

Tilakoidmembránok ultrastruktúrájának és szerkezeti rugalmasságának feltárása kisszögű neutronszórás mérésekkel különböző fotoszintetikus szervezetekben

CÍMŰ DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Ünnep Renáta

Szilárdtestfizikai és Optikai Intézet
Wigner Fizikai Kutatóközpont
Magyar Tudományos Akadémia

Témavezetők: Garab Győző, Prof. és Mezei Ferenc, Prof.



EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
Fizika Doktori Iskola
Iskolavezető: Prof. Dr. Tamás Tél, D.Sc.

Statisztikus Fizika, Biológiai Fizika és Kvantumrendszerek Fizikája
Programvezető: Prof. Dr. Jenő Kürti, D.Sc.

Budapest
2017

Bevezetés

Növények, algák és számos baktériumfaj fényt használ kémiai energia előállítására, azaz képesek fotoszintézisre. A fotoszintézis komplex folyamatát hagyományosan fény- és sötétreakciókra osztják fel. A fény elnyelését az ún. antennarendszerben és az energiaátadási folyamatait, valamint a fotokémiai reakciócentrumokban lejátszódó fényindukált elsődleges töltésszétválasztást redox változások és különböző ion mozgások követnek az úgynevezett elektrontranszportlánc mentén. A molekuláris oxigéntermelést (cianobaktériumokban, algákban és növényekben) a NADPH (redukáló erőt képviselő molekula) szintézise kíséri; a folyamat során képződő transzmembrán pH- és elektromos-grádiensből álló elektrokémiai potenciálgrádiens az energiahordozó molekula (ATP) szintéziséhez használandó fel. A sötétreakciókban, a NADPH és ATP felhasználódik a CO₂ 'fixációja' közben, azaz a cukor szintézisekor. Ezek a folyamatok, valamint az ezeket követő metabolikus folyamatok többszintű szabályozó mechanizmusok révén szoros összeköttetésben állnak egymással.

Az oxigént termelő fotoszintetikus szervezetekben a fényreakciók a tilakoidmembránban játszódnak le; ezek a membránok tartalmazzák vagy 'horgonyozzák le' a fotoszintetikus pigment-fehérje komplexeket és szinte minden más alkotórészét az energiaátalakító apparátusnak. A családonként kicsit különböző tilakoidmembrán multilamelláris rendszerekbe szerveződik, ezzel biztosítva az optimális fénybegyűjtést. A tilakoidmembránok szerkezete és összetétele különböző környezeti körülmények között azonos élőlényben is különböző lehet. A nagy szerkezeti változatosság és flexibilitás azt sugallja, hogy a rövid és hosszú lefutású szabályozó mechanizmusokban a szerkezeti flexibilitásnak jelentős szerepe van.

Az elmúlt évtizedekben ismereteink a kulcsfontosságú fotoszintetikus fehérje komplexek szerkezetéről és elsődleges funkciójáról, valamint a fényenergia-konvertálás molekuláris és fizikai mechanizmusairól nagymértékben fejlődtek. Ugyanakkor sokkal kevesebbet tudunk a teljes energiakonvertáló rendszer önszerveződéséről, szerkezetéről és azokról a mechanizmusokról, amelyek felelősek a szerkezet és funkció finomhangolásáért különböző szervezetekben és széles tartományban változó környezeti körülmények között. A tilakoidmembrán szerkezeti flexibilitása kulcsfontosságú szerepet tölt be a különféle fotoszintetikus adaptációs mechanizmusokban. Ezért különösen nagy fontosságot tulajdonítottunk a tilakoidmembrán-rendszer ultrastruktúrájának és dinamikai tulajdonságainak vizsgálatára.

PhD dolgozatom eredményeit elsősorban SANS módszerrel értem el. A SANS egy roncsolásmentes módszer, mely egyedi és pontos szerkezeti információt szolgáltat a membránrendszerről fiziológiailag releváns körülmények között, fixálás vagy festés nélkül, és megfelelő technika ultrastrukturális változások kinetikai méréséhez is.

