


Egyetemi doktori disszertáció

**FOTOSZINTETIKUS MEMBRÁNOK SZERKEZETÉNEK VIZSGÁLATA
SPIN JELZŐ ESR MÓDSZERREL**



Balogh Nándor

Témavezető: Dr. Horváth László

Magyar Tudományos Akadémia, Szegedi Biológiai Központ

BIOFIZIKAI INTÉZET

SZEGED

1994.

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK ÉS SZIMBÓLUMOK JEGYZÉKE	1
1. BEVEZETÉS	4
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
2.1. <i>Mozgások a membránban</i>	6
2.2. <i>Tilakoid membránok</i>	9
2.3. <i>A spin jelző ESR spektroszkópia</i>	22
3. CÉLKITÚZÉSEK	31
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	32
5. EREDMÉNYEK	40
5.1. <i>Hőmérsékletadaptáció</i>	40
5.2. <i>Zsírsavtelítetlenség megváltoztatása hidrogénezéssel</i>	49
5.3. <i>Izoterm körülmények között fellépő adaptív változások</i>	54
6. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	58
7. ÖSSZEFOGLALÁS	66
8. IRODALOMJEGYZÉK	68
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	

RÖVIDÍTÉSEK ÉS SZIMBÓLUMOK JEGYZÉKE

DGDG	digalaktozil-diacilglicerol
MGDG	monogalaktozil-diacilglicerol
PC	foszfatidil-kolin
PG	foszfatidil-glicerol
SQDG	szulfoquinovozil-diacilglicerol
16:0	palmitinsav
16:1	palmitoleilsav
16:2	hexadekadiénsav
17:0	heptadekánsav
18:0	sztearinsav
18:1	olajsav
18:2	linolsav
18:3	linolénsav
18:4	oktadekatetraénsav
ANS	8-anilino-1-naftalin-szulfonsav
ATP	adenozin-trinukleotid-foszfát
LHC I	első fénybegyűjtő komplex
LHC II	második fénybegyűjtő komplex
PCC	(<i>angol</i>) Pasteur Culture Collection
PQ	plasztokinon
PS I	első fotokémiai rendszer
PS II	második fotokémiai rendszer

ESR	elektron spin rezonancia
HEPES	N-(2-hidroxietyl)piperazin-N'-(2-etán-szulfonsav)
SDS	Na-dodecilszulfát
<i>sn</i> -1	glicerinváz 1-es pozíciója
<i>sn</i> -2	glicerinváz 2-es pozíciója
TES	N-tris(hidroximetil)metil-2-aminoetán-szulfonsav
14-SASL	spin jelzett sztearinsav
14-PGSL	spin jelzett foszfatidil-glicerol
12-MGDGSL	spin jelzett monogalaktozil-diacilglicerol
D_R	rotációs diffúziós állandó
D_T	laterális diffúziós állandó
\mathcal{H}	(spin-) Hamilton operátor
β	Bohr magneton
\mathbf{B}	mágneses indukció vektor
\mathbf{g}	(Landé-féle) g-tenzor
g_{xx}, g_{yy}, g_{zz}	g-tenzor főértékei
\mathbf{S}	elektronspin operátor
\mathbf{I}	magspin operátor
\mathbf{A}	hiperfinom csatolási tenzor
A_{xx}, A_{yy}, A_{zz}	A-tenzor főértékei
ω, φ	polárszögek
τ	rotációs korrelációs idő
t	idő
$G(\tau)$	korrelációs függvény

m	magspin
w(m)	csúcs-csúcs vonalszélesség
S	rendparaméter
P(γ)	Boltzman-féle valószínűségi irányeloszlás
k	polaritás korrekciós faktor
L	lipid koncentráció
L*	spin jelzett lipid koncentráció
B _i	fehérje felszíni hely
K	lipid relatív asszociációs állandója
N	fehérje felszíni helyek száma
P	fehérje koncentráció
L/P	lipid/fehérje arány
n _f [*] /n _b [*]	spin jelzett fluid/immobilis lipid arány
f	immobilis lipid hányad
I _{C=C}	zsírsavlánc kettőskötés index

1. BEVEZETÉS

A növényeket sokféle környezeti hatás éri. Minden környezeti tényezőnek van egy maximum és egy minimum értéke, amelyen túl az adott növény már nem képes életben maradni. Ezek a határok nem feltétlenül esnek egybe a károsodás küszöbértékeivel. Szubletális körülmények szintén lehetnek károsak, különösen akkor, ha ezek több napon keresztül fennállnak, vagy ismétlődnek. Az egyik legfontosabb ilyen környezeti tényező a hőmérséklet. A különböző fajok és a fajokon belüli genotípusok termotoleranciája nagymértékben különbözhet és megfelel annak a környezetnek, ahol az adott genotípus kifejlődött. A növények saját hőmérsékletüket nem tudják állandó értéken tartani, következésképpen ha életben akarnak maradni, minden eszközzel alkalmazkodniuk kell környezetükhöz.

A növények különböző hőmérsékletekhez való alkalmazkodásának három szintjét különböztetjük meg: (i) a rövidtávú akklimatizációt, ami akkor jelentkezik, amikor egy növény hirtelen magas vagy alacsony hőmérsékletnek van kitéve rövid ideig; (ii) a hosszútávú akklimatizációt, amikor a különböző hőmérsékleteken nőtt genotípusnak új, termotoleranciában különböző fenotípusai jönnek létre; (iii) és a genomiális adaptációt, mely során a hőmérsékleti körülmények hatására új genotípusok alakulnak ki (*Davison, 1991*).

Számos kísérlet igazolja, hogy a növényi életfolyamatok közül a fotoszintézis, egy tilakoid membránhoz kötött funkció, a legérzékenyebb a szervezetet ért hőmérsékleti stresszre (*Berry és Björkman, 1980*). Ebből következően a növények hőstabilitásában elsődleges szerep jut a fotoszintetikus membrán stabilitásának.

Viszonylag kevés adat áll rendelkezésre a különféle perturbációk okozta változásokról a tilakoid membránban a lipid mozgékonyág és lipid-fehérje kölcsönhatás területén. Ezért időszerűnek tűnik a hőmérsékleti beavatkozásokra adott válaszok molekuláris szintű vizsgálata.

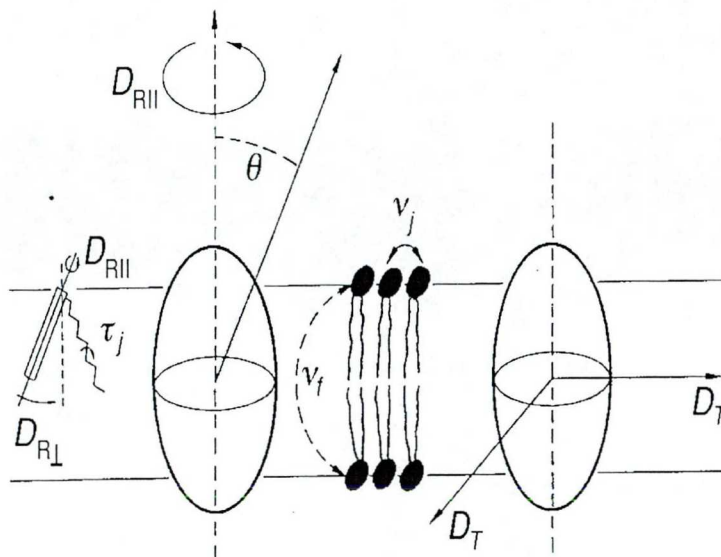
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Mozgások a membránban

Membrándinamika. A membrán alapvető szerkezeti egysége egy 4-5 nm vastagságú kettősréteg lemez, mely poláros és neutrális lipidek összességéből áll. A másik fontos alkotóelem, a fehérjék vagy belesüllyednek a membránba, vagy a felszínhez tapadnak. Előbbieket integráns, utóbbiakat perifériális fehérjéknek nevezzük. A biológiai membránokban lévő poláros lipidek különbözősége fejcsoportjuk, glicerín vázuk és zsírsavlánc összetételük eltérésében nyilvánul meg. Általánosságban a lipid kettősréteg egy jellemző, biológiai és fizikokémiai paraméterekkel rendelkező vektor mátrixot nyújt, mely a membránok változatos szerepéhez megfelelő környezetet biztosít.

A membránokról alkotott fenti kép statikus. Jól ismert azonban, hogy a legtöbb membrán működéséhez a benne található fehérjék és lipidek mozgása szükséges. Ez utóbbi követelményt a leghíresebb membrán modell, a „folyadékmozaik” modell írja le a legpontosabban, melyben az alkotóelemek szabadon mozoghatnak (*Singer és Nicolson, 1972*). A modell azonban napjainkban is folyamatos fejlődésen megy keresztül. A következőkben azokat az új felismeréseket vesszük sorra, melyek nem értelmezhetők az eredeti elképzelésekkel (*Chapman és Hayward, 1985*). A biomembrán alkotóinak rendezettsége nem egyforma (*Henderson és Unwin, 1975*). Számos biológiai membránban az integrális fehérjék nem diffundálhatnak szabadon a nagy fehérje/lipid arány, a fehérje-fehérje aggregáció, a lipid domén képződés vagy a sejt vázszerkezeti fehérjéivel való

kölcsönhatás miatt (Taylor és mtsai, 1984; Horváth és mtsai 1990). Egyes esetekben a lipidek tekintélyes hányada gél fázisban van (Jackson és Sturtevant, 1978). A biológiai membránok egyértelmű funkcionális anizotrópiát mutatnak, mely általában szerkezeti anizotrópiával (összetétel, lipid-fehérje arány) párosul. A jelenségek megértéséhez vegyük sorra a membránban zajló molekuláris mozgásokat (1. ábra).



1. ábra. Molekuláris mozgások biológiai membránokban. A lipid molekulák forognak a hossz tengelyük mentén. A forgás gyorsaságát a rotációs diffúziós állandóval, D_{RII} -sal jellemezzük. A lipidek hossz tengelyükre merőleges mozgást (D_{RI}) is végeznek a membránsík belsejében. A flexibilis zsírsavláncok $1/\tau_j$ frekvenciával transz-gauche izomerizáción mennek keresztül az egyes C-C kötések körül. A lipidek v_j kicserélődési frekvenciával laterálisan diffundálnak a membrán síkjában. A szemben lévő lipid rétegek közötti átugrási ráta, v_f , nagyon lassú tiszta, egykomponensű kettősrétegekben, de egyes fehérjék felgyorsíthatják ezt a folyamatot biomembránokban. Az integrális fehérjék a membrán síkjára merőleges tengely mentén forognak, rotációs diffúziós állandó D_{RI} és laterálisan mozognak a membránsíkban D_T . (Marsh, 1988)

A membránalkotók mozgását osztályozhatjuk aszerint, hogy a molekula egészként végzi a mozgást, vagy a molekulán belüli mozgásról van szó. A lipid molekulák forognak a hossz tengelyük mentén, laterálisan mozognak a kettősrétegben, ugrálnak az egyik rétegből a másikba, ún. „flip-flop” mozgást

végezve. A lipid zsírsavláncok flexibilisek, transz-*gauche* izomerizáción mennek keresztül. A fehérjék ugyancsak forognak és laterálisan mozognak a kettősrétegben, működésük közben konformáció változásokon mennek keresztül (Knowles és Marsh, 1991).

A membránok fizikai állapotának jellemzésekor legtöbbször a nehezen definiálható membrán fluiditásáról szokás beszélni. Tágabb értelemben a fluiditás a viszkozitás reciprokaként értelmezhető, de ez a megközelítés nem tökéletes. A biomembránokhoz nem rendelhető makroszkópikus viszkozitás érték úgy, mint a valódi oldatokhoz, ezért fluiditási érték sem. A membrán speciális szerveződéséből, a komponensek inhomogén eloszlásából eredően célszerűbb a kétdimenziós oldat mikroviszkozitásáról és annak reciprokaként értelmezett fluiditásról beszélni (Shinitzky és Barenholz, 1978). Használatos a membrán fluiditásnak olyan szűkebb értelmezése, mely szerint a fluiditás a kettősréteg szerkezetbe rendeződő membránlipidek zsírsavláncainak fizikai állapotával, rendezettségével kapcsolatos. További nehézségekbe ütközünk, ha valamely konkrét fizikai eljárás alapján alapuló paraméterrel igyekszünk számértéket rendelni a membránfluiditáshoz. Egy adott, a fluiditás meghatározására szolgáló eljárással mindig egy speciális, az alkalmazott sonda fizikai és kémiai tulajdonságaitól függő környezetről származnak információink. Ebben a dolgozatban spin jelző ESR technológiát alkalmazunk (2.3. fejezet) a fluiditás számszerű leírására. A lipid molekulák forgásának sebességét a rotációs korrelációs idővel, rendezettségét pedig orientációs rendparaméterrel jellemezzük.

2.2. Tilakoid membránok

A tilakoid összetétele és hőstabilitása. A fotoszintetikus oxigén fejlődés általánosan előforduló biológiai folyamat az eukarióta algáknál, a magasabbrendű növényeknél és a fotoszintetizáló prokariótáknál, melyek egyik csoportját a cianobaktériumok alkotják. A fénybegyűjtés és a fotoszintetikus elektrontranszport a tilakoid membránokban zajlik, melyek a fotoszintetizáló szervezetek membránjainak 60-80%-át teszik ki, így az ezeket alkotó fehérjék és lipidek a természet leggyakrabban előforduló szerves összetevői.

A magasabbrendű növények tilakoid membránjának fehérje összetétele meglehetősen bonyolult. Négy, több alegységből álló fehérje komplex végzi a fényenergia kémiai energiává történő átalakítását, az első fotokémiai rendszer (PS I), a második fotokémiai rendszer (PS II) a citokróm *b₆-f* és az ATP szintetáz. A fotokémiai rendszereket 10-20 darab fénybegyűjtő (LHC I és LHC II) komplex veszi körül a magasabb rendű növényekben (*Murphy, 1986*). A tilakoidok lipidösszetétele nagyon sajátos. Az állatok, baktériumok és a növények nem fotoszintetikus membránjainak fő összetevői a foszfolipidek. A tilakoid membránok lipidjeinek zömét azonban két galaktolipid, a monogalaktoszil-diacilglicerol (MGDG) és a digalaktoszil-diacilglicerol (DGDG) alkotják. Az MGDG, az összes tilakoid lipid 50%-a, önmagában nem képes kettősréteget alkotni. Ez a tény meglepő, mivel funkcióinak ellátásához a membránnak kettősréteg struktúrába kell szerveződnie. A fentieken túl a tilakoidok tartalmazznak még szulfoquinovozil-diacilglicerolt (SQDG) és foszfatidil-glicerolt (PG). Felmerül a kérdés: (i) mi a szerepe a tilakoidok sajátos lipidösszetételének, (ii) hogyan vesznek részt az egyes lipidek a

fotoszintetikus membrán hőmérséklet adaptációjában, (iii) van-e szerepük a termostabilitásban? Ezekre a kérdésekre számos kutatócsoport már régóta keresi a választ (*Quinn, 1989*).

Általánosan elfogadott, hogy a tilakoid lipidek magas telítetlenségi foka fontos tényezője a fotoszintézis alacsony hőmérsékleti stabilitásának. A növények számára a növekedési hőmérsékletüktől eltérő hőmérsékletek stresszt jelentenek. A szélsőséges hőhatások a növények pusztulásához is vezethetnek. A fagykárosodás kiváltó okát először Lyons és Raison próbálták meg a sejt membránjaiban bekövetkező változásokkal magyarázni (*Lyons, 1973; Raison, 1973*). Mindkét kutató azt állította, hogy a hidegkárosodás a sejt membránjainak folyadékkristályosból gél fázisba történő átalakulásával jár együtt. A gél fázisú membrán hibái miatt megnő annak permeabilitása az ionok és molekulák számára.

Lyons eredeti elméletének jelenlegi, kloroplasztisz membránokra vonatkozó verzióját Murata és munkatársai alkották meg (*Murata és Yamaya, 1984*). Elméletük szerint a fagyérzékeny növények tilakoidjában a PG magas olvadáspontú zsírsav specieszei okozzák a gél fázis kialakulását alacsony hőmérsékleteken. Számos kutatócsoport talált pozitív korrelációt a fagyérzékenység és a magas olvadáspontú zsírsavakat tartalmazó lipidek mennyisége között. Mások azonban ezt az összefüggést nem tudták igazolni, és megkérdőjelezték az elmélet általánosságát (*Wilson és Crawford, 1974; Kenrick és Bishop, 1986*). Egyes vizsgálatok során nem találtak kapcsolatot a hidegstressz és a tilakoidból extrahált poláros lipid frakció fázisállapota között (*Low és mtsai, 1984*). Egy viszonylag friss összefoglaló tanulmányban Somerville és Browse egyenesen arra a következtetésre jutottak, hogy a lipid telítetlenség nem indokolhatja a növények természetben

előforduló hidegérzékenységet (*Somerville és Browse, 1991*). Egy sokkal közvetlenebb kapcsolatot mutattak ki a gél fázis kialakulása és a sejt pusztulása között cianobaktériumokban (lásd a cianobaktériumokról szóló fejezetet, 16. oldal).

A tilakoid lipidek zsírsavalkilláncainak mozgékonyága alacsony hőmérsékletek hatására csökken. Ez a mobilis elektronszállító plasztokinon (PQ) diffúzióját a membránban akadályozhatja, ami a fotoszintetikus elektrontranszport működését gátolja (*Oquist, 1982*). Gombos és munkatársai viszont bizonyítékot találtak arra vonatkozóan, hogy a plasztokinonok két fotokémiai rendszer közötti diffúziójának sebessége a mátrix-lipidek mikroviszkozitásától független abban a fluiditás tartományban, amely a fotoszintetikus szervezetek környezeti hőmérsékletének valószínűsíthető ingadozása alapján elképzelhető (*Gombos és mtsai, 1988*).

A növények adaptív válasza alacsony hőmérsékleteken a membránok mikroviszkozitását csökkenti (a zsírsavtelítetlenség növelésével), ellensúlyozva az alacsony hőmérsékletek által okozott fluiditás csökkenést (*Raison, 1973*). Számos kísérlet támasztja alá ennek az állításnak a helyességét, azonban olyan kísérleti eredmények is megjelentek, melyek nem találtak összefüggést a zsírsavtelítetlenség és az aktuális túlélési hőmérséklet között (*Hellergen és mtsai, 1984*).

A membránokban hőmérsékletváltozás hatására bekövetkezhetnek más változások is. Módosulhat a foszfolipid összetétel (*Horváth és mtsai, 1981*), galaktolipid összetétel (*Vigh és mtsai, 1985a*), a zsírsavak pozícionális eloszlása (*Watanabe és mtsai, 1981*) és változhat a membrán egyéb összetevőinek aránya is (*Lynch és Steponkus, 1987*).

A tilakoid membránok magas hőmérséklet hatására bekövetkező változásairól viszonylag kevés adat áll rendelkezésre. Bizonyítottak látszik, hogy az MGDG telítetlensége fontos szerepet játszik a tilakoid hőérzékenységében. 40-50 °C-os hőmérsékleti stressz okozhatja a klorofill-protein komplexek irreverzibilis denaturációját (*Cramer és mtsai, 1981*), a fotoszintetikus oxigén fejlődés, a PS II aktivitás és a fotofoszforiláció csökkenését (*Thomas és mtsai, 1986a*). Magas hőmérséklet kiválthatja a tilakoid gránum régió szétesését, a lipidek fázisszeparációját és az invertált hexagonális fázis kialakulását (*Gounaris és mtsai, 1983*). A tilakoid lipidek *in vivo* hidrogénezésével bizonyították a zsírsavtelítettség szerepét a PS II aktivitás védelmében és az invertált hexagonális fázis kialakulása lehetőségének csökkentésében magas hőmérsékleteken (*Vigh és mtsai, 1989; Thomas és mtsai, 1986b*). A zsírsavtelítettség adaptív szerepét bizonyítja az is, hogy az *Arabidopsis thaliana* telítetlen zsírsavban hiányos mutáns változatainak hőstabilitása megnőtt a telítetlenebb vad típushoz képest (*Kunst és mtsai, 1989*).

