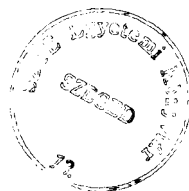


A Ph.D értekezés tézisei

**A FÉNY SZEREPE A FOTOSZINTETIKUS  
MEMBRÁNSZERKEZETET REGULÁLÓ  
FOLYAMATOKBAN**



**Írta: Zsíros Ottó**

**Témavezető: Dr. Gombos Zoltán**

**Magyar Tudományos Akadémia  
Szegedi Biológiai Központ  
Növénybiológiai Intézet**

**Szeged  
2000**

# I. Bevezetés és célkitűzések

## *Bevezetés*

Az élet sok milliárd évvel ezelőtt kezdődött, és ma is tartó története során a fotoszintetizáló szervezetek váltak azon kulcsfontosságú élőlényekké, amelyek nélkül elképzelhetlenné vált minden földi élet. A fotoszintézis az a folyamat, amely során ezen élőlények a fényenergiát a széndioxidnak szerves vegyületekké való redukciójára használják fel. Ezáltal biztosítják az egész élővilág számára a táplálékot, miközben fenntartják az oxigéndús légkört.

Egy élőlény fennmaradásához elengedhetetlen az a képesség, hogy alkalmazkodni tudjon a környezet állandó változásaihoz. A fotoszintetikus prokarióta szervezetek, köztük a cianobaktériumok, több, mint 3 milliárd éves történetük során sokszor kerültek szembe azzal a ténnyel, hogy környezetük hőmérséklete megváltozott. Egyed- és fajszínt az életben maradáshoz elengedhetetlen volt az alkalmazkodóképesség kifejlesztése, azaz az új és megváltozott környezetben való továbbélés és szaporodás. Azon egyedek és fajok, amelyek erre nem voltak képesek, eltűntek az élőlények sorából.

Az elmúlt évtizedekben a kutatók figyelme a különböző környezeti stresszekre és az ezekre adott válaszokra terelődött. A hőmérsékleti stresszek során a cianobaktériumok sejtmembránjainak

fizikai állapota, mikroviszkozitása és molekuláris szerveződése az optimálistól eltérővé válik. A stresszhez való alkalmazkodás pedig az új funkcionális állapot létrehozása és fenntartása, mely során a membránok lipid-, fehérje- és pigmentösszetétele megváltozik. Az élő szervezet így képes a sejtmembránok fizikai és szerkezeti tulajdonságait optimális szinten tartani az ehhez rendelhető élettani funkciókkal együtt, elsősorban a fotoszintézis folyamatával, amely az energiát szolgáltatja minden további életfolyamathoz. E regulációs mechanizmusok megértéséhez nyújtanak lehetőséget a magasabbrendű növények kloroplasztiszi modelljének tekinthető cianobaktériumok, elsősorban a *Synechocystis* PCC 6803 törzs, amely kedvelt objektuma számos laboratóriumnak.

### *Célkitűzések*

A magasabbrendű növények hőmérsékleti stresszekhez történő alkalmazkodásának tanulmányozása során ismertté vált, hogy az adaptáció és a membránfluiditás között szoros kapcsolat van. A hetvenes évektől számos más reguláló tényező mellett az is tudottá vált, hogy a membránfluiditást a telített és telítetlen zsírsavak aránya befolyásolja. A magasabbrendű növények esetében a zsírsav- és lipid- bioszintézis különböző organellekhez kötött. A növényi glicerolipid bioszintézis első lépése a foszfatidsav (PA) keletkezése. A növényi szövetekben megtalálható PA szintézise az

endoplazmatikus retikulumban "eukarióta úton" (Moore, 1984, Sauer és Robinson, 1985) és a kloroplasztisz envelop membránjához kötődve "prokarióta úton" történik (Andrews és mtsai, 1985, Block és mtsai, 1983, Dorne és mtsai, 1982). A zsírsavak citoplazmás és kloroplasztiszos úton keletkezhetnek. A termékek mozgása nem gátolt az organellek között, ami az adaptációs válaszok értelmezését nehezítette.