Előzmények és célkitűzések

1/ A korábbi SANS vizsgálatok információt szolgáltatottak a magasabbrendű növények és élő egyszéjtűek tilakoidmembránjának periodikus szerkezetéről és a szerkezeti flexibilitásáról fiziológiai vagy fiziológiailag releváns körülmények között^{1,2}. PhD munkám általános céljai közül az egyik az volt, hogy ezeket a vizsgálatokat kiterjesszem magasabbrendű növények intakt leveleire és a modell organizmus *Chlamydomonas* zöld algára in vivo. Ezen belül fontos cél volt a tilakoidmembrán statikus szerkezeti paramétereinek és a szerkezeti flexibilitásának összehasonlítása in situ (levélben) és izolált állapotban különböző reakció-médiumokban.

2/ További céлом volt a feltételezett ultrastrukturális változások nyomon követése SANS-szal, és annak az alapkérdésnek a megválaszolása, hogy vajon van-e és ha igen, akkor milyen mértékű különbség a membrán ultrastrukturák között különböző élettani körülmények között: különböző ozmotikus nyomások mellett és különböző hőmérsékleteken, valamint a tilakoidmembránhoz kapcsolt Cl^- csatornák és foszfát transzporterek hiányában.

3/ Levelekben lévő tilakoidmembrán ultrastrukturális változásának időbeli követése is fontos feladat, mert számos szabályozó mechanizmus nem figyelhető meg izolált tilakoidmembránokon. A feltételezett fényindukált tilakoidmembrán átrendeződések vizsgálatához méréseket végeztem intakt leveleken. Különösen érdekes célként jelöltük meg annak tanulmányozását, hogy kísérik-e fényindukált membránátrendeződések a klorofill-a első szinglet gerjesztett állapotának nemfotokémiai kioltását, az NPQ-t. Az NPQ egy molekuláris mechanizmus, amely védi a fotoszintetikus apparátust az elnyelt többlet fényenergia károsító hatásával szemben. Mivel qE (az NPQ leggyorsabban kialakuló és relaxáló komponense zöld növényekben) a tilakoidmembrán belső vizes fázisának savasodásától függ, indokoltnak tűnt tanulmányozni, mint egy in vitro modellt, az alacsony pH hatását izolált tilakoidmembránrendszeren.

4/ A kináz- és foszfatáz-függő kromatikus adaptációs mechanizmus (az úgynevezett state tranzíció) ultrastrukturális alapjának értelmezéséhez, vad típusú és kináz mutáns zöld algákon (*Chlamydomonas reinhardtii*) végeztem méréseket.

¹ Sadler és mtsai., *J. Mol. Biol.* vol. 159, p 485–499, 1982.

² Nagy és mtsai., *Biochem. J.* vol. 436, p 225–230, 2011.

Alkalmazott módszerek

Minta előkészítések során, amennyire lehetséges, megpróbáltuk megtartani a minta intakt szerkezetét. Intakt növények leveleit, valamint levágott, nehézvízben áztatott vagy infiltrált leveleket vagy levél-szegmenteket és egész alga sejteket vizsgáltunk SANS segítségével. A különböző sejtalkotók szórásának kiküszöbölése és a háttér csökkentése céljából izolált tilakoidmembránokat is mértünk. Izolált tilakoidmembránok és egyes algafajok mérésekor külső mágneses mezőt használtunk, hogy minél több membrán kerüljön Bragg helyzetbe és ezzel javítsuk a SANS mérés jel/zaj arányát.

Méréseimet különböző korszögű neutronszerzés vizsgáló berendezésen végeztem (BNC-Budapest, ILL-Grenoble, JCNS-Garching, PSI-Villigen), melyeknél különböző volt a neutronintenzitás, ami az időfelbontásos méréseknél különösen fontos volt. Kollégáim és együttműködő partnereink kiegészítő méréseket végeztek 77K fluoreszcencia és cirkuláris dikroizmus spektroszkópiával, klorofill-a fluoreszcencia tranzienssel, elektronmikroszkópiával, pigment és fehérje analízissel, gyakran a helyszínen, párhuzamosan a SANS mérésekkel. Ezekkel a kiegészítő mérésekkel a fotoszintetikus szervezetek és a tilakoidmembránok összetételéről és funkciójáról teljesebb képet kaptunk.

