

Mikrofluidikai eszközök fejlesztése
***Chlamydomonas reinhardtii* zöldalga egysejt-szintű**
morfológiai és fotoszintetikus vizsgálataihoz

PhD értekezés

Széles Eszter

Témavezető:

Dr. Tóth Szilvia Zita



Biológia Doktori Iskola
Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Növénybiológiai Intézet

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar

2023

Szeged

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés és irodalmi áttekintés.....	6
1.1. Zöldalgák	6
1.1.1. Zöldalgák biotechnológiai felhasználása	6
1.1.2. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	8
1.2. Fotoszintézis.....	10
1.3. Klorofill-a fluoreszcencia	15
1.4. Karotinoid bioszintézis fotoszintetikus organizmusokban.....	17
1.5. Mikrofluidika	22
1.5.1. Mikrofluidika alkalmazása az alga biotechnológiában	25
2. Céltűzés	27
3. Anyagok és módszerek.....	28
3.1. Mikrofluidikai eszközök tervezése és kivitelezése a <i>Chlamydomonas. reinhardtii</i> sejtek számára.....	28
3.2. A folyadékáramlás tulajdonságainak jellemzése modellszámításokkal és nyomkövető részecskékkel	29
3.3. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> törzsek és nevelési körülményeik.....	30
3.3.1. <i>Crvt2-1</i> aszkorbát-hiányos mutáns nevelése	30
3.3.2. Nitrát-indukálható amiRNS vonalak előállítása és nevelése.....	30
3.3.3. CC-124 vonalak nevelése.....	31
3.4. A kultúrák betöltése, kezelése és tenyésztése a mikrofluidikai eszközökben	31
3.5. Mikroszkópia és klorofill-a fluoreszcencia mérések	32
3.6. Elektronmikroszkópia	34
3.7. Statisztikai analízis.....	34
4. Eredmények.....	34
4.1. Mikrofluidikai eszközök fejlesztése.....	34
4.1.1. „Tulipán” mikrofluidikai eszköz egyetlen sejten végzett klorofill-a fluoreszcencia mérésekhez.....	36
4.1.2. Sejtosztódás megfigyelésére alkalmas „Csésze” alakú csapdákat tartalmazó mikrofluidikai platformok fejlesztése	42
4.2. A karotinoid-hiány PSII aktivitásra gyakorolt hatásának vizsgálata „Tulipán” alakú csapdákból	47
4.2.1. A mikrofluidikai kamrákban csapdázott sejtek fotoszintézise órákon át fenntartható..	48
4.2.2. Norflurazon kezelés hatása a <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> sejtekre	49
4.2.3. Linkomicin kezelés <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> sejtekre gyakorolt hatása.....	52
Eredmények megvitatása.....	54
Köszönetnyilvánítás	61

Irodalomjegyzék.....	62
Összefoglalás.....	80
Summary.....	84

Rövidítések jegyzéke

CAP	kloramfenikol
Chl	klorofill
CPTA	2-(4-klór-fenil-tio)-trietyl-amin
CYP97C	ε-karotin-hidroxiláz
cyt b ₆ f	citokróom b ₆ f
DCMU	(3-(3,4-diklór-fenil)-1,1-dimetil-karbamid)
GGPP	geranil-geranil-pirofoszfát
HSM	magas sótartalmú minimál médium
HYDB	karotin-β-hidroxiláz
LHC	fénybegyűjtő pigment protein komplex
LYCB	béta-cikláz
LYCE	epszilon-cikláz
NADP	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NPQ	nem-fotokémiai kioltás (non photochemical quenching)
NXS	neoxantin-szintáz
P ₆₈₀	a második fotokémiai rendszer elsődleges elektrondonora
P ₇₀₀	az első fotokémiai rendszer elsődleges elektrondonora
PC	plasztocianin
PDMS	polidimetilsziloxán
PDS	fitoén-deszaturáz
Pheo	feofitin
PQ	plasztokinon
PQH ₂	plasztokinol
PSBO	a vízbontó komplex 33kDa-os külső fehérjéje
PSI	első fotokémiai rendszer
PSII	második fotokémiai rendszer
PSY	fitoén szintáz
SEM	pásztázó elektronmikroszkóp
TAP	Tris-acetát-foszfát tápoldat
Tyr _Z	tirozin Z

VDE	violaxantin-deepoxidáz
WOC	vízbontó komplex (water-oxidizing complex)
ZDS	ζ-karotén deszaturáz
ZEP	zeaxantin-epoxidáz
Z-ISO	ζ-izomeráz

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

1.1. Zöldalgák

A bioszférában élő fotoautotróf szervezetek egyik legheterogénebb csoportját alkotják a zöldalgák. Taxonómiaiilag parafiletikus csoport (Naselli-Flores és mtsai, 2009). A Viridiplantae (zöld színtestű növények) alországon belül található a Chlorophyta (zöldalgák) divízió tagjai, amely kb. 9000-12000 fajt foglal magába. A fotoszintetikus pigmentek (klorofilok, karotinok és xantofilok) ugyanolyan arányban vannak jelen bennük, mint a magasabb rendű növényekben. A zöldalgák sejtfala általában poliszacharidokat tartalmaz és a szénhidrátokat keményítő formájában raktározzák a kloroplasztiszban (Judd és mtsai, 2002; Bold és Wynne, 1985). Édesvízben és tengervízben egyaránt előfordulnak, de megtalálhatóak a talajban is. Lehetnek egysejtűek, többsejtűek, koloniálisak (a sejtek laza aggregációja) vagy cönocitikusak (több sejtmag egyetlen nagy sejtben).

