

B 3726

**Cianobaktériumok fénybegyűjtő
rendszerének és fotoszintetikus
membránjának tanulmányozása rezgési
spektroszkópiával**

PhD dolgozat tézisei

**Készítette:
Debreczeny Mónika**



**Témavezető:
dr. Szalontai Balázs**

**MTA Szegedi Biológiai Központ
Biofizikai Intézet
Szeged, 2001**

Bevezetés

I. A földi légkör oxigéntartalmát a fotoszintézis biztosítja. Ez a folyamat, melyben a légköri CO₂ szerves vegyületekké történő redukálása zajlik fényenergia felhasználásával, minden élőlény számára közvetlenül, vagy közvetve a táplálékláncon keresztül, alapvető jelentőségű.

A fotoszintézis folyamata a fotoszintetizáló szervezetekben, a zöldbaktériumokban, a bíborbaktériumokban és a cianobaktériumokban, valamint a magasabbrendű növényekben egyaránt membránokban zajlik. Ezeknek a fotoszintetikus membránoknak, görög eredetű idegen néven tilakoidoknak a szerveződése az említett szervezetekben nem egyforma. A fotoszintetizáló prokarióták közül a zöld- és bíborbaktériumokban a fotoszintetikus membrán szerepét a citoplazmás membrán bizonyos részei, a kromatofórok töltik be. Ezek a baktériumok anaerob fotoszintézisük során általában kénvegyületeket bontanak. A fotoszintetizáló baktériumok harmadik csoportja, a cianobaktériumok két szempontból is különböznek a bíbor- és a zöldbaktériumoktól. Egyrészt a cianobaktériumok fotoszintetikus membránja önálló sejtalkotó, melynek szerkezete, összetétele sokkal inkább hasonlít az eukarióták kloroplasztiszának tilakoidjához, másrészt a cianobaktériumok aerob, oxigéntermelő fotoszintézist folytatnak (aerob fotoautotrófok). A cianobaktériumokban a fotoszintetikus membránok kitöltik a sejt belsejét, míg a fotoszintetizáló eukariótákban ezek a membránok a kloroplasztiszokban lokalizálódnak.

A fotoszintézis folyamatát két fő részre szokás szétválasztani, a fény jelenlétében és a sötétben lejátszódó reakciókra. A fényreakciók első lépései, a fényelnyelés, és a fényenergia továbbítása a reakciócentrumokhoz hasonlóan megy végbe a zöld növényekben és a cianobaktériumokban. Különbséget a fényelnyelő fehérjekomplexek struktúrájában, elhelyezkedésében találunk. Zöld növényekben a fénybegyűjtő komplexek - az irodalom legtöbbször angol nevük (light-harvesting

complex) rövidítését, az LHC-t használja - fényelnyelésért felelős molekulái a klorofilok. A klorofilok kémiai szerkezetüket tekintve porfirinek és a ciklikus tetrapirrolok családjába tartoznak.

A cianobaktériumokban és a vörös algákban az LHCI szerepét a fikobiliszómák töltik be, melyek a tilakoid membrán külső, citoplazmás oldalán sorakoznak, és pigment fehérjékből, az ún. fikobiliproteinekből épülnek fel. Direkt módon kapcsolódnak a PSII komplexhez, amelynek a tilakoid membránon belül nincs fénybegyűjtő antenna-rendszere úgy, mint a PSI-nek.

Minden cianobaktérium fikobiliszómája legalább három fajta fikobiliproteint tartalmaz, C-fikocianint (CPC), allofikocianint (APC) és allofikocianin B-t (APB). Számos cianobaktériumban található még C-fikoeritrin (CPE) is a PC, az APC és az APB mellett (pl. *Nostoc* törzsek, *Tolypothrix tenuis*, *Synechocystis* 6701). Létezik még ezenkívül 5 más fikobiliprotein is, de ezek előfordulása sokkal ritkább, mint az említetteké.