Korábbi eredmények alapján ismert, hogy a növekedési hőmérséklet jelentősen befolyásolja a cianobaktérium sejtek membrán szerkezetét. A hőmérsékleti adaptációban a membránszerkezetet (elsősorban a tilakoid membrán szerkezetét, amelyben a fotoszintetikus elektrontranszport-lánc található) befolyásoló tényezők közül a zsírsavak deszaturáz enzimek által katalizált telítetlenség-változása bizonyult a legjelentősebb tényezőnek.

A cianobaktériumok használatát az adaptív válaszok tanulmányozására több gyakorlati előny támasztja alá. 1996 óta a *Synechocystis* PCC 6803 törzs teljes génszekvenciája ismert. Egyszerű membránrendszerrel rendelkeznek, ami könnyen izolálható, és ez lehetővé teszi a membránszintű adaptáció tanulmányozását. A hetvenes évektől léteznek jól használható cianobakteriális transzformációs rendszerek, amelyek segítségével célzottan megváltoztatható a membránban található lipidek

zsírsavainak telítetlensége. Murata és munkatársai olyan mutánsokat hoztak létre, melyekben a zsírsavdeszaturáció egyes, jól definiált lépései gátoltak, és ezek segítségével fényt derítettek lipid- és zsírsavsintézisük folyamatára. A *Synechocystis* PCC 6803 törzs használatának egy másik előnye az, hogy ez a törzs képes heterotróf módon élni, ebben az esetben anyagcsere folyamatainak fenntartásához nem a fotoszintetikus apparátus szolgáltatja az energiát, hanem az oxidatív elektrontranszport, szénforrásként kívülről adott glükózt használ.

A fenti ismeretek birtokában a következő kérdésekre kerestünk választ:

I/1. A sejtek két, egymástól eltérő életformában (autotróf és heterotróf) képesek nőni. Az eltérő életformákhoz eltérő elektrontranszportok szolgáltatják az energiát. A magasabbrendű növényeknél ezek az elektrontranszport-láncok különböző sejtorganelumban lokalizáltak, az oxidatív elektrontranszport a mitokondriumban, míg a redukzív lánc komponensei a kloroplasztisban. A cianobaktériumoknál az oxidatív elektrontranszport-lánc komponenseinek egy része is a tilakoid membránban lokalizálódik, más részük a citoplazmás membránban. Arra szeretnénk volna választ kapni, hogy milyen előnyt jelent az

élőlény számára az egyik vagy a másik életforma. Ennek eldöntésére a sejtek osztódási sebességének mérése jól használható. Kíváncsiak voltunk a különböző hőmérsékleteken, sötétben és fényen nevelt kultúrák osztódási sebességére is.

I/2. A hőmérsékletfüggő fotoszintetikus aktivitást a tilakoid membrán szerkezete, elsősorban a lipidösszetétel határozza meg. Ha az azonos hőmérsékleten, autotróf és heterotróf módon nevelt sejtek hőmérsékletfüggő oxigén termelése eltérő, valószínűsíthető, hogy eltérő lipidtartalommal rendelkeznek.

II/1. A fotoszintetikus organizmusokra jellemző a tilakoid membránrendszer, amelyben a fotoszintetikus apparátus található. Ez az apparátus funkcióját fényen képes betölteni, ha a sejtek sötétben nőnek, a jól szervezett, de bonyolult tilakoid membránrendszer teljes felépítése energetikailag hátrányos lenne. Ezért elektronmikroszkópos képeket készítettünk, hogy tanulmányozzuk, milyen membránszerkezeti változások következnek be a sötétben nőtt sejteknél.

II/2. A sejtek pigmentációja függ a tápanyag összetételétől, az alkalmazott fény hullámhosszától. Arra voltunk kíváncsiak, hogy fény hiányában, amikor nincs fénybegyűjtő funkciója a pigmenteknek, milyen változások következnek be a pigmentrendszerben.

III/1. A *Synechocystis* PCC 6803 törzs deszaturáz enzimeket kódoló génjeinek expressziója autotróf módon nevelt sejtek esetében hőmérsékletfüggő, ebben az esetben a fény és a hőmérséklet együttes hatásának eredményét lehet nyomon követni. Az általunk használt rendszerrel egymástól függetlenül lehet vizsgálni, hogy milyen hatása van a hőmérsékletnek és a fénynek a deszaturáció folyamatára.