1.1.1. Zöldalgák biotechnológiai felhasználása

A becslések szerint 2050-re a világ népessége meghaladja a 10 milliárd főt (Egyesült Nemzetek Szervezete, 2019). A mezőgazdaság a teljesítőképessége határához érkezett, a szántóterületek nagy része már használatban van, és az olyan kérdések, mint az éghajlatváltozás és a városok terjeszkedése fontos jövőbeni kihívások elé állítják a mezőgazdaságot (Foley és mtsai, 2011). A mezőgazdaság, a gazdálkodás, a halászat és a fosszilis olajkitermelés intenzitásának növelése önmagában nem lesz elegendő a jövőbeli igények kielégítésére. A globális hőmérséklet emelkedése, a szélsőséges időjárás, a változó éghajlati minták és a megművelhető földterületek elvesztése miatt drasztikus változtatásokra lesz szükség a jelenlegi mezőgazdasági technológiában (Wurtzel és mtsai, 2019), hogy a termékek fenntartható módon történő előállítása révén minimalizáljuk a környezeti hatásokat. A csúcstechnológiás mérnöki és molekuláris genetikai megközelítések, mint a fenomika és a génszézés hatékonyan javíthatja a mezőgazdasági termények, például a szója, a kukorica, a búza és a rizs termőképességét, a költséghatékonyságot és csökkentheti a környezeti terhelést (Mir és mtsai, 2019). Ugyanakkor az állati eredetű élelmiszerek (a hús és a tejtermékek) és a műanyagok növényi eredetű alternatíváit is intenzíven kutatják és fejlesztik (Zhu és mtsai, 2016). E

megoldások egyértelmű előnyei ellenére az élelmiszernövények felhasználása a kevésbé fenntartható gyártási gyakorlatok helyettesítésére végül hozzájárul majd a mezőgazdasági kereslet növekedéséhez. Így ugyanazokkal a kihívásokkal nézünk majd szembe, amelyek az „üzemanyag kontra élelmiszer vitát” jellemezték. Ezért a növekvő igények kielégítéséhez új megoldásokra és további erőforrásokra van szükség. Erre nyújthat részben megoldást a zöldségek biotechnológiai felhasználása.

A fotoszintetikus mikroalgák olyan mikrobák, amelyek a Föld minden élőhelyén megtalálhatóak, rendkívüli biológiai sokféleséget mutatnak (Guiry, 2012), ami a hatalmas ökológiai alkalmazkodóképességüket is tükrözi. Ellentétben más, bioalapú gyártásokhoz általánosan használt mikroorganizmusokkal, - mint például az élesztő és a különböző baktériumok, - a fototróf algák előnye, hogy napfényt használnak a légköri szén-dioxid megkötésére, csökkentve ezáltal a cukroktól való függőséget a nevelésük során. Az időszakos és szűkös tápanyag-ellátottságú környezetben is jól fejlődő, burjánzó mikroalgák számos faja kiváló metabolikus alkalmazkodóképességgel rendelkezik, és kedvező körülmények között rendkívül gyors növekedésre képesek (Smetacek, 1999; Litchman, 2007). Ennek eredményeként az algák nagyobb CO₂-megkötő kapacitással rendelkeznek, mint a C₄-es növények (Bhola és mtsai, 2014), ami azt jelenti, hogy nagyobb biomassza-termelő képességet mutatnak (Benedetti és mtsai, 2018).

Biotechnológiai körülmények között – akár nyílt vízben, akár fotobioreaktorban történő nevelés során – a mikroalgák víztakarékosabbak, mint a haszonnövények (Demirbas, 2009), és mezőgazdasági művelésre alkalmatlan területeken is természetők minimális édesvíz felhasználás mellett (Demirbas, 2009), de akár tengervízben vagy szennyvízben is képesek fejlődni. Így egy jelentős kiterjedésű földrajzi terület, amely nem alkalmas vagy gazdaságossági szempontból nem megfelelő növénytermesztésre, hasznosítható lenne nagyüzemi algatermesztésre.

Számos algafaj természetes módon nagy mennyiségű szénhidrátot, lipidet, fehérjét, pigmentet halmoz fel, valamint számos kereskedelmi szempontból jelentős másodlagos anyagcsere-terméket állít elő, amelyek jelenleg a hagyományos mezőgazdaságból származnak (Koyande és mtsai, 2019). Ezen kívül a mikroalgák újgenerációs mikrobiális sejtgárákként jellemezhetők, amelyek számtalan termék fenntartható előállítására alkalmasak (Rasala és Mayfield, 2015; Vavitsas és mtsai, 2018), az olyan bevált mikrobiális platformok mintájára, mint az élesztők és baktériumok. Ebből a szempontból

a mikroalga alapú sejtgérek olcsóbb és fenntarthatóbb platformokká válhatnak, amelyek természetes módon alkalmasak bizonyos növényi eredetű termékek hatékony előállítására (Vavitsas és mtsai, 2018).