A fikobiliproteinek kromofórai szintén tetrapirrolok, mint a klorofilok, de nem ciklikusak, hanem nyíltláncúak. A tetrapirrolok gyűrűs láncában a szénatomok konjugált rendszert alkotnak, és attól függően, hogy hány kettőskötés része a konjugációnak, illetve ez a konjugált rendszer mely gyűrűkre terjed ki, a kromofóroknak 4 fő fajtáját különböztetik meg a cianobaktériumokban és a vörös algákban. Ezek a fikourobilin (PUB), a fikoeritrobilin (PEB), a fikobiliviolin (PXB) vagy másik néven kriptoviolin (CV) és a fikocianobilin (PCB).

Cianobaktériumokban a natív fikobiliproteinek általában trimerek, hexamerek, de megfigyeltek fikocianin dodekamereket is. Ezek az aggregátumok két alegységgel (α és β) biró monomerekből épülnek fel. Mindegyikük legalább egy, kovalensen kötött bilin kromofórt hordoz. Nevezetesen a C-fikocianin α alegységén egy PCB, a β -n kettő helyezkedik el, az allofikocianin mindkét alegységén egy-egy PCB van, a C-fikoeritrin α alegységén kettő, a β -n három vagy négy kromofór is található, mindegyikük PEB. A kromofórok kapcsolódása az

apoprotein egy-egy ciszteinjéhez tioéter kötésen keresztül történik.

A fikobiliszómákban a fikobiliprotein fajták elrendeződése nem véletlenszerű. A fikoeitriinek aggregátumai (amennyiben vannak), mindig legkívül helyezkednek el. A fikoeitriinek után a fikocianinok következnek, majd az allofikocianinok, s legközelemben, direkt kapcsolatban a tilakoid membrán II-es fotoszisztémájával az allofikocianin B található. Ezt a sorrendet az egyes pigment fehérjék abszorpciós-emissziós tulajdonságai indokolják.

A hosszabb hullámszámok felé haladva éppen az abszorpciós maximumok helyének sorrendjében követik egymást a fehérjék a fikobiliszómákban. Bármelyik fikobiliproteinben történik is meg a foton elnyelése, annak energiája végső soron mindig az APC-B-re, majd onnan a PSII reakciócentrumába jut. Az a kromofőr, amelyik a fotont elnyeli, gerjesztett elektronikus állapotba kerül, s ezt a gerjesztési energiát dipól-indukált dipól kölcsönhatáson keresztül képes átadni egy megfelelően orientált, közelebbi kromofőrnak. A gerjesztési energia továbbításának ezt a módját Förster írta le először (Förster, 1965). A fotofizikai folyamatok jól meghatározott kromofőr konformációkat és protein szerkezetet feltételeznek. Bármilyen kis változás egyikben vagy másikban erősen befolyásolja a fikobiliproteinek működését.

Röntgen-krisztallográfias tanulmányokból ismert, hogy a natív fikobiliproteinekben a kromofőrok nyújtott konformációban vannak jelen, ez azonban nem az energetikailag legkedvezőbb állapot. A kromofőrok nyújtott konformációjának fenntartásához a fehérjék aktívan hozzájárulnak. Ha hődenaturáció vagy urea kezelés hatására a fehérjékben olyan szerkezetváltozás történik, hogy tovább már nem képesek fenntartani a kromofőrok nyújtott konformációját, akkor azok betekerednek, egy helikálisan csavart konformációba vesznek fel. Ez a szerkezetváltozás együtt jár a látható tartományba eső abszorpció csökkenésével és a közelebbi UV tartománybeli abszorpció növekedésével.

