

**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM**

Természettudományi és Informatikai Kar  
Biotechnológiai Tanszék

**MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA**

Szegedi Biológiai Kutatóközpont  
Növénybiológiai Intézet, Molekuláris Stressz- és  
Fotobiológiai Csoport

**Tudományos Diákköri Konferencia**  
Biológia

**D1 fehérjék összehasonlító vizsgálata  
különböző fényviszonyhoz alkalmazkodott  
cianobaktériumokban**

Készítette: Solymosi Dániel

MSc Biológia szakos, I évfolyamos hallgató

Témavezető: Dr. Kós Péter

Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Kutatóközpont  
Növénybiológia Intézet, Molekuláris Stressz- és Fotobiológiai Csoport  
Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar,  
Biotechnológiai Tanszék

**2014. őszi forduló**

# Tartalomjegyzék

|                                                                                  |           |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Tartalomjegyzék.....</b>                                                      | <b>2</b>  |
| <b>Összefoglalás .....</b>                                                       | <b>3</b>  |
| <b>Bevezetés .....</b>                                                           | <b>4</b>  |
| <i>Acaryochloris marina</i> .....                                                | 4         |
| Fotoszintetikus védelmi és akklimációs rendszerek.....                           | 6         |
| <b>Célkitűzések .....</b>                                                        | <b>8</b>  |
| <b>Anyagok és módszerek.....</b>                                                 | <b>10</b> |
| <i>In silico</i> tervezés.....                                                   | 10        |
| A rekombináns plazmidok létrehozása, klónozása <i>Escherichia coli</i> -ban..... | 11        |
| Cianobaktériumok transzformálása, tenyésztése.....                               | 15        |
| Fotoszintetikus aktivitás mérése.....                                            | 18        |
| OJIP tranziensek.....                                                            | 19        |
| Oxigénfejlődés mérése .....                                                      | 20        |
| <b>Eredmények megvitatása.....</b>                                               | <b>22</b> |
| <b>Köszönetnyilvánítás .....</b>                                                 | <b>24</b> |
| <b>Irodalomjegyzék .....</b>                                                     | <b>25</b> |
| <b>Tételes szakmai hozzájárulás .....</b>                                        | <b>28</b> |

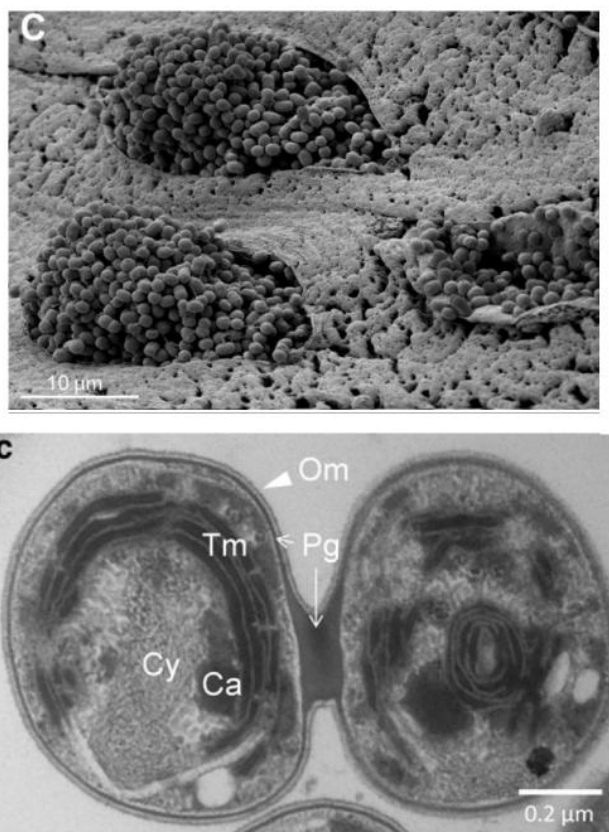
## Összefoglalás

Az *Acaryochloris marina* egysejtű cianobaktérium kivételes a fotoautotróf élőlények között. Legegyedibb tulajdonsága, hogy a fotoszintetikus centrumainak fő pigmentmolekulája a klorofill-d. Ez lehetővé teszi, hogy energiaforrásként a napfény infravörös közeli tartományát is hasznosítsa. Különleges tulajdonságai miatt világszerte számos kutatócsoportban vizsgálják a genomi összetételét, fotofiziológiás, fotoakklimációs tulajdonságait, pigmentösszetételét és a klorofill-d bioszintézist. Jelen dolgozat és kísérlet célja, hogy az *Acaryochloris marina* D1 fehérjéinek funkcióját és aktivitását megvizsgáljuk és összehasonlítsuk más cianobaktériumok D1 fehérjeivel és génjeivel. A vizsgált organizmus *psbA* génje 3 kópiában található a genomban. Ebből 2 kópia (AM1\_2166, AM1\_2889) nukleotidszekvenciája 97 %-ban, aminosav-szekvenciája pedig 100%-ban azonos egymással. A harmadik kópia (AM1\_0448) aminosav-szekvenciája csupán 61 %-os azonosságot mutat a többivel. Az aminosav-sorrend ilyen mértékű eltérése miatt a fehérje funkciója és működése kérdéses. A nagyfokú eltérés miatt a fehérje inaktív is lehet, ami a fotoszintetikus folyamatok szabályzásának, esetleg a fénygátlás kivédésének, illetve az *Acaryochloris marina* fényszegény környezethez való alkalmazkodásának egyik fontos eleme lehet. Például a *Thermosynechococcus elongatus* BP-1-ben ismert jelenség, hogy magas fényintenzitás hatására a PSII komplexben károsodott D1 fehérjét egy eltérő szekvenciájú kópiára cseréli, ami eltérő biofizikai tulajdonságokkal rendelkezik. Annak érdekében, hogy a két fehérjét külön tanulmányozhassuk, olyan cianobaktérium sejtvonalatokat kellett létrehozni, amiben csupán egy változat génje van jelen. Ezért az AM1\_0448 és AM1\_2166 *psbA* gént pPDF ingavektorba klónoztuk. A gének konstitutív expresszióját a plazmid *trc* promótere hajtja. A létrehozott plazmidkonstrukciókat D1 fehérjét kódoló géneket nem tartalmazó  $\Delta psbA$  *Synechocystis* sp. PCC6803 sejtekbe transzformáltam. A komplexek fotoszintetikus aktivitását  $O_2$  fejlődés mérésével és OJIP méréssel vizsgáltam, különös tekintettel arra, amelyik az AM1\_0448 *psbA* által kódolt D1 fehérjét tartalmazta.

## Bevezetés

### *Acaryochloris marina*

Az *Acaryochloris marina* MBIC11017 felfedezését 1997-ben publikálta először Miyashita és kutatócsoportja (Marquardt et al. 1997). A vonalat 1993-ban fedezték fel a nyugat csendes-óceáni Palau szigetekenél egy helytülő zsákállat, a *Lissoclinum patella* (Ascidiacea) külső és belső felszínén. Ez a cianobaktérium az eddig ismert egyetlen olyan fotoszintetizáló élőlény, melynek elsődleges pigmentmolekulája a klorofill d. Mostanáig 5 vonalat izoláltak és tenyésztettek sikeresen és számos filotípust különítettek el. Széles elterjedésüket és diverzitásukat tükrözi, hogy a fajt további alfajokra osztják (Loughlin, Lin, and Chen 2013).



1. ábra: **Elektronmikroszkópos felvételek az *Acaryochloris marina* cianobaktériumról.** A felső képen alginát polimer pórusaiban aggregálódott sejtek láthatóak. (SEM) Jelmagyarázat az alsó képhez (TEM): Om (külső membrán), Tm (tilakoid membrán) Cy (citoplazma), Ca (karboxiszóma), Pg (peptidoglikán) (Loughlin, Lin, and Chen 2013)



## Fotoszintetikus védelmi és akklimációs rendszerek

A tilakoidmembránba ágyazott fotoszintetikus fehérjekomplexek központi szerepet játszanak a fotoautotróf sejtek működésében. A fényfüggő reakciók zavartalan működése elengedhetetlen, hiszen a folyamatok során keletkező és elvezetett elektronok révén, illetve a protonok lumenbe juttatásával jön létre az ATP szintéziséhez szükséges  $H^+$ -grádiens, és a Calvin-ciklusban felhasználódó NADPH.