Tézisek

1. Megmutattam, hogy az izolált tilakoidmembránról származó SANS görbén lévő Bragg csúcs eredete $0,02 \text{ \AA}^{-1}$ körüli tartományban a gránum tilakoid, nem a sztróma tilakoid, mint ahogyan korábban feltételezték. Megmutattam azt is, hogy a széles körben alkalmazott izoláló módszer, amiben ozmotikumként szorbitolt használnak, megváltoztatja a tilakoidmembrán natív szerkezetét; a szorbitol helyett ozmotikumként használt NaCl sokkal jobban megőrzi az eredeti szerkezetet. Bizonyítottam azt is, hogy a fő diffrakciós csúcs a gránumtilakoidokról származik levél esetében is [P1,P2].
2. Közvetlen kísérleti bizonyítékot találtam arra, hogy a glutaraldehyd [P1] és a mannitol, melyek széles körben használatosak az elektronmikroszkópos preparációs technikáknál, szignifikáns hatással vannak a tilakoidmembrán ultrastruktúrájára: az elsődleges fixáló anyag, a glutaraldehyd csökkenti a tilakoidmembránok ismétlődési távolságát; hasonló hatása van a magas nyomású fagyasztásnál használt védőanyagoknak, a mannitolnak is.
3. Összefüggést találtam az ozmotikus nyomás (szorbitol) indukálta hatására bekövetkező reverzibilis lamelláris ismétlődési távolságok között *Phaeodactylum tricornutum* [P3] és *Chlamydomonas reinhardtii* [P4] algákon, amellyel igazoltam, hogy a Bragg csúcs és a nagyobb q tartományba eső csúcs ($0,06\text{-}0,08 \text{ \AA}^{-1}$) változásai a membránok közötti távolságra jellemző érték. Megmutattam, hogy a *Phaeodactylum tricornutum* tilakoidmembrán-rendszerében mérsékelt melegítés összenyomódáshoz vezet [P3].
4. A *pht4;1-3* (szervetlen foszfát transzporter) [P6] és a *vccn1-1* (Cl^- csatorna) [P7] mutáns és a megfelelő vad típusú *Arabidopsis* mutánsaik levelében található tilakoidmembránok ultrastruktúráját SANS-szal tanulmányozva megmutattam, hogy a mutánsok gránum tilakoidmembránja megtartja a szabályos periodikus felépítését, de szorosabb pakolásúak és/vagy keskenyebb a lumenjük a vad típusúakéhoz képest.
5. Nagymértékben reverzibilis fényindukált változásokat találtam intakt levelek tilakoidmembrán-rendszerében. Megállapítottam azt is, hogy a NaCl-dal izolált tilakoidmembránok fényindukált változásai jobban hasonlítanak a leveleken tapasztalt fényindukált változásokhoz, mint a szorbitollal izolált tilakoidmembránoké [P1,P2,P5].

6. A nagy multilamelláris gránummal és intenzív NPQ-val rendelkező *Monstera deliciosa* levélrészeken történt fényindukált reverzibilis SANS változások mérésével szoros összefüggést mutattam ki az ultrastrukturális változások és a ΔpH függő nem-fotokémiai kioltás között. Ezek a minták erős fényindukált Bragg csúcs intenzitás csökkenést mutattak, amely a fény kikapcsolása után reverzibilisnek bizonyult [M1]. Mágnesesen rendezett izolált növényi tilakoidmembránok 2D SANS profiljának pH függésének vizsgálata során azt tapasztaltam, hogy alacsonyabb pH hatására a tilakoidmembránok periodikus rendeződése csökken, ami a Bragg csúcs kiszélesedésében és elkenődésében nyilvánult meg; ez a megnövekedett mozaicitás annak a jele, hogy a membránok veszítenek rendezettségükből, valószínűleg behullámosodnak és/vagy meghajlanak [M2].

7. Vad típusú és mutáns *Chlamydomonas reinhardtii* sejteken megmutattam, első alkalommal in vivo, hogy a state tranzíció módosítja a kloroplasztisz tilakoidmembránjainak ultrastrukturáját: befolyásolja a membránok összetapadását és periodicitását [P4].

Következtetések és nyitott kérdések

PhD munkám központi technikája a kisszögű neutronszerzés (SANS). Kihhasználva azt, hogy a SANS egy nemroncsoló kísérleti technika, amellyel statisztikailag és térben átlagolt szerkezeti információt kapunk, meghatároztam magasabbrendű növényekből izolált tilakoidmembránok jellemző ismétlődési távolságát különböző fizikai-kémiai körülmények között és összevetettem őket a natív állapotukkal, vad típusú és mutáns cianobaktériumokban és alga sejtekben, valamint különböző vad típusú és mutáns levelekben. Ezekkel az eredményekkel sikeresen kiterjesztettem a SANS használatát a modell organizmus zöld algára, intakt levelekre és meghatároztam a szórési profilok karakterisztikus csúcsait.