A zöldalgák kiemelkedő ökológiai jelentőséggel bírnak és biotechnológiai szerepük is egyre nagyobb. Sokféleképpen felhasználhatóak: lehetnek értékes biostimulánsok, bioüzemanyagok, táplálékkiegészítők, gyógyszerek; ezek közül napjainkban az egyik leggyakoribb a táplálékkiegészítőként történő felhasználásuk (Fabris és mtsai, 2020; Benning, 2015). Az emberek már évszázadok óta fogyasztják élelmiszerként vagy gyógyszerként az algákat. Különböző bioaktív összetevőket, például fikocianint, karotinoidokat, γ -linolénsavat, rostokat és növényi szterolokat tartalmaznak, amelyek hozzájárulnak az emberi egészség megőrzéséhez. Tanulmányok kimutatták, hogy számos algafaj koleszterin- és trigliceridszint-csökkentő tulajdonságokkal rendelkezik, mivel szabályozzák a bélben a koleszterin felszívódását és a máj lipogén enzim génexpresszióját. Csökkenthetik a gyulladásokat és a proinflammatorikus citokinek termelését. Ezen kívül gátolják a lipid-peroxidációt és szabadgyök-fogó aktivitással rendelkeznek, ami előnyös lehet az oxidatív stressz elleni védelemben. Ezek a hatások hozzájárulhatnak az anyagcsere- és gyulladásos betegségek megelőzéséhez (Ku és mtsai, 2013).

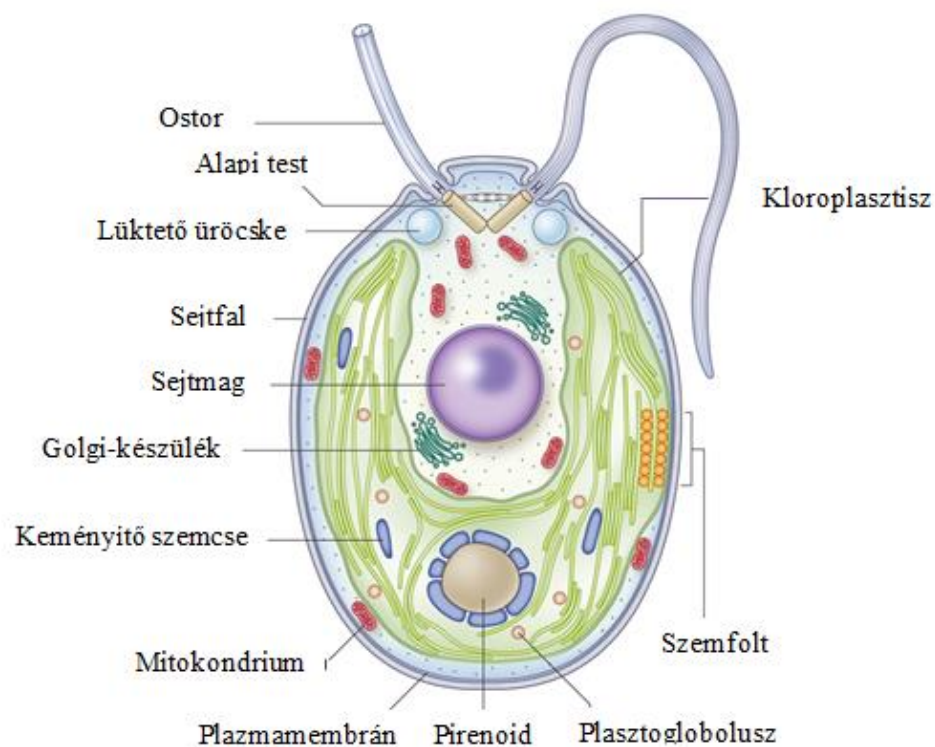
Hidrogéntermelésre is alkalmazhatóak a zöldalgák; erre jó példa a *Chlamydomonas reinhardtii*-val történő fotoautotróf hidrogéntermelés (részletesen a 9. oldalon olvasható.) Emellett a zöldalgák áramtermelésre is foghatók. Számos kutatócsoport foglalkozik a közvetlen napenergia-üzemanyag előállítására szolgáló fotoszintetikus mikrobasejtgérek tervezésével és vizsgálatával, biohibrid napelemek kialakításával.

1.1.2. *Chlamydomonas reinhardtii*

A *C. reinhardtii* a zöldalgák kiváló modellszervezetévé vált. Egysejtű, haploid és az egyetlen fotoszintetizáló szervezet, amelynek sejtmagi, kloroplasztisz- és mitokondriális genomja is transzformálható. Az utóbbi években történt genetikai módszerek fejlődése még kiemeltebb modellszervezetté tette (Nickelsen, 2005; Salomé és mtsai, 2019). A *C. reinhardtii* genetikai manipulálására ma már számos molekuláris biológiai módszer áll rendelkezésre, amelyeknek köszönhetően olyan fotoautotróf ipari biotechnológiai

platformmá válhat, amely egyenrangú az *Escherichia coli*-val és az élesztővel (Scaife és mtsai, 2015). A közelmúlt technológiai fejlődése, beleértve a CRISPR/Cas12a módszer kifejlesztését *C. reinhardtii*-ra (Ferenczi és mtsai, 2017), lehetővé tette a hatékony, célzott és nukleotid pontosságú genetikai módosításokat. Ezek az előrelépések jelentősen hozzájárulnak a *C. reinhardtii* biotechnológiai és bioipari alkalmazhatóságához.

