. A maximális fluoreszcencia növekedés ( $F_m - F_o$ ) amplitúdója arányos az aktív PSII reakciócentrumok össz mennyiségével. Ez közel 30%-kal volt alacsonyabb a  $\Delta$ PsbU sejtekben a WT-hoz képest. A DCMU hiányában mért fluoreszcencia lecsengésből meghatározható az  $S_2Q_B^-$  töltésrekombináció időállandója, mely 1.5x volt nagyobb a  $\Delta$ PsbU sejtekben, mint a WT-ban. DCMU jelenlétében a  $S_2Q_A^-$  lecsengésének időállandója a mutáns sejtekben 2.1x volt nagyobb, mint a WT ugyanezen értéke. A  $S_2Q_B^-$  és  $S_2Q_A^-$  lecsengési időállandók arányából ki lehet számítani a  $Q_A$  és a  $Q_B$  elektron akceptorok közti szabadenergia különbséget. Mivel a WT paramétereivel számolt arány különbözött a  $\Delta$ PsbU-tól, arra következtettünk, hogy a  $Q_A \leftrightarrow Q_B$  szabadenergia különbség megváltozott a mutánsban. Számításaink szerint ez 37 meV a WT-ban és 28 meV a mutáns sejtekben.

A vizsgálataink során a flash által indukált klorofill-fluoreszcencia mérések mellett termolumineszcencia méréseket is végeztünk, mindezt DCMU jelenlétében és hiányában egyaránt. A  $\Delta$ PsbU sejtekben a B sáv, ami DCMU hiányában az  $S_2Q_B^-$  töltésrekombinációnak tulajdonítható, és a Q sáv, ami DCMU jelenlétében az  $S_2Q_A^-$  töltésrekombinációhoz kapcsolható, magasabb hőmérsékletek felé tolódtak. Ezek az adatok megegyeznek a flash indukált klorofill-fluoreszcencia mérési eredményekkel és megerősítik az  $S_2Q_B^-$  és az  $S_2Q_A^-$  energetikai stabilizációját a mutáns sejtekben. Azonos számú funkcionális PSII komplex mellett a B sáv intenzitása 1.7-szer nagyobb a  $\Delta$ PsbU sejtekben a WT-hoz képest. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a  $P_{680}^+Phe^-$  elsődleges töltésszétválasztási állapot szabadenergia szintje befolyással van a termolumineszcencia intenzitására, azáltal, hogy megváltoztatja a  $P_{680}^*$  és a  $P_{680}^+Phe^-$  közti szabadenergia különbséget. A  $\Delta$ PsbU sejtek megnövekedett termolumineszcencia amplitúdója, a lassabb  $S_2Q_A^-$  és  $S_2Q_B^-$  töltésrekombinációval együtt, a  $P_{680}^+Phe^-$  elsődleges töltésszétválasztási állapot csökkent szabadenergiájára utal.

A WT és a  $\Delta$ PsbU sejtek fotoinhibícióra való érzékenységét 1.5 órás intenzív ( $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  foton) megvilágítás mellett teszteltük, a D1 fehérje szintézist gátló linkomicin jelenlétében, illetve annak hiányában. Kísérleteink azt mutatták, hogy linkomicin jelenlétében a  $\Delta$ PsbU sejtek fokozottan érzékenyek az erős fényre. Annak ellenére, hogy a mutáns sejtek hajlamosabbak voltak a fotoinhibícióra linkomicin hiányában, a fényintenzitás növekedési szintre való visszaállítása után jelentős mértékben regenerálódott a PSII aktivitásuk. Több folyamat is részt vesz a fotoinhibícióban: az akceptor oldali elektrontranszport folyamatok

következtében reaktív oxigénformák képződhetnek, ugyanakkor az oxigéntermelő komplex is inaktiválódhat.

Az eredményeink arra utalnak, hogy a PsbU fehérje hiánya változásokat idéz elő nemcsak a PSII donor oldalán, hanem az akceptor oldalon is. A fehérje hiánya az akceptor oldalon valószínűleg nem csak a  $Q_A$  és a  $Q_B$  környezetét befolyásolja, hanem módosítja a Phe, vagy a  $P_{680}$  reakciócentrum  $P_{D1}Chl$ -je hidrogénkötéses kölcsönhatásait. Ez utóbbi olyan töltésszétváláshoz vezet, ami triplett klorofillt ( $^3P_{680}$ ) eredményez, ami indukálhatja a szinglett oxigén termelését, így a PSII oxidatív károsodást szenvedhet.



