

**A foszfatidil-glicerin fiziológiai szerepe egy obligát  
fotoautotróf, a *Synechococcus* sp. PCC7942  
cianobaktériumban**

Ph.D. értekezés tézisei

Bogos Balázs

*Témavezető:* Dr. Gombos Zoltán

Biológia Doktori Iskola

MTA Szegedi Biológiai Központ Növénybiológia Intézet

SZTE TTIK

2010

Szeged

## Bevezetés:

A cianobaktériumok jelentős szerepet játszottak a Föld mai arculatának kialakításában. Oxigén termelő fotoszintézisük révén rendkívül fontos szerepet játszanak ma is az óceánok biomassza és oxigéntermelésében. A cianobaktériumok rendszertani csoportjai rendkívüli morfológiai és genetikai diverzitást mutatnak, melyben a fonalas, nitrogénkötő cianobaktériumok inkább monofiletikus, míg az egysejtű cianobaktériumok polifiletikus csoportokat alkotnak. Széles körben elfogadott, hogy a ma élő, magasabbrendű élőlények kloroplasztisza ősi cianobaktériumok endoszimbiotikus bekebelezésének eredménye. A kloroplasztiszok, és a cianobaktériális sejtek funkcionális és strukturális hasonlósága nem kétséges. Többek között ennek a genetikai, funkcionális hasonlóságnak következtében a cianobaktériumok kiváló modellszervezetek, közülük a *Synechococcus* sp. PCC7942 obligát fotoautotróf és a *Synechocystis* sp. PCC6803 törzsek kiemelkedő fontossággal bírnak.

A fotoszintézis fényreakciói kloroplasztiszok és cianobaktériumok tilakoid membránjába ágyazott fehérjekomplexek segítségével valósulnak meg. Ezek közül a komplexek közül a PSI és PSII kiemelkedő fontosságú a fotokémiai töltésszétválasztás szempontjából. Az oxigéntermelő cianobaktériumok többségében a tilakoid membránok igen jellemző, a többi baktériumtól eltérő lipidösszetétellel rendelkeznek. Ebben a tulajdonságukban hasonlítanak a magasabbrendű növények, algák kloroplasztisza tilakoidmembránjára. A tilakoid membránok főleg neutrális glikolipideket tartalmaznak, melyek szerkezeti és funkcionális szempontból is a legfontosabb lipidosztályok közé tartoznak. A glikolipidek közül az MGDG és DGDG található meg a legnagyobb arányban. Mindkét lipid szerkezeti elemként alapvetően befolyásolja a tilakoid membrán fizikai tulajdonságait ezzel közvetve a fotoszintézis hatékonyságát. A töltéssel rendelkező lipidek kis mennyiségben találhatóak meg a tilakoid membránokban. A semleges pH-n negatív töltéssel rendelkező SQDG és az egyetlen foszfolipid PG fehérje-lipid kölcsönhatásokban játszott szerepét számos tanulmányban próbálták felderíteni.

A membránlipidek fotoszintézis folyamataiban betöltött funkciójának tanulmányozására leggyakrabban alkalmazott modellszervezetek a *Synechocystis* sp. PCC6803 és *Synechococcus* sp. PCC7942 cianobaktérium törzsek. Mindkét törzs kiváló modellszervezetnek bizonyult, genomszekvenciájuk ismert, valamint genetikai

módosításaik esetében rengeteg tapasztalat halmozódott fel. A két törzs közötti lényeges különbségnek tekinthető, hogy a membránlipidek zsírsavösszetétele jelentősen különbözik egymástól. A *Synechocystis* sp. PCC6803 inkább a növényekre jellemző, többszörösen telítetlen zsírsavakat tartalmaz, míg a *Synechococcus* sp. PCC7942 a baktériumokra jellemző egyszeresen telítetlen zsírsavakat épít be a membránokat alkotó lipidekbe. A két törzsben az SQDG szerepe is különböző lehet, hiszen *Synechocystis* sp. PCC6803-ban ez a lipid létfontosságúnak tekinthető, míg *Synechococcus* sp. PCC7942 esetében az SQDG szintézisére képtelen mutáns csak foszfátéhezés során mutat különbséget a vad típushoz képest.