A *C. reinhardtii*-t gyakran használják a fotoszintézis és kloroplasztisz biogenezisének tanulmányozására. Fotoautotróf és mixotróf életmódra is képes, de szerves szénforrás (pl. acetát) jelenlétében sötétben is életképes (Spreitzer és Mets, 1981). Heterotróf körülmények között ezért még a fotoszintézisükben erősen érintett mutánsok is képesek fennmaradni és szaporodni (Harris, 2001).



1. ábra. Vegetatív *Chlamydomonas* sejt strukturális felépítése (Sasso és mtsai, 2018 nyomán). A sejten két ostor található. A sejt nagy részét egyetlen, csésze alakú kloroplasztisz foglalja el. A szemfolt a sejtmembrán és a kloroplasztisz találkozásánál található. A sejt elülső részén találhatóak a lüktető üröcskék. A csillók alapjánál találhatóak a bazális testek. A sejt közepén helyezkedik el a sejtmag és ezen kívül még Golgi-testek és mitokondriumok találhatóak a sejtben.

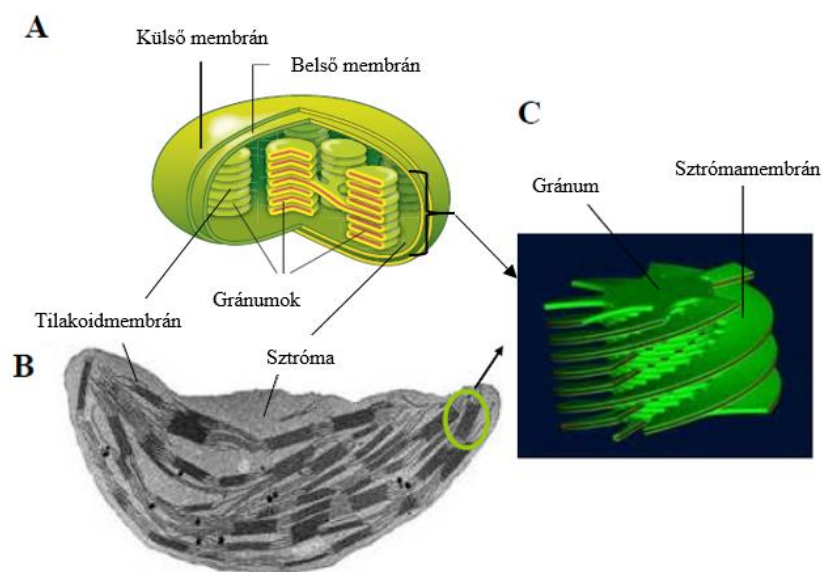
A *C. reinhardtii* az egész világon elterjedt, és mind a vizekben, mind a talajban egyaránt előfordul. Az „anyasejtek” átlagos átmérője 10-12 μm a „leánysejteké” 2-3 μm .

Strukturális felépítése az 1. ábrán látható (Sasso és mtsai, 2018). Az eukarióták mozgást biztosító csillóira és ostoraira általánosan jellemző felépítés jelenik meg a *C. reinhardtii* ostora esetében is. A mikrotubulus szerkezet 9+2-es felépítésű (Harris, 2001). A kloroplasztiszban található a pirenoid, amelyben a Rubisco koncentráldik (Mackinder és mtsai., 2016). A *C. reinhardtii* sejtek szemfolttal rendelkeznek, amely lehetővé teszi a sejtek fototaxisát. Lüktető üröcskéik segítenek fenntartani a citoplazmatikus víztartalmat hipoozmotikus körülmények között is (Komsic-Buchmann és mtsai, 2014). A csillók felépülését/összeszerelését a bazális testek biztosítják (Dutcher és O'Toole, 2016).

1.2. Fotoszintézis

A fotoszintézis folyamata a sejtek kloroplasztiszaiban megy végbe. A kloroplasztisz változatos alakokban fordul elő: lehet lencse vagy csésze alakú, illetve szalagszerű, amely kettős (magasabb rendű növényekben és zöldalgákban; Staehelin, 2003; Austin és Staehelin, 2011) vagy többszörös membránnal határolt sejtorganelum (kovamoszatokban és vörösalgákban; Kroth és Strotmann, 1999; McFadden és Dooren, 2004).

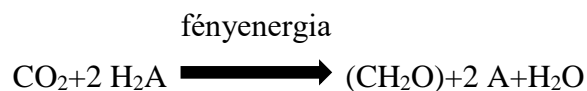
A kloroplasztisz sztrómájába beágyazott membránrendszer a tilakoidmembrán. Itt megy végbe a fényreakció (2. ábra).



2. ábra. A) Magasabb rendű növények kloroplasztiszaának sematikus ábrája B) transzmissziós elektronmikroszkópos kép C) számítógépes modell a sztrómamembránok gránum körüli elhelyezkedéséről (Mustárdy és mtsai, 2003 nyomán).