III/2. A zsírsavdeszaturáció energia- és elektronigényes folyamat, amit a fotoszintézis biztosít. Kíváncsiak voltunk, hogy a sötétben nevelt sejteknél, amikor nem működik a fotoszintézis, milyen a zsírsavszintű adaptáció, és milyen az alkalmazkodó képességük a különböző hőmérsékletekhez.

Kísérleteinket annak reményében kezdtük el, hogy eredményeink alapján választ tudunk adni arra a kérdésre, hogy a fény milyen szerepet tölt be a hőmérsékleti stresszekhez való alkalmazkodásban.

## II. A kísérletek során használt cianobaktérium és nevelési körülményei

A vad típusu *Synechocystis* PCC 6803 sejteket a Wada és mtsai által leírtak szerint neveltük (1989). A sejteket BG 11 médiumban

A vad típusu *Synechocystis* PCC 6803 sejteket a Wada és mtsai által leírtak szerint neveltük (1989). A sejteket BG 11 médiumban növesztettük (Stainer és mtsai, 1971) fotoautotróf körülmények között. A buborékoltatott kultúránál alkalmazott fényintenzitás  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  volt, a steril levegő 1 %  $\text{CO}_2$ -ot tartalmazott (Ono és Murata, 1981). A fotoheterotróf módon nőtt sejteket BG 11 médiumban növesztettük, amelyhez 5 mM előzőleg sterilizált glükózt adtunk. A nevelés során a sejtek termosztált rázóban, sötétben nőttek úgy, hogy napi 10 perces normál fényintenzitású ( $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) megvilágítást kaptak (Anderson és McIntosh 1991). A kísérletek során az alkalmazott fény intenzitása mindig  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  volt.

### III. Eredmények

Eredményeimet a következőekben foglalhatom össze:

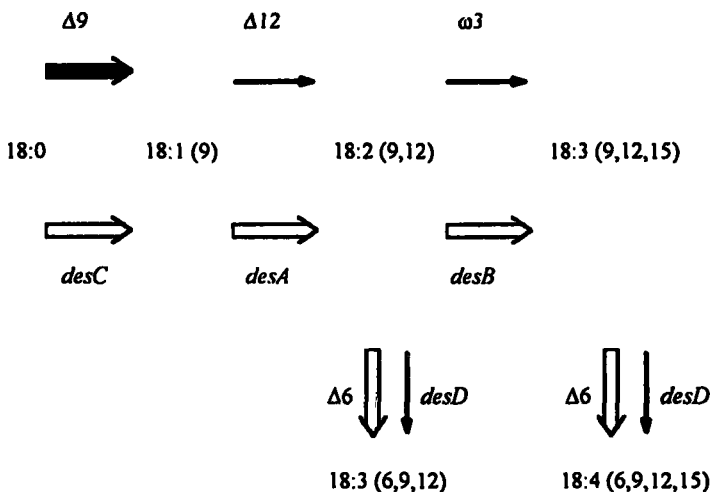
1. A fényen és különböző hőmérsékleteken nőtt sejtek fiziológiás állapotára jellemző fotoszintetikus aktivitás hőmérsékletfüggő maximuma jelentősen eltért, a  $25^\circ\text{C}$ -on nőtt sejtek esetében a maximum  $31^\circ\text{C}$  volt, míg a  $35^\circ\text{C}$ -on nőtt sejtek esetében  $40^\circ\text{C}$ . A sötétben nevelt sejtek esetében csak jelentéktelen eltérést kaptunk, ugyanezek a hőmérsékleteken a maximumok  $39^\circ\text{C}$  és



hőmérsékletekhez, viszont sötétben nem tudtak adaptálódni az alacsony hőmérséklethez.