Ezen komplexek összetételének és működésének szabályozása létfontosságú a sejt számára. A különböző fényviszonyokhoz alkalmazkodott cianobaktériumok változatos szabályozási mechanizmusokat alkalmaznak a fénygátlás elkerülése érdekében. Ennek egyik fontos eleme, a D1 fehérje *de novo* szintézisének és degradációjának szabályozása. A cianobaktériumok az eukariótákkal ellentétben gyakran hordoznak több *psbA* gént, melyek elsősorban az intenzív D1 szintézishez biztosítanak transzkriptum állományt. Az egyes *psbA* gének szekvenciája olykor eltérő lehet, így a paralógok varianciája különböző biofizikai tulajdonságú D1 izoformákat eredményezhet. Különböző fényviszonyok esetén az eltérő D1 fehérjék szelektíven épülhetnek be a PSII komplexekbe és optimalizálhatják az fotoszintetikus elektrontraszport-folyamatokat.

1. táblázat: **A cianobakteriális fotoszintetikus komplexek.** A PSII komplex funkciója a víz fényindukált bontása, a töltésszétválasztás és a keletkező elektronok elvezetése. A PSII komplex működése sokrétű és bonyolult folyamat, melyben a D1 fehérjének kiemelt szerepe van (Vermaas 2001).

| Komplex | Kódoló gén neve | Egységei                 | Kofaktorok                                              | Funkció                                                    |
|---------|-----------------|--------------------------|---------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| PSII    | <i>psb</i>      | D1, D2, CP43, CP47, psbO | Mn, Ca, Cl, Fe, PQ, klorofill, cyt $b_{559}$ , feofitin | fényindukált vízbontás, töltésszétválasztás, PQ redukciója |
| PSI     | <i>psa</i>      | psaA, psaB               | klorofilok, K1 vitamin, FeS centrum                     | fényindukált PC/ cyt $c_{553}$ oxidáció, Fd redukció       |

A *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 cianobaktérium genomja például 3 kópiában tartalmazza a D1 fehérje génjét. UV-B és intenzív ( $500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) megvilágítás hatására a transzkriptumok legnagyobb része a *psbA3* génről íródik át, melynek terméke eltérő biofizikai tulajdonságokkal rendelkezik. A normál *psbA1*-ről átíródó D1 fehérje lecserélése megakadályozza a sejt károsodását, melyet a fotokémiai munkára nem fordítható, hő és fluoreszcens sugárzás formájában nem leadható többletenergiát okozna. (Kós et al. 2008)

Hasonló szabályozási elv érvényesül a *Synechococcus* sp. PCC7942 baktériumban, ahol szintén kétféle D1 izoforma található (génjeik a *psbAI*, *psbAII* és *psbAIII*). UV-B sugárzás és erős fehér fény ( $500\text{-}1000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) hatására a *psbAII*-ről és *psbAIII*-ról átíródó D1:2 forma szelektíven felváltja a *psbAI*-ről átíródó D1:1 típust (Sane et al. 2002). A csere érinti a töltésszétválasztás hatékonyságát és a töltésrekombinációt is.

A *Synechocystis* sp. PCC6803 genomjában szintén három kópiában található a D1 fehérje génje (*psbA1*, *psbA2* és *psbA3*). Itt azonban az *psbA* mRNS-ek több, mint 90%-át a *psbA2* és *psbA3* adja, expressziójukat egy fényre indukálódó, erős promóter szabályozza. A harmadik gén fehérjeszekvenciája némileg eltér a másik kettőtől, de ennek kifejeződése és funkciója is kérdéses. (Sicora et al. 2006)

Az *Acaryochloris marina* AM1\_0448 *psbA* génje olyan D1 fehérjét kódol, melynek aminosav-szekvenciája csupán 61 %-os azonosságot mutat a másik 2 D1 kópiával. Ha a divergens fehérje működésképtelen és képes beépülni a PSII komplexbe, akkor ez fotoszintetikus folyamatok szabályzásának és fénygátlás kivédésének eddig még ismeretlen formája. Habár a gén kifejeződésének mértéke UV-B vagy erős megvilágítás hatására jelentősen nem változott, mégis szerepet játszhat a fényszegény környezethez való alkalmazkodásban, esetleg 'rogue' D1 fehérjeként kapcsolatban állhat a nitrogén metabolizmussal is. (Kiss et al. 2012; Loughlin, Lin, and Chen 2013)

## Célkitűzések

Az *Acaryochloris marina* PSII komplexében található D1 fehérje génje több kópiában is jelen van a sejtben. Ebből a 2 kópia (AM1\_2166, AM1\_2889) által kódolt D1 fehérjék aminosav-szekvenciája teljesen azonos egymással. A harmadik, divergens fehérje (AM1\_0448) csupán 61 %-os aminosav-szekvencia azonosságot mutat a többivel és más cianobaktériumok D1 fehérjétől is jelentősen különbözik. A sejtben mindkét izoforma jelen van, ezért biofizikai tulajdonságaik külön-külön nem vizsgálhatóak. Annak érdekében, hogy a két fehérjét külön tanulmányozhassuk, olyan cianobaktérium sejtvonalatokat kellett létrehozni, amiben csupán egy változat génje van jelen. Ahhoz, hogy az *Acaryochloris marina* D1 fehérjének funkcióját és működőképességét megvizsgálhassuk, szükség van egy *psbA* gének nem tartalmazó, könnyen transzformálható és növeszthető, jól ismert PSII komplexel rendelkező cianobaktériumra. A D1 izoformák fotoszintetikus aktivitásából megállapíthatjuk, hogy képesek-e beépülni a PSII komplexbe, képesek-e részt venni a fotoszintetikus elektrontranszportban, és ha igen, milyen hatásfokkal. E gondolatmenet mentén a következő célt, lépéseket tűztük ki: Összehasonlítjuk az *A. marina* D1 illetve az azokat tartalmazó PSII komplexek fotoszintetikus tulajdonságait. Ehhez a vizsgálathoz olyan cianobaktériumokat állítunk elő, amelyek genetikai állományában csupán egyetlen *psbA* gén található.

Ezen cél eléréséhez az alábbi lépéseket terveztük végrehajtani:

- 1) Olyan rekombináns plazmidok tervezése és létrehozása, amelyek külön-külön tartalmazzák az *Acaryochloris marina* AM1\_2166, AM1\_0448 *psbA* gének, valamint a *Synechocystis* sp. PCC6803 saját *psbA2* génjét.
  - a) trc-0448psba-pDF, trc-2166psbA-pDF, trc-6803psba-pDF
- 2) A konstrukciók transzformálása kompetens *Escherichia coli* baktériumokba, a plazmidok sokszorozása, preparálása és tisztítása.
- 3) Transzgénikus cianobaktériumok létrehozása,  $\Delta psbA$  *Synechocystis* sp. PCC6803 transzformálása a klónozott plazmidokkal.
  - a) trc-0448psba-pDF/ trc-2166psbA-pDF/ trc-6803psba-pDF:: $\Delta psbA$  *Synechocystis* sp. PCC6803
- 4) A mutáns, transzgénikus cianobaktériumok a fotoszintetikus aktivitásának és a plazmidról kifejeződő D1 fehérjék vizsgálata biofizikai módszerekkel.

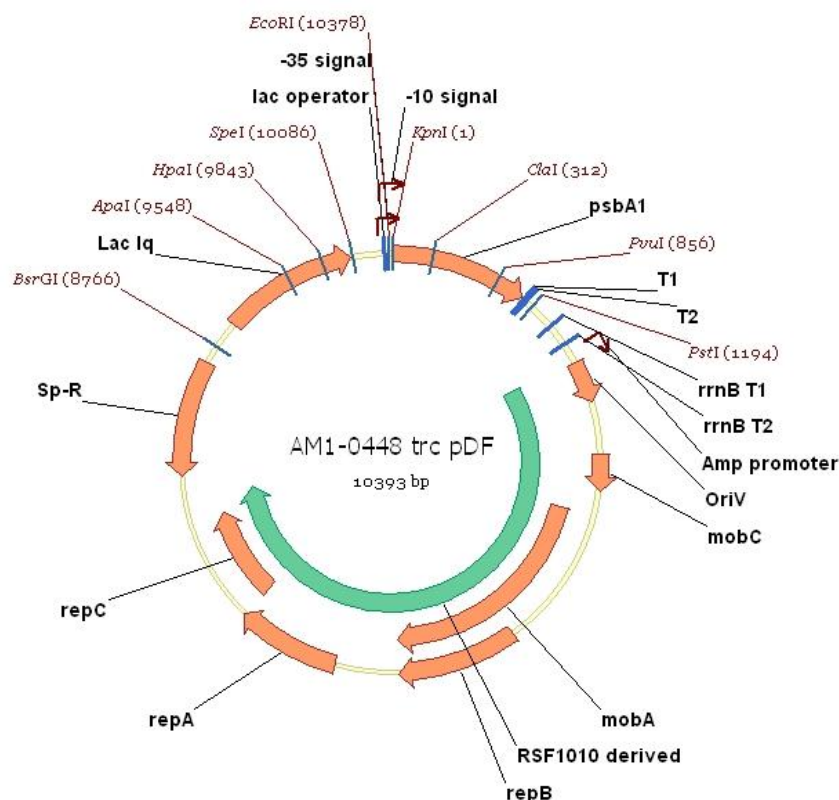
- a) A klorofill a fluoreszcenciájának meghatározása OJIP transziensek meghatározása által.
- b) A sejtek oxigén termelő képességének mérése.