A PG fiziológiai szerepének tanulmányozása *Synechocystis* sp. PCC6803  $\Delta pgsA$ ,  $\Delta cdsA$  és PAL/ $\Delta cdsA$  mutánsok létrehozásával és jellemzésével új információkkal gazdagodott. Ezek a mutánsok PG szintézisére képtelen, auxotróf mutánsok, melyek képesek a PG-t a külső tápoldatból felvenni és membránjaikba építeni. A külső tápoldatból eltávolítva a PG-t tanulmányozhatóvá válik a kiürülése során jelentkező, a fotoszintézist jelentősen befolyásoló fenotipikus hatások összessége. A mutánsok PG éhezése során gyűjtött adatok rávilágítottak, hogy a PG korai kiürülési fázisában inkább PSII-t érik hatások, míg hosszú távú PG éhezés során csak meglehetősen későn, a PG tartalom jelentős csökkenésekor változik meg a PSI szerkezete és működése. A PG kiürülés hatására az eredetileg trimer szerkezet monomerizálódik és ezáltal aktivitásuk is változik az említett mutánsokban.

**Célkitűzések:**

Az PG esetleges fajspecifikus fiziológiai szerepének tanulmányozása szempontjából a dolgozat a következő célokat jelöli meg:

1: Egy obligát fotoautotróf *Synechococcus* sp. PCC7942/ $\Delta$ *cdsA* sejtvonallétrehozása, mely modellrendszer jelentősen különbözik a korábbi *Synechocystis* sp. PCC6803 modelltől zsírsavösszetétel tekintetében.

2. A PG kivonás hatásának vizsgálata a lipid tartalomra és a zsírsav tartalom átalakítására

3: A PG kiürülés fiziológiás hatásának összehasonlítása a *Synechocystis* sp. PCC6803  $\Delta$ *pgsA*, PAL/ $\Delta$ *cdsA* és *Synechococcus* sp. PCC7942/ $\Delta$ *cdsA* sejtekben. A PG törzsspecifikus szerepének meghatározása a fotoszintetikus komplexek oligomerizációs folyamataiban a *Synechocystis* sp. PCC6803  $\Delta$ *pgsA* és PAL/ $\Delta$ *cdsA* mutáns tükrében.

4: A PG auxotróf, obligát fotoautotróf mutánsban a PG jelenlétében és hiányában mérhető alapvető fotoszintetikus folyamatok aktivitásának (oxigéntermelés) összehasonlítása.

## Kísérleti anyagok és módszerek

### Növekedési feltételek

A *Synechococcus* sp. PCC7942/ $\Delta$ *cdsA* sejteket szilárd, BG11 agar lemezekon neveltem 500  $\mu$ M nátrium acetát jelenlétében. A vad típusú és mutáns sejtek a fiziológiai karakterizálás során BG11 folyadék tápközegben növekedtek, puffer hozzáadása nélkül, 500  $\mu$ M nátrium acetát jelenlétében (ahol szükség volt rá a megfelelő antibiotikumokkal kiegészítve). A fotoautotróf növekedési feltételek megteremtéséhez a 150 ml-es lombikokban 50 ml mennyiségű kultúrák megvilágítására 30-35  $\mu$ mol foton  $m^{-2} s^{-1}$  fénysűrűséget alkalmaztam. A kultúrák rázatásához 100 rpm sebességgel pörgetett, vízszintes rázót használtam normál széndioxid mennyiség jelenlétében. A *Synechococcus* sp. PCC7942/ $\Delta$ *cdsA* mutáns kultúrákat 20  $\mu$ M dioleoil-PG (18:1/18:1 PG, P-9664, Sigma, St. Louis), 50  $\mu$ g/ml kanamycin, vagy 8  $\mu$ g/ml kloramfenikol jelenlétében tartottam fent. A PG kiürítését a sejtek centrifugálásával, PG mentes tápoldattal történő mosással, majd PG nélküli tápoldatba helyezéssel végeztem.

A *Synechocystis* sp. PCC6803/ $\Delta$ *pgsA* mutáns sejt vonal fotoautotróf módon, 20  $\mu$ g/ml kanamycin, valamint 5mM HEPES puffer (pH 7.5) jelenlétében növekedett. A további nevelési körülmények megegyeztek a *Synechococcus* sp. PCC7942/ $\Delta$ *cdsA* mutáns növekedési feltételeivel.