A fikobiliproteinek pontosan összehangolt működését biztosító fehérje és

kromofór konformációk, valamint a fehérje - kromofór kölcsönhatások tanulmányozása, tekintetbe véve a fehérjék abszorpciós tulajdonságait, rezonancia Raman spektroszkópiával a legcélravezetőbb. Csoportunk bekapcsolódása a nyíltláncú tetrapirrolok vizsgálatába azért volt jelentős, mert ezeket a molekulákat fehérjékbe ágyazottan kezdtük tanulmányozni. A fikobiliproteinek vizsgálata más, hasonló felépítésű fehérjék, nevezetesen a fitokrómok szempontjából is érdekes és hasznos volt. A fitokrómok a magasabbrendű növények fény-jelátvivői. A fényt, mint a külső környezetből érkező jelet a fitokrómok átalakítják és továbbítják, a jel pedig végül a génexpresszió szintjén fejeződik ki. A fitokrómok kromofórja szintén nyíltláncú tetrapirrolo, a fitokromobilin, mely szintén kovalens kötéssel kapcsolódik a fehérjéhez és mindössze annyiban tér el a PCB-től, hogy a 18-as szénatomhoz nem etil (C_2H_5), hanem vinil (C_2H_3) csoport kapcsolódik. A fitokrómok fényelnyelés következtében a vörösben abszorbeáló, ún. P_r formából a távoli vörösben abszorbeáló P_f formába alakulnak át. A fiziológiásan aktív forma ez az utóbbi. Nagy mennyiségben történő előállításuk meglehetősen bonyolult feladat, így a sokkal könnyebben és nagy mennyiségben előállítható fikobiliproteinek jól használható modellt jelentettek a fitokrómok tekintetében.

A fikobiliproteinek Raman spektroszkópiai vizsgálatánál a gerjesztő hullámhossznak és a minta koncentrációjának a megválasztása nem egyszerű feladat, mert ha a gerjesztő hullámhosszat közelítjük a látható tartományba eső abszorpciós sávokhoz, akkor a fluoreszcencia nagy nehézségeket okozhat a RR spektrumok fölvetelében. Ennek ellenére, főleg csoportunk munkája nyomán álltak rendelkezésre 488, illetve 514.5 nm-es hullámhosszúságú fényvel gerjesztett RR spektrumok fikocianinról, illetve allofikocianinról. A fluoreszcencia kiküszöbölésének egyik módja nagy koncentrációjú minták vizsgálata volt. Nagyon sűrű mintákban ugyanis megnő a reabszorpció valószínűsége, s ez a folyamat kioltja a fluoreszcenciát. Főlép azonban egy másik veszély, mégpedig a fotodegradáció.

Tekintettel arra, hogy a fikoeritrin látható abszorpciós maximuma rendkívül közel esik az alkalmazott látható tartománybeli gerjesztési hullámhosszakhoz, a fikoeritrinnek ehhez az elektronikus átmenetéhez kapcsolódó RR spektrumot nem sikerült fölvenni.

A másik mód a fluoreszcencia által okozott gond elkerülésére, ha a gerjesztési hullámhosszat úgy választjuk meg, hogy az az UV tartománybeli abszorpciós sávhoz essék közel. λ_T -t 363.8 nm-nek választva szintén történtek RR spektroszkópiai mérések, és ezekből, valamint a láthatóban gerjesztett rezonancia Raman spektrumokból tudjuk, hogy egyértelműen elkülöníthetők olyan spektrumtartományok, melyek érzékenyek a kromofórok konformációjára vagy fehérjekörnyezetére. A legjellemzőbb példa erre az 1642 cm^{-1} -es sáv eltolódása és az 1245 cm^{-1} -es sáv intenzitásának csökkenése, mely akkor következik be, ha a fehérjeoldat pH-ja lecsökken, és amit úgy értelmeztek, hogy a kromofór a nyújtott konformációja helyett egy helikálisan betekeredett konformációt vesz fel.

Nem volt azonban bizonyított, hogy a RR spektrumokban látható változások valóban a kromofórok konformációjának megváltozását tükrözik-e a pH csökkenése során. Egyes nézetek szerint a spektrális változásokat a kromofórok alacsony pH-n történő protonálódása is okozhatta.