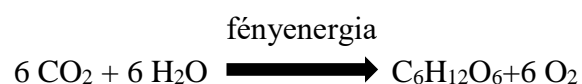
A tilakoidmembránok helyenként szorosan összetapadva henger alakú gránumokat hoznak létre a magasabb rendű növényekben. Ezek átmérője kb. 400-600 nm és egy gránum 5-20 tilakoidmembrán-rétegből tevődik össze (Mustárdy és mtsai, 2003; Mullineaux, 2005; Pribil és mtsai, 2014). A gránumokhoz sztrómatilakoidok csatlakoznak helikális elrendeződésben (Mustárdy és mtsai, 2003; Mustárdy és mtsai, 2008; Kouřil és mtsai, 2011). Így a gránumok és a sztrómatilakoidok egy összefüggő membránrendszert alkotnak (Shimoni és mtsai, 2005; Mustárdy és mtsai, 2008). A tilakoidmembrán belső fehérvékben gazdag fázisát lumennek nevezzük.

A fotoszintézis lényegét az alábbi oxido-redukciós egyenletben lehet kifejezni a legtömörebben:



Ebben a folyamatban tehát fényenergia segítségével a szén-dioxid szerves anyaggá (CH_2O) redukálódik a H_2A -val jelzett elektrondonor révén, miközben a donor oxidált alakja felszabadul. A fényenergia egy része átalakul kémiai energiává, a többi pedig hőenergia formájában disszipálódik, veszendőbe megy (pl. Stirbet és mtsai, 2020).

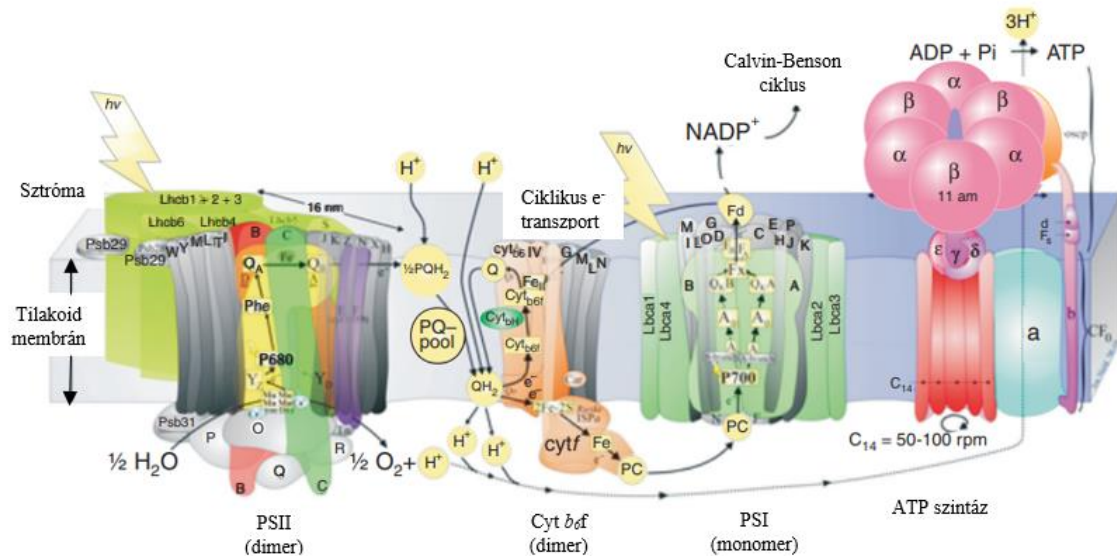
Az elektrondonorok változatosak lehetnek, és ennek megfelelően vannak oxigéntermelő és nem oxigéntermelő fotoszintetizáló élőlények (Blankenship, 2001). A Föld légkörének kialakulása szempontjából alapvető szerepet játszottak azok a fotoszintetizáló élőlények, amelyeknél az elektrondonor szerepét a víz tölti be, és oxidációja során oxigén termelődik, amely a következő egyenlettel írható le (Blankenship, 1992; Nelson és Ben-Shem, 2004; Johnson, 2016):



A fotoszintézis folyamata fotoszintetikus elektrontranszportból és Calvin-Benson ciklusból áll. A fotoszintetikus elektrontranszport során elektron- és protontranszfer folyamatok játszódnak le. A Calvin-Benson ciklus során történik meg CO_2 megkötése és a szénhidrátok bioszintézise. A fotoszintetikus elektrontranszport a víz oxidációjától a NADP^+ redukciójáig tart, amihez transztilakoidális protontranszfer kapcsolódik. A tilakoidmembrán (TM) négy fő fehérjekomplexe, a második fotokémiai rendszer (PSII),

a citokróm b_6f komplex (cyt b_6f), az első fotokémiai rendszer (PSI) és az ATP-szintáz (3. ábra) vesz részt az ATP és a NADPH termelésében, amelyek a Calvin-Benson ciklusban hasznosulnak.

A fényt a PSI és PSII (LHCI és LHCII) fénygyűjtő komplexeiben lévő pigmentek kötik meg. A gerjesztési energia a P700-hez (PSI-ben) és a P680-hoz továbbítódik (PSII-ben), ahol töltésszétválás történik, redox reakciók láncolatát indítva el.



3. ábra. A fotoszintetikus elektrontranszportlánc felépítése és szerveződése: főbb fehérje és fehérjekomplexei, valamint az elektron és proton transzport útvonal. Főbb részei magasabb rendű növény kloroplasztizában elhelyezkedő fotoszintetikus apparátusban (pl.: *Arabidopsis thaliana*-ban): a második fotokémiai rendszer (PS II); citokróm b_6f (Cyt b_6f); első fotokémiai rendszer (PS I); ATP-szintáz; plasztokinon (PQ); plasztokinol (PQH $_2$); tilakoid membrán... (Allen, 2011).