## KÖVETKEZTETÉSEK

1. Korábban nem volt ismert, hogy az igen fontos, kék fény által indukált fluoreszcencia-kioltási fényvédő mechanizmus általánosan elterjedt-e a cianobaktériumok körében vagy sem. Munkánk során kimutattuk, hogy csak azok a cianobaktériumok képesek kék fény által indukált klorofill-fluoreszcencia kioltásra, amelyek genomja tartalmazza a teljes OCP-t kódoló gént. Ez egyaránt igaz optimális és vashiányos körülmények között nevelt cianobaktériumokra. Ezzel ellentétben azok a cianobaktériumok, amelyek csak részben tartalmazzák vagy teljesen nélkülözik az OCP-t kódoló gént, nem képesek a kék fény által indukált fluoreszcencia kioltásra sem optimális, sem vashiányos viszonyok mellett. Az utóbbi csoportba tartozó cianobaktérium törzsek más módszerrel birkóznak meg az olyan stresszkörülményekkel, mint amilyen a vashiány: az OCP-t kódoló gént nem tartalmazó törzsek sejtjeiben vashiányos környezetben csökken a fikobiliprotein mennyisége és ezáltal elkerülhetővé válik a veszélyes, szabad fikobiliszómák felhalmozódása. Hasonló stresszkörülmények közt, amelyek során a sejtekben megjelenhetnek a szabad fikobiliszómák, az OCP-t előállítani képes törzsekben az erős fény elleni védekezés az OCP-fikobiliszóma szintjén zajló energia elvezetés útján történik.
2. A PsbU protein alegység szerepét a PSII komplex elektrontranszportjával és fényérzékenységevel kapcsolatban tanulmányoztuk. A kísérleteket egy korábban leírt PsbU-hiányos *Synechococcus* PCC 7942 mutánsra végeztük, amelyről kimutatták, hogy emelkedett antioxidáns kapacitással rendelkezik. Fényimpulzus által indukált klorofill-fluoreszcencia méréseink szerint a PsbU hiánya lelassítja az  $S_2Q_A^-$  és az  $S_2Q_B^-$  töltésrekombinációs folyamatokat. Termolumineszcencia adataink, azaz a magasabb hőmérsékletek felé tolódott Q- és B-sávok arra utalnak, hogy ezekben a mutáns sejtekben megnövekszik az  $S_2Q_A^-$  és az  $S_2Q_B^-$  töltéspárok stabilitása. Továbbá, a termolumineszcencia sávok intenzitása általában magasabb a  $\Delta$ PsbU sejtekben ( $\approx 1.7\times$  a B-csúcs esetében), a WT-ban mérthez képest. A mutáns sejtek erős megvilágítás mellett

érzékenyebbek a fotoinhibícióra, linkomicin jelenlétében és hiányában egyaránt. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a PsbU alegység hiánya a *Synechococcus* PCC 7942 cianobaktérium törzsben befolyással van az  $S_2Q_A^-$  és  $S_2Q_B^-$  töltéspárok stabilitására, azáltal, hogy módosítja a PSII donor és akceptor oldali elemeit. A hatást valószínűleg a donor oldali oxigénfejlesztő komplex közvetlen környezetében, valamint PSII-n belül bekövetkező szerkezeti változások okozzák. Eredményeink szerint ezeket a változásokat a PsbU fehérje alegység hiánya a lumenális oldalról indukálhatja. A  $\Delta$ PsbU sejtek fényérzékenysége valószínűleg a reaktív oxigénformák jelenlétéhez kapcsolható, amelyek létrejöttét vagy a megváltozott donor oldal, vagy/és az elsődleges töltéspár módosított energetikai állapota indukálja.

## PUBLIKÁCIÓS LISTA

### Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Boulay, C., **Abasova, L.**, Six, C., Vass, I., Kirilovsky, D., 2008. Occurrence and function of the orange carotenoid protein in photoprotective mechanisms in various cyanobacteria. *Biochim Biophys Acta* 1777, 1344-1354. **IF:5.1**

**Abasova, L.**, Deák, Z., Schwarz, R., Vass, I., 2011. The role of the PsbU subunit in the light sensitivity of PSII in the cyanobacterium *Synechococcus* 7942. *J Photochem Photobiol B: Biology*. **IF:2.1**

### Egyéb közlemények:

Bogos, B., Ughy, B., Domonkos, I., Laczko-Dobos, H., Komenda, J., **Abasova, L.**, Cser, K., Vass, I., Sallai, A., Wada, H., Gombos, Z., 2010. Phosphatidylglycerol depletion affects photosystem II activity in *Synechococcus* sp. PCC 7942 cells. *Photosynth Res* 103, 19-30. **IF:2.4**

Wu, H., **Abasova, L.**, Cheregi, O., Deak, Z., Gao, K., Vass, I., 2011. D1 protein turnover is involved in protection of Photosystem II against UV-B induced damage in the cyanobacterium *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*. *J Photochem Photobiol B* 104, 320-325. **IF:2.1**

Funk, C., Hernandez-Prieto, M.A., Tibiletti, T., **Abasova, L.**, Kirilovsky, D., Vass, I., 2011. The small CAB-like proteins of the cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803: Their involvement in chlorophyll biogenesis for Photosystem II. *Bba-Bioenergetics* 1807, 1143-1151. **IF:5.1**