### A mutánsok létrehozása, transzformáció

A *Synechococcus* sp. PCC7942/ $\Delta$ *cdsA* mutáns létrehozását általánosan használt molekuláris biológiai módszerekkel végeztem. *Escherichia coli* DH5a és XL1-Blue sejtek a megfelelő módszerek szerint szolgálták a transzformáló konstrukciók létrehozásakor (LB gazdag tápoldatban, 37C<sup>o</sup>-on nevelve). A *cdsA* lókuszt PCR amplifikációjához RCU1: 5'-CTCGAGCAACGCTTGCTTAT-3' és RCD1: 5'-AATTCGCATTGCCGCTGAGG-3' primerpárt használtam. A primereket a *Synechococcus* sp. PCC7942 cianobaktérium elérhető, nyers genomszekvenciája alapján terveztem meg ([http://genome.ornl.gov/microbial/syn\\_PCC7942/](http://genome.ornl.gov/microbial/syn_PCC7942/)). A *Synechocystis* sp. PCC6803 genomja alapján (<http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase/>) a

*cdsA* gén kódoló szekvenciájának azonosítása homológia kereséssel történt. A primerek segítségével amplifikált 1596 bp hosszúságú genomi DNS szakasz a pMPM-A2 befogadóvektorba klónoztam. A szekvencia helyességét automata szekvenátorral ellenőriztem. A klónozott fragment *MunI/HincII* szakaszát a pZE31, vagy pZE21 vektorok kloramfenikol/kanamycin rezisztenciát kódoló génjeivel helyettesítettem. A *Synechococcus* sp. PCC7942 sejtek transzformálásához (a *cdsA* gén elrontása) inszerciós mutagenezist használtam a kanamycin rezisztenciát hordozó pRC5K1, vagy a kloramfenikol rezisztenciát hordozó pRC5C1 plazmidok felhasználásával optimalizált körülmények között.

### **Lipid analízis**

A lipidek extrakciójához egész sejteket tartalmazó kultúrákat használtam. A lipidextrakciót a Blight-Dyer módszerrel végeztem 10 mg fehérjét tartalmazó mintákat felhasználva. A lipidosztályok elválasztására vékonyréteg kromatográfia adott lehetőséget (szilikagél vékonyréteg lapok, Merck 5721). A futtató elegy összetétele 65:35:5 arányú kloroform:metanol:ammónium-hidroxid (28%) miatt a lipidek szétválasztását követően a lipidosztályok sorrendje a szilikagél lapokon (fentről lefelé) MGDG-DGDG-SQDG-PG. A kvalitatív analízis során belső kontrollt (15:0) alkalmaztam. A lipidosztályokat a vékonyrétegen ANSA (8-anilino-1-naftalén-szulfonsav) metanos oldatának a lemezre permetezésével, UV megvilágítással tettem láthatóvá. A lemezen bejelölve, majd 50 µg 15:0 zsírsav belső kontroll felvitelét követően a vékonyréteg lemezéről lekapartam az elválasztott MGDG, DGDG, SQDG, PG sávokban található lipideket. Az izolált lipideket 5% sósavat tartalmazó metanolban észteresítettem, majd ezt követően a keletkező zsírsav metilésztereket hexánba átrázva Hewlett Packard HP689 gázkromatográfival Supelco SP2330 kapilláris oszlopon mértem le. Az egyes lipidosztályok össz mennyiségét a hozzáadott belső kontroll mennyiségére normáltam, majd a relatív molszázalékok kiszámítását követően a PG jelenlétében és PG hozzáadása nélkül nevelt mintákból származó adatokat összehasonlítottam.

### **A sejtsűrűség, fehérjekoncentráció és pigment tartalom vizsgálata spektroszkópiai módszerekkel**

Meghatározott mennyiségű sejt fényszórását (750 nm hullámhosszú fényt alkalmazva), megfelelő hígításban Shimadzu UV-3000 spektrofotométerrel (Columbia,

MD) mértem meg. A fényszórás meghatározását követően a sejteket lecentrifugálva, 7:2 arányú aceton:metanol keverékkel extraháltam, ezáltal kivonható a klorofill-a tartalom. A feloldott klorofill koncentrációját annak abszorpciós maximumán mérve (7:2 aceton:metanol oldószerben 663 nm),  $82 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  extinkciós állandót használva számoltam ki. A színanyagok kivonását követően az aceton:metanolban nem oldódó sejtörmeléket fehérjekoncentráció meghatározásához használtam fel (Lowry módszer). A kalibrációs egyenest BSA (borjú szérum albumin) hígítási sor mérésével határoztam meg. A kultúrák növekedését fényszórásuk alapján követtem, valamint kiegészítő méréseként minden 24 óra nevelést követően a kultúrák fényszórásán kívül fehérje és pigment tartalmát is meghatároztam egyetlen mintavétel során.