A PSII leggyakrabban dimer formában van jelen. Ez a komplex katalizálja a víz bontását és a plasztokinon redukcióját. A PSII az ún. reakciócentrumból, valamint a belső és a külső vagy perifériális fénybegyűjtő proteinkomplexeiből (LHCII) áll össze. A PSII reakciócentrumot a D1 (PsbA) és a D2 (PsbD) fehérjék heterodimere, valamint a citokróm b_{559} α (PsbE) és β (PsbF) alegysége alkotja. A D1 és D2 fehérjéken található az elektronátadási folyamathoz szükséges különböző akceptorok és donorok (Q_A és Q_B kinon, P680, feofitin, tirozin Z (Tyr $_Z$) és tirozin D (Tyr $_D$)), illetve egy nem-hem vas, amely bikarbonát iont (HCO_3^-) köt meg (Stirbet és mtsai, 2020; Müh és mtsai, 2012). A D1 fehérje elektrondonor oldalán egy mangán komplex ($\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$) és egy tirozin (Y $_Z$)

található. A PSII fénybegyűjtő antennájaként működnek a D1 és D2 fehérjéhez közvetlenül kapcsolódó a CP43 (PsbC) és CP47 (PsbB) alegységek (Barber, 2008), amelyek klorofill-a molekulák mellett néhány β -karotin molekulát is tartalmaznak. Hat különböző (Lhcb1-6) pigment-protein komplexből épül fel a magkomplexhez kapcsolódó perifériális antenna komplex. Az LHCII fehérjék tartalmaznak klorofill *a*-t, *b*-t és különböző xantofill-molekulákat is.

A PSII antennarendszere által elnyelt fényenergia a reakciócentrumba jut, aminek következtében a P_{680} gerjesztett állapotba kerül, majd egy elektront átad a Pheo molekulának. A redukált Pheo-ról átjut az elektron a Q_A -ra, majd a Q_A és a Q_B között két egymást követő elektrontranszfer lépés történik. Két elektron és két proton felvétele után a Q_B a mobilis plasztokinon (PQ) pool-ba jut, majd onnan újabb PQ molekula kötődik be a D1 fehérjére (Barber, 2003, 2008).

A PSII lumen felőli oldalán helyezkedik el a vízbontó komplex (WOC), amely fő funkciója a víz bontása protonokra, elektronokra és oxigénre. Az WOC központi részét négy Mn-ion, egy Ca^{2+} és egy Cl^- alkotja. A lumen felőli oldalon fehérje alegységek veszik körbe, melyek elnevezése magasabb rendű növényekben PSBO, PSBP, PSBQ és PSBR (Allahverdiyeva és mtsai, 2013).

A PSII reakciócentrumában lezajló töltésszeparációk hatására a Mn-komplex S_0 állapotból S_1 , S_2 , S_3 , S_4 oxidációs állapotokba kerül, melynek során pozitív töltések halmozódnak fel (Kok és mtsai, 1970). Az S_4 állapotnál oxigén szabadul fel, majd az S_4 állapot S_0 -ba alakul. A vízbontó komplexbe az egyik H_2O molekula az S_4 - S_0 átmenet után a másik az S_2 - S_3 átmenet során kötődik be, és ezzel helyreáll a kiindulási állapot. A TyrZ redukálja a P_{680}^{+} -t és a képződött TyrZ $^{+}$ -t pedig a vízbontó komplex redukálja.

A citokróm *b₆/f* komplex proton grádiens alakít ki a tilakoid membrán két oldala között, ugyanis miközben a plasztokinol (PQH₂) oxidációját és a plasztocianin (PC) redukcióját végzi, protont pumpál a sztrómából a tilakoid lumenbe. A Cyt *b₆/f* komplex tartalmaz egy Cyt *f*-et, egy Rieske vas-kén fehérjét (Fe-S), és két citokrómot *b*-t. Az elektronok a plasztocianin felől a P_{700}^{+} -ra továbbítódnak.

A plasztocianin oxidációját és a ferredoxin (Fd) redukcióját a PSI végzi. A PSI reakciócentrumból és perifériás fénybegyűjtő komplexből (LHCI) áll, amely magasabb rendű növények és algák esetében monomer formában van jelen. Kb. 20 kisebb

fehérjealegység, illetve a PsA és PsB alkotják a PSI reakciócentrumot. A PsA és a PsB alegységek kötik a pigmentmolekulák legnagyobb részét, és így a PSI belső antennáját alkotják (Jensen és mtsai, 2007). A pigmentmolekulákat kisebb arányban a PsF, PsG, PsJ, PsK, és a PsL külső alegység köti. Fény hatására a PSI reakciócentrumában található P_{700} gerjesztett állapotba kerül. Ezután átad egy elektront a primer akceptornak (A_0), majd az elektron a másodlagos akceptorra (A_1) kerül. Innen a vas-kén centrumot tartalmazó komponenseken (F_X , F_B és az F_A) keresztül a ferredoxinra (Fd) jut, utolsó lépésként pedig a Fd-NADP⁺ oxidoreduktáz (FNR) enzim segítségével NADPH keletkezik, amely a Calvin-Benson ciklusban és egyéb folyamatokban kerül felhasználásra.