Izolált tilakoidmembránokat vizsgálva arra a következtetésre jutottam, hogy tilakoidmembránok izolálására leggyakrabban használt módszer, valamint az elektronmikroszkópiás minták hagyományos, glutáraldehides fixálása és a magas nyomású fagyasztás technikája során alkalmazott mannitolos kezelés jelentősen megváltoztatja a tilakoidmembránrendszer natív szerkezetét. Bár ezek az adatok magyarázatot nyújtanak a SANS és az EM mérésből kapott RD értékek közötti különbségekre, további részletes vizsgálatok nélkül nem lehet kizárni, hogy a SANS mérések is valamelyest torzítják az értékeket (pl. a jel erősségének feltételezett vízréteg-vastagságtól függése révén).

A membránrendszer pontosabb leírásához fontos lenne, hogy beazonosítsuk a nagy momentumtranszfernél lévő csúcsnak a pontos eredetét. Ennek segítségével képesek leszünk információt kapni az intertilakoidális és belső vizes (lumen) fázis nagyságáról ill. viselkedéséről különböző fiziko-kémiai környezetben és a fotoszintézis működése közben különböző élettani körülmények között.

Élő zöld algán és magasabbrendű növények levelein végzett SANS mérések szerepet játszottak a tilakoidmembránrendszer átszerveződése és a fontos szabályozó mechanizmusok összefüggésének felismerésében.

Első alkalommal sikerült kimutatnunk, hogy a *Monstera* leveleiben perces időskálán lezajló NPQ kapcsolatban van a reverzibilis ultrastrukturális változásokkal. További mérések folyamatban vannak annak tisztázására, hogy hasonló átszervezések jelen vannak-e más vaszkuláris növényekben, valamint vízinövényekben és algákban.

Chlamydomonas sejtekben karakterisztikus membránátrendeződéseket találtunk, amelyek a state tranzíció újszerű modelljének megalkotásához vezettek a zöld algákban. Érdeklődésre tart számot kináz és foszfataz *Arabidopsis* mutánsok SANS vizsgálata is – tisztázandó, hogy milyen kapcsolat van a state tranzíció és az ultrastrukturális változások között magasabbrendű növények leveleiben. Ezek nem csak élettani szerepük miatt fontosak, ha-

nem azért is, mert SANS méréseink fontos különbséget találtak algák és magasabbrendű növények fényindukált változásai között – ezek a megfigyelések még magyarázatra várnak.

Több más fontos kérdés és ellentmondás is tisztázásra vár. Például meg kell találni, hogyan lehet összeegyeztetni azt két megfigyelést, mely szerint egyrészt megvilágítás hatására a SANS-al mért ismétlődési távolság csökken, másrészt irodalmi elektronmikroszkópiás analízis azt mutatja, hogy a tilakoid lumen szélessége fényben megnő³.

A fényindukált membrán-átrendeződések további jellemzőinek és/vagy következményeinek feltárása érdekében érdekesnek tűnnek a SANS-al párhuzamosan végezhető egyéb mérések. Nemrégiben Stingaciu és mtsai. (2015)⁴ összefüggést találtak a fényindukált RD változás és a belső membrándinamika (a membránok spin-echoval mért rugalmassága) között. Chukhutsina és mtsai. (2015)⁵ megfigyelték, hogy megvilágítás hatására a PSI-ről fikobiliszómák (energetikailag) lecsatolódnak, ami minden valószínűség szerint magyarázza a SANS révén detektált RD változásokat. Általában elmondható, hogy a neutronszerzési technikákról bebizonyosodott, hogy hasznos eszköz a tilakoidmembrán statikus és dinamikus tulajdonságainak meghatározásához *in vivo*. SANS és más neutronszerzési technikák, kombinálva a szerkezeti és funkcionális jellemzők meghatározására alkalmas más módszerekkel, jelentősen hozzájárulhatnak önszerveződő mezoszkópikus fotoszintetikus szerkezetek struktúrájának és szerkezeti és funkcionális flexibilitásának megértéséhez és élettani szerepük tisztázásához fontos regulációs folyamatokban.