## Anyagok és módszerek

### *In silico* tervezés

A munkáim során rendszeresen használtam a Vector NTI Advance® programot ami a klasszikus molekuláris biológiai munkafolyamatok megtervezése mellett modernebb technológiákhoz is segítséget nyújt.

Lehetőségünk van miRNS, shRNS interferenciapróba, qPCR primerpár és TaqMan® Gene Expression Assay megtervezésére. A programmal a DNS szekvenálás során leolvasott szakaszokat kontigokba illeszthetjük, gének jóslását és annotálását is elvégezhetjük. A DNS és aminosav szekvenciák kiterjedt vizsgálatát segíti, hogy számos külső adatbázissal és szolgáltatással van összekapcsolva (például GenBank, ExPASy, EMBL, BLAST).



3. ábra: Az AM1\_0448 psbA gént hordozó rekombináns plazmid. Az inszerttel együtt a gén transzlációs STOP (T1, T2) jelei is be lettek építve a plazmidba.

Megkönnyíti a szekvenciák többszörös (multiple alignment) és páros (pair-wise alignment) illesztését, DNS és fehérje motívumok keresését vagy a fehérjék háromdimenziós

szerkezetének jóslását. Én a PCR-hoz szükséges primerek termodinamikai paramétereinek kiszámolásához, a tesztelés várható fragmentumainak meghatározásához, valamint a rekombináns plazmid *in silico* létrehozásához használtam.

## **A rekombináns plazmidok létrehozása, klónozása *Escherichia coli*-ban**

A plazmidokat klasszikus molekuláris biológiai módszerekkel hoztam létre (Sambrook and Russell 2001). Az *E. coli* tenyészetekhez LB (Lysogeny Broth) és TB (Terrific Broth) tápoldatot, valamint LB szilárd agarlemezt használtunk. (Bertani 1951; Hobbs, K. D. Tartof 1987) A tenyészeteket 37°C-on növesztettük, a folyadékkultúrákat 250 rpm sebességgel rázattuk. A kísérletek során a PCR-okhoz minden esetben a Bioer Technology Co. Ltd. által gyártott TC-24/H(b) típusú Thermo Cyclert használtuk. A transzformáns *E. coli* kolóniákkal elvégzett colonyPCR-okhoz Taq Polymerase Mastermixet (Thermo Scientific) használtunk, a klónozásra szánt DNS fragmentumokat pedig a Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase és Phire Hot Start Green DNA Polymerase (Thermo Scientific) enzimekkel amplifikáltuk. A gélelektroforézishez minden esetben 0,8 % agaróz gél-t öntöttünk (SeaKem® LE Agarose), pufferként 1x TBE (TRIS-borát-EDTA) oldatot használtunk. Az elválasztásokat Cleaver Scientific mini, midi kádjaiban omniPAC CS-500V MAXI áramforrással végeztük. A nukleinsavakat GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain-el (Lonza) festettük, markerként az O'GeneRuler #SM1163 (Thermo Scientific) létrát használtuk.

Az inszertek amplifikálását és az ehhez szükséges primerek megtervezését a csoportom más tagjai végezték el. Templátként az *Acaryochloris marina* MBIC11017 genomi DNS-e szolgált, a polimerizációt a Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase katalizálta. A termékek tisztítását a GeneJET PCR Purification Kit segítségével a gyártó utasítása alapján végezték el. Az inszertek 3' végét FastDigest KpnI, az 5' végét SpeI restrikciós endonukleázzal emésztették a gyártó (Fermentas) utasítása szerint. A KpnI saját puffer oldatában is csak 20-50 %-os hatékonysággal működik, ezért használták a FastDigest KpnI változatát, ami egy nagyobb hatásfokkal vágó enzim.

2. táblázat: **A vizsgálandó géneket tartalmazó rekombináns plazmidok.** A restrikciós térképezésnél a *HindIII*, *HincII* és *BstEI* enzimekkel az inszert meglétét igazoltuk, az *NcoI* a vektort vágta fragmentumokra.

| Gén neve             | Inszert mérete (bázispár) | Plazmid neve     | Mérete (bp) | Ellenőrzéshez használt enzimek |
|----------------------|---------------------------|------------------|-------------|--------------------------------|
| AM1_0448 <i>psbA</i> | 1313                      | trc-0448psbA-pDF | 10393       | NcoI, HindIII                  |
| AM1_2166 <i>psbA</i> | 1302                      | trc-2166psbA-pDF | 10382       | NcoI, HincII                   |
| slr1311 <i>psbA2</i> | 1217                      | trc-6803psbA-pDF | 10297       | NcoI, BstEI                    |

A géneket egy spanyol kutatócsoport által megalkotott cianobakteriális ingavektorral juttatuk a sejtekbe (Guerrero et al. 2012). A vektort 3 változatban kaptuk meg, különböző promóterekkel ellátva. A  $P_{lac}$  IPTG, míg a  $P_{coa}$   $Co^{2+}$  hatására iniciálja az általa szabályozott gén expresszióját, de céljainak a konstitutív kifejeződést biztosító  $P_{trc}$  felelt meg a legjobban. Az EFEh (etylene-forming enzyme) gént a FastDigest KpnI és PstI enzimek segítségével irányítottan cseréltük le az általunk vizsgálni kívánt fehérjék génjeire. pDF-trc-EFEh plazmidot a két endonukleázzal 37°C-on egy órán át emésztettem. Az reakció lejátszódása után az enzimeket egy 80°C-os, 20 perces lépéssel inaktiváltam. Az emésztési elegyet agaróz gélre felvittem, a fragmentumokat gélelektroforézissel 70 V-on elválasztottam. A ~9080 bázispár hosszúságú fragment az EFEh nélküli lineáris pDF-nek felel meg. Ezt a sávot steril pengével kivágtam, a DNS-t GenElute™ Gel Extraction Kittel izoláltam a gélből és megmértem a koncentrációját.. Az agaróz gélből DNS-t izolálni veszteséges folyamat, a feltöltött DNS több mint a fele elveszik, így a kapott oldatok nagyrészt alacsony koncentrációjúak. Ez a ligálási elegy összeállításánál hátrányos lehet, ezért az oldatot vákuumszáritóval töményítettem.

A pDF/KpnI; PstI fragmentet ligáltam külön-külön az AM1\_2166, az AM1\_0448 és a *Synechocystis psbA2* génjével. A reakciót 37°C-on egy órán át végeztem a Fermentas T4 Nucleotide Ligase enzimmal. Az elegyet a szerző utasítása alapján állítottam össze.

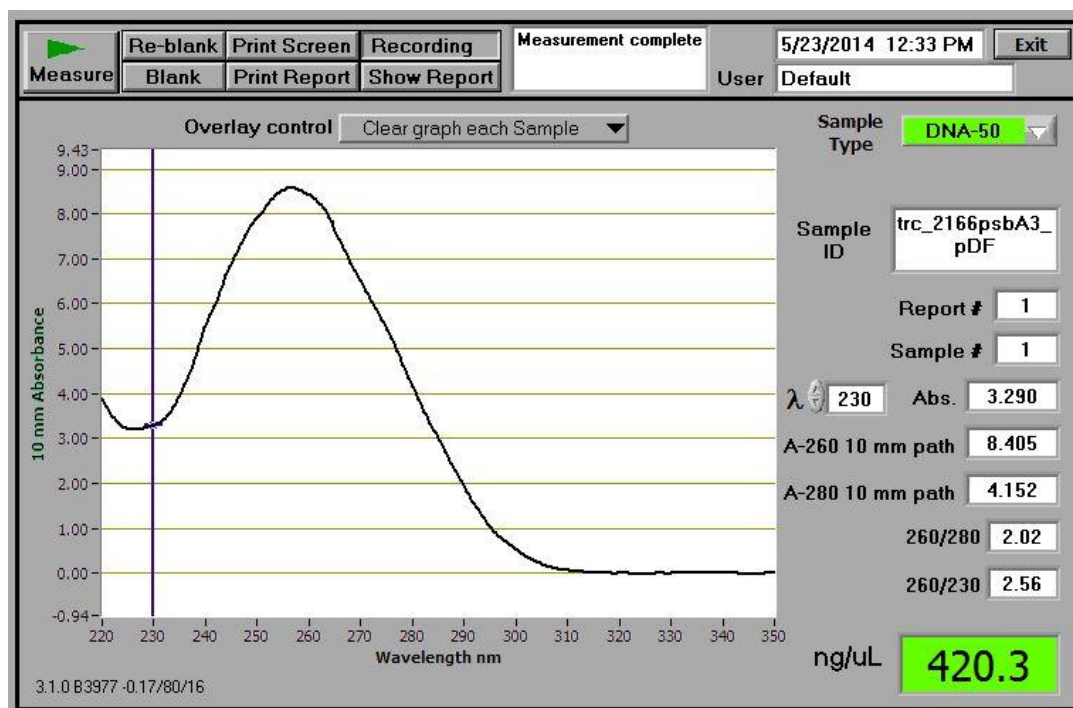
2. táblázat: **A kísérletek során használt *Escherichia coli* vonalak.** Az XL1 Blue vonal kanamicin-rezisztens, az F plazmidon hordozott Tn10 operonnak köszönhetően. A sejt vonal hsdR17 (EcoKI), recA1 (rekombinááz) és endA1 (endonukleáz) mutációinak köszönhetően könnyebben transzformálható, a plazmidpreparálások hozama pedig nagyobb. A DH5  $\alpha$  a konjugációhoz használt sejt vonal. A pRK2013 plazmidon hordozza a konjugációhoz szükséges mob és tra régiókat valamint a kanamicin rezisztenciáért felelős aminoglikozidázt.