II. A biológiai membránok többféle funkciót töltenek be az élő szervezetekben. Elválasztják egymástól és a környezetüktől az egyes sejteket, illetve a sejteken belül a sejtalkotókat, valamint gátat képeznek számos vegyülettel, molekulával szemben. Ehhez az elhatároló funkcióhoz azonban a környezettel való állandó kapcsolattartás funkciója társul, amely bizonyos molekuláknak a membránon keresztüli transzportját teszi lehetővé. A membránok a felületükre érkező jeleket, ingereket is továbbítják, s így a sejt alkalmazkodni tud a folytonosan változó külső körülményekhez.

Ahhoz, hogy sokrétű funkciójukat betölthessék, a biológiai membránoknak

egy fizikailag jól körülhatárolt, dinamikus membránszerkezettel kell rendelkezniük. Ehhez a szerkezethez az építőelemeket elsősorban a lipidek, a fehérjék, és amennyiben vannak, a pigmentek (mint pl. a karotinoidek) jelentik. A különböző membránok egymástól eltérő funkciói különböző membránösszetételt határoznak meg. A citoplazmás membránokban a fehérjék és a lipidek összetömegének aránya 1:1, míg pl. a fotoszintetikus membránokban ez az arány 2:1. A membránok fehérje- és lipidösszetételét azonban nemcsak a membránfunkció szabja meg, hanem befolyásolja a külső környezet is. Cianobaktériumok esetében pl. a növekedési hőmérséklet meghatározza a glicerolipidek telítettségi fokát, méghozzá oly módon, hogy minél alacsonyabb a növekedési hőmérséklet, annál nagyobb a többszörösen telítetlen zsírsavak relatív aránya.

A hatékony membránfunkcióhoz elengedhetetlen, hogy a membránalkotók rotációs, translációs mozgása biztosított legyen. Ez csak a membránok folyadékkristályos, vagy ahhoz igen közeli fázisállapotában lehetséges. Modellmembránokon végzett kísérletekből tudjuk, hogy a gél→folyadékkristályos fázisátmenet függ a lipidek telítettségétől, és hogy a fiziológiai aktivitás jelentősen megváltozik a fázistranzíciós hőmérsékleten.

A Fourier-transzformációs infravörös (FTIR) spektroszkópia különösen alkalmas arra, hogy lipidek konformációs rendjét, pontosabban a zsírsavláncok rendezettségének alakulását a hőmérséklet függvényében nyomon kövesse. Ehhez, az EPR spektroszkópiától eltérően, nem szükséges külső jelölő molekula bevitele a vizsgált rendszerbe, ezért annak perturbáló hatásával nem kell számolni. Nagy előnye ezen kívül ennek a módszernek, hogy a lipidekkel egyidőben a fehérjék másodlagos szerkezetének alakulása is vizsgálható, mert az ezeket a fehérje konformációkat jellemző amid sávok az FTIR spektrumokban jól elkülönülten, a zsírsavláncok CH_2 csoportjainak karakterisztikus rezgési frekvenciáitól távol helyezkednek el.

Biológiai membránok hőmérsékletfüggő dinamikájának tanulmányozására

ezért a FTIR spektroszkópiát választottuk. Méréseim során arra kerestem a választ, miképpen hatnak a környezeti körülmények, például a növekedési hőmérséklet változása, egyes nehézfém ionok (réz, cink, ólom, nikkel, kadmium) jelenléte a membránok szerkezetére. Összhangban állnak-e az FTIR spektrumokból levonható következtetések azokkal, melyek a membránösszetétel biokémiai módszerekkel történő meghatározásából adódnak?