³ Kirchhoff és mtsai, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* vol. 108, p. 20248–20253, 2011.

⁴ Stingaciu és mtsai, *Sci. Rep.* vol. 6, 2016.

⁵ Chukhutsina és mtsai, *Sci. Rep.* vol. 5, p 141–193, 2015.

Publikációk

Referált folyóiratokban megjelent publikációim

- [P1] R. Ünnep, O. Zsiros, K. Solymosi, L. Kovács, P.H. Lambrev, T. Tóth, R. Schweins, D. Posselt, N. Székely, L. Rosta, G. Nagy, G. Garab, The ultrastructure and flexibility of thylakoid membranes in leaves and isolated chloroplasts as revealed by small angle neutron scattering, *Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics*, 1837 (2014) 1572-1580.
- [P2] R. Ünnep, G. Nagy, M. Markó, G. Garab, Monitoring thylakoid ultrastructural changes in vivo using small-angle neutron scattering, *PlantPhysiol. Bioch.*, 81 (2014) 197-207.
- [P3] G. Nagy, M. Szabó, R. Ünnep, G. Káli, Y. Miloslavina, P.H. Lambrev, O. Zsiros, L. Porcar, P. Timmins, L. Rosta, G. Garab, Modulation of the multilamellar membrane organization and of the chiral macrodomains in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* revealed by small-angle neutron scattering and circular dichroism spectroscopy, *Photosynth. Res.*, 111 (2012) 71-79.
- [P4] G. Nagy, R. Ünnep, O. Zsiros, R. Tokutsu, K. Takizawa, L. Porcar, L. Moyet, D. Petroustos, G. Garab, G. Finazzi, J. Minagawa, Chloroplast remodeling during state transitions in *Chlamydomonas reinhardtii* as revealed by noninvasive techniques in vivo, *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 111 (2014) 5042-5047.
- [P5] G. Nagy, L. Kovács, R. Ünnep, O. Zsiros, L. Almásy, L. Rosta, P. Timmins, J. Peters, D. Posselt, G. Garab, Kinetics of structural reorganizations in multilamellar photosynthetic membranes monitored by small-angle neutron scattering, *Eur. Phys. J. E.*, 36 (2013).
- [P6] P. Karlsson, A. Herdean, A. Beebo; S. Irigoyen, R. Ünnep, O. Zsiros, G. Nagy, G. Garab, H. Aronsson, W. Versaw and C. Spetea (2015) The Arabidopsis phosphate transporter PHT4;1 influences thylakoid pH balance and phosphate accumulation in leaves, *The Plant Journal*, 84 (2015) 99-110
- [P7] A. Herdean, E. Teardo, A. Nilsson, B. E. Pfeil, O. Johansson, R. Ünnep, G. Nagy, O. Zsiros, K. Solymosi, S. Dana, G. Garab, I. Szabó, C. Spetea and B. Lundin (2015) A voltage-dependent chloride channel fine-tunes photosynthesis in plants, *Nat. Commun.*, 7 (2016)

Az alábbi kéziratok eredményei a doktori részét képezik

- [M1] R. Ünnep, N. K. Székely, S. Paul, O. Zsiros, L. Kovács, G. Nagy, A. R. Holzwarth and G. Garab, Structural reorganization of thylakoid membranes in the *Monstera deliciosa* upon illumination revealed by small angle neutron scattering
- [M2] R. Ünnep, O. Zsiros, Zs. Hörcsik, M. Markó, A. Jajoo, J. Kohlbrecher, G. Nagy and G. Garab, Low-pH induced reversible reorganizations of chloroplast thylakoid membranes - as revealed by small-angle neutron scattering (*Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics* - revízió alatt)

Az alábbi publikációim nem képezik a doktori disszertáció részét:

- B. Szabó, R. Ünnep, K. Markó, Z. Környei, E. Méhes, A. Czirók, Inhibition of myosin II triggers morphological transition and increased nuclear motility, *Cytoskeleton*, 68 (2011) 325-339
- A. Szabó, R. Ünnep, E. Méhes, W. O. Twal, W. S. Argraves, Y. Cao, A. Czirók, Collective cell motion in endothelial monolayers, *Phys. Biol.*, 7 (2010) 046007