A fotoszintetizáló élőlények a természetben gyakran fotoszintetikus igényeiket meghaladó fényviszonyokkal találkoznak. A fénybegyűjtő apparátus által felvett többlet gerjesztési energia reaktív oxigénformák keletkezéséhez és a fotoszintetikus apparátus fotooxidációjához vezethet. Abban az esetben beszélünk fotoinhibícióról, amikor a fotoszintetikus folyamatok rövidtávon visszafordíthatatlan lassulása, károsodása következik be (Demmig és mtsai, 2014). A káros hatások kivédése érdekében a fotoszintetizáló szervezetek különféle fotoprotektív folyamatokat alakítottak ki. Ezek közé tartozik a nem-fotokémiai kioltás (továbbiakban NPQ), azaz a gerjesztési energiatöbblet disszipációja hő formájában (részletesen lásd a 17. oldalon).

Az oxidatív stresszel szembeni védelemben az aszkorbát (C-vitamin) is igen jelentős szerepet játszik. Legismertebb a szabadgyök-kioltó hatása, és magasabb rendű növényekben részt vesz az NPQ kialakulásában is. E szerepek mellett alternatív elektrondonorként is védi a PSII reakciócentrumot a donor-oldali fotoinhibíció káros hatásaival szemben, azáltal, hogy folyamatos elektrontranszportot biztosít a $P680^+$ irányába (Tóth és mtsai, 2009, 2011).

A zöldalgák a fotoszintézisük során hidrogént is képesek termelni a PSI akceptor oldalán található hidrogenáz enzimeknek köszönhetően. A *C. reinhardtii* a zöldalgák hidrogéntermelésének kutatására kitűnően alkalmas. A természetben a *C. reinhardtii* hidrogéntermelése oxigénszegény környezetben a sötét-fény átmenetek alatt a fotoszintézis indukciója során mintegy „biztonsági szelepként” szolgál, és megakadályozza a fotoszintetikus elektrontranszport lánc túlzott redukcióját, amíg a Calvin-Benson ciklus nem aktiválódik (Nagy és mtsai, 2018a).

A *C. reinhardtii* hidrogéntermelését laboratóriumi körülmények között kénmegvonással sikerült fenntartani (Melis és mtsai, 2000). A kénmegvonás összetett anyagcsere-reakciót indít el, ami a fotoszintézis leszabályozását, anaerobiózis kialakulását és hidrogenázok aktiválódását eredményezi (Ghirardi, 2015; Nagy és mtsai, 2018).

A kénmegvonással indukált hidrogéntermelés acetát-függő, azonban fotoautotróf rendszerben is lehetséges hidrogént termeltetni. Ez a rendszer a Calvin-Benson ciklus inaktív állapotban történő tartásán alapul, amit a szénforrás megvonásával érnek el (Nagy és mtsai, 2018). A hidrogenázok védelmét pedig a maradék oxigénnel szemben oxigénabszorbessel biztosítják. A rendszer előnyei a kénmegvonással szemben az, hogy nem igényel acetátot, valamint nem jár a fotoszintetikus apparátus jelentős károsodásával.

1.3. Klorofill-a fluoreszcencia

A klorofill-a fluoreszcencia mérése az algák és növények fotoszintetikus hatékonyságának vizsgálatára széles körben elterjedt módszer. Népszerűsége a fluoreszcencia-paraméterek és a fotoszintetikus elektrontranszport működése között felfedezett összefüggések, valamint a megfizethető és könnyen használható, hordozható fluoriméterek kereskedelmi forgalomba hozatalának köszönhető. A fluoreszcencia mérése nagyon hatékony módszer a fotoszintetikus hatékonyság tanulmányozására, különösen, ha más nem invazív mérésekkel, például abszorpciós spektroszkópiával, gázanalízissel és infravörös hőmérséklet-meghatározással kombinálják (Baker, 2008).

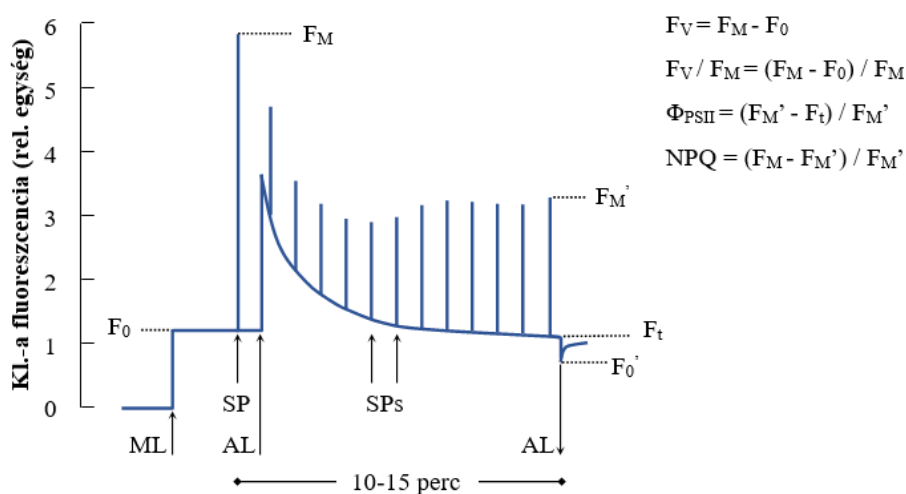
A klorofill-a fluoreszcencia igen jól alkalmazható intakt sejtek és levelek fotoszintetikus elektrontranszportjának és különböző stresszhatások vizsgálatára (Wingler és mtsai, 2005). A legtöbb anyagcsere-változás befolyásolja növények fotoszintézisét, így ez a módszer jól alkalmazható mutáns fenotípusok azonosítására is (Baker, 2008). A klorofill-a fluoreszcencia alkalmazható nagy áteresztőképességű módszerként, de egyedi sejtek vagy kloroplasztiszok is vizsgálhatóak nagy felbontású mikroszkópos képalkotással kombinálva (Trampe és mtsai, 2011).