Célkitűzések

Kutatómunkámhoz a következő célokat tűztem ki:

(1) olyan kísérleti körülmények beállítását, amelyek mellett Raman spektroszkópiával vizsgálni tudjuk a fikobiliproteinek szerkezetét. A legnagyobb problémát a pigmentek fluoreszcenciája jelentette. A fluoreszcencia sugárzás okozta háttérrel a Raman spektrumokból egy új módszer, a felület-erősített rezonancia Raman spektroszkópia segítségével kívántam kiküszöbölni.

(2) SERR spektrumok segítségével bizonyítani kívántam, hogy a fehérjeoldat pH-jának csökkenése a kromofórok konformációjának megváltozásához vezet. Ehhez:

- a) semleges pH-n pronáz enzim kezeléssel a pigment fehérje szerkezetét szándékoztam megbontani, illetve
- b) pH-denaturációval kívántam megváltoztatni a teljes pigment szerkezetét.

A megváltozott fehérje - kromofór kölcsönhatásokat SERR spektrumok fölvételével terveztem nyomon követni.

(3) A kromofórok konformációra érzékenynek bizonyuló sávjait össze kívántam hasonlítani a fitokrómok spektrumának megfelelő sávjaival és amennyiben lehetséges, asszignációt végezni.

(4) Célul tűztem ki a korábban egyáltalán nem vizsgált fikoeitritin molekula tanulmányozását, melynek kromofórjában a konjugált kettős kötések rendszere nem terjed ki a negyedik pirrol gyűrűre úgy, mint a fikocianin és allofikocianin

esetében. Azt igyekeztem kideríteni, hogy a kromofórok kémiai szerkezete és fehérje környezete közötti különbséget az általam használt spektroszkópiai módszerekkel hogyan tudom azonosítani.

(5) Célul tűztem ki a *Synechocystis PCC 6803* kultúrákból izolált fotoszintetikus membránok esetében annak földerítését, hogyan alkalmazkodik a membránszerkezet a sejtek növekedési hőmérsékletéhez. Kíváncsi voltam arra, hogy az FTIR spektrumok alapján kapott membránfluiditás változás magyarázható-e a membránok zsírsavösszetételének változásával, illetve annak megváltoztatásával, amit genetikailag módosított, mutáns *Synechocystis PCC 6805* törzsek használata tesz lehetővé.

(6) Célom volt annak vizsgálata, hogy a nevelési hőmérséklet és a membránfluiditás közti kapcsolat fennáll-e más, a természetben előforduló cianobaktérium törzsek esetében is. Ennek eldöntésére *Spirulina platensis* és *Cylindrospermopsis raciborskii* sejtekből izolált membránokat vizsgáltam meg.

(7) A növekedési hőmérséklet megváltozásán kívül egy másik fajta környezeti stressz, a nehézfém szennyezés membránszerkezetre gyakorolt hatását is vizsgálni kívántam. Borsóból izolált tilakoid membránt használva mintának arra kerestem a választ, hogy bizonyos nehézfémek, a réz, a cink, a kadmium, az ólom és a nikkel a membránszerkezetet melyik összetevőjén, a lipideken, a fehérjéken, vagy mindkettőn keresztül fejtik ki károsító hatásukat.

Eredmények

Dolgozatomban a cianobaktériumok fénybegyűjtő fehérjéit, s magát a fotoszintetikus membránt vizsgáltam abból a szempontból, hogy milyen is az a szerkezet, amely a rendkívül sokrétű életani folyamatoknak megfelelő hátteret biztosít, és milyen változások zajlanak le benne különböző környezeti hatásokra.

(1) Beállítottam egy, az intézetünkben addig nem alkalmazott mérési technikát, a felület-erősített rezonancia Raman spektroszkópiát (SERR).

Megállapítottam, hogy ez a módszer alkalmas fikobiliproteinek tanulmányozására, mert a fehérjék a felület-erősítés mechanizmusáért felelős fémfelülethez történő kötés során nem veszítik el konformációjukat, nem denaturálódnak, és nem koagulálnak az általam alkalmazott ezüst szol szemcséivel. Ráműtattam arra, hogy a fémfelülethez történő adszorbeáltság után a fehérje szerkezete már nem módosítható, s így hozzájárultam a fitokrómok elektródán, illetve szolon felvett SERR spektrumainak értelmezéséhez.