A tilakoid membrán fluiditásának módosítása. Ismeretes, hogy néhány kutatócsoport megkísérelte *in vivo* megváltoztatni a tilakoid fluiditását. Árpa hajtások lipid telítetlensége jelentősen csökkent egy piridazinon származék hatására. A zsírsavtelítettség növekedése a fotoszintetikus aktivitás csökkenését okozta. Az izolált lipidekből készített liposzómákon mért fluiditás azonban nem változott számottevően (*Laskay és Lehoczki, 1986*). A Vigh László és Joó Ferenc által kidolgozott vízdékony, eltávolítható katalizátorral végezhető homogén katalitikus hidrogénezés lehetővé tette a biológiai membránok *in vitro* és *in vivo* hidrogénezését (*Vigh és Joó, 1983*). A borsó tilakoidokon végzett kísérletek azt

mutatták, hogy a tilakoid membrán 10%-os hidrogénezése gátolta az elektrontranszportot a PS II és a PS I között. További hidrogénezés hatására csökkent a PS II aktivitása, a PS I aktivitása azonban a kettőskötés tartalom 50%-os csökkenéséig nem változott jelentősen (*Vigh és mtsai, 1985b; Horváth és mtsai 1986*). A katalizátor bizonyítottan nem lépett kölcsönhatásba az antenna komplexekkel és a reakció központokkal (*Horváth és mtsai, 1986*), klorofillokkal, karotenoidokkal és a plasztokinonnal (*Szalontai és mtsai, 1986*). A zsírsavtelítés elektrontranszport blokkoló hatását nem a tilakoid membrán „átlagfluiditásának” módosulásával, hanem a PS II mikrokörnyezetében specifikus lipid-fehérje kölcsönhatás változásokkal magyarázták (*Gombos és mtsai, 1988*). 10%-os hidrogénezés után, amikor a teljes elektrontranszport aktivitása 30%-kal csökkent, spin jelzett sztearinsav (12-SASL) ESR spektrumából számolt rendparaméter nem nőtt, hanem csökkent (*Vigh és mtsai, 1985b*). 40%-os hidrogénezés után 16-SASL spin próbával mért rotációs korrelációs idő csak nagyon kis növekedést mutatott (*Horváth és mtsai, 1986*). Ez a megfigyelés jó összhangban van azzal, hogy a DGDG kettőskötés tartalmának csökkenése nem okoz jelentős fluiditás csökkenést a membránok hidrofób régiójában az alkalmazott mérési eljárások szerint (*Koole és mtsai, 1984*).

Fehérjék hatása. A fenti eredmények közvetve azt is igazolják, hogy a zsírsavtelítetlenség nem az egyetlen tényező, ami befolyásolhatja a tilakoid membrán fluiditását. Ezt a tételt támasztják alá azok a kísérletek, melyek a tilakoid lipidekből rekonstruált liposzómák fluiditását hasonlították össze az intakt tilakoiddal. Kimutatták, hogy a tilakoid mikroviszkozitása nagyobb, mint az izolált

lipideké (*Ford és Barber, 1983*). A fehérjék fluiditást csökkentő hatását támasztja alá, hogy a sztróma tilakoid fluiditása nagyobb, mint a gránum tilakoidé, ugyanis a sztróma tilakoidban a fehérje/lipid arány kisebb, de a lipidek telítetlensége megegyezik a gránum régióéval (*Murphy és Woodrow, 1983*). Spin jelzett PC, PG és MGDG lipidekkel végzett ESR mérések szerint a PS II gazdag membránrégióban a rotációs korrelációs idő szintje lényegesen alacsonyabb a fluid fázisú tiszta lipid membránhoz viszonyítva. Néhány esetben azt tapasztalták, hogy a növények alacsony hőmérséklet adaptáció során tilakoidjuk fluiditását a protein/lipid arány csökkentésével állítják be inkább, mint a zsírsavtelítettség módosításával (*Chapman és mtsai, 1983*). Ezt igazolja az az ESR vizsgálat is, melyben alacsony hőmérséklethez adaptálódott *Synechococcus sp.* tilakoid membrán fluiditását és összetételét hasonlították össze. Nem találtak szoros összefüggést az alacsony hőmérsékletek esetén megnövekedett zsírsavtelítettség és a tilakoid fluiditása között (*Miller és mtsai, 1988*). Az *Arabidopsis thaliana* fadC mutánsának tilakoid membránjában 50%-kal kisebb a kétszeresen ill. háromszorosan telítetlen zsírsavak aránya a vad típusúnál. Ezzel szemben a protein/lipid arány 30%-kal csökkent. Ezen változások mellett a teljes fotoszintetikus elektrontranszport lánc és a PS I aktivitása változatlan maradt, amíg a PS II aktivitása 20%-kal csökkent (*Hughly és mtsai, 1989*). *Anacystis nidulans* sejtek nitrát-éheztetése fordított eredményre vezetett. A nitrátmentes közegben nevelt sejtek plazmamembránjában a protein/lipid arány jelentősen csökkent, ugyanakkor a membrán mikroviszkozitása nem változott. Ezt a lipidek zsírsavalkilláncainak egyidejűleg megnövekedett telítettsége okozta (*Gombos és mtsai, 1987a*). E kísérletek a lipidtelítettség és a fehérje/lipid arány komplement

változtatásának lehetőségét vetik fel a membrán szintű adaptáció során.

Összefoglalva: csak néhány organizmusban és csak bizonyos specifikus membrán rendszerben tekinthető a zsírsavtelítetlenség elsődleges válasznak hőmérséklet adaptáció során. Amint láttuk, a telítetlenség szintjének növekedése nem vonja maga után a membrán fluiditásának növekedését. A tilakoid lipidek lehetnek erősen telítetlenek, ami elősegítheti a PQ gyors diffúzióját, de jelentős rigidizáló tényezőt jelent a tilakoid membrán magas fehérje tartalma. Egy bizonyos *cis* kettőskötés szint biztosítja, hogy a membrán folyadékkristályos állapotban legyen, ám magas hőmérsékletek esetén ez a tilakoid instabilitásához vezethet, amikor is a telítetlen MGDG molekulák fordított hexagonális fázis kialakulását idézhetik elő.

Lipid-fehérje kölcsönhatás. A tilakoid lipidek zsírsav specieszeinek rendkívül heterogén előfordulása számos kutatócsoport figyelmét irányította a membránfehérjék és lipidek közötti specifikus kölcsönhatások keresésére. A fehérjékhez asszociált, „immobilizált” lipidek a membránfehérjék szerkezetének stabilizálásában vesznek részt, vagy funkcionális fehérje-lipid komplexek létrejöttét segítik elő (*Murphy, 1986; Li és mtsai, 1990*). ESR vizsgálatok szerint a spin jelzett foszfatidil-glicerol (14-PGSL) nagyobb arányban kötődik a fehérjékhez a tilakoidban ill. PS II és PS I gazdag membrán frakciókban, mint a spin jelzett foszfatidil-kolin (14-PCSL, 12-PCSL) és monogalaktozil-diacilglicerol (12-MGDGSL) (*Li és mtsai, 1989*). Ez a PG specifikus asszociációját jelenti mindkét fotokémiai rendszerhez.

Számos vizsgálat foglalkozott azzal, hogy mely lipidek maradnak együtt a

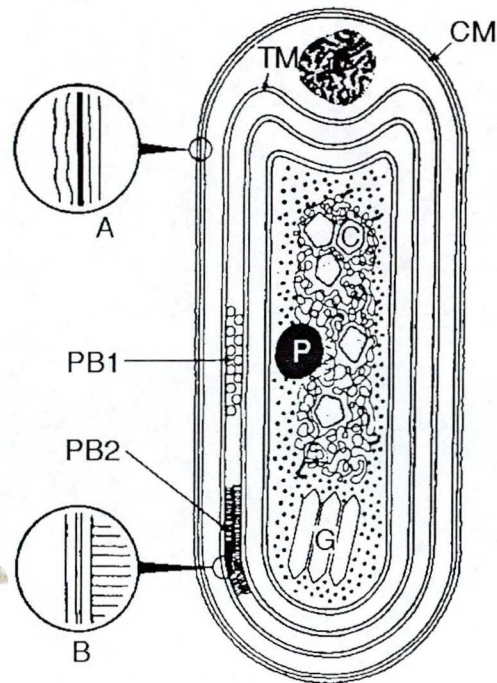


tilakoid membránból izolált fehérjékkel ill. pigment-fehérje komplexekkel az izolálási eljárás során. Az eredmények - valószínűleg a tisztítási módszerek különbségei miatt - sokszor ellentmondanak egymásnak. Murata és munkatársai azt találták, hogy a PS II komplexszel sok PG és néhány MGDG izolálható, míg egyáltalán nem található benne SQDG és PC. A kötött lipidek sokkal telítettebbek voltak, mint a membrán átlagos telítettsége (*Murata és mtsai, 1990*). A negatív töltésű SQDG spenót és *Dunaliella salina* esetén a CF_0 - CF_1 komplexhez kötődött, és *in vitro* növelte az enzim aktivitását (*Pick és mtsai, 1985*). A fenti eredményeknek ellentmondóan más munkacsoportok az SQDG-t majdnem az összes fő pigment-protein komplexszel együtt tisztíthatónak találták. A DGDG különböző fehérje komplexekkel való együttes tisztíthatóságára vonatkozóan az irodalomban nem található adat.

A membránok permeabilitását jelentősen módosítják a fehérjék és a lipidek kapcsolódásánál esetlegesen előforduló szerkezeti hibák. Ezt a feltevést támasztja alá pl. a citokróm *c* oxidáz rekonstitúciója különböző összetételű liposzómákban (*Madden és mtsai, 1983*). A tilakoid membránban az MGDG egyik lehetséges szerepe lehet, hogy ilyen nem specifikus membrán permeabilitást gátoljon a nagy pigment-protein komplexek közelében (*Murphy, 1986*). E modell érdekessége, hogy megengedi az MGDG molekulák nem kettősrétegbe való szerveződését normál körülmények között.

Cianobaktériumok hőmérsékletadaptációja. A cianobaktériumok a Gram-negatív baktériumok csoportjába tartoznak. Sejtjeiket egy kettős „envelop” membrán határolja, a külső és a plazma (belső) membrán. E kettős

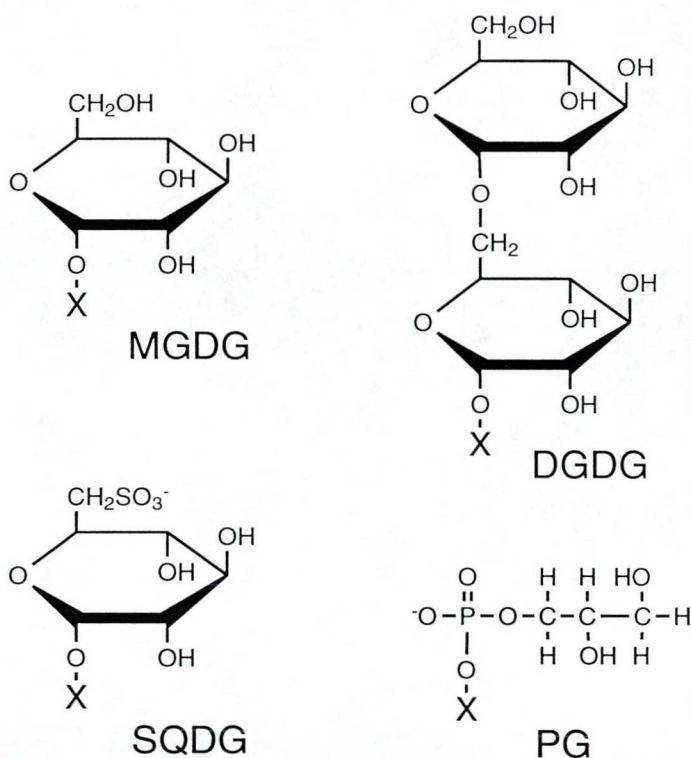
membránrendszer által határolt intracelluláris térben található a körkörös futó tilakoid membránok (2. ábra).



2. ábra. A cianobakteriális sejt vázlatos rajza (Stainer, 1988). CM: sejt membrán; TM: tilakoid membrán; PB1 és PB2: fikobiliszóma szemből és oldalnézetben; C: a nukleoplazma által körülvevett karboxiszóma; G: gáz vezikulum. A: a sejtmembrán kinagyított részlete a külső membránnal, a peptidoglikán sejtfallal és a belső vagy citoplazmás membránnal. B: a tilakoid membrán kinagyított részlete a két tilakoid közti lumennel és a tilakoid felszínén elhelyezkedő fikobiliszómákkal.

A magasabbrendű növényektől eltérően a fotoszintézishez szükséges fény begyűjtését nem integráns membránfehérje komplexek (fénybegyűjtő komplexek, LHC I és LHC II), hanem a fikobiliszómák végzik (PB1 és PB2). A fikobiliszómák nem veszik körül a fotokémiai rendszereket, mint a zöld növények esetében, hanem antennaként nyúlnak ki a membrán síkjából. Ettől az eltéréstől eltekintve ezideig nem találtak lényeges különbséget a cianobakteriális tilakoid fehérjék és magasabb rendű növények tilakoid fehérjéi között (Cantrell és Bryant, 1987).

A tilakoid membránokban zajlik le mind a fotoszintetikus, mind a légzési elektron transzport. Az alacsony hőmérsékletek hatását a lipidösszetételre, a membrán fluiditására és a különböző élettani folyamatokra eddig csak néhány cianobakteriális rendszerben vizsgálták (*Anacystis nidulans*, *Anabaena variabilis*, *Synechococcus lividus*, *Synechocystis* PCC 6803) (összefoglaló: *Murata, 1989*).



3. ábra. Cianobaktériumok membránját alkotó négy fő glicerolipid fejcsoportjának kémiai szerkezete. X jelöli a fejcsoportokhoz glicerinnel kapcsolódó két zsírsavláncot (lásd szövegben). MGDG, monogalaktozil-diacilglicerol; DGDG, digalaktozil-diacilglicerol; SQDG, szulfoquinovozil-diacilglicerol; PG, foszfatidil-glicerol.

A cianobaktériumok membránjait alkotó négy fő glicerolipid az MGDG (50-60%), DGDG (10-20%), SQDG (10-20%) és a PG (10-20%) (3. ábra). A tilakoid, a plazma ill. a külső membrán lipidösszetételében *A. nidulans* esetén nem találtak szignifikáns különbséget (*Murata és mtsai, 1981*). A relatív szárazsúlyban mért lipidtartalom a tilakoidokban 19%, a plazmamembránban 57%, a külső

membránban 3% volt. A cianobakteriális lipidek zsírsavösszetételének fő komponensei a palmitinsav (16:0), palmitoleilsav (16:1), hexadekadiénsav (16:2), sztearinsav (18:0), olajsav (18:1), linolsav (18:2), α -linolénsav (18:3 (9,12,15)), γ -linolénsav (18:3 (6,9,12)) és az ω -3,6,9,12-oktadekatetraén sav (18:4). Ezen belül a különböző törzsek esetén kisebb-nagyobb eltérések mutatkoznak. Az *A. nidulans* és a *S. lividus* csupán telített és egyszeresen telítetlen zsírsavakat tartalmaznak. Az *Anabaena variabilis* ezeken kívül még tartalmaz linolsavat és α -linolénsavat, a *Synechocystis* PCC 6803-ban pedig az előbbieken túl még található γ -linolénsav és oktadekatetraén sav is (Kenyon és mtsai, 1972).

Murata és munkatársai a zsírsavtelítettség és a környezeti hőmérséklet közötti összefüggést több cianobaktérium esetén megvizsgálták. *Anabaena variabilis* esetén kimutatták, hogy a 22 °C-on nőtt sejtek összes lipidosztályában csökkent az olajsav és nőtt a linolénsav tartalom a 38 °C-on tenyésztett sejtekhez viszonyítva (Sato és Murata, 1980). Amikor a 38 °C-on tenyésztett sejtek környezeti hőmérsékletét hirtelen 22 °C-ra csökkentették, az összes lipid mennyiség nem változott 10 óra alatt, de a monogalaktozil-diacilglicerolban a palmitinsav szintje csökkent és ezzel egyidőben nőtt a palmitoleilsav tartalom. Ahogy a lipidszintézis újra beindult, a 16 szénlánc hosszúságú telített és egyszeresen telítetlen zsírsav tartalom lassan visszatért a hőmérsékletkezelés előtti szintre. A kettőskötés gyors és átmeneti megjelenése a palmitinsavban, ami az MGDG *sn*-2 pozíciójában található, egy vészreakciónak tekinthető, ami arra hivatott, hogy az alacsony hőmérséklet által okozott fluiditás csökkenést kompenzálja. Ez a deszaturáció nem igényelte a zsírsavak *de novo* szintézisét. Az olajsav és linolsav tartalom csökkenése ill. a linolénsav tartalom emelkedése, mely

zsírsavak a lipidek *sn*-1 pozíciójában találhatóak, hosszabb időt vett igénybe.

Amikor *Anacystis nidulans* sejteket 0 °C-on inkubáltak, azok elvesztették élettani aktivitásukat, majd elpusztultak. Az alacsonyhőmérsékleti károsodás a plazmamembrán lipidjeinek fázistranzíciójával kezdődött. A tilakoid membrán fázistranzíciója, ami a plazmamembránénál magasabb hőmérsékleten következett be, csupán a fotoszintetikus aktivitás reverzibilis elvesztését eredményezte. Ezen vizsgálatok alapján írták le a következő modellt (*Murata, 1989*): a plazmamembrán és a tilakoid membránok gátat jelentenek az ionokkal és molekulákkal szemben. A növekedési hőmérsékleten mind a plazmamembrán, mind a tilakoid membránok folyadékkristályos állapotban vannak, és áthatolhatatlanok az ionok és molekulák számára. A hőmérséklet csökkentésével a tilakoid membrán fázisszeparált állapotba kerül, benne gél fázis szigetek alakulnak ki és ebben az állapotban a membrán átjárható az ionok számára. A fotoszintetikus aktivitás reverzibilisen csökken ilyen körülmények között. A hőmérséklet további csökkenése esetén a plazmamembrán is permeábilissá válik. A citoplazma és a környezet között az ionok, és kisebb molekulák szabadon áramolhatnak, ami végül a sejt pusztulásához vezet (*Murata, 1989*). A modell helyességét Vigh László és munkatársai is alátámasztották, akik homogén katalitikus hidrogénezéssel szelektíven a plazmamembránban lévő lipidek zsírsavláncainak telítettségét csökkentették. A telítettség növekedése, a plazmamembrán fázisátalakulási hőmérséklete, a K⁺ kifolyás és a fotoszintézis irreverzibilis károsodása szoros párhuzamot mutatott (*Vigh és mtsai, 1985c*). A zsírsavtelítettség fagyérzékenységben betöltött szerepének további bizonyítékát adta az a kísérlet, melyben *Anacystis nidulans* sejteket transzformáltak

Synechocystis $\Delta 12$ -deszaturáz génnel és a sejtek hidegérzékenysége szignifikánsan csökkent (Wada és mtsai, 1990). A többszörösen telítetlen zsírsavak eltüntetése pedig fokozta az alacsony hőmérsékleti stressz-érzékenységet (Gombos és mtsai, 1992). Membrán lipidek hidrogénezése után fokozódott a *desA* gén kifejeződése *Synechocystis* sejtekben, mely ellenlépésként fogható fel a mesterséges beavatkozásra (Vigh és mtsai, 1993).

A zsírsavtelítetlenségnek a magashőmérsékleti adaptációban betöltött szerepéről cianobakteriális rendszerekben, hasonlóan a magasabbrendű növényekhez, csak nagyon kevés adat áll rendelkezésre. A *Synechocystis* PCC 6803 vad, Fad12 és Fad12/*desA* mutáns sejtvonalaik magashőmérséklet stabilitását összehasonlítva azt a meglepő eredményt kapták, hogy a különböző sejtvonalak fotoszintetikus aktivitásának hőmérsékletfüggése, azaz hőstabilitása ill. a PS I és PS II aktivitása nem mutattak mérhető különbséget annak ellenére, hogy zsírsavtelítetlenségi szintjük jelentős különbségeket mutatott. Arra a következtetésre jutottak, hogy a tilakoid membránt alkotó lipidek kétszeresen ill. háromszorosan telítetlen zsírsavspeciesszei nem játszanak jelentős szerepet a mért fotoszintetikus folyamatok hőstabilitásában (Gombos és mtsai, 1991).

2.3. A spin jelző ESR spektroszkópia

A biológiai membránok megismerésében eredményes területnek bizonyultak a különféle spektroszkópiai módszerek. Ebben a fejezetben a spin jelző elektron spin rezonancia (ESR) spektroszkópiáról lesz szó (*Marsh és Horváth, 1989*). A molekuláris mozgások típusáról és sebességéről, valamint a kettősréteg rendezettségének mértékéről ezen módon gyűjtött ismeretek nagyban hozzásegítenek a membránkomponensek dinamikai viselkedésének molekuláris szintű megértéséhez (*Marsh, 1988*).

A membránok dinamikájának ESR spektroszkópiai vizsgálatához paramágneses molekulák szükségesek. Ezért fontos szerep jut a szintetikus, stabil nitroxil szabadgyököknek, a spin jelzőknek. A membrán vizsgálatokban legcélszerűbbek a spin jelzett lipidek és zsírsavak. A spin jelzett lipidek poláris végükkel a membrán felszínén horgonyozva alkil láncokkal beépülnek a kettősrétegbe és csak kismértékű perturbációt okoznak (*Taylor és Smith, 1980*). A nitroxid csoportot egy oxazolidinil (doxil) gyűrű tartalmazza. A gyűrű egyetlen közös szénatommal kötődik a zsírsavlánchoz, aminek következtében a lánchoz képest nem rendelkezik belső molekuláris szabadsági fokkal, vagyis a gyűrű mozgását minden pillanatban a lánca szegmensének mozgása határozza meg, amelyikhez kötődik. A doxil gyűrű a lánca bármelyik szénatomján kialakítható, azaz a membrán különböző mélységeibe hatolhatunk be és így a spin jelzők különösen alkalmasak a szegmentális rotációs dinamika tanulmányozására (*Lange és mtsai, 1985; Moser és mtsai, 1989*). Ezeknek a pozíciós izomereknek elterjedt jelölése pl. m-doxil sztearinsav (m-stearic acid spin label; m-SASL), ahol m a poláris vég felől számolt szénatom helyzetére utal.