2. Izoterm hőmérsékleten nem tapasztaltunk jelentős eltérést a növekedési sebességekben, ha a sejtek fényen vagy sötétben nőttek 5 mM glükóz jelenlétében. 35°C-on a sejtek gyorsabban nőttek, mint 25°C-on. A hőmérséklet befolyásolta az osztódás sebességét, míg a fény nem befolyásolta.
3. A sötétben nevelt sejtek pigmentösszetételét összehasonlítva a fényen nőtt sejtek pigment-tartalmával az jelentősen megváltozott. Csökkent a sötétben nevelt sejtek klorofill tartalma.
4. A *Synechocystis* PCC 6803 fotoszintetikus prokarióta cianobaktériumban lévő acil-deszaturáz enzimeket kódoló gének (*desC*, *desA*, *desD* és *desB*) alacsony hőmérsékleten és fényen kifejeződnek, míg sötétben, izoterm körülmények között csak a *desC* gén expressziója teljes. A másik három gén kifejeződése részben (*desA* és *desD*) vagy teljesen (*desB*) gátolt. A *desC* gén expresszióján kívül a másik három gén fényregulált, ami a különböző hőmérsékletekhez való adaptációs folyamatokban játszik szerepet. A *Synechocystis* PCC 6803 törzs deszaturáz

génjeinek lehetséges expressziós sémáját 25°C-on fényen és sötétben a következő ábra mutatja.



Lipid-deszaturáz gének expressziójának lehetséges sémája a *Synechocystis* PCC 6803 törzsben. Üres nyilak a gének expresszióját fényen, 25°C-on, a sötét nyilak sötétben, 25°C-on mutatják. A nyilak vastagsága az egyes gének aktivitását mutatják.

5. A génexpressziós vizsgálatokkal bizonyítottuk, hogy a lipid-deszaturáció folyamata szoros kapcsolatban van a fotoszintetikus elektrontranszport lánc aktivitásával, a deszaturáció a fotoszintézis kontrollja alatt áll. A fotoszintézis tehát nemcsak

energiát szolgáltat a sejt számára, hanem a membránszerkezet kialakításában regulációs szerepet is betölt.

6. A megváltozott génexpresszió következménye, hogy a sötétben nevelt sejtek membránjainak eltérő lipidtartalma van, kevesebb bennük a telítetlen lipidek mennyisége a fényen növesztett sejtekhez képest és ez rigidebbé teszi a membránt, ami 25°C alatt a sejtek halálához vezet.
  
7. A megváltozott lipidösszetétel miatt sötétben megváltozik a membránok szerkezete, amit transzmissziós elektronmikroszkópiával bizonyítottunk. Ez a megváltozott membránszerkezet helyre áll, ha a sejteket visszahelyezzük fényre. A fénynek a fotoszintetikus elektrontranszport láncon és a zsírsav deszaturáció folyamatán keresztül szerepe van a makroszkópikus struktúra kialakításában.
  
8. A tilakoid-membránok finom szerkezeti változásait elsőik között vizsgáltuk infravörös spektroszkópiával, amely egy jól használható új technika. A módszerrel meghatároztuk a különböző nevelési körülmények között növesztett sejtekből izolált tilakoid membránok fázistranziációs pontjait. A kísérleti eredményekkel összhangban ezzel a módszerrel magyarázni

tudjuk azt, hogy egy adott élőlény miért képes az adott hőmérsékleti tartományban élni. A spektrumok analízisével meghatározható a membránok fehérje-lipid aránya, melynek fontos szerepe van az alacsony és a magas hőmérsékletekhez történő adaptációs folyamatokban.

9. Végül, de hangsúlyozottan kijelenthetjük, hogy a fénynek az alapvető bioenergetikai jelentőségén túl kulcsszerepe van a különböző hőmérsékletekhez történő adaptációs folyamatokban és ezt a hatását, a fotoszintetikus folyamatokon keresztül fejt ki.

### III. Publikációs lista

#### *A dolgozatban felhasznált közlemények*

1. Kis, M., Zsfros, O., Farkas, T., Wada, H., Nagy, F., Gombos, Z.  
Light-induced expression of fatty acid desaturase genes.  
(1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 4209-4214.
2. Zsfros, O., Várkonyi, Zs., Mustárdy, L., Ughy, B., Gombos, Z.,  
Light is necessary in the acclimation process of photosynthetic  
organism to low-temperature stress.  
In: Advances in Plant Lipid Research (1998) Sánchez, J.,  
Cerdá-Olmedo, E., Martínez-Force, E. (eds) 118-121. Printed  
in Spain, Universidad de Sevilla