A kultúrák abszorpciós spektrumát Shimadzu UV-1601 spektrofotométerrel és 3ml-es kvarcküveték alkalmazásával vettem fel. A spektrumokat minden említett időpontban 3-3 független, fehérjekoncentrációra normalizált minta lemérése szolgáltatva ( $200 \text{ } \mu\text{g/ml}$ ). A felvett spektrumokat tovább normáltam a sejtek fikobiliprotein tartalmának elnyelési maximumához ( $625 \text{ nm}$ ).

### **A fotoszintetikus oxigénfejlesztő aktivitás mérése**

A kultúrák oxigénfejlesztő aktivitását intakt sejteken, Clark-típusú oxigénelektrod alkalmazásával mértem meg (Instruments, Kings Lynn, U.K). A teljes elektrontranszportlánc aktivitása ( $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2$  végső akceptorig), valamint a PSII saját aktivitása hozzáadott, mesterséges elektronakceptor ( $\text{H}_2\text{O} \rightarrow 500 \text{ } \mu\text{M}$  p-benzokinon) alkalmazásával határoztam meg. A méréseket telítő fénysűrűség mellett ( $500 \text{ } \mu\text{M}$  foton  $\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), vörös előszűréssel,  $5 \text{ } \mu\text{g/ml}$  normalizált klorofilltartalom beállításával végeztem.

### **Flash-indukált fluoreszcencia lecsengés mérése**

A flash-indukált fluoreszcencia lecsengésének kinetikáját  $150 \text{ } \mu\text{s}$  és  $100 \text{ s}$  közötti időtartományban dupla modulációs PAM fluoriméter segítségével mértük (PS instruments, Brno). A  $200 \text{ } \mu\text{g/ml}$  fehérjetartalmú mintákat használtunk a méréshez. A görbék alakját, a fluoreszcencia lecsengés kinetikáját összehasonlítottuk a PG éheztetett és PG jelenlétében nevelt minták között. A minták  $F_{\text{max}}$  értékét 1-re normáltuk.

## Fehérje analízis

75 $\mu$ g összklorofillt tartalmazó sejtmenyiséget radioaktívan jelöltünk [<sup>35</sup>S]Met (>1,000 Ci mmol<sup>-1</sup> Izótóp Intézet Kft, Magyarország) hozzáadásával 60  $\mu$ mol foton m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> fénysűrűség mellett, 29°C-on. 20 perc jelölést követően a fotoszintetikus membránokat a korábban ismertetett módszerek alapján izoláltuk. A cianobakteriális membránok kinyerése érdekében a sejteket 150-200 mikron átmérőjű üveggyöngyök alkalmazásával tártuk fel.

Az izolált membránok fehérje komplexeinek elválasztása dodecil- $\beta$ -D- maltozid szolubilizációt követően, 4 °C -on inkubált, 5-14% akril-amidot tartalmazó natív gradiens történt (BN-PAGE). A második dimenzió (SDS-PAGE) futtatásához a teljes natív gél sávját izoláltuk, Tris-HCl (pH 7.5) pufferben, 1% SDS jelenlétében 30 percig áztatva denaturáltuk, majd a gélcsíkot a denaturáló, második gél tetejére rétegeztük. A második futtatás 12-20% poliakrilamid gradienst alkalmazott 7M Urea jelenlétében. A gélfuttatást követően a fehérjefoltok kimutatása Coomassie festéssel történt, illetve a radioaktív jelölést követően a röntgenfilmet 2-3 napig exponáltuk, majd a filmet előhívtuk.