Az ESR spektroszkópia alapjai. Az ESR mérés alapelve az, hogy mágneses térben a párosítatlan elektronok Zeeman degenerációja megszűnik és a felhasadt energianívók között mágneses dipólátmenetet indukálunk. Az átmenet létrejöttéhez a sugárzási kvantum energiájának meg kell egyeznie az alap és gerjesztett állapotok energiájának különbségével. Szokásos felépítésű spektrométerekben rögzített frekvencián, a mágneses tér lassú változtatásával haladunk át a rezonancián, és a spektrumot a minta által felvett rádiófrekvenciás energia detektálásával kapjuk. Pontosabban az abszorpciós spektrum első deriváltját kapjuk, mely a mágneses tér modulációjának következménye. E moduláció fázisérzékeny detektálást tesz lehetővé és jelentős jel/zaj viszony javulást eredményez.

Mágneses térben lévő N-O rendszer energiáját leíró spin-Hamilton operátor a következő:

$$\mathcal{H} = \beta \cdot \mathbf{B} \cdot \mathbf{g} \cdot \mathbf{S} + \mathbf{I} \cdot \mathbf{A} \cdot \mathbf{S}, \quad (1)$$

ahol β a Bohr magneton, \mathbf{B} a mágneses indukció vektora, \mathbf{S} az elektronspin, \mathbf{I} a ^{14}N magspin operátora. \mathbf{g} és \mathbf{A} tenzormennyiségek, előbbi a Landé-féle, utóbbi pedig a magspin és elektronspin hiperfinom csatolási tenzora. A tenzorok egykristályos minták színekéből határozhatók meg (*Jost és mtsai, 1971*). Az N-O kötéshez rögzített koordinátarendszerben legyen az x tengely az N-O kötés, a z tengely a π pálya síkjában, az y tengely pedig legyen merőleges x -re és z -re úgy, hogy a három tengely jobbsodrású rendszert alkosson. Ebben a koordinátarendszerben \mathbf{g} és \mathbf{A} tenzorok diagonálisak (*Knowles és mtsai, 1976*). Áttérve polár koordinátarendszerbe, valamely (ϑ, φ) irányban \mathbf{g} és \mathbf{A} értékekre a következőket kapjuk:

$$g(\vartheta, \varphi) = \sqrt{g_{zz}^2 \cdot \cos^2 \vartheta + g_{xx}^2 \sin^2 \vartheta \cdot \cos^2 \varphi + g_{yy}^2 \sin^2 \vartheta \sin^2 \varphi}, \quad (2)$$

$$A(\vartheta, \varphi) = \sqrt{A_{zz}^2 \cdot \cos^2 \vartheta + A_{xx}^2 \sin^2 \vartheta \cdot \cos^2 \varphi + A_{yy}^2 \sin^2 \vartheta \sin^2 \varphi}, \quad (3)$$

ahol g_{xx} , g_{yy} , g_{zz} és A_{xx} , A_{yy} , A_{zz} \mathbf{g} és \mathbf{A} tenzorok átlójának elemei. Ezek az értékek függenek az N-O csoportot magába foglaló molekula szerkezetétől, pl. az 5-SASL spin jelzett lipid esetében a tenzorelemek rendre $\mathbf{g}=(2,0088 \ 2,0061 \ 2,0027)$ $\mathbf{A}=(0,63 \text{ mT} \ 0,58 \text{ mT} \ 3,36 \text{ mT})$ (Berliner, 1976). Egy membránba épített és lefagyasztott spin jelző ESR spektruma az összes lehetséges iránynak megfelelő elemi spektrum összege.

A hiperfinom csatolási állandók és g értékek anizotrópiája lehetővé teszik a molekula orientációjának meghatározását. Gyors molekuláris mozgások kiátlagolják az anizotrópiát, mely a spektrumvonalak szélességére fejt ki hatását. Ennél fogva a vonalszélességekből a rotációs korrelációs idő kiszámítható.

A rotációs korrelációs idő. A nitroxid spin jelzők kis viszkozitású, izotróp közegben gyorsan forognak, spektrális anizotrópiájuk teljesen kiátlagolódik, ennél fogva három éles vonalból álló spektrumot kapunk. A molekuláris mozgások a spin-spin relaxációs időn (T_2) keresztül hatnak a vonalszélességekre, az első derivált spektrumok esetében az ún. csúcs-csúcs távolságokra. Időtől függő perturbáció elmélet alkalmazható a relaxációs idők meghatározására a gyors mozgások időskáláján belül, azaz abban az esetben, ha a rotációs korrelációs idő $10^{-11} \text{ s} < \tau_R < 3 \cdot 10^{-9} \text{ s}$. Mágneses anizotrópiák modulációja τ idő múlva a következő módon fejezhető ki a korrelációs függvényel (Redfield, 1965):

$$G(\tau) = \langle \mathcal{H}_1^*(t) \mathcal{H}_1(t+\tau) \rangle, \quad (4)$$

ahol $\mathcal{H}_1(t)$ a spin-Hamilton operátor időfüggő tagja. Brown mozgást feltételezve az időfüggő molekuláris orientáció valószínűség sűrűségét a rotációs diffúzió egyenlete adja meg. A korrelációs függvény exponenciális τ függését a

$$G(\tau) \sim \sum_{K=-L}^L g_{LK} \exp[-\tau/\tau_{LK}] \quad (5)$$

formula írja le (*Freed, 1964*). Az itt szereplő rotációs korrelációs idő (τ_{LK}), mely megadja, hogy a korrelációs függvény mennyi idő alatt csökken $1/e$ -ad részére, a diffúzió egyenlet sajátértékeiből számolható:

$$1/\tau_{LK} = D_{R\perp} L(L+1) + (D_{R\parallel} - D_{R\perp}) K^2, \quad (6)$$

ahol $D_{R\parallel}$ és $D_{R\perp}$ a diffúziós tenzor elemei. Másodrendű harmonikusok esetében ($L=2$) és izotróp rotációs diffúziót feltételezve ($D_{R\parallel} = D_{R\perp} = D_R$) a korrelációs idő:

$$\tau_R = 1/6D_R. \quad (7)$$

Kivelson megmutatta, hogy a Lorentz vonalszélesség a következő módon függ a ^{14}N magspintől (*Kivelson, 1957*):

$$w(m_f) = A + Bm + Cm^2, \quad (8)$$

ahol $m = -1, 0, +1$ a nagy, közép és kis terű vonalaknak megfelelően. $w(m)$ pedig spektrumból leolvasható csúcs-csúcs vonalszélesség. Az összeg első, A tagja egy állandó vonalkiszélesedést okoz, B tagja különböző mértékben szélesíti a vonalakat, míg az utolsó tag C , a középvonalra nézve szimmetrikus szélesedést okoz. Az integrális intenzitás megegyezik az egyes vonalakra, ezért a három vonalból álló spektrumokban a középső vonal amplitúdója a legnagyobb, melyet két szélesebb

vonallal foglalkozunk. A nagy terű vonal amplitúdója a legkisebb, hiszen mindhárom tag szélesíti. Izotróp forgás esetén a következő kifejezéseket kapjuk B és C koefficiensekre (Fraenkel, 1967; Schreier és mtsai, 1978):

$$B = \frac{\sqrt{3}g_e}{4} \cdot w(0) [\sqrt{h(0)/h(+1)} - \sqrt{h(0)/h(-1)}], \quad (9)$$

$$C = \frac{\sqrt{3}g_e}{4} \cdot w(0) [\sqrt{h(0)/h(+1)} - \sqrt{h(0)/h(-1)} - 2], \quad (10)$$

ahol $h(+1)$, $h(0)$, $h(-1)$ az alacsony-, közép- és magasterű vonal amplitúdók, $w(0)$ a középtér csúcs-csúcs vonalszélessége mT-ban. g_e pedig a szabad elektron Landé faktora. Stone közelítő modelljét alkalmazva (Stone és mtsai, 1965) a következő egyszerű formulához jutunk, melyből a rotációs korrelációs idő kifejezhető a spektrális paraméterekkel:

$$\tau = 6,1 \cdot 10^{-10} w(0) [\sqrt{h(0)/h(+1)} - \sqrt{h(0)/h(-1)}] [s]. \quad (11)$$

A rendparaméter. A folyadékkristályok molekuláris rendezettségének jellemzésére Saupe egy 3x3-as rendezettségi mátrixot definiált (Saupe, 1964). A mátrixelemeket a laboratóriumi koordinátarendszer és a molekulához rögzített koordinátarendszer tengelypárjai által bezárt szögek határozzák meg:

$$S_{ij} = 1/2(3\langle \cos^2 \gamma \rangle - 1), \quad (12)$$

ahol $i, j = 1, 2, 3$ a koordinátarendszerek x, y, z tengelyeinek felel meg. Az így definiált rendparaméter egy másodrendű tenzor, melynek elemei $-1/2$ és 1 közötti értékeket vesznek fel. Ha a laboratóriumi rendszer z tengelye a membrán normálisával egybe esik, a nitroxidhoz rögzített tengelyek a már korábban leírtaknak felel meg, akkor

a rendparaméter mátrix diagonális. A szögamplitúdó időátlagát a következő integrál hányados határozza meg:

$$\langle \cos^2 \gamma \rangle = \frac{\int_0^\pi \cos^2 \gamma P(\gamma) \sin \gamma d\gamma}{\int_0^\pi P(\gamma) \sin \gamma d\gamma}, \quad (13)$$

ahol $P(\gamma)$ Boltzman-féle valószínűségi irányeloszlás. Mivel a spin jelzők mozgása gyakran a gyors mozgások időskálájába esik a membránban, közelítő eljárást alkalmazunk a spektrumok elemzésében. A megfontolás azon alapszik, hogy a kiátlagolt hiperfinom (\mathbf{A}) és Zeeman (\mathbf{g}) tenzorok komponensei ebben az időintervallumban geometriai úton meghatározhatók. Spektrális paraméterekkel a következő módon fejezhetjük ki a rendparamétereket (*Dalton, 1985*):

$$S_{33} = \frac{A_{\parallel} - A_{\perp}}{A_{zz} - A_{xx}}, \quad (14)$$

$$S_{11} = \frac{3g_{\parallel} - (g_{xx} + g_{yy} + g_{zz}) - 2S_{33}(g_{zz} - g_{yy})}{2(g_{xx} - g_{yy})}, \quad (15)$$

$$S_{22} = 1 - S_{33} - S_{11}. \quad (16)$$

Általában csak S_{33} -at ábrázolják, mely a lipidlánc membrán normálistól való eltérését jellemzi. A_{\parallel} és A_{\perp} a membránban lévő spin jelzők spektrumából leolvasható paraméterek. g_{xx} , g_{yy} , g_{zz} és A_{xx} , A_{yy} , A_{zz} tenzorelemek pedig egykristály mérésekből határozhatók meg. Amint a (14) egyenletből látható S_{33} a kettősrétegbe és a kristályos környezetbe ágyazott N-O gyök anizotrópiájának aránya. Nyilvánvaló azonban, hogy a két médium polaritása különböző, melynek meg kell nyilvánulnia a rendparaméterben is. Hubbell és McConnell egy korrekciós faktort

vezettek be a probléma kiküszöbölése érdekében:

$$k = \frac{A_{xx} + A_{yy} + A_{zz}}{A_{\parallel} - 2A_{\perp}}. \quad (17)$$

Lipid-fehérje kölcsönhatás. 1973-ban Jost és munkatársai lipid kettősrétegbe citokrómmal *c* oxidázt építettek be és azt tapasztalták, hogy a spin jelzett lipidek ESR spektruma kétkomponensű (Jost és mtsai, 1973). Az egyik spektrum komponens megegyezik a fehérjementes fluid lipid spektrummal. Ha a lipid-fehérje komplex spektrumból digitálisan kivonjuk a fehérje mentes fluid lipid spektrumot, akkor láthatóvá válik egy másik spektrum komponens, melyet a kétkomponensű spektrumban a szélektől eltekintve mindenhol elfed a 3-vonalas fluid lipid spektrum. A második komponens eredetére legjobban azok a kísérletek mutattak rá, melyekben a fehérje/lipid arányt változtatták. Magas fehérje/lipid arány esetében csak egy komponens jelenik meg, mely közel azonos a fagyasztott oldatok immobilizált spektrumával. Ekkor az összes lipid valamely fehérjével közvetlen kontaktusban van. Kézenfekvő az a feltételezés, hogy ezen spektrum komponens a membránfehérje felszínén immobilizált lipideknek felel meg. A fehérje/lipid arány csökkenésével a lipidfelesleg a fehérje körüli második és távolabbi lipidburkokat hozza létre, melynek spektruma megegyezik a gyors mozgású fluid lipidek spektrumával. Közepes fehérje/lipid arány mellett mindkét komponens jól megfigyelhető, kis fehérje/lipid aránynál a fluid lipid spektrum dominál. A fehérje felszínén immobilizált, szolvatációs lipidek a kettősrétegbe beépült fehérje és a fluid lipidek közötti hidrofób kölcsönhatást biztosítják. A szolvatációs lipidek dinamikai sajátosságai a fluid lipidekéétől igen eltérőek, mivel flexibilis zsírsavláncaikkal a nagyobb tömegű, egyben lassúbb mozgású fehérje felszínéhez

illeszkednek. A fehérje/lipid arány szisztematikus változtatásával fontos adatokat nyerhetünk a lipid asszociációról, a szolvatációs lipidek számát és a fehérje lipid specificitását határozhatjuk meg. Legyen a kettősrétegben lévő jelzett és nem jelzett lipidek száma L^* és L . Ezen lipidek versenyeznek a fehérje felszíni helyekért B_i ($i=1,2,\dots,m$), mindegyik fehérjének n_i lipid helye van (Brotherus és mtsai, 1981):

$$B_i L + L^* \rightleftharpoons B_i L^* + L. \quad (18)$$

Egy jelzett lipid relatív asszociációs állandója ekkor:

$$K = \frac{L_{b_i}^* \cdot L_f}{L_{b_i} \cdot L_f^*}, \quad (19)$$

ahol L_b^* és L_b a fehérje felszínéhez asszociált jelzett és nem jelzett lipidek száma. L_f^* és L_f a jelzett és nem jelzett szabad lipid populációk. A szolvatációs helyek számának, a jelzett és nem jelzett lipidek számának megmaradása a következő egyenletekkel fejezhető ki:

$$\sum_{i=1}^m (L_{b_i} + L_{b_i}^*) = N \cdot P, \quad (20)$$

$$L_f^* + \sum_{i=1}^m L_{b_i}^* = L^*, \quad (21)$$

$$L_f + \sum_{i=1}^m L_{b_i} = L, \quad (22)$$

ahol P a fehérjék száma. A fenti egyenletek kombinációja a következő összefüggéshez vezet az $L^*/P \ll L/P$ közelítést alkalmazva (Brotherus és mtsai, 1981):

$$(n_f^*/n_b^*) = \frac{L/P}{N \cdot K} - 1/K. \quad (23)$$

Mérhető mennyiség a lipid/fehérje arány (L/P) és az ESR spektrumokból meghatározható a fluid/immobilis (n_f^*/n_b^*) spin jelzett lipid arány. Ez utóbbi mennyiséget ábrázolva a L/P arány függvényében egy egyenest kapunk, melynek extrapolált zérus helye megadja a fehérje felszíni szolvatációs helyek számát, az y tengely metszete pedig az asszociációs állandó reciprokát. A módszer elsősorban rekonstitúciós kísérleteknél hasznos, ahol tetszőleges L/P arányt állíthatunk be, ellentétben a természetes membránokkal, ahol ez az arány rögzített. Ha ismerjük a membránban lévő fehérjék átlagos méretét, melyből geometriai megfontolásokkal a szolvatációs helyek száma meghatározható, akkor a két pontra illesztett egyenes y tengelyi metszéspontjából becsülhetjük meg a relatív asszociációs állandót. Több spin jelzett lipiddel végzett kísérlet alapján az egymáshoz viszonyított asszociációs állandó meghatározására mindenféleképpen lehetőség nyílik a biomembránokban hiszen a (23) egyenletből kapjuk:

$$(n_f^*/n_b^*)^{PG} / (n_f^*/n_b^*)^L = K(L) / K(PG), \quad (24)$$

ahol $K(L) / K(PG)$ egy bizonyos jelzett lipid (L) átlagos relatív asszociációs állandója pl. a spin jelzett foszfatidil-glicerolra (PG) nézve. Az asszociációs állandók ismeretében a fehérje lipid szelektivitásának egyfajta sorrendje állítható fel. Általánosságban a legtöbb fehérjéről elmondható, hogy elsősorban a negatívan töltött lipidek közül válogat. Az eddigi adatok sokfélesége azonban azt sugallja, hogy a lipid specificitás nem tisztán elektrosztatikus eredetű, a résztvevők kémiai szerkezete sem elhanyagolható tényező.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Az irodalmi áttekintésben összefoglalt ismeretek alapján az alábbiakban részletezett célokat tűztük ki:

1. A vizsgálatok tárgyát képező *Synechocystis* PCC 6803 tilakoid membránban tanulmányozni kívántuk a hőmérsékleti változásokra adott molekuláris szintű szerkezetbeli és dinamikai eltéréseket. Igazolandó, hogy a zsírsavlánc összetétel és lipid/fehérje arány megváltozása a tilakoid fluiditásának szabályozására szolgál. A lipid-fehérje kölcsönhatás nem kisebb szereppel bír az adaptáció során, ehhez igazolni kell a kölcsönhatás létét és jellemezni annak szerkezetét. A lipid mobilitás és a lipid-fehérje kölcsönhatás vizsgálatára alkalmas módszer a spin jelző ESR spektroszkópia, melynek időablaka az említett mozgások tartományába esik.

2. A zsírsavlánc összetétel egyoldalú módosítására nyílik lehetőség homogén katalitikus hidrogénezéssel. A kettőskötések telítésének folyamatát zsírsavanalízissel kell követni. A telítettség növelésével együtt járó fluiditásbeli változásokat demonstrálni kell és meg kell határozni a fehérje felszíni immobilis lipidek arányát különféle spin jelzők használatával.

3. Mutáns *Synechocystis* sejtekben bizonyos deszaturációs enzimek hiányában a sejtek nem képesek többszörösen telítetlen zsírsavak szintézisére. Tanulmányozni kell a genetikai módosítások során fellépő szerkezetbeli eltéréseket. Az eredményeket össze kell vetni az azonos hőmérsékleten nevelt vad típusú sejtek adataival. Jellemezni kell a teljes membránok fizikai állapotát, közelebb kerülve az „azonos nevelési hőmérséklet azonos fluiditás” kérdésének megválaszolásához.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejtenyésztési körülmények. A *Synechocystis* PCC 6803 (Pasteur Culture Collection No.6803) vad típusú sejtvonalkat 22 °C-on illetve 36 °C-on, a Fad6 és Fad6/desA vonalkat 36 °C-on tenyésztettük (Wada és Murata, 1990). A sejteket BG-11 folyadékkultúrában (Allen, 1968) fotoautotróf körülmények között $70 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ erősségű fehér fény megvilágítás mellett neveltük. A tenyészeteket 1% CO₂-ot tartalmazó steril levegővel buborékoltattuk. A sejtek növekedését 800 nm-en mért abszorpció változásával követtük és exponenciális növekedési szakaszukban (OD₈₀₀=0,5-1,0) használtuk fel azokat az adott kísérlet céljára.

Tilakoid membránizolálás. A sejteket 4000 x g-s, 20 perces centrifugálással gyűjtöttük, majd 10 mM TES-NaOH (pH 7,0), 30 mM CaCl₂ pufferben (izoláló puffer) vettük fel. A kapott sejtuszuspenziót egy órán keresztül jégben, sötétben inkubáltuk. Az ezt követő izolálási lépéseket 4 °C-on végeztük. A sejtek feltörése üvegyöngyös technikával történt (Pakrasi és mtsai, 1989). Normál kémcsőben a szuszpenzióval megegyező térfogatú 0,1-0,11 mm átmérőjű üvegyöngyöt kevertünk össze, majd sötétben 3x3 perces erőteljes keveréssel (vortex) végeztük a sejtek feltárását (két keverés között 2 percig jégen hűtve). Az üvegyöngyök eltávolítása után a sejtörmeléket és a feltáratlan sejteket 1500 x g-s, 15 perces centrifugálással üleptítettük. A felülúszót óvatosan leszívtuk, majd 27000 x g-s 30 perces centrifugálás üledékeként nyertük a tilakoid membránban gazdag frakciót. Az üledéket az izoláló pufferben szuszpendáltuk fel.