3. Zsíros, O., Várkonyi, Zs., Kovács, A., Farkas, T., Gombos, Z., Garab, G.

Induction of polyunsaturated fatty-acid synthesis enhances the tolerance of a cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*, to low-temperature photoinhibition. (2000) Indian Journal of Biochemistry & Biophysics on "Photosynthesis Research in Post-genomic Era", (in press)

4. Zsíros, O., Kis, M., Mustárty, L., Farkas, T., Várkonyi, Zs., Ughy, B., Gombos, Z., Szalontai, B.

Light-driven structural changes in thylakoid cytoplasmic membranes of a cyanobacterium, *Synechocystis* PCC 6803. (Biochem. Biophys. Acta, elküldve)

#### *Egyéb közlemények*

1. Gombos, Z., Kis, M., Zsíros O., Ughy, B., Várkonyi, Zs., Wada, H., Tasaka, Y., Farkas, T., Murata, N.

Light induction of lipid desaturation and its role in acclimation to low temperature

In: Advances in Plant Lipid Research (1998) Sánchez, J., Cerdá-Olmedo, E., Martínez-Force, E. (eds) 118-121. Printed in Spain, Universidad de Sevilla

2. Gombos, Z., Hideg, É., Zsíros O., Wada, H., Murata, N.

The role of lipid desaturation in protection mechanism against temperature stresses (1995) Acta Phytopat. Entomol. Hung. 30(1-2): 89-92.

3. Masamoto, K., Zsíros, O., Gombos, Z.,

Accumulation of Zeaxanthin in cytoplasmic membranes of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain PCC 7942 grown

under the light conditions (1999) *J. Plant Physiol.* 155: 136-138.

4. Várkonyi, Zs., Zsíros O., Gombos, Z.,

The application of genetically manipulated cyanobacterial strains in the study of glycerolipid unsaturation of photosynthetic membranes in the tolerance of photosynthetic machinery to temperature stresses (1996) *J. Scien. Indust. Res.* 55: 658-668.

5. Fodor, E., Zsíros, O., Várkonyi, Zs., Gombos, Z., Kovács, A., Mustárdy, L., Horváth, I. L., Hiripi, L., Farkas, T.

Exceptional to seasonal adaptation: cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Applied and Environmental Microbiology, elküldve)

6. Gombos, Z., Tasaka, Y., Zsíros O., Várkonyi, Zs., Murata, N.

Lipids of photosynthetic membranes in cyanobacteria: roles in protection against low-temperature stress

In: *The Phototrophic Prokaryotes* (1999) G.A. Peschek, W. Löffelhardt, G. Schmetterer (eds.) 647-655. Kluwer Academic Publishers, Printed in USA

7. Debreczeny, M., Szalontai, B., Gombos, Z., Zsíros O., Tasaka, Y., Murata, N.

Elimination of polyunsaturated lipids affects the structure of photosynthetic membranes

In: *Photosynthesis: from Light to Biosphere Vol III.* (1995) Mathis, P. (ed.) 409-412. Kluwer Academic Publishers, Printed in the Netherlands

8. Z. Gombos, M. Kis, O. Zsíros, B. Ughy, Zs. Várkonyi, H. Wada, T. Farkas, F. Nagy

Light induction of lipid desaturation and its role in acclimation to low temperature

In:Photosynthesis: Mechanism and Effects Vol. III. (1998) G. Garab (ed.) 1783-1786.  
Kluwer Academic Publishers , Printed in the Netherlands

9. Zs. Várkonyi, O. Zsiros, T. Farkas, G. Garab, B. Ughy, Zs. Szegletes, Z. Gombos

Adaptation mechanism of the photosynthetic apparatus of *Cylindrospermopsis raciborskii* ACT 9502 to different environmental effects

In:Photosynthesis: Mechanism and Effects Vol. III. (1998) G. Garab (ed.) 1783-1786.

Kluwer Academic Publishers , Printed in the Netherlands

10. Büchel, C., Zsiros O., Garab, G.

Alternative cyanid-sensitive oxidase interacting with photosynthesis in *Synechocystis* PCC 6803. Ancestor of the oxidase of chlororespiration? (1998) *Photosynthetica* 35: 223-231.