| E. coli vonal neve | Genotípusa                                                                                                                                                                                                    |
|--------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| XL1-Blue           | endA1, gyrA96 (nal <sup>R</sup> ), thi-1, recA1, relA1, lac glnV44, hsdR17 (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ), F'[:Tn10, proAB <sup>+</sup> , lacI <sup>q</sup> , $\Delta$ (lacZ)M15] |
| DH5 $\alpha$       | supE44, $\Delta$ lacU169 ( $\Phi$ lacZ $\Delta$ M15), recA1, endA1, hsdR17, thi-1, gyrA96, relA1, pRK2013[:Km <sup>R</sup> oriColE1 RK2-Mob+ RK2-Tra+]                                                        |

A ligált konstrukciókat kémiaiilag kompetens *Escherichia coli* XL1 Blue és DH5- $\alpha$  sejtekbe transzformáltam. A sejtek kompetennsé tételét magam végeztem el a Molecular Cloning: A Laboratory Manual alapján (Sambrook and Russell 2001). A transzformációs hatékonyság normál körülmények között nevelt és tartott *E. coli*-nál alacsony, mivel a sejtek felszínén található lipopoliszacharidok, lipoproteinek ösztötlése negatív, ami taszítja a DNS makromolekulákat. Ezért a transzformálandó baktériumokat MgSO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub> és KCl tartalmú folyékony tápoldatban neveljük ~0,5 OD<sub>600</sub> értékig, alacsony (~20°C) hőmérsékleten. Az exponenciális növekedési fázisban lévő baktériumok sejtfala vékony, a sejtmembrán zsírsav-összetétele pedig az alacsony növekedési hőmérsékletnek köszönhetően olyan lesz, hogy a transzformálási hősök hatására fluiddá váljon. A sejtekkel szigorúan jégen dolgozunk, hogy a membrán még fluidabb legyen. A lefugált sejteket KOH, CaCl<sub>2</sub> és MnCl<sub>2</sub> tartalmú TB pufferoldatban felfuszpendáljuk és DMSO-t adunk az oldathoz. A Ca<sup>2+</sup> kovalensen köt a sejtfal egyes komponenseihez és képes a negatív töltésű nukleinsavak elektrosztatikus vonzására. A DMSO-nak (dimetil-szulfoxid) köszönhetően pedig a kompetens sejtjeinket tárolhatjuk -80 °C-on, mivel ez a vegyület megakadályozza a sejteket roncsoló jégkristályok kialakulását.

A kompetens *E. coli* XL1 Blue és DH5- $\alpha$  vonalat Pope B. 5 perces protokollja alapján transzformáltam. (Pope and Kent 1996) A jégen kiolvasztott baktériumokhoz ~200 ng rekombináns plazmidot adtam, majd az elegyet 5 percig jégen inkubáltam. Ezt 50  $\mu$ g/ml

spektinomicint tartalmazó, 37°C-ra előmelegített szelektív LB agarlemezre szélesztettem. A lemezen felnőtt kolóniákat izoláltam és folyékony LB+Spec tápoldatban 37 °C-on tovább növesztettem. A szelektív lemezek mellett minden esetben kontroll lemezeket is készítettem. A kiolvasztott sejtek életképességét 15 µg/ml tetraciklint tartalmazó LB lemezen teszteltem, a spektinomicin ellen kialakuló rezisztencia mutációs rátáját pedig LB+Spec lemezen becsültem meg.



4. ábra: **Az egyik rekombináns plazmid koncentrációjának mérése ND-1000 Spectrophotometerrel.** A nukleinsav oldatok tisztaságát általában az  $OD_{260}/OD_{280}$  és  $OD_{260}/OD_{230}$  alapján határozzuk meg. A leggyakoribb szennyeződések a fehérjék, szénhidrátok, EDTA, és a fenol. Ezen vegyületek 280 nm és 230 nm közelében erősen abszorbeálóak, a nukleinsavak pedig 260 nm-en mutatnak elnyelési maximumot, ezért ez a 2 hányados alkalmas a DNS és RNS oldatok tisztaságának meghatározására. Az ábrán látható preparátum igen tiszta, GeneJET Plasmid Midiprep Kittel készült.

A folyadékkultúrákból plazmid DNS-t preparáltam, a laborunkban általánosan használt 'plazmid boiling miniprep' módszer alapján. A módszer előnye, hogy gyors, magas hozamú a szükséges vegyszerek pedig olcsók. Hátránya, hogy a preparátum tisztasága rosszabb ( $\sim 1,5$   $OD_{260}/OD_{280}$ ) mint a kommerciális kittel készülték esetén. Az RNS szennyeződést RNáz H enzimmel, a sejtörmeléket pedig fenol-kloroform szerves folyadékfázis-extrakcióval távolítottam el. A kapott oldat nukleinsav-tartalmát fotometriásan, DNS tartalmát pedig

gélelektroforézissel ellenőriztem. Ha a gélen látszott a cirkuláris plazmidokra jellemző mintázat, akkor az adott minta szekvenciáját restrikciós endonukleázokkal ellenőriztem. A cianobaktériumok természetes transzformálásához és elektroporálásához viszonylag nagy mennyiségű plazmidra van szükség (1-10 µg/ml), ezért az igazoltan transzformáns kolóniákból a Thermo Scientific által gyártott és forgalmazott GeneJET Plasmid Midiprep Kit segítségével nagy mennyiségű és nagy tisztaságú plazmidot preparáltam.

## Cianobaktériumok transzformálása, tenyésztése

A *Synechocystis* genetikai módosítására számos jól kidolgozott, hatékony módszer létezik. Transzformálhatóak természetesen, konjugációval és elektroporációval is. Létrehozhatunk mutánsokat homológ rekombinációval, Tn5-transzpozon inszerciós mutagenézissel vagy fúziós PCR-rel. A *Synechocystis* fakultatív fotoheterotróf, tehát gyenge megvilágításnál képes a glükózt is szénforrásként felhasználni. (Berla et al. 2013; Nagarajan et al. 2014)

A kísérletek során felhasznált  $\Delta psbA$  *Synechocystis* sp. PCC6803 mutáns sejtvonalat Julian Eaton-Rye professzor bocsátotta rendelkezésünkre. A *psbA2* gént kloramfenikol kazettával helyettesítették, a *psbA1* és *psbA3* géneket pedig markermentes deléciós technikával ütötték ki. A mutáns és vad típusú cianobaktériumokat minden esetben 50 ml folyékony, standard BG-11 tápoldatban (Rippka et al. 1979) növesztettük  $40\mu\text{mol foton} \cdot (\text{m}^2)^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  fehér fényen, 3%-os  $\text{CO}_2$ -ra dúsított levegőben, 30°C-on egy Gallenkamp síkrázóban, ami a tenyészeteket 120 rpm sebességgel forgatta. Az oldatokhoz 5 mM glükózt és 20 µg/ml klórampfenikolt adtunk. A 25 ml-es BG-11 agarlemezeken növekvő sejteket minden esetben 30°C-on, fehér fényen tartottam. A tenyészetek növekedését fotometriásan követtük 720 nm-en egy Shimadzu UV-1601 típusú spektrofotométerrel.