A klorofill meghatározást minden esetben spektrofotometriás módszerrel



végeztük, 90%-os acetonos extraktummal (Arnon és mtsai, 1974). 50 µl tilakoid szuszpenzióhoz 3 ml 90%-os acetont adtunk, összekevertük (vortex), 20 percig állni hagytuk. A csapadékot 2000 x g-s 5 perces centrifugálással üleptítettük. A tiszta, klorofillt tartalmazó felülúszó abszorpcióját 664 nm-nél és 750 nm-nél (referencia pont) mértük. A minta klorofill tartalmának meghatározása a következő szorzat szerint történt: $(OD_{664} - OD_{750}) \cdot 12,19 \cdot \text{hígítás} = \text{klorofill tartalom } (\mu\text{g/ml})$. Egy minta általában 400 µg klorofillt tartalmazott 1 ml 10 mM TES-NaOH (pH 7,0), 30 mM CaCl_2 pufferben.

Fehérje mennyiség mérése. A fehérje/lipid arány meghatározásánál a fehérje tartalmat módosított Lowry módszer szerint mértük SIGMA (Deisenhofen, Németország) Lowry reagensek felhasználásával (Peterson, 1977).

Lipid kivonás és szétválasztás. A lipideket Bligh és Dyer által leírt módon kloroform és metanol 1:2 arányú elegyével nyertük ki a sejtekből (Bligh és Dyer, 1959). A lipidek analízisét és lipidosztályokra történő szétválasztását Sato és Murata által közölt eljárás alapján végeztük (Sato és Murata, 1988). A szilikagél vékonyrétegen (Merck 5721, Darmstadt, Németország) való azonosítás során a futató közeg kloroform, metanol és 28%-os ammonium-hidroxid (65:35:5) arányú keveréke volt. Az egyes lipidek mennyiségi meghatározását két lépésben végeztük. A vékonyrétegen történő szétválasztás után a foltokat 8-anilino-1-naftalin szulfonsavval (ANS) UV fényben láthatóvá tettük, heptadekánsav belső standardot cseppentettünk rájuk, majd ampullákba kapartuk, metileztük és a zsírsavakat gázkromatografáltuk. A lipidek mennyiségét az átlagos móltömegük alapján számoltuk.

Zsírsvanalízis. A gázkromatográfias vizsgálatokhoz a zsírsavak metilésztereit készítettük el. A bepárolt összlipidekre ill. az előzőleg elválasztott és ampullákba kapart komplex lipid foltokra mintánként 3 ml 5% cc. sósavat tartalmazó metanolt öntöttünk, széndioxiddal lefúvattuk és leforrasztottuk. 2 óras 80 °C-on történő metilezés után az ampullákat feltörtük, tartalmukat kémcsövekbe tettük. 6 ml víz és 3 ml petroléter hozzáadása és rázás után megvártuk a fázisok szétválását. A petroléteres fázist nitrogén gázáram alatt szárazra pároltuk, majd benzolban vettük fel. A metilészter törzsoldatból 1-2 µl-t gázkromatografáltunk, 30 m-es SP2330 kapilláris oszloppal felszerelt Hewlett Packard 5890 (USA) készüléket használva. Az oszlop ill. a láng-ionizációs detektor hőmérséklete 170 °C és 220 °C volt. Az egyes kromatográfias csúcsok azonosítását standardok retenciós idejével való összevetés alapján végeztük. Mennyiségi meghatározásukhoz 17:0 belső standardot használtunk, a csúcsok alatti területek meghatározását elektronikus integrátor (HP 3394A; Hewlett Packard, USA) segítségével végeztük.

A zsírsavak meghatározásának hibája 2,5% alatt volt a fő komponensek ill. 5% alatt az egyéb komponensek esetében.

Homogén katalitikus hidrogénezés. A frissen izolált tilakoidok lipidjeinek homogén katalitikus hidrogénezését hidrogén atmoszférában végeztük. A homogén hidrogénező katalizátor a palládium szulfonált alizarin komplexe (Pd(QS)₂) volt, melyet Joó Ferenc szintetizált (*Vigh és mtsai, 1985b*).

A katalizátort 5 mg/ml koncentrációban 10 mM Na-foszfát pufferben (pH 7,0) előaktiváltuk (*Joó és mtsai, 1991*): vákuumba, majd hidrogén atmoszféra alá helyeztük. Ezt a műveletet háromszor ismételtük meg. Az eredetileg bordó színű

katalizátor oldatot addig tartottuk hidrogén gáz alatt, míg színe barnává nem vált. Ezután levegőn ráztuk, melyet követően az oldat lilás-vörös lett. Ezt az aktivált katalizátor-formát (B-forma) használtuk a további lépések során (az így nyert katalizátor aktivitását egy napig megőrizte).

A hidrogénező médium 10 mM Na-foszfát (pH 7,0) volt. Az eredetileg 400 µg/ml klorofill koncentrációjú tömény tilakoid szuszpenziót 15 µg/ml klorofill koncentrációra hígítottuk, majd speciális hidrogénező edénybe töltöttük. A mintát vákuumba, majd hidrogén alá helyeztük háromszor 15-15 s-ig, ezáltal teljesen lecserélve a puffer és a légtér oxigén tartalmát. A hidrogén atmoszféra alatt lévő szuszpenzióhoz a szeptumon keresztül befecskendeztük az aktivált tömény katalizátor oldatot úgy, hogy a katalizátor koncentrációja a tilakoid szuszpenzióban 0,2 mg/ml legyen. A reakciót ezzel elindítottuk, majd jégen, síkrázon kevertetve időnként mintát vettünk a szeptumon keresztül (2 min, 5 min, 10 min, 20 min, 30 min). A kísérletekben a 0 perces hidrogénezésnek megfelelő mintákat nem hidrogéneztek, az előaktivált katalizátort sem fecskendezték a mintába. A hidrogénezett mintákból kétszeres mosással távolítottuk el a katalizátort: 27000 x g-s, 30 perces centrifugálás; ülepitett tilakoid szuszpendálása 10 mM Na-foszfát (pH 7,0) pufferrel. Folytonos cukor (30-70%-os) grádiensen tovább tisztítottuk a mintákat 120.000 g-s 15 órás ultracentrifugálással. A tilakoidban gazdag, sötétzöld frakciót végül 10 mM TES-NaOH (pH 7,0), 30 mM CaCl₂ pufferben vettük fel az ESR mérésekhez. A hidrogénezés után 10%-ot vettünk ki minden egyes mintából a zsírsavanalízishez.

Spin jelzés. A spin jelzett sztearinsav (14-SASL) az Aldrich (Beerse, Belgium) készítménye. A spin jelzett foszfatidil-glicerolt (14-PGSL) Dr. Derek Marsh (Göttingen, Németország) bocsátotta laboratóriumunk rendelkezésére, mely spin jelzett sztearinsav és tojás lizofoszfatidil-kolinból készült. A spin jelzett monogalaktozil-diacilglicerol (12-MGDGSL) Dr. Nishida (Tokió, Japán) ajándéka (*Nishida és Yamada, 1985*).

A tilakoid membránok spin jelzése 1 ml 10 mM TES-NaOH (pH 7,0), 30 mM CaCl₂ pufferben történt, az oldat 1-2 mg poláros lipidet tartalmazott. Az oldathoz 10 µl 1 mg/ml koncentrációjú etanolban oldott spin jelzett lipidet adtunk. A relatív spin jelzett lipid koncentráció a poláros lipidekre nézve mindig kisebb volt, mint 1%, az etanol pufferhez viszonyított térfogata pedig ≈1%. A spin jelzett mintákat 1 percig intenzíven kevertük (vortex), majd 10 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. Eppendorf centrifugában üleptítettünk (4000 x g; 10 perc), a sűrű tilakoid üledékből 10 µl-t 100 µl-es, 1 mm belső átmérőjű mérőkapillárisba töltöttünk. A hidrogénezett membránokat is a fentiek alapján jelöltük.

Poláros lipid diszperziók jelzéséhez a tilakodból kivont, majd kloroformban feloldott lipidekhez (1-2 mg) 10 µl 1 mg/ml etanolban oldott spin jelzett lipidet adtunk. A keveréket száraz nitrogén gázárammal üveg edény aljára pároltuk, majd 1 órán át 10 Pa nyomású vákuumban tovább szárítottuk. A száraz lipid filmet 50 µl 10 mM TES-NaOH (pH 7,0); 30 mM CaCl₂ pufferrel hidratáltuk intenzív keverés (vortex) közben. A lipid diszperziót ezután 100 µl-es, 1 mm belső átmérőjű ESR mérőkapillárisba töltöttük. Asztali centrifugában üleptítettünk, a minta hosszát a kapilláris csőben 10 mm-re állítottuk be. Az alacsony hőmérsékleten mért minták pufferét etilénlikollal egészítettük ki úgy, hogy annak végső koncentrációja 30

térfogatszázalékos legyen.

ESR spektroszkópia. Az ESR spektrumokat egy Bruker ECS106 (Rheinstetten, Németország) típusú spektrométerrel vettük fel. A mikrohullámú frekvencia hangolástól függően $9,44 \pm 0,01$ GHz, a teljesítmény minden esetben 10 mW volt. A derivált abszorpciós spektrum felvételéhez 100 kHz-es modulációs technikát alkalmaztunk, a moduláció szélessége 0,125 mT. A középtér értéke rendszerint 335,5 mT, a mérési tartomány szélessége 10 mT volt. A minták hőmérsékletét egy ER 4111VT típusú, számítógép vezérelt hőmérséklet szabályozóval állítottuk be. Alacsony hőmérsékletről indulva, 1°C -os lépésenként temperáltuk a mintát előhűtött, sűrített levegőáram melegítésével. Minden új hőmérsékleti pont elérése 1 percet vett igénybe és további 1 percet vártunk a termikus egyensúly beállítására. Az adatgyűjtés digitális úton történt, a készülék beépített, Motorola processzoros számítógépén keresztül a Bruker ECS106 program segítségével. A spektrum y tengely menti feloldását meghatározó A/D átalakító konverziós ideje 41 msec volt, mely 16 bites ábrázolást tesz lehetővé. Az analóg szűrő időállandóját 20,5 msec-re állítottuk. A spektrumokat minden esetben 1024 pontban vettük fel. A spektrumokon további konvertálásokat hajtottunk végre, hogy a laboratóriumunkban IBM kompatibilis gépekre kidolgozott, saját programok segítségével végezhessük el az adatok feldolgozását. Az első konverziót a Bruker cég „doswrite” programja segítségével végeztük, mely a Motorola formátumú spektrumokat IBM kompatibilis gépek által olvasható lemezekre másolja. A spektrum normálását és végső kompatibilitását egy második konvertálás végzi, melyet FORTRAN nyelven írtunk. A spektrumokon egyéb manipulációt (pl. símítást) nem végeztünk.

Az adatok értékelése. Az adatokat részben a spektrométer beépített számítógépén, részben IBM PC kompatibilis számítógéppel értékeltük ki. A kétkomponensű kísérleti spektrumok vonalalakjait kétkomponensű szimulációval határoztuk meg, mely a következő módon történt (*Horváth és mtsai, 1988; Davoust és Devaux, 1982*): külön-külön meghatároztuk a fluid lipid (4.A ábra) és az immobilis (4.C ábra) komponens spektrális alakját, a két komponens meghatározott arányú összegeként kapjuk a szimulált, kétkomponensű (4.B ábra) spektrumot. A kísérleti spektrummal legjobb egyezést adó szimulált spektrum megtalálása érdekében hibafüggvényt (H_{err}) vezettünk be,

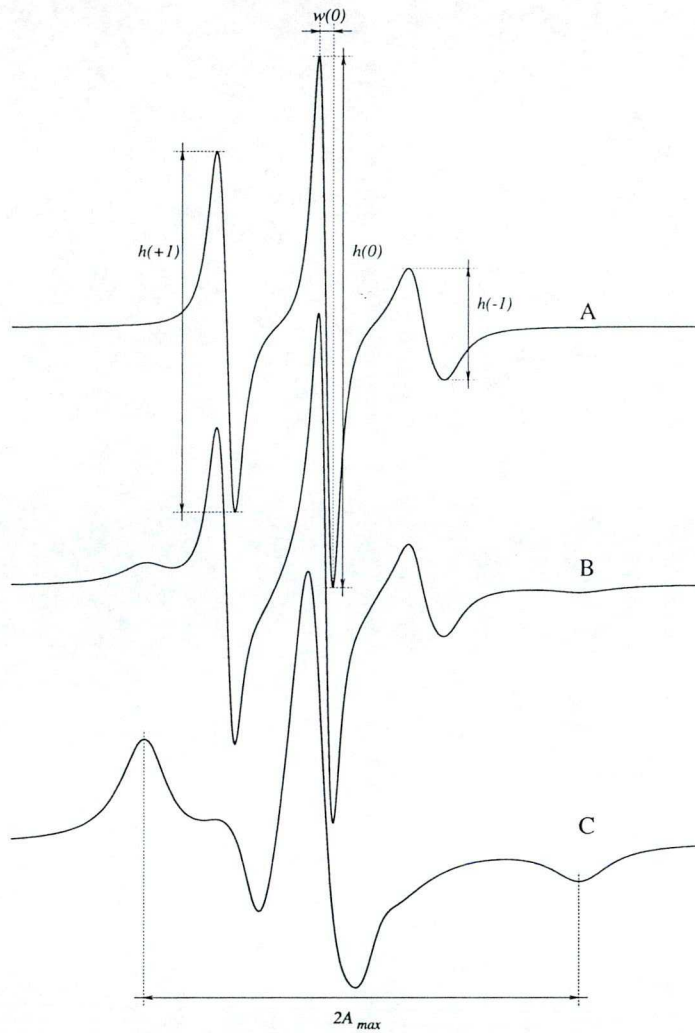
$$H_{err} = \frac{\sum_i [Y_{simu}(i) - Y_{exp}(i)]^2}{\sum_i [Y_{exp}(i)]^2} \quad (25)$$

mely a kísérleti ($Y_{exp}(i)$) és a szimulált ($Y_{simu}(i)$) spektrális pontok relatív különbségének normált négyzetösszege. Ez a hiba a szimulációk során mindig 1% alatt volt, a legjobb illesztéseknél kevesebb, mint 0,5%.

A fluid fázis dinamikai leírására alkalmas rotációs korrelációs időt a (11) egyenlet alapján számoltuk ki. A lipid extraktumokból készített diszperziók esetében az egykomponensű kísérleti spektrumokból, a kétkomponensű tilakoid mintáknál a szimulált fluid spektrumokból. A korrelációs idő meghatározásához szükséges spektrális paramétereket a 4.A ábra mutatja be.

Az alacsonyabb hőmérsékleten használható rendparaméter viszonylag szűk hőmérsékleti intervallumon ad felvilágosítást a rendszer fizikai állapotáról. Ezért az egyszerűbben mérhető külső sávélék távolságát ($2A_{max}$) (4.C ábra) ábrázoltuk a hőmérséklet függvényében, mely a mobilitás egyfajta empirikus mérése és elegendő

az orientációs rendezettség kvalitatív jellemzésére (Schreier és mtsai, 1978).



4. ábra. Spektrális paraméterek és kétkomponensű spektrális szimuláció. Szimulált fluid lipid spektrum (A) és a rotációs korrelációs idő meghatározásához szükséges paraméterek, $h(+1)$, $h(0)$ és $h(-1)$ az alacsony-, közép- és magasterű vonalamplitúdók, $w(0)$ a középtér csúcs-csúcs vonalszélessége mT-ban. Szimulált kétkomponensű spektrum (B), mely integrális intenzitását tekintve 40% fluid lipid komponenst (A) és 60% immobilis komponenst (C) tartalmaz. Szimulált immobilis spektrum (C) és az orientációs rendezettség jellemzésére használt spektrális paraméter, a külső sávélék távolsága, $2A_{max}$.

5. EREDMÉNYEK

5.1 Hőmérsékletadaptáció

Membránösszetétel. A hőmérséklet-adaptációs kísérleteket egy cianobaktérium, a *Synechocystis* PCC 6803 tilakoid membránján végeztük. Arra kerestük a választ, hogy mi történik a sejtek fotoszintetikus membránjaiban (összetétel, fluiditás) hőmérsékletadaptáció közben. A sejteket egy alacsonyabb (22 °C) és az optimális tenyésztési hőmérséklethez közel eső hőmérsékleten (36 °C) tenyésztettük.

A kezdeti kísérletek a tilakoid membrán összetételének meghatározására irányultak. Miután a tilakoid membránt a többi biológiai membránhoz hasonlóan alapvetően két komponens építi fel, lipidek és fehérjék, értelemszerűen ezek mennyiségét és arányát mértük.

I. táblázat. A különböző hőmérsékleteken növesztett *Synechocystis* PCC 6803 sejtek tilakoid membránjának lipidösszetétele. A táblázat a fejcsoport szerinti osztályozást tünteti fel.

lipid (mol %)	22 °C	36 °C
MGDG	54	53
DGDG	18	16
SQDG	15	19
PG	13	12

Az I. táblázat tünteti fel a 22 °C ill. 36 °C-on növesztett *Synechocystis* PCC 6803 tilakoid membránjának lipidösszetételét. A táblázatból kitűnik, hogy a tilakoid

lipidösszetétele viszonylag egyszerű, összesen négyféle lipidet tartalmaz. Közel azonos arányban (10-20%) vannak jelen a DGDG, az SQDG és a PG lipidek. A tilakoidban a legnagyobb mennyiségben előforduló lipid az MGDG, ami több mint 50%-át teszi ki az összes lipidnek. Láthatjuk, hogy a membrán lipidösszetétele, korábbi vizsgálatokkal összehangban (Wada és Murata, 1989; Raison és mtsai, 1982), a hőmérséklet adaptáció során lényegében változatlan marad.

A következő kísérlet során arra kerestünk választ, hogy miképp módosul a különböző tilakoid lipidek zsírsavösszetétele a tárgyalt hőmérsékleti adaptáció során a kétféle fenotípusban. A II. táblázat mutatja, hogy csak a 16 és 18 szénatom hosszúságú lipid zsírsavakkal kell számolnunk. Számottevő eltérést nem tapasztalunk a palmitinsav (16:0) és palmitoleilsav (16:1) összetételben. A 36 °C-on nevelt sejtek tilakoidja kis mértékben több olajsavat (18:1), dupla mennyiségű linolsavat (18:2) tartalmaz, egyáltalán nem tartalmaz α -linolénsavat (18:3) és oktadekatetraénsavat (18:4), és a γ -linolénsav (18:3) tartalom a felére csökkent a 22 °C-on növesztett sejtekhez viszonyítva.

Általános tendencia, hogy a sejtek tilakoidjának lipidjei magasabb hőmérsékleten telítettebbé válnak. *Synechocystis* PCC 6803 sejteket vizsgálva Wada és Murata az alacsony hőmérséklet okozta zsírsavtelítetlenség növekedést egész sejt szinten is kimutatták (Wada és Murata, 1990). A zsírsavak deszaturációja sötétben és fotoszintézis gátlók jelenléte mellett nem következett be, viszont zsírsavsintézis inhibitorok esetén zavartalan volt. Ebből arra a következtetésre jutottak, hogy a zsírsavdeszaturáció a fotoszintetikus elektrontranszporttal kapcsolatos, és nem igényli a zsírsavak *de novo* szintézisét.