(2) Bebizonyítottam, hogy a fehérjeoldat pH-jának csökkenése a megváltozott kromofór-fehérje kölcsönhatások miatt a kromofórok konformációjának megváltozását eredményezi. Ehhez először semleges pH-n egy pronáz nevű proteináz enzimmel a pigmentek fehérje-szerkezetét módosítottam, majd a teljes pigment szerkezetet (a kromofórt és a fehérjét egyaránt) változtattam meg alacsony pH-n bekövetkező fehérje denaturációval. A megváltozott kromofór-fehérje kölcsönhatásokat abszorpció és SERR spektrumok fölvetélével követtem nyomon. Az emésztett és a pH-denaturált fehérjékről fölvetett rezgési spektrumok konformáció érzékeny sávjainak hasonló viselkedése, pl. a natív fehérjékre jellemző 1640-1642 cm^{-1} -es csúcs eltolódása, az 1600 cm^{-1} -es váll eltűnése mind az emésztett, mind az alacsony (<2.4) pH-jú fehérjék esetében azt bizonyította, hogy protonálódás nem történik. Ezt az állítást alátámasztja az a tény is, hogy a pH csökkentésével denaturált PC és ACP SERR spektrumaiban nem jelent meg 3 olyan sáv (1375, 1404 és 1482 cm^{-1} -nél), melyek elméleti számítások szerint a D gyűrű protonálódását jelzik.

(3) A kromofórok konformációra érzékenyek bizonyult sávjait összevettem egy olyan fehérjé, a fitokróm spektrumának megfelelő sávjaival, melynek mind a kromofór, mind a fehérje szerkezete hasonló a fikobiliproteinekéhez. Az összehasonlítás eredményeképpen ezeknek a fehérjéknek a spektrumában az 1590-1599 cm^{-1} -es sávot a kromofórok C és D gyűrűjét összekötő metinhíd *ant* konformációjához rendeltem. Ez a sáv különösen fontos

jelölje a fikocianobilin, illetve fitokromobilin kromofórok konformációs állapotának. Eltűnése mind a RR, mind a SERR spektrumokból a fitokrómok fotoizomerizációját, illetve a PC és az APC kromofórajainak betekeredését jelzi.

(4) Fikoeritrinről látható fényel gerjesztett SERR spektrumot vettem fel. Erről a fehérjéről láthatóan gerjesztett rezgési spektrumot korábban nem sikerült fölvenni, mert a fikoeritobilin konjugált kettős kötés rendszere kisebb, mint a fikocianobiliné, s ezért a látható tartományban működő lézerek gerjesztő hullámhosszai olyan fluoreszcencia sugárzást váltanak ki, amely elnyomja a RR sávokat.

A fikoeritobilin és a fikocianobilin kémiai szerkezetbeli különbségének azonosítása a Raman spektrumokban nem megoldott, az UV RR spektrumokban csak két sáv asszignációja történt meg (Szalontai és mts. 1994). A sávok azonosítását megnehezíti, hogy bár a kromofór-fehérje kölcsönhatásokat hasonló módon változtattam, mint a PC (és az APC) esetében, eltérést csak a natív és az 1 M NaClO₄-tal monomerizált fehérje spektrumaiban találtam. További sávok azonosítása érdekében emésztett PE és alacsony pH-jú fehérjeoldatok FTIRaman spektrumait tervezem felvenni.

(5) A fotoszintetikus membránok vizsgálatára alkalmasabb a RR sepektroszkópiánál az FTIR spektroszkópia, mert ez utóbbi nem szelektíven ad információt egyes membránalkotókról, hanem egyszerre mutatja a membránok fő összetevőinek szerkezetében bekövetkezett változásokat.