A standard BG-11 agarlemezekben a cianobaktériumok számára optimális pH tartományt a HEPES (4-(2-hydroxietyl)-1-piperazin-etánszulfonát) pufferolja. Csoportunk vendégkutatóinak javaslatára a HEPES helyett kipróbáltuk a TES (2-[[1,3-dihidroxil-2-(hidroximetil)-propán-2-il]amino]-etánszulfonát) tartalmú BG-11 lemezt, illetve  $\text{NaHCO}_3$  hozzáadásával próbáltuk növelni a transzformáns cianobaktériumok életképességét és növekedési sebességét. Javaslatukat azzal indokolták, hogy a HEPES képes reaktív hidroxilgyökök képzésére, ami révén jelentős stresszforrás, csökkenti a megjelenő transzformáns kolóniák számát (Simpson et al. 1988). A csoportunk más tagjai változó HEPES

koncentrációjú BG-11 tápoldatban végeztek növekedési kísérleteket vad típusú és  $\Delta psbA$  *Synechocystis* mutánsal is, de jelentős eltérést a normál növekedéstől nem tapasztaltak.

A rekombináns plazmidok sejtbe juttatását először természetes transzformálással próbáltam. Az exponenciális növekedési fázisban (0,6-1,0 OD<sub>720</sub>) lévő  $\Delta psbA$  *Synechocystis* tenyészetből 3 ml-t lefugáltam és 200 µl friss BG-11 oldatban felfuszpendáltam. Ezután ~10 µg/ml koncentrációban (a lefugált kultúra térfogatára vonatkoztatva) hozzáadtam a bevinni kívánt plazmidot, majd 30°C-on, fényen tartva 100 rpm-es rázatással Bioer Rocker-Shakeren inkubáltam 5 óráig. Az elegyet antibiotikum-mentes BG-11 agarlemezre kiszélesztettem és egy napig 30°C-on fényen tartottam, hogy a transzformáns sejtek akkumulálják a plazmidról átíródó amidoglikozilázt (spektinomycinrezisztencia génjének terméke) és a transzformálás okozta stresszállapotot mérsékeljék. Másnap az agarlemez alá spektinomocint rétegeztem 15 µg/ml koncentrációban és 30°C-on, fényen tartva inkubáltam. A vad típusú *Synechocystis* duplázási ideje fehér fényen tartva, folyékony tápoldatban is ~6-12 óra, szilárd lemezen pedig még lassabban nőnek. A transzformáns kolóniák megjelenése ezért legalább egy hét. A megjelenő kolóniákat magasabb, 25 µg/ml spektinomycin koncentrációjú BG-11 lemezre átoltottam és újabb 1 hetet inkubáltam.

Ezen a lemezen megjelenő kolóniákat már folyékony 25 µg/ml spektinomycin koncentrációjú BG-11 oldatba oltottam át és a sejteket addig növesztettem, amíg a tenyészet ~0,5 OD<sub>720</sub> értéket elérte. Ebből 100 µl-t eppendorf csőben izoláltam, hogy a rekombináns plazmidok jelenlétét PCR segítségével is igazolni tudjam. Ahhoz, hogy a sejtől a plazmidokat kinyerhessem, fagyasztás-forralás módszerrel sejtfeltárást végeztem. A fagyasztás folyékony nitrogénben (legfeljebb -196°C), a forralás egy 95°C-ra melegített termosztátban történt, az extrém hőmérsékleti különbség miatt további detergensok, szerves oldószerek hozzáadására nincs szükség. Az oldatokból 1-1 µl-t templátként felhasználva elvégeztem a PCR-okat. A reakciókhoz Phire Hot Start DNA Polymerase enzimet használtam. Ez az enzim extrém pontosságú (a hibázási arány ~0,4\*10<sup>-7</sup>), magas processzivitással és robusztussággal jellemezhetjük. Az elongációs időket minden esetben az enzim ~20s/kb sebessége és az ampikon hossza alapján határoztam meg. Az enzimet egy előzetes, 98°C-os 1 perc hosszú lépéssel aktiváltam. A reakció után az elegyek DNS tartalmát 0,8 %-os agaróz gélen elektroforézissel vizsgáltam meg.

A természetes transzformálásnál legalább 1 nagyságrenddel hatékonyabb módszer az elektroporálás. A technika lényege, hogy a nagy ellenállású (legalább 600 Ω) oldatban felfuszpendált sejteknek egy rövid, nagyfeszültségű impulzust adunk. A sejtmembránon így

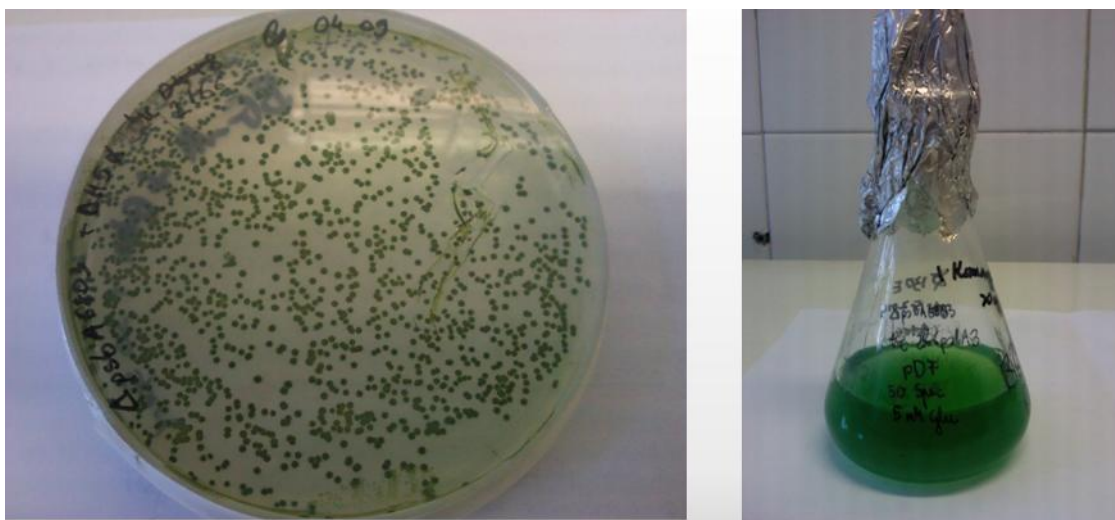
nanométeres nagyságrendű pórusok keletkeznek, amit víz tölt ki, ezen keresztül pedig a plazmidok szabadon a sejtbe diffundálhatnak. A technika egyik hátránya, hogy sejtípusonként optimalizálni kell. Cianobaktériumoknál ez már számos egysejtű és fonalas fajra megtörtént, így a *Synechocystis*nél is. A folyamathoz exponenciális növekedési fázisban lévő sejtenyészetet használtunk (jelen esetben 0,3-0,5 OD<sub>720</sub>). A tenyészetből OD<sub>720</sub>-tól függően 1 vagy 2 ml-t 4°C-on, 5000 g-vel lecentrifugáltunk. A sejteket fél térfogatnyi majd újabb centrifugálás után negyed térfogatnyi steril, jéghideg vízben átmostuk. Újabb centrifugálás után steril, desztillált vízben felszuszpendáltuk és 40 µl-t egy elektroporáló küvetába (BioRad Gene Pulser®, 0,2 cm) mértünk. A szuszpenzióhoz 2µg plazmidot adtam és 3 percig jégen inkubáltam. Az elektroporálás egy 4 ms-os 2,5 kV feszültségű impulzussal történt (a desztillált víz ellenállása 20°C-on 18 kΩ). A sejteket ezután 5 ml glükóz tartalmú BG-11 oldatban a fent leírtak szerint egy napig növesztettem, majd 25 µg/ml spektinomicint tartalmazó BG-11 lemezre szélesztettem.