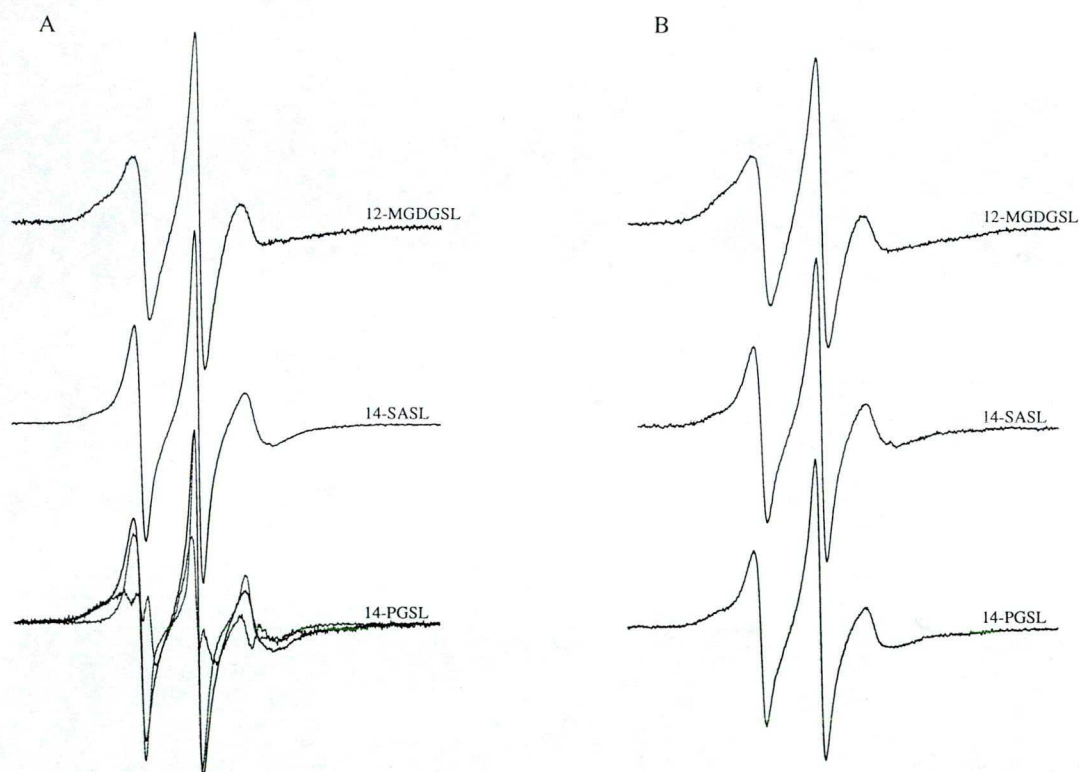
II. táblázat. A kétféle hőmérsékleten növesztett vad típusú *Synechocystis* sejtvonalak tilakoid membránjának zsírsavösszetétele. (ny: nyomnyi mennyiség, <0.4%)

zsírsav (mol %)	22 °C	36 °C
16:0	46,0	51,3
16:1	4,0	3,0
18:0	4,3	ny
18:1(9)	7,4	12,2
18:2(9,12)	11,5	23,3
α 18:3(9,12,15)	2,6	-
γ 18:3(6,9,12)	22,1	10,1
18:4(6,9,12,15)	2,3	-

A lipid- és zsírsavanalízist követően megvizsgáltuk, hogyan módosul a fehérje/lipid arány a tilakoid membránban a hőmérsékletadaptáció során. Magashőmérséklet adaptáció esetén ez az arány 0,8 mg/mg -ról (22 °C) 1,05 mg/mg -ra (36 °C) nőtt. A tilakoid membrán fehérje/lipid arányának adaptív szerepét Chapman és munkatársai vetették fel borsó tilakoidon végzett vizsgálataik alapján (*Chapman és mtsai, 1983*). A magasabb hőmérsékleten nevelt növények tilakoidjában a fehérje/lipid arány szignifikánsan megnövekedett. Magyarázatuk szerint ez a membrán fluiditásának optimális szinten tartását célozza.

Lipid-fehérje kölcsönhatás és membrádinamika. Különböző hőmérsékleten nevelt cianobaktériumok preparált tilakoid membránján több spin jelzővel végeztük el méréseinket. Egyikük a legtöbbször használt lipidanalóg a spin jelzett sztearinsav (14-SASL). Ez a szabad zsírsav ugyan nem fordul elő a tilakoid

membránban, de feltesszük, hogy az esetleges lipid doménekből nem halmozódik fel, azaz az átlagos lipid mobilitást tükrözi. További két jelölőt választottunk, melyek közül az egyik a 14-es szénatomnál spin jelzett foszfatidil-glicerol (14-PGSL), a másik pedig a 12-es pozícióban spin jelzett monogalaktozil-diacil-glicerol (12-MGDGSL) volt. Előbbi a tilakoid membránban is megtalálható egyetlen foszfolipid, utóbbi a membrán 50 %-át kitevő poláros lipid.



5.ábra. 22 °C-on (A) és 36 °C-on (B) nevelt *Synechocystis* sejtek tilakoid membránjába bejuttatott spin jelzett lipidek ESR spektrumai. A spektrumok jobb oldalán az alkalmazott spin jelzett lipid rövidítése látható. A kétkomponensű 14-PGSL spektrum (22 °C-on nevelt tilakoidban, A sorozat 3. spektrum) egyes komponenseit is feltünteti az ábra. A spektrumokat 36°C-on vettük fel. Teljes mérési tartomány = 10 mT.

Tilakoid membránokban lévő különböző spin jelzők ESR spektrumai láthatók az 5. ábrán. Amint az már sok, korábban vizsgált lipid/fehérje rendszer esetében látható volt, a spektrumok itt is kétkomponensűek. A két komponens két eltérő

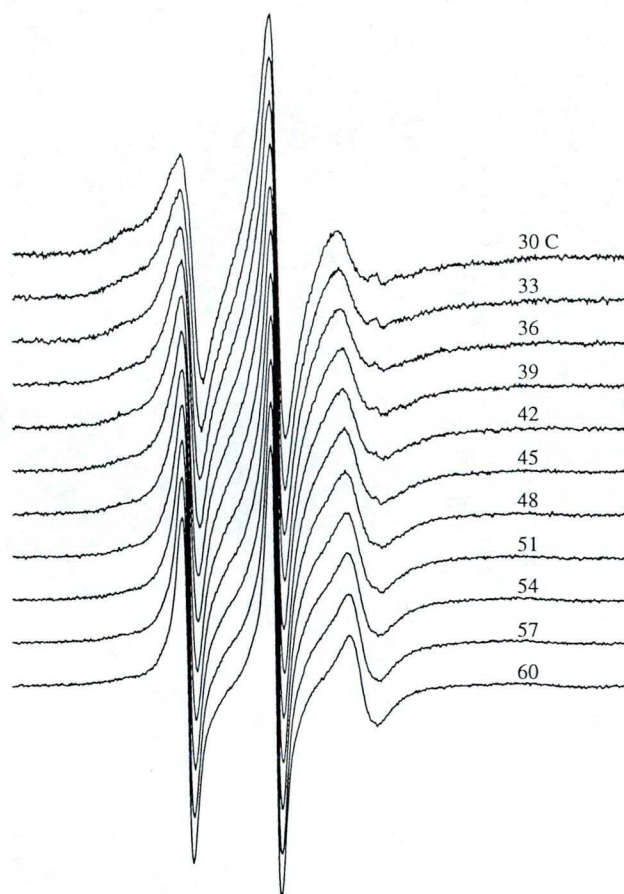
mozgékonyaságú spin jelzett lipid populációnak felel meg. Az egyik komponens, a spektrum középső régiójában, azon spin jelzőktől származik, melyek az ún. fluid lipid környezetben helyezkednek el. A másik spektrum komponens, melynek részei a kétkomponensű színek bal és jobb oldalán láthatók, azon spin jelzett lipidek spektruma, melyek mozgékonyasága erősen korlátozott a tilakoid membránba belesüllyedő, integráns fehérjék által. Spektrális kivonással meghatároztuk a két komponens arányát mindhárom spin jelző esetében. Legnagyobb immobilis arányt a 36 °C-on növesztett sejtek esetében a spin jelzett monogalaktozil-diacilglicerollal (12-MGDGSL) detektáltuk (58%), míg a 22 °C-on növesztett sejtekben a spin jelzett foszfatidilglicerol (14-PGSL) volt a fehérjékhez legspecifikusabban asszociált lipid (64%). A spin jelzett zsírsavval (14-SASL) kapott eredmények szerint az immobilis komponensek aránya 49% és 35% a 36 °C-on ill. a 22 °C-on nevelt sejtek tilakoid membránjában.

III. táblázat. Spin jelzett lipidek (12-MGDGSL, 14-PGSL és 14-SASL) immobilis komponenseinek arányai (*f*) és fehérje/lipid arányok különböző hőmérsékleten nevelt sejtek tilakoid membránjaiban.

tenyésztési hőmérséklet	12-MGDGSL	14-PGSL	14-SASL	fehérje/lipid mg/mg
22 °C	0,47	0,64	0,35	0,8
36 °C	0,58	0,54	0,49	1,05

Az *f* értékeket, azaz az immobilis komponensek arányát, a III. táblázat foglalja össze feltüntetve a fehérje/lipid arányokat is. Az eredmények azt mutatják, hogy két spin jelző esetén (12-MGDGSL és 14-SASL), a lassúbb komponens aránya

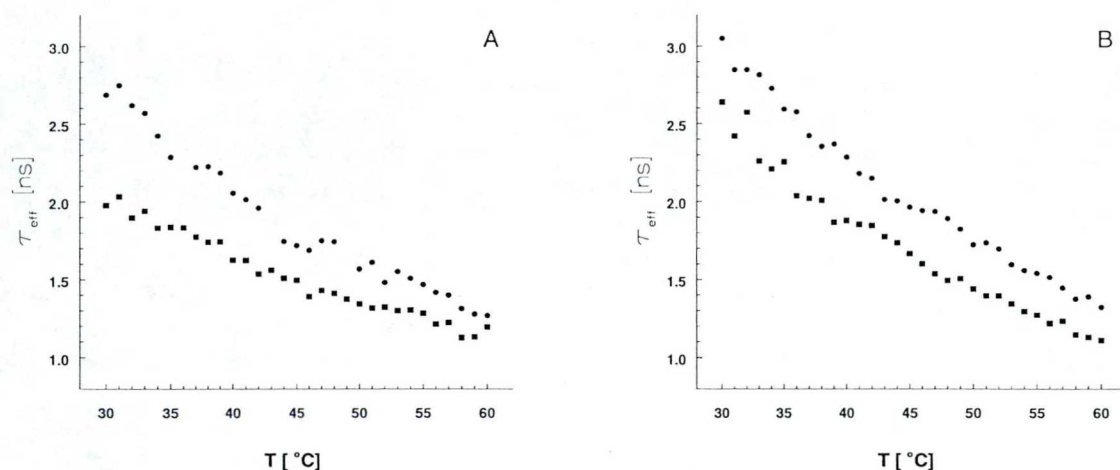
nagyobb a 36 °C-on nevelt sejtek tilakoid membránjában, míg a 14-PGSL-el kapott eredmények ezzel ellentétesek.



6. ábra. Spin jelzett sztearinsav (14-SASL) ESR spektrumok hőmérséklet függése. A jelölt lipideket 36 °C-on nevelt *Synechocystis* sejtekből izolált tilakoid membránokba ágyasztuk. Teljes mérési tartomány = 10 mT.

14-SASL spin jelzett lipidek ESR spektrumának hőmérséklet függését mutatja be a 6. ábra. Jól látható a fluid komponens spektrális alakjának változása, míg az immobilis komponens viszonylag stabil marad a mért hőmérsékleti tartományon. Magasabb hőmérsékleteken a fluid komponens spektrális alakjából közel izotróp forgásra következettünk. Ezen körülmények között a relatív vonal amplitúdókból a rotációs korrelációs idő meghatározható. A tilakoidokban lévő spin

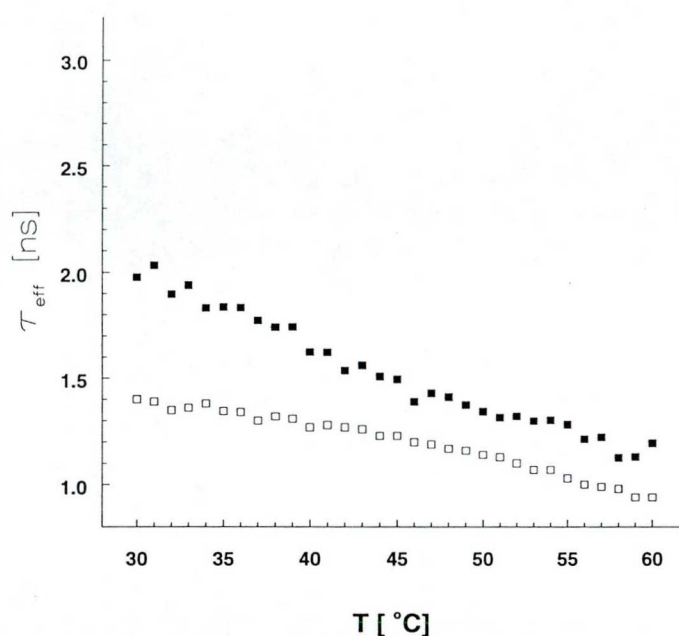
jelzők fluid spektrum komponenséből számolt korrelációs idők hőmérséklet függése látható a 7. ábrán. Az értékek csökkennek a hőmérséklet növelésével, mely egyre fluidabb lipid környezetnek felel meg. Alacsonyabb hőmérsékleteken a korrelációs idők már a lassú mozgások tartományába esnek, valószínűleg anizotrópiával társulva. Éppen ezért a kapott értékek kvantitatív elemzésre nem használhatók.



7. ábra. Az effektív rotációs korrelációs idő (τ_{eff}) hőmérséklet függése. Az adatokat a szimulált kétkomponensű 14-PGSL (A) és 14-SASL (B) spektrumok fluid komponenseiből számoltuk. A jelzőket 36 °C-on (●) ill. 22 °C-on (■)nevelt Synechocystis sejtek tilakoid membránjába juttattuk be.

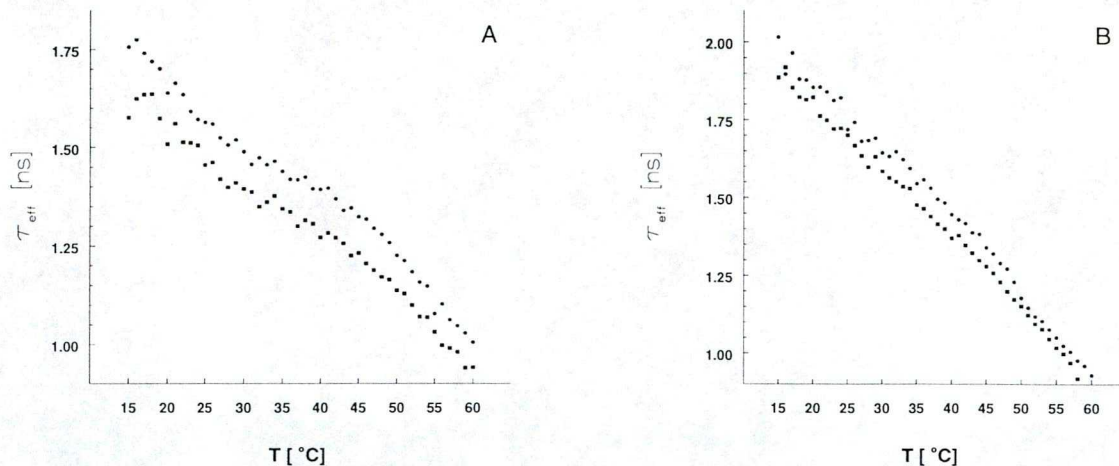
A 22 °C- és 36 °C-os adatokat összehasonlítva azt látjuk, hogy a teljes 30-60 °C-os intervallumon az alacsonyabb hőmérsékleten nevelt sejtek tilakoid membránja fluidabb, mind a 14-PGSL, mind a 14-SASL spin jelzők esetében. A membrán fluiditás szabályozás mechanizmusának mélyebb megértése érdekében további kísérleteket végeztünk. A tilakoidból kivont poláros lipidekből fehérjék nélküli lipid diszperziókat készítettünk. Olyan vezikulákat hoztunk létre,

melyekben ezen poláros lipidek aránya megegyezett az eredeti tilakoid membránéval. Lipid-fehérje kölcsönhatással nem kellett számolnunk, hiszen ezek a liposzómák nem tartalmazták a fotoszintetikus membrán fehérjéit. Az így kapott ESR spektrumok egykomponensűek voltak, ezért az effektív rotációs korrelációs idő a fluid komponensből közvetlenül származtatható volt.



8. ábra. Fehérje hatása a lipid mobilitásra. Spin jelzett foszfatidil glicerol (14-PGSL) ESR spektrumából számított korrelációs idő (τ_{eff}) hőmérséklet függése 22 °C-on nevelt sejt tilakoid membránjában (■) és membránból kivont lipidek alkotta diszperzióban (□).

A fehérjék lipid mobilitásra gyakorolt hatását demonstrálja a 8. ábra, mely 22 °C-on nevelt sejtek tilakoid membránjában mért eredményeket hasonlítja össze lipid diszperzióban mért adatokkal. A lipid diszperzió olyan lipidekből készült, melyeket ugyancsak 22 °C-os sejtekből vontuk ki. A fehérje mentes lipid diszperzióban csökken az effektív rotációs korrelációs idő (τ_{eff}), azaz nő a membrán fluiditása.



9. ábra. Spin jelzett foszfatidil-glicerol (14-PGSL; A) és sztearinsav (14-SASL; B) ESR spektrumok effektív rotációs korrelációs idejének hőmérséklet függése 36 °C-os (●) és 22 °C-os (■) *Synechocystis* tilakoid membránokból kivont lipid diszperziókban.

A 14-PGSL spin jelzett lipid rotációs korrelációs idejének hőmérséklet függését mutatja a 9.A ábra azokban a lipid diszperziókban melyeket a különböző hőmérsékleten nevelt sejtek tilakoidjából vontunk ki. Az eredmények azt mutatják, hogy a 22 °C-os sejtekből kivont lipidek alkotta kettősrétegek fluidabbak a mért hőmérsékleti tartományon. A különbség jóval kisebb, mint a teljes tilakoid membrán esetében, de az eredmények arra engednek következtetni, hogy a lipid-telítettségnek is van szerepe a membrán fluiditás beállításában. Hasonló eredményt kaptunk azokban a kísérletekben, mikor 14-SASL (9.B ábra) jelölővel dolgoztunk, bár a lipid diszperziók fluiditás különbségének kimutatására nem tűnt olyan érzékenynek, mint a 14-PGSL lipidanalóg.

5.2. Zsírsvtelítetlenség megváltoztatása hidrogénezéssel

Membránösszetétel. Vízoldékony palládium katalizátor használatával lehetőség nyílik a lipid zsírsavláncok hidrogénezésére, a C=C kettőskötések telítésére. A beavatkozás során kizárólag a zsírsvösszetétel módosul, a fehérje/lipid arány változatlan marad. A hidrogénezést 22 °C-on nevelt sejtek tilakoidján hajtottuk végre különböző mértékben. Ily módon egy telítettségi grádienszt hoztunk létre.

IV. táblázat. Hidrogénezett minták tilakoid membránjának zsírsvösszetétele és kettős kötés indexe. Az adatok %-ban megadva, $I_{C=C}$ kiszámolását lásd a szövegben.

zsírsv	hidrogénezés időtartama (perc)					
	0	2	5	10	20	30
16:0	48,5	49,2	52,0	52,7	52,0	51,0
16:1	3,5	3,1	2,6	2,0	1,8	1,8
18:0	5,3	9,2	13,5	15,8	21,1	24,1
18:1	9,4	13,5	18,0	20,2	19,0	16,7
18:2	12,8	11,2	8,2	6,7	3,8	4,7
α 18:3	1,6	1,1	ny	ny	ny	ny
γ 18:3	18,8	12,7	5,6	2,4	2,3	1,7
18:4	ny	ny	-	-	-	-
$I_{C=C}$	1,00	0,80	0,54	0,43	0,35	0,33

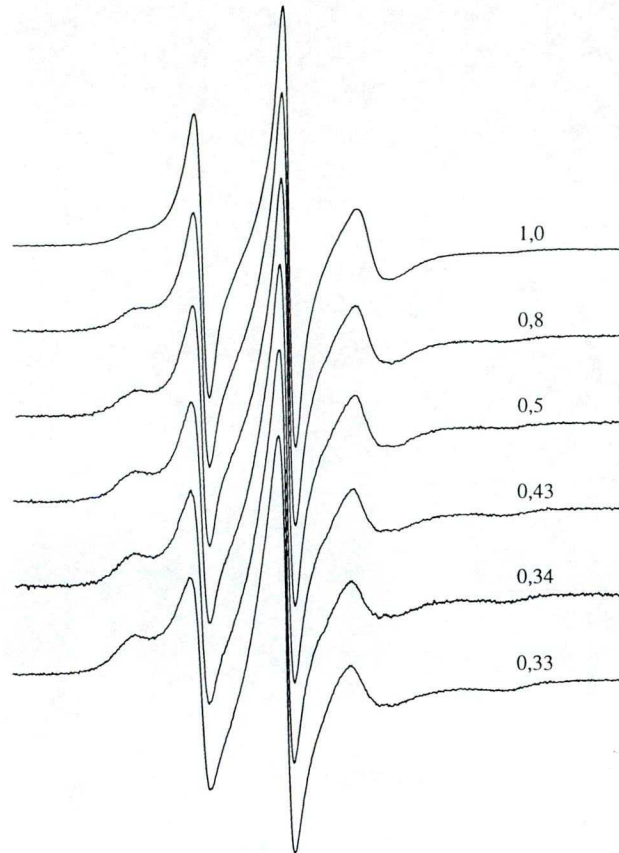
A IV. táblázat mutatja a tilakoid membrán *in situ* hidrogénezése során kialakult új zsírsvösszetételeket a 22 °C-on növesztett sejtek membránjaiban. A táblázat második oszlopának adatai, ahol 0 perces hidrogénezés található, azon

mintából származnak, ahol nem történt hidrogénezés. Ekkor a katalizátor sem volt benne a tilakoid membránban (lásd Anyagok és módszerek). A hidrogénezés fokának mérésére a kettőskötés tartalom meghatározása tűnt a legcélszerűbbnek. A kettőskötés index ($I_{C=C}$) meghatározása a következő egyenlet alapján történt (Watson, 1980):

$$I_{C=C} = \frac{\sum n \cdot [X:n]}{\sum [X:n]} \quad (26)$$

ahol n a zsírsavban (X:n) lévő kettőskötések száma, $[X:n]$ a zsírsav előfordulási aránya százalékban kifejezve (pl. 0 percnél 18:2-re $n=2$; $[X:n]=12,8$). A hidrogénezés idejének növelésével a kettőskötések száma csökken, melyet a kettőskötés index csökkenése is mutat.