## Eredmények

Létrehoztuk a *Synechococcus* sp. PCC7942/ $\Delta$ *cdsA* mutánst, mely képtelen a PG szintézisére és esetében a PG megvonás súlyosabb következményekkel jár, mint a *Synechocystis* sp. PCC6803/ $\Delta$ *pgsA*, illetve PAL/ $\Delta$ *cdsA* mutáns esetében.

1. A PG kiürülés jelentősen megváltoztatja a sejtek lipidösszetételét. A PG megvonás hatására az SQDG mennyisége számottevően megnövekszik, valamint a kívülről a kultúrákhoz adagolt szintetikus dioleoil-PG (18:1) átalakul a sejtekben eredetileg megtalálható zsírsavakkal észtereszített, vad típushoz közelebbi PG molekulákká. Azonban sem a megemelkedett SQDG tartalom, sem pedig a PG átalakított zsírsavtartalma nem képes kompenzálni a PG mennyiségének drasztikus csökkenéséből fakadó negatív hatásokat.
2. A PG kiürülés jelentős hatással van a tilakoid membránokban található fotoszintetikus reakciócentrumok (PSI, PSII) oligomerizációjára. Rövidtávú PG megvonás hatására az eredetileg dimer, trimer formában jelen levő szuperkomplexek esetében jelentős monomerizáció figyelhető meg. A fehérjeszintézis ilyen rövidtávú PG éhezés hatására nem gátlódik ugyan, de az újonnan megszintetizálódott reakciócentrum alegységek összeszerelődése jelentős gátlást szenved, főleg a PSII esetében. Igen valószínű tehát, hogy a tilakoid membránban megtalálható PG aktív szerepet vállal az újonnan szintetizálódott fehérjék membránba ágyazódásában.
3. *Synechococcus* sp. PCC7942/ $\Delta$ *cdsA* sejtek esetében a fotoszintetikus aktivitás gyors csökkenése figyelhető meg PG megvonás hatására. Ez a csökkenés jórészt a PSII akceptor oldali gátlásának köszönhető, míg a PSII donor oldalán nem figyelhető meg jelentős változás a PG jelenlétében nevelt kontrollokhoz képest. Ugyanakkor *Synechocystis* sp. PCC6803/ $\Delta$ *pgsA* mutánssal ellentétben az oxigénfejlesztő aktivitás nem a PSII elsődleges és másodlagos ( $Q_A/Q_B$ ) kinon akceptorai közötti elektronátmenet gátlásával valósul meg. Sokkal inkább a lecsökkent egyensúlyi állandónak köszönhető a  $Q_A^-Q_B$  és  $Q_AQ_B^-$  elektronállapotok között.

## Publikációs lista:

### A dolgozatban felhasznált közlemény:

**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. PCC7942 cells PHOTOSYNTH RES 103:(1) 19-30

**IF: 2.681**

### A dolgozat témájához kapcsolódó közlemények:

Domonkos I, Malec P, Sallai A, Kovacs L, Itoh K, Shen GZ, Ughy B, **Bogos B**, Sakurai I, Kis M, Strzalka K, Wada H, Itoh S, Farkas T, Gombos Z (2004) Phosphatidylglycerol is essential for oligomerization of photosystem I reaction center PLANT PHYSIOL 134: 1471-1478

**IF: 5.881**

Apostolova EL, Domonkos I, Dobrikova AG, Sallai A, **Bogos B**, Wada H, Gombos Z, Taneva SG (2008) Effect of phosphatidylglycerol depletion on the surface electric properties and the fluorescence emission of thylakoid membranes J PHOTOCH PHOTOBIO B 91:(1) 51-57

**IF: 1.838**

Laczko-Dobos H, Ughy B, Toth SZ, Kornenda J, Zsiros O, Domonkos I, Parducz A, **Bogos B**, Komura M, Itoh S, Gombos Z (2008) Role of phosphatidylglycerol in the function and assembly of Photosystem II reaction center, studied in a *cdsA*-inactivated PAL mutant strain of *Synechocystis* sp. PCC6803 that lacks phycobilisomes BBA-BIOENERGETICS 1777:(9) 1184-1194

**IF: 4.447**

### Egyéb közlemények:

Takacs M, Toth A, **Bogos B**, Varga A, Rakhely G, Kovacs KL (2008) Formate hydrogenlyase in the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus litoralis* BMC MICROBIOL 8: 10.1186/1471-2180-8-88- p.

**IF: 2.877**