3. táblázat: **A D1 fehérjék vizsgálatára létrehozott transzgénikus cianobaktériumok.** Általánosságban elmondható, hogy a transzformálás hatékonyságát csökkentette a rekombináns plazmid nagy mérete.

| Transzgénikus cianobaktérium neve                          | Sikeres transzformálás módja |
|------------------------------------------------------------|------------------------------|
| trc-0448psba-pDF in ΔpsbA <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 | konjugáció                   |
| trc-2166psba-pDF in ΔpsbA <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 | konjugáció                   |
| trc-6803psba-pDF in ΔpsbA <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 | természetes transzformálás   |

A fent leírt technikák relatív eredménytelensége miatt egy harmadik módszert, a konjugációt is kipróbáltam. Ennek lényege, hogy a transzformálandó ΔpsbA *Synechocystis* sejtekhez olyan *E. coli* sejteket keverünk, amely a rekombináns plazmid mellett „helper” plazmiddal is rendelkezik. A „helper” plazmid tartalmazza a konjugációhoz szükséges *mob* és *tra* régiókat, ellenben a rekombináns plazmiddal. A már transzformált DH5-α sejteket 5 ml 50 µg/ml spektinomicin tartalmú LB tápoldatban 37°C-on, 250 rpm-es rázatással ~0,25 OD<sub>600</sub> értékig növesztettem. A sejteket lefugáltam, majd 1 ml BG-11 oldatban felszuszpendáltam. A ΔpsbA *Synechocystis* a korábban leírt módon a tápoldat ~0,4 OD<sub>730</sub> értékéig növesztettem. A két baktériumkultúrát egy 50 ml végtérfogatú BG-11 oldatba (1 V% LB, 5 mM glükóz)

összeöntöttem és a Gallenkamp síkrázatonkban egy napig növesztettem. A kevert kultúrából 200  $\mu$ l-t antibiotikum-mentes, 5 mM glükózt tartalmazó BG-11 lemezre szélesztettem és egy napig 30°C-on, fényen inkubáltam. Másnap az agarlemez alá 10  $\mu$ g/ml koncentrációban spektinomycin rétegeztem. Az ~1 hét után megjelenő kolóniákat átoltottam egy 25  $\mu$ g/ml spektinomycin koncentrációjú, 5 mM glükózt tartalmazó BG-11 lemezre. Ezen a lemezen újabb egy hét után megjelenő kolóniákat BG-11 oldatba oltottam és a korábban leírt módon PCR segítségével ellenőriztem, hogy tartalmazzák-e a rekombináns plazmidot. Egy olyan kolóniát, ami a PCR során határozott, pozitív jelet adott, 50 ml BG-11 oldatban felnövesztettem (~2-3 OD<sub>730</sub>-ig) és legalább 10 darab 1,5 ml-es eppendorf csőbe mérve - 80°C-os mélyhűtőbe elraktam.



5. ábra: **Traszgénikus cianobaktériumok BG-11 agarlemezen és tápoldatban.** A bal oldali lemezen a *trc-6803psba-pDF in  $\Delta$ psbA* *Synechocystis* sp. PCC6803 vonal kolóniái a jobb oldali lombikban pedig a *trc-2166psba-pDF in  $\Delta$ psbA* *Synechocystis* sp. PCC6803 vonal tenyésztete látható.

## Fotoszintetikus aktivitás mérése

Az  *$\Delta$ psbA* *Synechocystis* mutánsba transzformált *Synechocystis* *psbA3*, az AM1\_2166 és az AM1\_0448 *psbA* gének által kódolt D1 fehérjék feltételezett működését biofizikai módszerekkel vizsgáltuk meg. Meghatároztuk a transzformáns cianobaktériumokból izolált PSII maximális kvantumhatásfokát OJIP méréssel egybekötve, valamint az intakt sejtek oxigén-termelő képességét. A felsorolt mérések eredményei alapján megállapíthatjuk, hogy a plazmidról kifejeződő *Acaryochloris marina* D1 fehérjéi képesek-e beépülni a *Synechocystis*

PSII komplexébe, ha igen, működnek-e és milyen hatásokkal. Az eredményeket összehasonlítva összevethetjük a divergens AM1\_0448 által kódolt D1 fehérje működését az AM1\_2166 és *Synechocystis psbA2* génje által kódolt D1 fehérjével.

## OJIP tranziensek

Az OJIP görbe a klorofill-a gyors fluoreszcencia indukcióját jelenti, ami a Kautsky-effektust ábrázolja. A sejtekből izolált klorofill-a fluoreszcenciájának intenzitása 1 másodpercig tartó ( $1000\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  intenzitású) megvilágítás hatására gyorsan,  $\sim 300$  ms alatt elér egy maximumot, majd több másodperc alatt (akár egy perc is lehet) lecsökken. Az elnevezés a fluoreszcencia görbe egyes, jól elkülöníthető szakaszaiból származik, melyeket O, J, I és P betűjelekkel jelölnek. Az O pont a görbe kezdőpontja, ami az  $F_0$  értéknek felel meg. Ez a sötétadaptált minta fluoreszcencia minimuma. A J a kezdeti fluoreszcenciát jelöli, a töltésszétválasztás már megtörtént. Ekkor a  $Q_A$  (elsődleges elektronakceptor) redukciója még nagyobb, mint a reoxidációja. Az I egy törés, ahol a  $Q_A$  reoxidációja már megnő a  $Q_A$ - $Q_B$  elektronátadás miatt. ( $Q_B$  a másodlagos elektronakceptor). A P az indukált gyors fluoreszcencia legmagasabb értéke, ami megfelel  $F_m$ -nek. A P csúcs vonatkoztatható a PQ nagymértékű redukciójára. A görbe alapján meghatározhatjuk a vizsgált PSII maximális kvantumhatásfokát, ami megmutatja, hogy a komplex mekkora hatásokkal fordítja a beérkező fotonok energiáját fotokémiai munkavégzésre. Ez az  $F_v/F_m$  hányados, ahol  $F_m$  a sötétadaptált minta maximális fluoreszcenciája,  $F_v$  pedig a sötétadaptált minta fluoreszcencia minimuma ( $F_0$ ) és  $F_m$  közötti különbség. Fotoautotróf módon nevelt cianobaktériumoknál esetében ez az érték általában 0,4-0,5 körüli, ami alacsonyabb, mint a magasabb rendű növényeknél mért 0,8. Ennek oka, hogy cianobaktériumokban a fikobiliszómák is rendelkeznek egy alap fluoreszcenciával, így az  $F_0$  érték magasabb.

Elsőként az  $F_v/F_m$  hányadost, a maximális kvantumhatékonyságot határoztuk meg. A transzgénikus cianobaktérium kultúrákat 3 napig növesztettük a korábban már leírt módon. A mutáns sejtek mixotróf módon nőttek, ezért kontrollként szintén mixotróf módon nőtt (cukorral ellátott tápoldatban, fényen tartva) vad típusú *Synechocystis* használtunk. A kultúrákból klorofillt izoláltunk. A tenyészetekből ( $\sim 0,5$ - $0,8$  OD<sub>730</sub>) 1 ml-t lefugáltunk majd 2 ml metanolban felfuszpendáltuk. Sötétben tartva, fél óráig inkubáltuk a sejteket. Újabb centrifugálással eltávolítottuk a sejtörmeléket. A klorofilltartalmat fotometriásan határoztuk meg a mért OD<sub>664</sub> és OD<sub>750</sub> értékek alapján. Az izolált klorofill-a indukált fluoreszcenciáját FL-3000 típusú Dual-Modulation Kinetic Fluorometer készülékkel vizsgáltuk meg 3 perc

sötétadaptálás után. A mérést 1 s-ig tartó,  $1000\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  intenzitású fényimpulzussal végeztük, egy mérés 20 s-ig tartott.

3. táblázat: **A különböző transzgenikus cianobaktériumokból izolált klorofillok maximális kvantumhatékonysága.** Az  $F_v/F_m$  hányados alapján egyértelmű, hogy az AM1\_0448 génnel transzformált *Synechocystis* aktív PSII komplexszel nem rendelkezik. A mutáns klorofill-fluoreszcenciája magas volt, mivel a PSI is tartalmaz klorofillt. Az AM1\_2166 által kódolt D1 fehérje nagy hatékonysággal fordította a beérkező fotonokat fotokémiai munkára.

|                             | <b>vad típusú<br/><i>Synechocystis</i></b> | <b>6803 <i>psbA2</i></b> | <b>AM1_2166 <i>psbA</i></b> | <b>AM1_0448 <i>psbA</i></b> |
|-----------------------------|--------------------------------------------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| <b><math>F_v/F_m</math></b> | 0,206359                                   | 0,15665                  | 0,224474                    | 0,024933                    |
| <b>Százalék</b>             | 100,0                                      | 75,9                     | 108,8                       | 12,1                        |