Különböző ideig hidrogénezett tilakoid membránokban lévő 14-SASL spin jelzők ESR spektrumai láthatók a 10. ábrán. A spektrumok kétkomponensűek, csakúgy mint a nem hidrogénezett minták esetében. A spektrumokból világosan látszik az immobilis komponens - az alacsonyterű lokális maximum és magasterű, alig látható lokális minimum - arányának növekedése a zsírsav kettőskötés tartalom csökkenésével. Másik szembevetendő változás a fluid komponens spektrális alakjának megváltozása. Az egyes vonalak kiszélesednek, jelezve a lipidek mobilitásának csökkenését. Hasonló eredményt kaptunk 14-PGSL spin jelzett lipidekkel is. Kétkomponensű spektrum szimulációval meghatároztuk az egyes komponensek spektrális alakját és az immobilis komponens arányát, f -et. A szimuláció során a fluid lipid komponens paramétereit és f -et illesztettük, míg az immobilis komponens alakját nem változtattuk. A kísérleti spektrumhoz legjobban illeszkedő, azaz a legkisebb hibával rendelkező szimulált fluid és immobilis

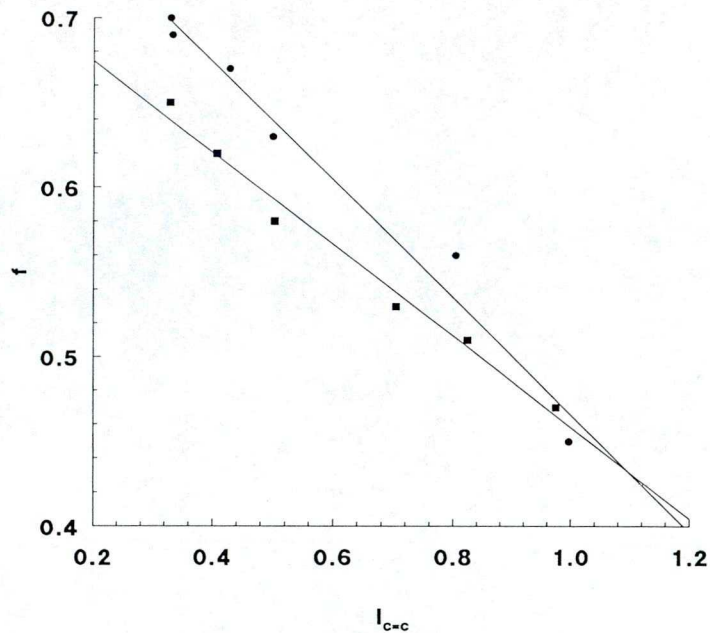


10. ábra. Spin jelzett sztearinsav (14-SASL) ESR spektrumai különböző ideig hidrogénezett tilakoid membránokban. A 0 perces hidrogénezésnél a katalizátor nem volt a mintában, hidrogénezés nem történt. A színeképek jobb oldalán a kettős kötés indexet ($I_{C=C}$) tüntettük fel. A spektrumokat 36°C-on vettük fel, a teljes spektrum szélesség = 10 mT.

spektrumok összegét tekintettük véglegesnek. A (25) egyenlet alapján meghatározott hiba minden esetben kisebb volt, mint 1%.

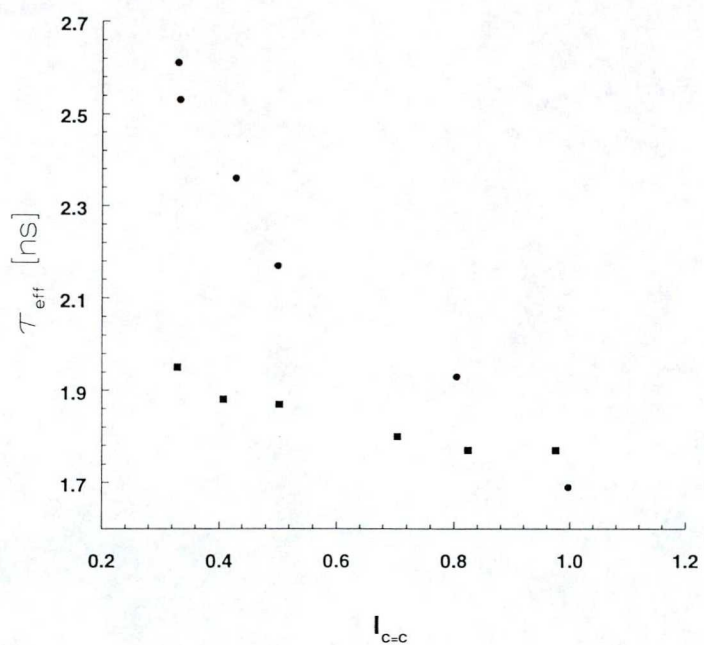
A 11. ábra a hidrogénezett minták immobilis komponenseinek arányát (f -et) ábrázolja a kettőskötés index ($I_{C=C}$) függvényében. A kettőskötés tartalom csökkenésével az immobilis komponens aránya növekszik, jelezve azt, hogy a lassú spin jelzett 14-SASL és 14-PGSL lipidek aránya egyre nő a hidrogénezéssel a 22 °C-on nevelt *Synechocystis* PCC 6803 tilakoid membránjában. Lineáris

összefüggést feltételezve az adatokra a legkisebb négyzetes eltérés módszerével egyeneseket illesztettünk. Meredekebb egyenes nagyobb lipid specificitást jelent, azaz a 14-SASL jelölt zsírsavak hosszabb ideig tartózkodnak a fehérje felszínén, mint a 14-PGSL lipidanalógok.



11. ábra. Spin jelzett sztearinsav (14-SASL:●) és foszfatidil glicerol (14-PGSL:■) spektrumaiból meghatározott immobilis komponensek aránya (f) az átlagos zsírsavlánc telítetlenség ($I_{C=C}$) függvényében. Minden egyes pont különböző hidrogénezésnek felel meg. A pontokra lineáris összefüggést feltételezve egyeneseket illesztettünk.

A fluid lipid spektrumkomponens relatív vonalamplitúdóiból meghatároztuk az effektív rotációs korrelációs időt (τ_{eff} -et). A kapott adatok hidrogénezés függését mutatja be a 12. ábra. A lipid mozgékonyág is függ a hidrogénezés mértékétől. A kettőskötések telítése merevebbé teszi a membránt, amint azt az alacsonyabb kettőskötés indexekhez rendelt nagyobb rotációs korrelációs idők mutatják. Szignifikáns a különbség a 14-SASL és 14-PGSL spin jelzők spektrumaiból számított eredményei között, míg a nem hidrogénezett minták esetében ($I_{C=C}=1$) a



12. ábra. Az effektív rotációs korrelációs idő (τ_{eff}) átlagos zsírsavlánc telítetlenségi ($I_{C=C}$) függése. Az adatokat spin jelzett sztearinsav (14-SASL:●) és foszfatidil-glicerol (14-PGSL:■) spektrumainak fluid komponenséből határoztuk meg. Az egyes pontok más-más hidrogénezésnek felelnek meg.

korrelációs idők közel azonosak az eltérés egyre nő a kettőskötések számának csökkenésével.

5.3. Izoterm körülmények között fellépő membrán reguláció

A zsírsavtelítettség adaptív és regulációs szerepének mélyebb megértése érdekében a *Synechocystis* PCC 6803 vad típusa mellett olyan mutánsok esetén is elvégeztük a zsírsavösszetételre vonatkozó analitikai vizsgálatokat, melyben bizonyos deszaturációs enzimek hiányában nincs mód kétszeresen vagy háromszorosan telítetlen zsírsavak szintézisére.

Feltételeztük, hogy ily módon közvetlenül lehetőség nyílik arra, hogy az élő sejtben a kettőskötés tartalom és a fotoszintetikus aktivitás ill. hőstabilitás kapcsolatát modellezzük. Ez a rendszer az előző fejezetben leírt kétféle, egyidejűleg fellépő adaptív mechanizmus működésének mélyebb megértését teszi lehetővé - választ kaphatunk arra, hogy a feltehetően fluiditásregulációért felelős tényezők képesek-e egymást helyettesíteni mind a fluiditás, mind a fluiditás függő funkciók tekintetében. Vizsgálatainkban a *Synechocystis* Fad6 mutáns és Fad6/*desA* mutáns/transzformánst alkalmaztuk (Wada és mtsai, 1992). A Fad6 mutáns a $\Delta 6$ helyzetű zsírsav deszaturációt végző enzimben hiányos (Wada és Murata, 1989). Az izolált Fad6 mutánst transzformálták kanamicin rezisztenciát kódoló gén inzerciójával elrontott *desA* génnel. A *desA* a $\Delta 12$ zsírsavdeszaturázt kódoló gén, amit *Synechocystis* PCC 6803 mutánsai felhasználásával izoláltak (Wada és mtsai, 1990). A kanamicin nevű antibiotikummal szembeni rezisztenciát kódoló gén inzerciója megakadályozta a *desA* kifejeződését és jelenléte egyidejűleg lehetővé tette a mutáns/transzformáns szelekcióját, miután kanamicin jelenlétében csak ez volt képes nőni. Ebben mutánsban a polién zsírsavak teljesen hiányoznak, mivel a $\Delta 6$ és $\Delta 12$ kettőskötések kialakítására nem képes (V. táblázat). Ez a mutáns

22 °C-on nagyon lassan képes nőni, így csak 36 °C-on növesztettük. A 36 °C-on nevelt vad típussal összehasonlítva a *Fad6/desA* mutáns zsírsavláncai sokkal telítettebbek. Telítetlen zsírsavként csak 16:1-et és 18:1-et képes szintetizálni, ugyanakkor a lipidösszetétel relatív arányát tekintve a vad típussal megegyezik.

V. táblázat. 36 °C-on nevelt *Synechocystis* sejtek tilakoid membánjának zsírsavösszetétele. A táblázat a vad típus, és két mutáns a *Fad6* és *Fad6/desA* vonalak százalékos zsírsavlánc megoszlását tünteti fel a fehérje/lipid (P/L) arányok mellett. (ny: nyomnyi mennyiség, <0,4%)

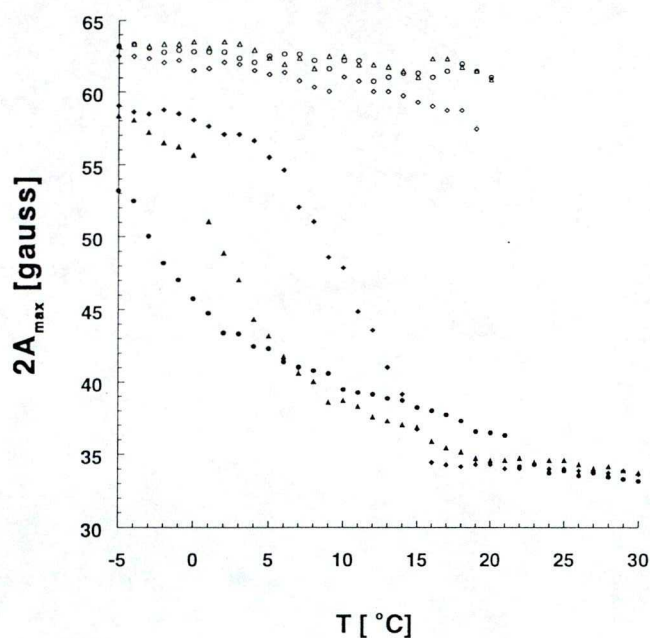
zsírsav (mol%)	36 °C	36 °C <i>Fad6</i>	36 °C <i>Fad6/desA</i>
16:0	51,3	59,9	55,5
16:1	3,0	4,3	4,0
18:0	ny.	ny.	3,3
18:1	12,2	10,0	37,2
18:2	23,3	25,8	ny.
γ 18:3	10,1	-	-
P/L (mg/mg)	1,05	0,81	0,69

A 36 °C-on növesztett mutáns és vad típusok tilakoid membránjának fehérje/lipid arányát összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy 1,05 mg/mg-ról (vad típus) 0,7-0,8 mg/mg-ra (mutánsok) csökkent. Ezzel bizonyítottnak látszik, hogy egy belső "szerkezeti fluiditás modulátor" (kettőskötés tartalom) megváltoztatása egy másik modulátor (fehérje tartalom) egyidejű változását idézi elő. Ebből következően a jelenség háttérében ugyanúgy a fluiditásreguláció állhat, mint amikor a modulátorok arányváltozása a külső környezeti tényezők hatását (hőmérséklet) kompenzálja. A fehérje/lipid arány változása a mutáns tilakoidjában azt is bizonyítja, hogy ez a tilakoid nem egyszerűen polién zsírsavakban szegény

membrán, hanem egy, a membrán szerkezetére nézve alapvetően megváltozott rendszer. A célzott genetikai beavatkozásokat követő metabolikus átrendeződés problémáját már más, magasabbrendű növényen végzett vizsgálatok alapján is felvetették (*Somerville és Browse, 1991*). A zsírsavtelítetlenség genetikai eszközökkel való drasztikus csökkentése után a tilakoidban olyan funkciók maradnak szinte zavartalanul épségben, melyeket egy *in situ* beavatkozás (pl. hidrogénezés) jelentős mértékben gátol (*Quinn és mtsai, 1989*).

-5 °C - 30 °C hőmérsékleti tartományon méréseket végeztünk a 36 °C-on nevelt *Synechocystis* sejtek tilakoid membránjain és a membránokból kivont lipidek diszperzióján. Ezen a tilakoid membránok számára alacsony hőmérsékleten egyszerű módon a rotációs korrelációs időt nem tudjuk meghatározni, ezért a rendparamétert alkalmaztuk a membrán fizikai állapotának leírására, mely a szerkezeti rendezettségének állapotáról ad felvilágosítást. Ez a paraméter csak egy szűk hőmérsékleti intervallumon adható meg. Túl alacsony hőmérsékleten a spin jelző mozgása nagyon lassú, a minimum hiperfinom felhasadást nem lehet leolvasni. Magas hőmérsékleten pedig a spin jelző mozgása belép a gyors mozgások régiójába, ahol a leolvasható vonaltávolságok (A_{max} , A_{min}) még jó közelítéssel sem egyeznek meg a hiperfinom tenzorelemekkel ($A_{||}$, A_{\perp}). A szűk intervallum kiszélesítésére a külső hiperfinom felhasadás használható, mely a mobilitás egyfajta empirikus mérése és elegendő az orientációs rendezettség kvalitatív jellemzésére (*Schreier és mtsai, 1978*). Tilakoid membránokba és membránokból kivont poláros lipidek diszperziójába ágyazott 14-SASL külső hiperfinom felhasadásának hőmérséklet függését mutatja be a 13. ábra.

A teljes membránoknál nincs különbség az ábrázolt intervallumon. Lipid



13. ábra. Spin jelzett sztearinsav (14-SASL) külső felhasadásának ($2A_{\max}$) hőmérséklet függése lipid diszperziókban (teli szimbólumok) és teljes tilakoidokban (nyitott szimbólumok). A tilakoid membránokat vad (●), Fad6 mutáns (▲) és Fad6/desA⁻ mutáns/transzformáns (◆) *Synechocystis* sejtekből izoláltuk. A sejtek az összes speciesz esetében 36 °C-on növekedtek.

diszperziókban a hőmérséklet növelésével a felhasadás csökken mindhárom sejt esetében, mutatva a spin jelző gyorsuló mozgását. 23 °C felett nem tapasztaltunk különbséget az azonos hőmérsékleten nevelt, de eltérő lipidösszetételű sejtek tilakoidjából kivont lipidek diszperziójában. Világos az eltérés a 20 °C alatti tartományon. Éles csökkenést fedezhetünk fel mindhárom görbében, azonban a legnagyobb változás mindig más-más intervallumon következik be. A változás közepe -2 °C, 3 °C és 9 °C-ra tehető a vad, Fad6 mutáns és Fad6/desA⁻ mutáns/transzformáns esetében.

6. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

Hőmérsékletadaptáció. A cianobakteriális tilakoid membrán lipidjeinek zsírsavösszetétele határozott különbséget mutat, mikor egy bizonyos sejtvonal nevelési körülményeit megváltoztatjuk (Miller és mtsai, 1988). Általános a tendencia, hogy a magasabb hőmérsékleten nevelt sejtek zsírsavláncai telítettebbek és a láncok is rövidebbek. A zsírsavösszetételben detektált változások mérhető effektusként kell, hogy jelentkezzenek a fotoszintetikus membrán fluiditásában. A tilakoid fizikai állapotának vizsgálatára spin jelző ESR módszert alkalmaztunk, mely a membránszerkezet és dinamika kutatásának egyik leghatékonyabb eszköze.

A környezeti hőmérséklet módosítására adott molekuláris szintű változásokat tanulmányoztuk egy cianobaktérium, a *Synechocystis* PCC 6803 tilakoid membránjában. Két különböző hőmérsékleten nevelt sejt tilakoid membránjába és lipid diszperziókba spin jelzőket juttattunk be, majd meghatároztuk a membrán fizikai állapotát jellemző paramétereket. Összehasonlítva a megfelelő effektív rotációs korrelációs időket a teljes tilakoidban és a kivont poláros tilakoid lipidekből képzett, fehérje mentes diszperziókban azt a következtetést vontuk le, hogy a fehérjék növelik a rotációs korrelációs időt, azaz csökkentik a membrán lipidek mozgékonyágát (8. ábra). Az alacsonyabb hőmérsékleten nevelt sejt tilakoid membránjában mért rotációs korrelációs idő kisebb, azaz a membrán fluidabb mind a teljes tilakoidra, mind a lipid diszperzióra nézve (7. és 9. ábra). A teljes tilakoid membránban a fluiditásbeli eltérés felerősödése is kimutatható, amit a fehérje mennyiségbeli különbségnek tulajdonítunk. Ezen eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy hibás közelítés lenne a fehérjéket figyelmen kívül hagyva,



csak a zsírsavösszetétellel számolni a membrán dinamika és adaptáció szélesebb körű vizsgálatakor. Korai hőmérséklet adaptációval foglalkozó tanulmányok nem találtak teljes bizonyosságot a fehérje tartalom változásra, amikor különböző hőmérsékleten nevelt cianobakteriális sejteket hasonlítottak össze. A fehérje/lipid arány megváltozását a hőmérséklethez való adaptáció során először Chapman és munkatársai mutatták ki kloroplasztiszokban (*Chapman és mtsai, 1983*). A fehérjék fluiditás reguláló szerepével algákban először a nitrát éheztetéssel kapcsolatos kísérletekben találkozunk (*Gombos és mtsai, 1987a; Gombos és Vigh, 1989*). A nitrát éheztetett sejtek membrán fehérje tartalmának csökkenését a lipidek telítődése kísérte, így kompenzálva a fluiditáscsökkentő hatást.

Az általunk vizsgált cianobaktérium tilakoid membránjában hasonlóképpen sikerült változást kimutatni a zsírsavösszetétel mellett a fehérje tartalmat illetően is (fehérje/lipid arány) (II. és III. táblázat). Ezen változások kimutathatóak voltak a tilakoid membránban a kémiai módszerek mellett a spin jelző ESR technikával is. Az eltérő fehérje/lipid arányok is megmutatkoztak a lipid-fehérje kölcsönhatásokban. Eredményeink jó egyezést mutatnak a magasabbrendű növényeken végzett vizsgálatokkal, melyekben különböző hőmérsékleten nevelt, eltérő növényeket hasonlítottak össze (*Li és mtsai, 1990*). A szerzők egy korábbi munkában szubtilakoid membrán frakciók vizsgálatát is elvégezték borsó tilakoidban (*Li és mtsai, 1989*). A lipid-fehérje kölcsönhatásokra vonatkozó eredményeik alapján felállított fehérjékhez kötődő lipidek specificitási sorrendje (az immobilizált spin jelzett lipid frakciók (*f*) nagyság szerinti sorrendje) a tilakoid membránban és PS I, PS II gazdag membrán frakcióban a következő volt: foszfatidil-glicerol > monogalaktozil-diacilglicerol ≥ foszfatidil-kolin. Az

immobilizált MGDG és PC lipidek aránya szignifikánsan magasabbnak adódott a PS II dús membránokban a tilakoid átlaghoz képest. Hasonló sorrendet állíthatunk fel a prokarióta *Synechocystis* sejtek tilakoid membránjában, ahol $PG \geq MGDG > SA$ a sorrend. A tilakoid lipidek többségét adó MGDG molekulák kisebb szelektivitást mutatnak 22 °C-on, míg magasabb hőmérsékleten ez a differencia megszűnik. A negatívan töltött spin jelzett sztearinsav (14-SASL) a legkisebb specificitással kötődő lipidanalóg, ami azért érdekes, mert korábbi rekonstitúciós kísérletek alapján az ugyancsak negatívan töltött spin jelzett foszfatidsavval (14-PASL) együtt a fehérjékhez legerősebben kötődő spin jelző volt (*Brophy és mtsai, 1984; Ellena és mtsai, 1983;*).