A fehérjékre és a lipidekre jellemző sávok jól elkülönülten vannak jelen az FTIR spektrumokban. A fehérjék másodlagos szerkezetét leíró legintenzívebb amid sávok főként a spektrum 1300 - 1800 cm⁻¹ tartományában találhatóak, míg a lipideket, illetve azok zsírsavláncait jellemző C-H rezgések a 2800 - 3100 cm⁻¹ tartományban. Ez utóbbi tartomány 2850 cm⁻¹-es és 2920 cm⁻¹-es sávjai, melyek a CH₂ csoportok szimmetrikus, illetve antiszimmetrikus nyújtási rezgéseikhez tartoznak, a lipidek fázisstranzíciója során ugrásszerűen eltolódnak a magasabb hullámszámok

felé.

Bizonyítottam, hogy biológiai membránok fázistranzíciójának vizsgálatával jellemezni lehet a membránok rendezettségét, figyelemmel lehet kísérni a környezeti hatásokat kísérő szerkezeti változásokat, melyek kihatnak a membránfehérjék és lipidek rendezettségére is.

Synechocystis PCC 6803, *Spirulina platensis* és *Cylindrospermopsis raciborskii* cianobaktériumok esetében azt vizsgáltam, hogy a növekedési hőmérséklet, mint külső környezeti tényező, milyen membránszerkezet változásokat idéz elő. Ezeket a változásokat FTIR spektroszkópia segítségével analizáltam. Megállapítottam, hogy az alacsonyabb hőmérsékleten nőtt *Synechocystis PCC 6803* és *Spirulina platensis* kulturákból izolált fotoszintetikus membránok lipid fázisa kevésbé rendezett, mint a magasabb hőmérsékleten nőtt sejtekből izolált tilakoidoké. Ennek a két törzsnak a tilakoidjait egymással is összehasonlítottam, és azt találtam, hogy az azonos körülmények között nevelt *Synechocystis PCC 6803* és *Spirulina platensis* sejtek közül, az utóbbiakban rendezetlenebbek a lipidek (tilakoid membránok). Eredményeim bizonyítják, hogy a membránösszetétel, nevezetesen a zsírsavak biokémiai módszerekkel meghatározott változása valóban az eltérő növekedési hőmérséklet által megkívánt membrándinamika kialakítását szolgálja.

(6) A telítetlen zsírsavak membránszerkezetet befolyásoló hőmérséklet adaptációban játszott szerepét olyan genetikailag módosított *Synechocystis PCC 6803* sejtekben is vizsgáltam, melyek inszerciós mutagenézis következtében képtelenek bizonyos polién zsírsavak szintézisére. Bizonyítottam, hogy minél többféle kétszeresen és háromszorosan telítetlen zsírsav szintézisére képesek a sejtek, annál könnyebben tudják membránjaik homeosztázisát a megváltozott nevelési hőmérsékleten beállítani. Azok a sejtek, melyek egyáltalán nem tartalmaznak többszörösen telítetlen zsírsavakat, csak nagyon nehezen képesek fenntartani membránjaik homeosztázisát, mely a biológiai funkciók ellátásához

szükséges.

Megállapítottam, hogy a 25, 30 illetve 35 °C-on nevelt, polién zsírsavakat nem tartalmazó sejtek (amelyek tehát nem különböznek zsírsavösszetételükben) eltérő hőmérséklet adaptációt mutatnak. Ez arra hívja fel a figyelmet, hogy a sejtek hőmérséklet adaptációjának vizsgálatakor nem csak a zsírsavösszetétel változására kell figyelemmel lenni, hanem vizsgálni kell más membránösszetevők membránszerkezetre gyakorolt hatását is.