### Oxigénfejlődés mérése

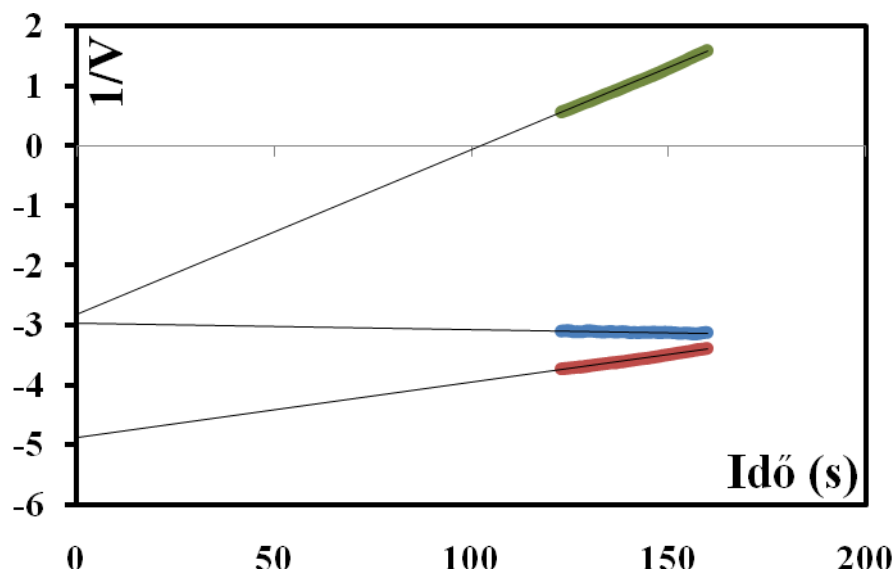
5. táblázat: **A transzgenikus vonalak  $\text{O}_2$  fejlesztésének összehasonlítása.** Az egyenesek meredeksége jelenti az oxigén kibocsátásának intenzitását. Az AM1\_2166 *psbA* mind a maximális kvantumhasznosításban, mind az oxigéntermelésben felülmúlja vad típusú a *Synechocystis*.

|                                                  | <b>6803 <i>psbA2</i></b> | <b>AM1_2166 <i>psbA</i></b> | <b>AM1_0448 <i>psbA</i></b> |
|--------------------------------------------------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| <b>Egyenes egyenlete</b>                         | $y = 0,027x - 2,826$     | $y = 0,009x - 4,891$        | $y = -0,001x - 2,961$       |
| <b>Meredekség a<br/>0448-hoz<br/>viszonyítva</b> | 288                      | 108                         | 0                           |
| <b>Százalék</b>                                  | 100                      | 138                         | 0                           |

Az intakt sejtek oxigénfejlesztési képességét ugyanazzal a tenyésztettel végeztük, amelyből a klorofill a kioldása után a maximális kvantumhatékonyságot és az OJIP tranzienst

is meghatároztuk. A mérést telítő fényen egy Hansatech DW2 oxigén-elektóddal végeztük, 1 ml sejt kultúrával, 0,005 másodperces felbontásban.

3. ábra: A transzgenikus cianobaktériumok O<sub>2</sub> fejlesztésének mértéke.



Az ábrán az oxigénfejlődés görbéire illesztett egyenesek láthatóak. Kontrollnak a **zöld** trendet (saját *psbA2* génjét tartalmazó *Synechocystis*) tekinthetjük. A kontroll egyenes meredekségétől való eltérés mutatja a transzgenikus vonalak oxigénfejlesztésének intenzitása közötti különbséget. A **kék** trend (AM1\_0448 *psbA*) a fotoszintetizálni nem képes, divergens D1 fehérjével rendelkező cianobaktériumot jelöli. A **piros** alapján az *Acaryochloris marina* AM1\_2166 izoformája fotoszintetikusán aktív.

## Eredmények megvitatása

A különböző fényviszonyokhoz való alkalmazkodás; a fotoakklimáció létfontosságú a fotoautotróf organizmusok számára. Az UV sugárzás, erős megvilágítás hatására kialakuló fénystressz okozta állapot, a fotoinhibíció jelensége megfelelő, hatékony válaszreakciók nélkül letális a sejtek számára. A cianobaktériumok egyik jellemző stratégiája, hogy a D1 fehérjét kódoló *psbA* gének duplikátumai; paralógjai találhatóak meg a genomban. Ez egyrészt az intenzív D1 szintézishez biztosít megfelelő mennyiségű mRNS állományt, másrészt az eltérő szekvenciájú duplikátumok eltérő redox-tulajdonságú D1 fehérjét kódolhatnak. A homológok így az adott környezeti körülményeknek megfelelően épülhetnek be a PSII komplexekbe és optimalizálhatják az fotoszintetikus elektrontranszport-folyamatokat, hogy a felesleges energia és szinglet oxigén keletkezését.

A vizsgált organizmus, az *Acaryochloris marina* *psbA* génje 3 kópiában található a genomban. Ebből 2 kópia (AM1\_2166, AM1\_2889) nukleotidszekvenciája 97%-ban, aminosav-szekvenciája pedig 100%-ban azonos egymással. A harmadik kópia (AM1\_0448) aminosav-szekvenciája csupán 61 %-os azonosságot mutat a többivel. A divergens fehérje fotoszintetikus aktivitása és funkciója kérdéses. Ezt megvizsgálni egy olyan cianobaktérium sejtvonalon lehet, amiben csupán ez az egy változat génje van jelen. A fehérje működését azonban össze akartuk hasonlítani a másik izoformával és a *Synechocystis* egyik D1 változatával is, ezért további transzgénikus sejtvonalak létrehozására volt szükség.

A kísérletekhez szükséges plazmid konstrukciók létrehozását klasszikus molekuláris biológiai eszközökkel elvégeztük. A molekuláris klónozások során nagy mennyiségű és tisztaságú plazmidot preparáltunk. A rekombináns plazmidot több transzformálási módszer kipróbálása után sikeresen bejuttattuk a *psbA* génekkel nem rendelkező mutáns *Synechocystis* sejtvonalakba. A transzgénikus sejtek sikeres tenyésztése után biofizikai módszerekkel megvizsgáltuk D1 fehérjeformák fotoszintetikus aktivitását. A maximális kvantumhatékonyság mérésével meghatároztuk, hogy a mutáns sejtek a beérkező sugárzás energiájának mekkora részét képesek aktívan fotokémiai munkára fordítani. A fotoszintéziséhez, ezáltal az oxigén termeléséhez teljes fotoszintetikus elektrontranszport-láncra van szükség. A különböző sejtvonalak oxigénfejlesztési képességének vizsgálatával megállapítható, hogy esetünkben a D1 fehérje beépült-e a PSII komplexbe és aktívan részt vesz-e a töltésszétválasztásban és az elektronok elvezetésében.

AM1\_0448 *psbA*-t hordozó sejtvonal fotoszintetikus komplexeinek kvantumhatékonysága 0, tehát fotokémiai munkát végezni nem képes. Ezt megerősíti, hogy az intakt sejtek sem képesek oxigént termelni. Ezek alapján megállapíthatjuk, hogy az AM1\_0448 *psbA* által kódolt D1 fehérje miatt a fotoszintetikus elektrontranszport-lánrendszer megszakad. Ezt okozhatja közvetlenül a PSII komplexbe épülésével. Ez esetben az eltérő szekvencia miatt biofizikai tulajdonságai olyan mértékben megváltoztak, hogy esszenciális funkcióját nem képes ellátni. Fontos megjegyezni, hogy a gén, habár kis mértékben, de kifejeződik *Acaryochloris marina* sejtekben. Így kizárhatjuk annak a lehetőségét, hogy az AM1\_0448 *psbA* egy pszeudogén, és pusztán az általa kódolt D1 fehérje hiánya okozza a PSII inaktivitását. Ha a fotoszintézis szabályozása ilyen módon valósul meg, hogy egy inaktív fehérje leszabályozza az elektrontranszport-folyamatokat, akkor ez az élővilágban egy eddig teljesen ismeretlen és egyedi módja a metabolikus útvonalak szabályozásának. A sejtek felépítésében, replikációjában és anyagcseréjében részt vevő fehérjék minden esetben a szerkezetük által meghatározott funkciót látják el. Az, hogy egy aktívan kifejeződő fehérje elsődleges funkciója az aktivitás hiánya, egy eddig példátlan megfigyelés az elő szervezetekben.

Az AM1\_2166 *psbA* által kódolt D1 fehérje fotoszintetikusan aktív, az oxigén fejlesztésének intenzitása és maximális kvantumhatékonysága felülmúlja saját *psbA2* génjét hordozó *ΔpsbA Synechocystis sp. PCC6803* sejtvonalat.

Eredményeink alapján messzemenő következtetéseket vonhatunk le az *Acaryochloris marina* fotoszintetikus aktivitásáról és fotoakklimációjáról. A gyenge fényhez adaptálódott cianobaktérium AM1\_0448 *psbA* génjéről átíródó D1 fehérje fotoszintetikusan inaktív. Kifejeződésével gátolja a fotoszintézist, vagy inaktív fehérjeként a PSII komplexben, vagy a komplexbe beépülni nem tudó divergens fehérjeként. A másik izoforma nagy hatékonysággal fordítja a fotonok energiáját fotokémiai munkára, ami előnyt jelenthet a gyenge fényforrású élőhelyek esetén. Az izoformák pontos működése és a cianobaktérium életében betöltött szerepe még tisztázatlan. A fehérjék további biofizikai vizsgálata laboratóriumunkban folyamatban van.

## Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek dr. Kós Péternek a rám szánt idejét, energiáját és a tanításomba fektetett munkáját. A labormunkához szükséges készségeket alaposan, bőséges magyarázattal, tematikusan, türelemmel és a hasznos praktikákkal együtt adta át. Kérdéseimre mindig készségesen válaszolt, nagyon sok segítséget nyújtott a konstruktív, kritikus gondolkodás alakításában. Segített a tudomány műveléséhez elengedhetetlen és alapvető ismeretek megszerzésében: a szakirodalom megfelelő használata, bioinformatikai alapismeretek, a műszerek kiismerése és rutinos használata, praktikus jegyzőkönyvvezetés, önálló munka elsajátítása, a munkafolyamatok logikus megszervezése, az eredmények kritikus kiértékelése és a hibák okainak feltárása. Szeretném megköszönni Nagy Csabának segítségét, amit mind a laborban, mind a kérdéseimre adott válaszaival nyújtott. Köszönöm az MTA SZBK Növénybiológiai Intézetének és igazgatójának dr. Vass Imrének, hogy a munkámhoz szükséges anyagokat és eszközöket biztosította. Külön köszönöm Fleit Gabriella laboráns munkáját, együttműködését és kedvességét, hogy amire szükségem volt, mindig rendelkezésemre állt. Köszönöm Kovács Lászlónak a fotoszinetikus aktivitások mérésében nyújtott segítségét.

## Irodalomjegyzék

- Berla, Bertram M, Rajib Saha, Cheryl M Immethun, Costas D Maranas, Tae Seok Moon, and Himadri B Pakrasi. 2013. "Synthetic Biology of Cyanobacteria: Unique Challenges and Opportunities." *Frontiers in Microbiology* 4 (August) (January): 246. doi:10.3389/fmicb.2013.00246. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3755261&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Bertani, G. 1951. "Studies on Lysogenesis. I. The Mode of Phage Liberation by Lysogenic *Escherichia Coli*." *Journal of Bacteriology* 62 (3) (September): 293–300. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=386127&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Guerrero, Fernando, Verónica Carbonell, Matteo Cossu, Danilo Correddu, and Patrik R Jones. 2012. "Ethylene Synthesis and Regulated Expression of Recombinant Protein in *Synechocystis* Sp. PCC 6803." *PloS One* 7 (11) (January): e50470. doi:10.1371/journal.pone.0050470. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3503970&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Hobbs, K. D. Tartof, C. A. 1987. "Improved Media for Growing Plasmid and Cosmid Clones." <http://libra.msra.cn/Publication/3221158/improved-media-for-growing-plasmid-and-cosmid-clones>.
- Kiss, Éva, Péter B Kós, Min Chen, and Imre Vass. 2012. "Biochimica et Biophysica Acta A Unique Regulation of the Expression of the psbA , psbD , and psbE Genes , Encoding the D1 , D2 and Cytochrome b559 Subunits of the Photosystem II Complex in the Chlorophyll D Containing Cyanobacterium *Acaryochloris Marina*." *BBA - Bioenergetics* 1817 (7): 1083–1094. doi:10.1016/j.bbabo.2012.04.010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabo.2012.04.010>.
- Kós, Péter B, Zsuzsanna Deák, Otilia Cheregi, and Imre Vass. 2008. "Differential Regulation of psbA and psbD Gene Expression, and the Role of the Different D1 Protein Copies in the Cyanobacterium *Thermosynechococcus Elongatus* BP-1." *Biochimica et Biophysica Acta* 1777 (1) (January): 74–83. doi:10.1016/j.bbabo.2007.10.015. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18053792>.
- Loughlin, Patrick, Yuankui Lin, and Min Chen. 2013. "Chlorophyll D and *Acaryochloris Marina*: Current Status." *Photosynthesis Research* 116 (2-3) (October): 277–93. doi:10.1007/s11120-013-9829-y. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23615924>.
- Marquardt, J, H Senger, H Miyashita, S Miyachi, and E Mörschel. 1997. "Isolation and Characterization of Biliprotein Aggregates from *Acaryochloris Marina*, a Prochloron-like Prokaryote Containing Mainly Chlorophyll D." *FEBS Letters* 410 (2-3) (June 30): 428–32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9237676>.

- Nagarajan, Aparna, Regan Winter, Julian Eaton-Rye, and Robert Burnap. 2014. "A Synthetic DNA and Fusion PCR Approach to the Ectopic Expression of High Levels of the D1 Protein of Photosystem II in *Synechocystis* Sp. PCC 6803." *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology* 104 (1-2): 212–9. doi:10.1016/j.jphotobiol.2011.02.009. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21377372>.
- Pope, B, and H M Kent. 1996. "High Efficiency 5 Min Transformation of *Escherichia Coli*." *Nucleic Acids Research* 24 (3) (March 1): 536–7. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=145660&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Rippka, R., J. Deruelles, J. B. Waterbury, M. Herdman, and R. Y. Stanier. 1979. "Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria." *Journal of General Microbiology* 111 (1) (March 1): 1–61. doi:10.1099/00221287-111-1-1. <http://mic.sgmjournals.org/content/111/1/1.abstract>.
- Sambrook, Joseph, and David William Russell. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 1. Kötet. CSHL Press. [http://books.google.hu/books/about/Molecular\\_Cloning.html?id=Bosc5JVxNpkC&pgis=1](http://books.google.hu/books/about/Molecular_Cloning.html?id=Bosc5JVxNpkC&pgis=1).
- Sane, P V, Alexander G Ivanov, Dmitry Sveshnikov, Norman P A Huner, and Gunnar Oquist. 2002. "A Transient Exchange of the Photosystem II Reaction Center Protein D1:1 with D1:2 during Low Temperature Stress of *Synechococcus* Sp. PCC 7942 in the Light Lowers the Redox Potential of QB." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (36) (September 6): 32739–45. doi:10.1074/jbc.M200444200. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12105211>.
- Sicora, Cosmin I, Sarah E Appleton, Christopher M Brown, Jonathon Chung, Jillian Chandler, Amanda M Cockshutt, Imre Vass, and Douglas A Campbell. 2006. "Cyanobacterial psbA Families in *Anabaena* and *Synechocystis* Encode Trace, Constitutive and UVB-Induced D1 Isoforms." *Biochimica et Biophysica Acta* 1757 (1) (January): 47–56. doi:10.1016/j.bbabi.2005.11.002. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16388778>.
- Simpson, J A, K H Cheeseman, S E Smith, and R T Dean. 1988. "Free-Radical Generation by Copper Ions and Hydrogen Peroxide. Stimulation by Hepes Buffer." *The Biochemical Journal* 254 (2) (September 1): 519–23. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1135108&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Swingley, Wesley D, Min Chen, Patricia C Cheung, Amber L Conrad, Liza C Dejesa, Jicheng Hao, Barbara M Honchak, et al. 2008. "Niche Adaptation and Genome Expansion in the Chlorophyll D-Producing Cyanobacterium *Acaryochloris Marina*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (6) (February 12): 2005–10. doi:10.1073/pnas.0709772105. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2538872&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Vermaas, Wim F J. 2001. "Photosynthesis and Respiration in Cyanobacteria."

# Tételes szakmai hozzájárulás

## Tételes szakmai hozzájárulás

Alulírott SOLYMOSI DÁNIEL nyilatkozom, hogy a dolgozatban foglalt munkafolyamatok közül az alábbiakat végeztem el:

- ✓ rekombináns plazmid DNS elkészítése, restrikciós ellenőrzése, gélelektroforézis
- ✓ DNS koncentrációmérések, oldatok tisztítása, töményítése
- ✓ *E. coli* transzformálása, növesztése, átoltása, kompetenssé tétele
- ✓ plazmidpreparálás, -tisztítás, colon
- ✓ yPCR
- ✓ *Synechocystis* természetes transzformálása, elektroporálása, konjugációs transzformálása
- ✓ a tenyészetek fenntartása, átoltása, transzformáns kolóniák ellenőrzése PCR által
- ✓ TES-BG-11 oldat elkészítése, agar lemezek öntése
- ✓ transzgénikus *E. coli* és *Synechocystis* mosása, fagyasztóba tétele
- ✓ OJIP mérés, O<sub>2</sub> fejlődés mérése
- ✓ eredmények kiértékelése, ábrázolása

Solymosi Dániel

Aláírás