Eredményeink értelmezéséhez használjuk a következő közelítéseket: tételezzük fel, hogy a magasabb rendű, növényi tilakoid membrán molekuláris összetétele a fénybegyűjtő komplexektől eltekintve nem tér el jelentősen a cianobaktériumokétól. Vegyük egy cianobaktérium tilakoidjában található fehérje komplex átlagos molekula tömegét 250000-nek (LHC nélkül), egy lipid átlagos molekula tömegét pedig 1000-nek (*Murphy, 1986*). Az átlagos lipid/fehérje moláris arányok ezen értékkel számolva 298:1 és 244:1 a 22 °C és 36 °C-os sejtek tilakoidjaiban. A III. táblázatból vegyük a 12-MGDGSL-re vonatkozó immobilis lipid arányokat (f értékeket) és azt kapjuk, hogy 140 és 142 immobilizált lipid jut fehérjénként a 22 °C ill. a 36 °C-os sejt tilakoid membránjában. Ugyanezen értékek a foszfatidil-glicerolra nézve 191 és 132. Megállapítható tehát, hogy a fehérje felszíni MGDG lipidek száma állandó marad a hőmérséklet változás következtében, míg a fehérje felszínéhez kötődő PG mennyisége növekszik a hőmérséklet csökkenésével. A jelenség magyarázható azon fehérje komplexek mennyiségének

növekedésével (PS I), melyekhez a PG molekulák szelektívebben kötődnek (*Li és mtsai, 1989*). Véleményünk szerint a fehérje/lipid arány mellett a PS II / PS I arány is megváltozik a hőmérséklet csökkenés során, bár erre közvetlen bizonyítékunk nincsen. Ismert tény viszont, hogy a környezeti tényezők (fény, nitrát éheztetés, hőmérséklet) megváltoztatják a fénybegyűjtő komplexek pigmentösszetételét (arányát) *Anacystis nidulans* sejtek tilakoidjában (*Goedheer, 1976, Gombos és mtsai, 1987b*).

Zsírsvitelítettség megváltoztatása hidrogénezéssel. Zsírsvláncok homogén katalitikus hidrogénezését Chapman és Quinn mutatták be, tilakoid membránokon pedig Restall és munkatársai alkalmazták elsőként (*Chapman és Quinn, 1976; Restall és mtsai, 1979*). Az eljárást Vigh és Joó oly módon fejlesztették tovább, hogy egy új katalizátor alkalmazásával az inkubálási időt sikerült csökkenteni, a vízdékonyság elérésével pedig a katalizátor kimosható a membránból (*Vigh és Joó, 1983*). A módszer membrán lipidek zsírsvláncbaiban lévő kettőskötések telítését teszi lehetővé úgy, hogy a tilakoid architektúrája változatlan marad a kezelés során (*Vigh és mtsai, 1985b*). Az utóbbi időben ez a módszer széles körben elfogadott eszközzé vált az izolált membránok szelektív módosításában (*Thomas és mtsai, 1986b; Quinn és mtsai, 1989; Schlame és mtsai, 1990*).

A dolgozatban demonstráljuk, hogy a homogén katalitikus hidrogénezés alkalmas a *Synechocystis* tilakoid membrán lipidösszetételének szignifikáns megváltoztatására, míg a fehérjék változatlanok maradnak (IV. táblázat). A hidrogénezés fokának mérésére a zsírsvlánc kettőskötés indexét használtuk a korábban használatos %-os meghatározás helyett. Spin jelző elektron spin rezonancia spektroszkópiát alkalmaztunk a hidrogénezett tilakoidok fluiditás

változásának nyomon követésére. A rotációs korrelációs időt határoztuk meg spin jelzett sztearinsav (14-SASL) és foszfatidil-glicerol (14-PGSL) ESR spektrumaiból. Az adatok, összhangban egy korábbi, borsó tilakoidban végzett vizsgálat eredményeivel (*Horváth és mtsai, 1986*) azt mutatták, hogy a membrán fluiditás csökken a hidrogénezés során a kettősréteg középső régiójában. Eltérés mutatkozik a két spin jelzett lipid korrelációs idejének zsírsavtelítetlenségtől való függésében. Míg a 14-PGSL esetében kis változást észleltünk, a sztearinsav jelző szerint jelentősen csökken a membrán fluiditása (12. ábra). Ezen eltérő viselkedés egyik lehetséges magyarázata lehet az, hogy a jelzők nem egyenlő mértékben hidrogénezett lipid környezetből tudósítanak. Korábbi tanulmányok többféle membránban megfigyelték a hidrogénező katalizátor eltérő hozzáférhetőségét a különféle lipid szubsztrátokhoz. Például a 18:1/18:1 foszfatidil-etanolamin zsírsavainak hidrogénezhetősége lassabb a vele azonos zsírsavláncú, de a fejcsoportjában eltérő 18:1/18:1 foszfatidil-kolin molekuláénál (*Vigh és mtsai, 1987*). Lipidek szelektív hidrogénezését ugyancsak igazolja Schlame és munkatársai egyik korábbi munkája (*Schlame és mtsai, 1990*). Izolált mitokondriumban kimutatták, hogy a kardiolipin molekulák kevésbé telíthetők, mint a foszfatidil-kolin és a foszfatidil-etanolamin lipidek. Egyéb modell és biomembránokon végzett tanulmányok alapján három főbb ok jelölhető meg szubsztrátok katalizátorhoz való eltérő hozzáférhetőségét illetően (*Joó és mtsai, 1991*): (i) különbségek a lokális fluiditásban és a fluiditás megváltozása a hidrogénezés során, mely késlelteti vagy akadályozza a katalizátor partícióját bizonyos membrán régiókba (*Vigh és mtsai, 1987*); (ii) lipidek és fehérjék egymáshoz való szoros kötődése, mint a már említett kardiolipin esete máj mitokondriumban (*Schlame és mtsai, 1990*); (iii) a

membránokat jellemző kettősréteg struktúra helyett helyenként megjelenő ún. hexagonális fázisok létrejötte (*Vigh és mtsai, 1987*).

A 14-PGSL spin jelzővel kapott rotációs korrelációs eredményeink azt sugallják, hogy a foszfatidil-glicerol molekulák a katalizátor számára viszonylag korlátozottan elérhető lipid régiókban helyezkednek el, hiszen a teljes hidrogénezés alatt kis mértékben változott a lipid mobilitásra jellemző paraméter. Úgy gondoljuk, hogy ezek a régiók a fehérjékhez közeli lipid molekulákat reprezentálják, mely összhangban van korábbi eredményünkkel.

A fehérjék által immobilizált lipidek mennyisége függ a fehérje/lipid aránytól, a fehérje felszíni lipid kötőhelyek számától és a lipid-fehérje kölcsönhatás relatív asszociációs állandójától. A hidrogénezés során a fehérje/lipid arány változatlan marad. Mivel a lipid kötőhelyek száma feltételezésünk szerint nem változik jelentősen, ezért úgy tűnik a zsírsavláncok telítetlensége nem csekély szereppel bír a fehérje felszíni helyekért történő kompetícióban. Az asszociációs állandó meghatározójaként korábbi kísérletek a lipid fejcsoportok jelentőségét emelték ki, azon belül is a fejcsoport töltésének elsődleges szerepét jelölték meg (*Horváth és mtsai, 1988*). A hidrogénezés során a spin jelzett lipidek egyre telítettebb lipidekkel versenyeznek a solvatációs helyekért. A növekvő immobilis spin jelzett lipid arány csökkenő specificitást mutat az egyre telítettebbé alakított endogén lipidekre nézve.

Izoterm körülmények között fellépő adaptív változások. A hidrogénezés nem az egyetlen lehetséges módja a zsírsavtelítetlenség módosításának. Néhány évvel ezelőtt sikerült olyan mutáns sejteket (Fad6 és Fad12) izolálni *Synechocystis* sejtekből, melyek bizonyos deszaturáz enzimek hiányában nem képesek kettős-

kötések beépítésére (Wada és Murata, 1989). A Fad12 mutáns segítségével, mely mutáns hiányos a $\Delta 12$ deszaturációban, izolálták a $\Delta 12$ deszaturázt kódoló gént (*desA*) (Wada és mtsai, 1990). Ezen gén bevitele *Anacystis nidulans* sejtekbe megerősítette a korábbi feltevést, hogy a $\Delta 12$ deszaturáz enzimet kódolja, mert az enzim termékeként új zsírsavak jelentek meg. Az új, 16:2(9,12) és 18:2(9,12) zsírsavak növelték az egyébként hidegérzékeny sejtvonala hidegtűrését (Wada és mtsai, 1990). Meg kell jegyezni azonban, hogy vad típusú és mutáns *Synechocystis* sejtekben elrontott deszaturáz gének transzformációja során létrejövő többszörösen telítetlen zsírsavban hiányos sejtvonalak hideg érzékenysége nem változik az eredeti sejtvonallalhoz képest (Wada és mtsai, 1992).

A dolgozatban a vad típusú *Synechocystis* sejt tilakoid membránjának molekuláris összetételét és fizikai állapotát, egy mutáns (Fad6) és egy mutáns/transzformáns (Fad6*desA*⁻) sejtvonallal hasonlítottuk össze. A vad, mutáns és mutáns/transzformáns sejteket azonos hőmérsékleten neveltük. A sejtek e hármában a hidrogénezéshez hasonlóan egy telítettségi grádienszt állíthatunk fel, a zsírsavláncaiban legtöbb kettőskötést tartalmazó vad típustól a Fad6 sejteken át a legtelítettebb Fad6*desA*⁻ sejtekig. Lényeges eltérés van a hidrogénezett sejtekhez képest a fehérje/lipid arányban, mely nem változik a kémiai beavatkozás során, míg a vizsgált sejtekben ez az arány legnagyobb a vad típusban, legkisebb a mutáns/transzformáns sejtek tilakoid membránjában (V. táblázat). A tilakoid membrán rendezettségét tanulmányoztuk alacsony hőmérsékleten és azt találtuk, hogy ellentétben a hidrogénezéssel telített mintákon kapottakkal, a vizsgált tartományon ezzel a módszerrel nem találunk különbséget az izoterm körülmények között nevelkedett sejtekben (13. ábra). A tilakoid lipid extraktumokból készített

diszperziós kísérletek szerint az egyes specieszek zsírsavláncaiban létrejött telítettségi szinteltérés azonban jelentkezik a rendezettségben is. Az eredmények azt sugallják, hogy az azonos hőmérsékleten nevelt sejtek a génmanipuláció ellenére azonos membrán fizikai állapotot igyekeznek beállítani. A mesterségesen, géntechnikai úton megváltoztatott zsírsavlánc összetételbeli változás tehát összeségében kompenzálható, így a sejtek membránjának eredő fluiditása és ezzel együtt hidegérzékenysége nem változik. A sejtek a membrán fehérje/lipid arány változtatásával, valószínűleg a fehérjeösszetétel módosításával együtt védekeznek a hőmérsékleti behatások ellen. Megfigyeléseink teljes összhangban vannak a Sinensky által először megfogalmazott ún. homeoviszkozus adaptáció elvével (Sinensky, 1974). Másrészt új megközelítésben mutatnak rá a membránfüggő folyamatok módosítását célzó géntechnikai eljárások korlátaira.

Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a lipidek, a fehérjék ill. ezek kölcsönhatása többértűen fejtik ki hatásukat a cianobaktériumok tilakoid membránjának környezeti hőmérséklethez való alkalmazkodásában. Alacsonyabb hőmérsékletek magasabb membránfluiditást igényelnek, feltehetően az érzékeny fotoszintézis hatékonyságát növelendő. Az átlagos lipid mobilitás függ egyrészt a zsírsavösszetételtől másrészt a fehérje/lipid aránytól. Ezen két manipulációs lehetőség segítségével a sejt képes beállítani az optimális működéséhez feltétlen szükséges optimális membrán fizikai állapotot. Az eltérő lipid specificitás ugyancsak fontos lehet az adaptációban. A foszfatidil-glicerol elsődleges asszociációját tilakoid komplexekhez többen felvetették. Lehetséges, hogy specifikus lipidek stabilizálhatnak bizonyos lipo-protein komplexeket a megváltozott hőmérséklettel és/vagy lipid mobilitással szemben.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

1. Igazoltuk, hogy a *Synechocystis* PCC 6803 cianobaktérium tilakoid membránjának lipidösszetétele változatlan, míg zsírsavláncainak telítettsége és a tilakoid fehérje/lipid aránya megváltozik eltérő nevelési hőmérsékleten. A membrán dinamikai sajátosságait elektron spin rezonancia spektroszkópia módszerével követtük. Teljes tilakoid membránban és lipid extraktumokban meghatároztuk a lipid mobilitást jellemző rotációs korrelációs időket. Megállapítottuk, hogy a magasabb hőmérsékleten nevelt sejtek membrán fluiditása kisebb, a fehérjék nagy mértékben befolyásolják, merevítik ezt a fluiditást. A lipid-fehérje kölcsönhatás tanulmányozására irányuló kísérleteink alapján több spin jelzett lipid alkalmazásával meghatároztuk a komplexek által immobilizált lipidek arányát. Megállapítottuk, hogy az endogén tilakoid lipidek eltérő specificitással asszociálódnak a tilakoid fehérje komplexekhez. A fehérje felszíni monogalaktoszil-diacilglicerol lipidek kevésbé érzékenyek a hőmérsékleti változásokra. Felvetettük a foszfatidil-glicerol lipidek fontos szerepét az optimális fehérje működés szinten tartásához. A hőmérséklet változása során valószínűleg a fehérjék összetétele is megváltozik.

2. A homogén katalitikus hidrogénezés eljárás alkalmazásával képesek voltunk a *Synechocystis* PCC 6803 tilakoid zsírsavláncai telítettségi szintjének programozott, izoterm módosítására, míg a fehérjeösszetétel és mennyiség változatlan maradt. Meghatároztuk a rotációs korrelációs időket és megállapítottuk, hogy a hidrogénezés során, azaz a kettőskötések telítésével a membrán fluiditása csökken. A spin jelzett foszfatidil-glicerol mobilitásának

hidrogénezéssel szembeni csekély érzékenysége azt sugallja, hogy léteznek olyan lipid régiók, domének a membránban, melyek a katalizátor számára korlátozottan hozzáférhetőek. A kettőskötés tartalom függvényében meghatároztuk az immobilis komponensek arányát. Valószínűsítettük, hogy a lipidek asszociációs állandóját nem kizárólag a fejcsoport határozza meg, hanem a zsírsavlánc telítetlenség is számottevően befolyásolja. Ennek fényében biztosra vehető, hogy az adaptációs folyamatok során megfigyelhető kettőskötés tartalom változások nem csak a mátrix lipidek fluiditását, hanem a fehérjékhez asszociált lipidek minőségét és végső soron a membránhoz kötött folyamatok aktivitását is befolyásolják.

3. Végezetül, az azonos hőmérsékleten nevelt vad típusú és mutáns sejtek molekuláris összetételét és dinamikai sajátságait vetettük össze. A mutáció és genetikai beavatkozás során a zsírsavláncok telítődnek, mely a fehérje/lipid arány csökkenésével jár együtt. Megállapítottuk, hogy az eltérő zsírsavlánc telítettség eltérő rendezettséget mutat alacsony hőmérsékleten a tilakoid lipid diszperziókban. Teljes membrán szinten azonban nem találtunk szignifikáns különbséget. Következésképpen igazoltuk, hogy a membrán szintű hőmérséklet adaptációra képes szervezet a membrán fluiditás különféle eredetű perturbációját képes kompenzálni, ezáltal az eredő membrán fluiditást közel állandó szinten tartani.

8. IRODALOMJEGYZÉK

- Allen, M.M. (1968) Simple conditions for growth of unicellular blue-green alga on plates. *J. Phycol.* **4**, 1-4
- Arnon, D.I., McSwain, B.D., Tsujimoto, H.Y. and Wada, K. (1974) Photochemical activity and components of membrane preparations from blue-green algae. I. Coexistence of two photosystems in relation to chlorophyll *a* and removal of phycocyanin, *Biochim. Biophys. Acta* **357**, 231-245
- Berliner, L.J., ed. (1976, 1979) *Spin Labeling Theory and Applications*. Academic Press, New York.
- Berry, J.A. and Björkman, O. (1980) Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants, *Annu. Rev. Plant Physiol.* **31**, 491-543
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911-917
- Brophy, P.J., Horváth, L.I. and Marsh, D. (1984) Stoichiometry and specificity of lipid-protein interaction with myelin proteolipid protein studied by spin-label electron spin resonance, *Biochemistry* **23**, 860-865
- Brotherus, J.R., Griffith, O.H., Brotherus, M.O., Jost, P.C., Silvius, J.R. and Hokin, L.E. (1981) Lipid-Protein Multiple Binding Equilibria in Membranes, *Biochemistry* **20**, 5261-5267.
- ▼ Cantrell, A. and Bryant, D.A. (1987) Molecular cloning and nucleotide sequence of the *psaA* and *psaB* genes of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002, *Plant. Mol. Biol.* **9**, 453-468.
- Chapman, D.J., De-Felice, J. and Barber, J. (1983) Growth temperature effects on thylakoid membrane lipid and protein content of pea chloroplasts, *Plant Physiol.* **72**, 225-228
- Chapman, D. and Hayward, J.A. (1985) New Biophysical Techniques and their Application to the Study of Membranes, *Biochem. J.* **228**, 281-295.
- Chapman, D. and Quinn, P.J. (1976) A method for the modulation of membrane fluidity: Homogeneous catalytic hydrogenation of phospholipids and phospholipid-water model biomembranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **73**, 3971-3975
- Cramer, W.A., Whitmarsh, J. and Low, P.S. (1981) Differential scanning calorimetry of chloroplast membranes: identification of an endothermic transition associated with the water-splitting complex of photosystem II, *Biochemistry* **20**, 157-162
- Dalton, L.R. (1985) *EPR and advanced EPR studies of biological systems, Order parameters*, CRC Press Florida, pp. 80-92.
- Davison, I.R. (1991) Environmental effects on algal photosynthesis temperature, *J. Phycol.* **27**, 2-8
- Davoust, J. and Devaux, P.F. (1982) Simulation of electron spin resonance spectra of spin-labelled fatty acids covalently attached to the boundary of an intrinsic membrane protein. A chemical exchange model, *J. Magn. Reson.* **48**, 475-494
- Ellena, J.F., Blazing, M.A. and McNamee, M.G. (1983) Lipid-protein interactions in reconstituted membranes containing acetylcholine receptor, *Biochemistry* **22**, 5523-5535
- Ford, R. and Barber, J. (1983) Time dependent decay and anisotropy of fluorescence from diphenylhexatriene embedded in the chloroplast thylakoid membrane, *Biochim. Biophys. Acta* **722**,

- Fraenkel, G.K. (1967) Linewidths and frequency shifts in electron spin resonance spectra, *J. Phys. Chem.* **71**, 139.
- Freed, J.H., (1964) Anisotropic rotational diffusion and electron resonance linewidths, *J. Chem. Phys.* **41**, 2077
- Goedheer, J.C. (1976) Spectral properties of the blue-green algae *Anacystis nidulans* grown under differential environmental conditions, *Photosynthetica*, **10**, 411-422
- Gombos, Z., Kis, M., Páli, T. and Vigh, L. (1987a) Nitrate starvation induces homeoviscous regulation of lipids in the cell envelope of the blue-green alga, *Anacystis nidulans*, *Eur. J. Biochem.* **165**, 461-465
- Gombos, Z., Szalontai, B., Surányi, Gy. and Csatorday, K. (1987b) Selective alteration of the pigment composition of the blue-green alga, *Anacystis nidulans*, *Photochem. Photobiol.* **45**, 399-402
- Gombos, Z. and Vigh, L. (1989) Homeoviscous regulation of membrane physical state in the blue-green alga, *Anacystis nidulans*, In: *Biological role of plant lipids* (Biacs, P.A., Gruiz, K. and Kremmer, T. eds.) Akadémiai Kiadó, Budapest, pp. 545-548
- Gombos, Z., Barabás, K., Joó, F. and Vigh, L. (1988) Lipid saturation induced microviscosity *Plant. Physiol.* **86**, 335-337
- Gombos, Z., Wada, H. and Murata, N. (1991) Direct evaluation of effects of fatty-acid unsaturation on the thermal properties of photosynthetic activities, as studied by mutation and transformation of *Synechocystis* PCC 6803, *Plant Cell Physiol.* **32**, 205-211
- Gombos, Z., Wada, H. and Murata, N. (1992) Unsaturation of fatty acids in membrane lipids enhances the tolerance of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 to low temperature photoinhibition, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 9959-9963.
- Gounaris, K., Brain, A.P.R., Quinn, P.J. and Williams, W.P. (1983) Structural and functional changes associated with heat-induced phase-separations of non-bilayer lipids in chloroplast thylakoid membranes, *FEBS Lett.* **153**, 47-52
- Hellergren, J., Lundborg, T. and Widell, S. (1984) Cold acclimation in *Pinus silvestris*: phospholipids in purified plasma membranes from needles of pine, *Physiol. Plant.* **62**, 162-166
- Henderson, R. and Unwin, P. (1975) Three Dimensional Model of Purple Membrane Obtained by Electron Microscopy, *Nature* **257**, 28-32.
- Horváth, I., Vigh, L. and Farkas, T. (1981) The manipulation of polar headgroup composition of phospholipids in the wheat *Miranoovskaja* 808 affects frost tolerance, *Planta* **151**, 103-108
- Horváth, G., Droppa, M., Szito, T., Mustárdy, L.A., Horváth, L.I. and Vigh, L. (1986) Homogeneous catalytic hydrogenation of lipids in the photosynthetic membrane: effects on membrane structure and photosynthetic activity, *Biochim. Biophys. Acta* **849**, 325-336
- Horváth, L.I., Brophy, P.J. and Marsh, D. (1988) Exchange rates at the lipid-protein interface of myelin proteolipid protein studied by spin-label electron spin resonance, *Biochemistry* **27**, 46-52
- Horváth, L.I., Dux, L., Hankovszky, H.O., Hideg, K. and Marsh, D. (1990) Saturation Transfer Electron Spin Resonance of Ca²⁺-ATP-ase Covalently Labelled with -substituted Vinyl Ketone and