(7) Kimutattam, hogy a *Cylindrospermopsis raciborskii* sejtek hőmérséklet adaptációját nem lehetséges pusztán a zsírsavösszetétel változásával magyarázni. Ebből arra következtettem, hogy az ebből a törzsből izolált membránok rendezettségét nagy mértékben befolyásolják olyan más sejtalkotók, mint pl. a karotinoidok. Munkatársaim legújabb kísérleti eredményei a tilakoid és citoplazmás membránok karotinoid összetételére vonatkozóan igazolják ezt a feltételezésemet. Alacsonyabb növekedési hőmérsékleteken megnő azoknak a karotinoidoknak a relatív aránya, melyek a membránstruktúrát rendezettebbé képesek tenni.

(8) Borsólevélből izolált tilakoidon azt vizsgáltam, hogy bizonyos nehézfémek, a kadmium, a nikkel, a réz, a cink és az ólom milyen módon képesek hatni a membrán lipidjeinek és fehérjeinek konformációjára abban az esetben, ha beépülésük a membránba a tilakoidok izolálása után történik.

Az FTIR spektrumokból megállapítottam, hogy a tilakoid membránok lipid-fázisának viselkedését egyik nehézfém jelenléte sem befolyásolta szignifikánsan. Az amid sávok kiértékelése alapján a vizsgált nehézfémeket két csoportba soroltam: i) a Cd és a Ni a fehérjék szerkezetét nem módosította. ii) A Cu, a Zn és az Pb oly módon hatott kölcsön a membránfehérjékkel, hogy akadályozták a hődenaturáció hatására létrejövő aggregálódást. A méréseket PS II partikulumokon megisméltelve megállapítottam azt, hogy az Pb a PS II partikulumok hődenaturáció okozta aggregációját nem gátolta, míg a többi ion kezelés hatása megegyezett az izolált membránoknál kapott eredményekkel.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények jegyzéke

Debreczeny, M., Gombos, Z., Csizmadia, V., Várkonyi, Zs., Szalontai, B.:
Chromophore conformational analysis in phycocyanin and in related chromopeptides by surface enhanced Raman spectroscopy
Biochem. and Biophys. Res. Comm., (1989) 159, No. 3, 1227-1232.

Debreczeny, M., Gombos, Z., Szalontai, B.:
Surface-enhanced Resonance Raman spectra of Phycocyanin and Allophycocyanin
Spectroscopy of Biological Molecules edited by R. E. Hester and R. B. Girling,
The Royal Society of Chemistry 1991, printed in Great Britain

Debreczeny, M., Gombos, Z., and Szalontai, B.:
Surface-enhanced resonance Raman spectroscopy of phycocyanin and allophycocyanin
Eur. Biophys. J., (1992) 21, 193-198.

Debreczeny, M., Szalontai, B., Gombos, Z., Zsíros, O., Tasaka, Y., Murata, N.:
Elimination of polyunsaturated lipids affects the structure of photosynthetic membranes
P. Mathis (ed.), *Photosynthesis: from light to Biosphere*, Vol. III, 409-412.
1995 Kluwer Academic Publishers, printed in the Netherlands

Kóta, Z., Debreczeny, M., Szalontai, B.:
Separable contribution of ordered and disordered lipid fatty acyl chain segment to νCH_2 band in model and biological membrane. A Fourier Transform

Infrared Spectroscopical Study

Biospectroscopy (1999) 5, 169-168.

Szalontai, B. Horváth, L.I., Debreczeny, M., Droppa, M., Horváth, G.:

**Molecular rearrangement of thylakoids after heavy metal poisoning as seen by
Fourier transform infrared (FTIR) and electron spin resonance (ESR)
spectroscopies.**

Photosynthesis Research (1999) 61, 241-252.

***Az értekezés témájához nem kapcsolódó
közlemények***

Tsvetkova, N., Mohanty, P., Moon, B.Y., Debreczeny, M., Murata, N.

**The irreversible photoinhibition of photosystem II by strong light depends on
temperature and on the extent of saturation of fatty acids in membrane
lipids**

Közlésre beküldve