- Maleimide-Nitroxide Derivatives: Effect of Segmental Motion and Labelling Levels, *Biophysical J.* **58**, 231-234.
- Hughly, S., Kunst, L., Browse, J. and Somerville, C. (1989) Enhanced thermal tolerance of photosynthesis and altered chloroplast ultrastructure in a mutant of *Arabidopsis* deficient in lipid desaturation, *Plant Physiol.* **90**, 1134-1142
- Jackson, M.B. and Sturtevant, J.M. (1978) Phase Transitions of the Purple Membranes of *Halobacterium halobium*, *Biochemistry* **17**, 911-915.
- Joó, F., Balogh, N., Horváth, L.I., Filep, Gy., Horváth, I. and Vigh, L. (1991) Complex hydrogenation/oxidation reactions of the water-soluble hydrogenation catalyst palladium di(sodium alizarinmonosulfonate) and details of homogeneous hydrogenation of lipids in isolated biomembranes and living cells, *Anal. Biochem.* **194**, 34-40
- Jost, P., Libertini L.J., Hebert V.C. and Griffith O.H. (1971) Lipid Spin Labels in Lecithin Multilayers. A Study of Motion Along Fatty Acid Chains, *J. Mol. Biol.* **59**, 77-98.
- Jost, P.C., Griffith, O.H., Capaldi, R.A. and Vanderkooi, G.A. (1973) Evidence for boundary lipid in membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **70** 4756-4763.
- Kenrick, J. R. and Bishop, D. G. (1986) The fatty acid composition of phosphatidyl glycerol and sulfoquinovosyl diacyl glycerol of higher plants in relation to chilling sensitivity, *Plant Physiol.* **81**, 946-949
- Kenyon, C.N., Rippka, R. and Stanier, R.Y. (1972) Fatty acid composition and physiological properties of some filamentous blue-green algae, *Arch. Microbiol.* **83**, 216-236
- Kivelson, D. (1957) Theory of the effects of exchange on the nuclear fine structure in the paramagnetic resonance spectra of liquids, *J. Chem. Phys.* **27**, 1087
- Kivelson, D. (1960) Theory of ESR Linewidths of Free Radicals. *J. Chem. Phys.* **33**, 1094-1107.
- Knowles, P.F. and Marsh, D. (1991) Magnetic resonance of membranes, *Biochem. J.* **274**, 625-641.
- Knowles, P.F., Marsh, D. and Rattle, H.W.E., eds. (1976) *Magnetic Resonance of Biomolecules*, John Wiley, London.
- Koole, P., Dammers, A.J., Van Ginkel, G. and Levine, Y.K. (1984) Slow motion ESR spectra of cholestane spin labels in polar multibilayers of diacyldigalactosyl-diglycerides, *Biochim. Biophys. Acta* **777**, 297-305
- Kunst, L., Browse, J. and Somerville, C. (1989) Enhanced thermal tolerance in a mutant of *Arabidopsis* deficient in palmitic acid unsaturation, *Plant Physiol.* **91**, 401-408
- Lange, A., Marsh, D., Wassmer, K.-H., Meier, P. and Kothe, G. (1985) Electron Spin Resonance of Phospholipid Membranes Employing a Comprehensive Line-Shape Model, *Biochemistry* **24**, 4383-4392.
- Laskay, G. and Lehoczki, E. (1986) Correlation between linoleic-acid deficiency in chloroplast membrane lipids and decreasing photosynthetic activity in barley, *Biochim. Biophys. Acta* **849**, 77-84.
- Li, G., Knowles, P.F., Murphy, D.J., Nishida, I. and Marsh, D. (1989) Spin-Label ESR Studies of Lipid-Protein Interactions in Thylakoid Membranes, *Biochemistry* **28** 7446-7452.

- Li, G., Knowles, P.F., Murphy, D.J. and Marsh, D. (1990) Lipid-Protein Interactions in Thylakoid Membranes of Chilling-resistant and -sensitive, Plants Studied by Spin Label Electron Spin Resonance Spectroscopy *J. Biol. Chem.* **265** 16867-16872.
- Lyons, J.M. (1973) Chilling injury in plants, *Annu. Rev. Plant Physiol.* **24**, 445-466
- Low, P.S., Ort, D.R., Cramer, W.A., Whitmarsh, J. and Martin, B. (1984) Search for an endotherm in chloroplast lamellar membranes associated with chilling-inhibition of photosynthesis, *Arch. Biochem. Biophys.* **231**, 336-344
- Lynch, D.V. and Steponkus, P.L. (1987) Plasma membrane lipid alterations associated with cold acclimation of winter rye seedlings (*Secale cereale L. cv Puma*), *Plant Physiol.* **83**, 761-767
- Madden, T.D., Hope, M.J. and Cullis, P.R. (1983) Lipid requirements for coupled cytochrome oxidase vesicles, *Biochemistry* **22**, 1970-1974
- Marsh, D. (1985) ESR Spin Label Studies of Lipid-Protein Interactions In: *Progress in Protein-Lipid Interactions* (Watts, De Pont eds.) Elsevier Science Publishers B.V. pp. 143-172.
- Marsh, D. (1988) Molecular Mobility in Membranes. In: *Physical Properties of Biological Membranes and Their Functional Implications* (Hidalgo, C., ed.), Plenum Press, New York, pp. 123-145.
- Marsh, D. and Horváth, L.I. (1989) Spin-Label Studies of the Structure and Dynamics of Lipids and Proteins in Membranes. In: *Advanced EPR Applications in Biology and Biochemistry* (Hoff, A.J., ed.), Elsevier, Amsterdam, pp. 707-752.
- McConnell, H.M. and McFarland, B.G. (1970) Physics and chemistry of spin labels, *Q. Rev. Biophys.* **3**, 91-136.
- Miller, M., Pedersen, J.Z. and Cox, R.P. (1988) Effect of Growth Temperature on Membrane Dynamics in a Thermophilic Cyanobacterium: a Spin Label Study *Biochim. Biophys. Acta* **943** 501-510.
- Moser, M., Marsh D., Meier, P., Wassmer, K.-H. and Kothe, G. (1989) Chain Configuration and Flexibility Gradient in Phospholipid Membranes. Comparison between Spin-Label Electron Spin Resonance and Deuteron Nuclear Magnetic Resonance, and Identification of New Conformations. *Biophys. J.* **55**, 111-123.
- Murata, N., Sato, N., Omata, T. and Kuwabara, T. (1981) Separation and characterization of thylakoid and cell envelope of the blue-green alga (cyanobacterium) *Anacystis nidulans*, *Plant and Cell Physiol.* **22**(5) 855-866.
- Murata, N. and Yamaya, J. (1984) Temperature dependent phase behavior of phosphatidylglycerols from chilling-sensitive and chilling-resistant plants, *Plant Physiol.* **74**, 1016-1024
- Murata, N. (1989) Low temperature effects on cyanobacterial membranes, *J. Bioenerg. Biomembr.* **21**, 61-75
- Murata, N., Higashi, S.I. and Fujimura, Y. (1990) Glycerolipids in various preparations of photosystem II from spinach chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta* **1019**, 261-268
- Murphy, D.J. and Woodrow, I.E. (1983) Lateral heterogeneity in the distribution of thylakoid membrane lipid and protein components and its implications for the molecular organisation of photosynthetic membranes, *Biochim. Biophys. Acta* **725**, 104-112

- Murphy, D.J. (1986) The molecular organisation of the photosynthetic membranes of higher plants, *Biochim. Biophys. Acta* **864**, 33-94
- Nishida, I and Yamada, M. (1985) Semisynthesis of a spin-labeled monogalactosyldiacylglycerol and its application to the assay for galactolipid-transfer activity in spinach leaves, *Biochim. Biophys. Acta* **813**, 298-306
- Oquist, G. (1982) Seasonally induced changes in acyl lipids and fatty acids of chloroplast thylakoids of *Pinus silvestris*, *Plant. Physiol.* **69**, 869-875
- Pakrasi, H.B., Diner, B.A. Williams, J.G.K., Arntzen, C.J. (1989) Deletion mutagenesis of the cytochrome b₅₅₉ protein inactivates the reaction center of photosystem II, *The Plant Cell* **1**, 591-597
- Peterson, G.L. (1977) A simplification of the protein assay method Lowry *et al.* which is more generally applicable, *Anal. Biochem.* **83**, 346-353
- Pick, U., Gounaris, K., Weiss, M. and Barber, J. (1985) Tightly bound sulpholipids in chloroplast CF₀-CF₁, *Biochim. Biophys. Acta* **808**, 415-420
- Quinn, P.J. (1989) Principles of membrane stability and phase behavior under extreme conditions, *J. Bioenerg. Biomem.* **21**, 3-19
- Quinn, P.J., Joó, F. and Vigh, L. (1989) The role of unsaturated lipids in membrane structure and stability, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **53**, 71-103
- Raison, J.K. (1973) The influence of temperature-induced phase changes on the kinetics of respiratory and other membrane-associated enzyme systems, *J. Bioenerg.* **4**, 285-309
- Raison, J.K., Roberts, J.K.M. and Berry, J.A. (1982) Correlation between the thermal stability of chloroplast (thylakoid) membranes and the composition and fluidity of their polar lipids upon acclimation of higher plant, *Nerium oleander*, to growth temperature, *Biochim. Biophys. Acta* **688**, 218-228
- Redfield, A.G., (1965) The theory of relaxation processes, *Adv. Magn. Reson.* **1**, 1-32.
- Restall, C.J., Williams, P., Percival, M.P., Quinn, P.J. and Chapman, D. (1979) The modulation of membrane fluidity by hydrogenation process III. The hydrogenation of biomembranes of spinach chloroplasts and a study of the effect of this on photosynthetic electron transport, *Biochim. Biophys. Acta* **555**, 119-130
- Sato, N. and Murata, N. (1980) Temperature shift-induced responses in lipids in the blue-green alga, *Anabaena variabilis*. The central role of diacylmonogalactosylglycerol in thermo-adaptation, *Biochim. Biophys. Acta* **619**, 353-366
- Sato, N., and Murata, N. (1988) Membrane lipids, *Meth. Enzymol.* **167**, 251-259
- Saupe, A. (1964) Kernresonanzen in kristallinen Flüssigkeiten und kristallin-flüssigen Lösungen, Teil I, *Z. Naturforsch.* **19A**, 161-171.
- Schlame, M., Horváth, L.I. and Vigh, L. (1990) Relationship between lipid saturation and lipid-protein interaction in liver mitochondria modified by catalytic hydrogenation with reference to cardiolipin molecular species, *Biochem. J.* **265**, 79-85
- Schreier, S., Polnaszek, C.F. and Smith, I.C.P., (1978) Spin labels in membranes. Problems in practice, *Biochim. Biophys. Acta* **515**, 395-436.

- Shinitzky, M. and Barenholz, Y. (1978) Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization, *Biochim. Biophys. Acta* **515**, 367-394
- Sinensky, M. (1974) Homeoviscous adaptation - A homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **71**, 522-525
- Singer, S.J. and Nicolson, G.L. (1972) The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science* **175**, 720-731.
- Somerville, C. and Browse, J. (1991) Plant lipids: Metabolism, mutants and membranes, *Science* **252**, 80-87
- Stainer, G. (1988) Fine structure of cyanobacteria, *Meth. Enzymol.* **167**, 157-172
- Stone, T.J., Buckman, T., Nordio P.L., and McConnell, H.M., (1965) Spin-labeled biomolecules, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **54**, 1010.
- Szalontai, B., Droppa, M., Vigh, L., Joó, F. and Horváth, G. (1986) Selectivity of homogeneous catalytic hydrogenation in saturation of double bonds of lipids in chloroplast lamellae, *Photobiochem. Photobiophys.* **10**, 233-240
- Taylor, M.G. and Smith, I.C.P. (1980) The Fidelity of Responses by Nitroxide Spin Probes to Changes in Membrane Organization. The Condensing Effect of Cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta* **599**, 140-149.
- Taylor, K., Dux, L. and Martonosi, A. (1984) Structure of Vanadate-Induced Crystals of Sarcoplasmic Ca²⁺-ATPase. *J. Mol. Biol.* **174**, 193-204.
- Thomas, P.G., Quinn, P.J. and Williams, W.P. (1986a) The origin of photosystem-I-mediated electron transport stimulation in heat stressed chloroplasts, *Planta* **167**, 133-139
- Thomas, P.G., Dominy, P.J., Vigh, L., Mansourian, A.R., Quinn, P.J. and Williams, W.P. (1986b) Increased thermal stability of pigment-protein complexes of pea thylakoids following catalytic hydrogenation of membrane lipids, *Biochim. Biophys. Acta* **849**, 131-140
- Vigh, L. and Joó, F. (1983) Modulation of membrane fluidity by catalytical hydrogenation affects the chilling susceptibility of the blue-green alga, *Anacystis nidulans*, *FEBS Lett.* **162**, 423-427
- Vigh, L., Horváth, I., Van Hasselt, P.R. and Kuiper, P.J.C. (1985a) Effect of frost hardening on lipid and fatty acid composition of chloroplast thylakoid membranes in two wheat varieties of contrasting hardiness, *Plant Physiol.* **79**, 756-759
- Vigh, L., Joó, F., Droppa, M., Horváth, L. and Horváth, G. (1985b) Modulation of chloroplast membrane lipids by homogeneous catalytic hydrogenation, *Eur. J. Biochem.* **147**, 477-481
- Vigh, L., Gombos, Z. and Joó, F. (1985c) Selective modification of cytoplasmic membrane fluidity by catalytic hydrogenation provides evidence on its primary role in chilling susceptibility of the blue-green alga *Anacystis nidulans*, *FEBS Lett.* **191**, 200-204
- Vigh, L., Gombos, Z., Horváth, I. and Joó, F. (1989) Saturation of membrane lipids by hydrogenation induces thermal stability in chloroplast inhibiting the heat-dependent stimulation of photosystem I mediated electron transport, *Biochim. Biophys. Acta* **979**, 361-364
- Vigh, L., Horváth, I., Joó, F. and Thompson, G.A., Jr. (1987) The hydrogenation of phospholipid

- bound unsaturated fatty acids by homogeneous palladium catalyst, *Biochim. Biophys. Acta* **921**, 167-174
- Vigh, L., Los, D.A., Horváth, I. and Murata, N. (1993) The primary signal in the biological perception of temperature: Pd-catalyzed hydrogenation of membrane lipids stimulated the expression of the *desA* gene in *Synechocystis* PCC6803, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 9090-9094.
- Wada, H. and Murata, N. (1990) Temperature-induced changes in the fatty acid composition of the cyanobacterium, *Synechocystis* PCC 6803, *Plant Physiol.* **92**, 1062-1069
- Wada, H., Gombos, Z., Sakamoto, T. and Murata, N. (1992) Genetic manipulation of desaturation of fatty acids in membrane lipids in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803, *Plant. Cell Physiol.* **33**, 535-540
- Wada, H. and Murata, N. (1989) *Synechocystis* PCC6803 mutants defective in desaturation of fatty acids, *Plant Cell Physiol.* **30**, 971-978
- Wada, H., Gombos, Z. and Murata, N. (1990) Enhancement of chilling tolerance of a cyanobacterium by genetic manipulation of fatty acid desaturation, *Nature* **347**, 200-203.
- Wada, H., Gombos, Z. and Murata, N. (1994) Contribution of membrane lipids to the ability of the photosynthetic machinery to tolerate temperature stress, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 4273-4277.
- Watanabe, T., Fukushima, H., Kasai, R. and Nozawa, Y. (1981) Studies on thermal adaptation in *Tetrahymena* membrane lipids changes in positional distribution of fatty acids in diacyl-phospholipids and alkyl-acyl phospholipids during temperature acclimation, *Biochim. Biophys. Acta* **665**, 66-73
- Watson, K. (1980) Homeoviscous adaptation in psychrophilic, mesophilic and thermophilic yeasts. In: *Membrane Fluidity: Biophysical techniques and cellular regulation*, (Kates, M. and Kuksis, A. eds.) The Humana Press, Inc., Clifton, New Jersey, pp. 349-361
- Wilson, J.M. and Crawford, R.M.M. (1974) The acclimatization of plants to chilling temperatures in relation to the fatty acid composition of leaf polar lipids, *New Phytol.* **73**, 805-820

Publikációs lista:

László Vigh, Csaba Lehel, Zsolt Török, Zoltán Gombos, Nándor Balogh, Ibolya Horváth (1990) Factors affecting thylakoid thermal stability in cyanobacterium, *Synechocystis* PCC 6803
In: *Plant Lipid Biochemistry, Structure and Utilization* (P.J. Quinn and J.L. Harwood eds.), Portland Press Limited, London, pp. 373-381.

Ferenc Joó, Nándor Balogh, László I. Horváth, György Filep, Ibolya Horváth, and László Vigh (1991) Complex hydrogenation/oxidation reactions of the water-soluble hydrogenation catalyst palladium di(sodium alizarinmonosulfonate) and details of homogenous hydrogenation of lipids in isolated biomembranes and living cells, *Analytical Biochemistry* **194**, 34-40.

László Vigh, Zsolt Török, Eszter Kovács, Attila Glatz, Nándor Balogh and Ibolya Horváth (1994) Thermal acclimation and heat stress response of *Synechocystis* PCC 6803: The possible role of thylakoid physical state, lipid saturation and molecular chaperones
In: *Biochemical and Cellular Mechanisms of Stress Tolerance in Plants* (J.H. Cherry ed.) NATO ASI Series, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 77-95.

Csaba Buda, Indranil Dey, Nándor Balogh, László I. Horváth, Katalin Maderspach, Miklós Juhász and Tibor Farkas (1994) Structural order of membranes and composition of phospholipids in fish brain cells during thermal acclimatization, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8234-8238.

Zsolt Török, Eszter Kovács, Ibolya Horváth, Nándor Balogh and László Vigh (1994) Growth temperature induced modulation of membrane fluidity in thylakoids of *Synechocystis* sp. PCC 6803, submitted

Nándor Balogh, Zsolt Török, Ibolya Horváth, László I. Horváth, Norio Murata and László Vigh (1994) Self-regulation of thylakoid membrane fluidity in mutant/transformant *Synechocystis* sp. PCC 6803 cells, deficient in polyunsaturated fatty acids, submitted

Nándor Balogh, Zsolt Török, Ibolya Horváth, Éva Petrényi, László I. Horváth and László Vigh (1994) Estimation of the effects of Pd-catalyzed hydrogenation on the membrane fluidity and pool size of protein immobilized lipids in thylakoids isolated from *Synechocystis* sp. PCC 6803, submitted

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Dolgozatomban az 1989 és 1994 között *Synechocystis* algákon végzett kutatásaim eredményeit összegeztem.

Köszönettel tartozom a Biofizikai Intézet igazgatóinak, Keszthelyi Lajosnak és Ormos Pálnak, hogy munkámat lehetővé tették.

Külön köszönet Horváth Lászlónak, tudományos témavezetőmnek, aki segítőkész hozzáállással és magas szakmai hozzáértéssel segített a felmerülő problémák megoldásában.

Köszönet Vigh Lászlónak, aki a tilakoid membránokat és lipid extraktumokat biztosította a mérésekhez és sokat segített a probléma biológiai oldalának megértésében.

Köszönet Páli Tibornak, a szakmai és baráti légkör megteremtésében.

Köszönet illeti Gombos Zoltánt, aki először ismertetett meg a *Synechocystis* tilakoidok rejtelseivel.

Köszönet Petrényi Lászlónénak a lelkiismeretes technikai segítségéért.

Végül köszönet mindazoknak, akik a kézirat elolvasásával és javaslataikkal járultak hozzá a dolgozat elkészítéséhez.

A TMB ösztöndíj és a Fiatal Kutatói Pályázat ösztöndíjának elnyerése nélkül a dolgozat nem jöhetett volna létre. A disszertáció megírását a Magyar Hitel Bank Rt. „A Magyar Tudományért” Alapítványa is támogatta.