A leggyakrabban használt klorofill-a fluoreszcencia paraméterek közé tartozik az F_0 , az F_M , az F_V/F_M , a Φ_{PSII} és az NPQ.

Az F_0 a sötétadaptált levelek fluoreszcencia minimuma, ekkor minden reakciócentrum nyitott állapotban van. Az F_M a maximális fluoreszcencia értéke, mely során a

reakciócentrumok zárt állapotban vannak. Az F_V pedig a maximális változó fluoreszcencia ($F_V = F_M - F_0$) (Trampe és mtsai, 2011). Az F_V/F_M hányados a fotoszintetikus aktivitás jellemzésére szolgáló paraméter (Sipka és mtsai, 2021), amely egyaránt függ a vízbontó komplex, a PSII és a teljes fotoszintetikus elektrontranszportban végbemenő folyamatoktól (Schansker és mtsai, 2014; Tóth és mtsai, 2020).

Ismert, hogy a PSII D1 fehérjéje erős fény hatására sérülhet, ami miatt a térszerkezete megváltozik. Az ennek következtében fellépő PSII inaktiválódást a D1 fehérjét javító folyamat bizonyos mértékig ellensúlyozni tudja, de ha ennek a kapacitása eléri a maximumát, a PSII irreverzibilis módon károsodik. Ez a károsodás számos elektrontranszport paraméter változásában megmutatkozik, amelyek közül az F_V/F_M hányados csökkenése egyszerűen nyomon követhető. A fotoinhibíció mellett az F_V/F_M értéke csökkenhet a vízbontó komplex sérülése következtében is, amely például hőstressz esetén következhet be. Ilyenkorra WOC külső fehérjei (pl. a PSBO és a PSBP), valamint a Mn és Ca-ionok leválnak, aminek következtében a vízbontó aktivitás megszűnik (Yamashita és mtsai, 2008).



4. ábra. A levél klorofill-a fluoreszcencia hatásfokának változása a kioltás-analízis során telítési impulzus módszerrel és főbb paraméterei. F_0 -sötét adaptált minta fluoreszcencia minimuma, F_M -sötét adaptált minta maximális fluoreszcenciája fényimpulzus alatt, F_M' - maximális fluoreszcencia fényadaptált állapotban, F_0' -a fluoreszcencia minimuma röviddel az aktinikus fény kikapcsolása után mérve, ML-mérőfény (measuring light), AL-aktinikus fény (actinic light), SP-telítő impulzus, NPQ-nemfotokémiai kioltás. Schreiber (2004) nyomán.

A PSII aktuális, megvilágítás alatt kialakuló fotokémiai hatékonyságának jellemzésére alkalmazzák a Φ_{PSII} paramétert (Genty és mtsai, 1989; 4. ábra).

Olyan esetekben, amikor az elnyelt energia meghaladja a fotoszintetikus elektrontranszport-lánc kapacitását, a klorofill-a fluoreszcencia nemfotokémiai úton történő kioltása (NPQ) gyorsan képes mérsékelni a nagy fényterhelés okozta stresszhatást. Az NPQ megakadályozza a fotokémiai reakciócentrumok túlgerjesztését azáltal, hogy a gerjesztési energia egy részét hő formájában disszipálja. Az NPQ legalább három komponensből áll, amelyek megkülönböztethetők az erős megvilágítást követő relaxációs idő alapján: a ΔpH vagy energiafüggő kioltás (qE), az állapotátmenetek miatti kioltás melynek során a gerjesztési energia újraelosztásra kerül a két fotokémiai rendszer között (qT), és a fotoinhibíciós kioltás (qI) (Baker, 2008; Muller és mtsai, 2001). Az NPQ egyik legfőbb összetevője általában a qE. Ez magasabbrendű növényekben és zöldalgákban a zeaxantin felhalmozódásához köthető, amely a violaxantin fényfüggő, reverzibilis deepoxidációja során képződik az úgynevezett xantofill ciklusban (Yamamoto és mtsai, 1962). A violaxantin deepoxidációja magasabbrendű növényekben aszkorbát-függő, zöldalgákban viszont nem szükséges e folyamathoz (Vidal-Meireles és mtsai, 2020). A zeaxantin-függő kioltás (qZ) elősegítheti a qE típusú NPQ kialakulását (Horton és mtsai, 1994) vagy közvetlenül deaktiválhatja a klorofill gerjesztett állapotát (Avenson és mtsai, 2008; Holt és mtsai, 2005; Holub és mtsai, 2007).

1.4. Karotinoid bioszintézis fotoszintetikus organizmusokban

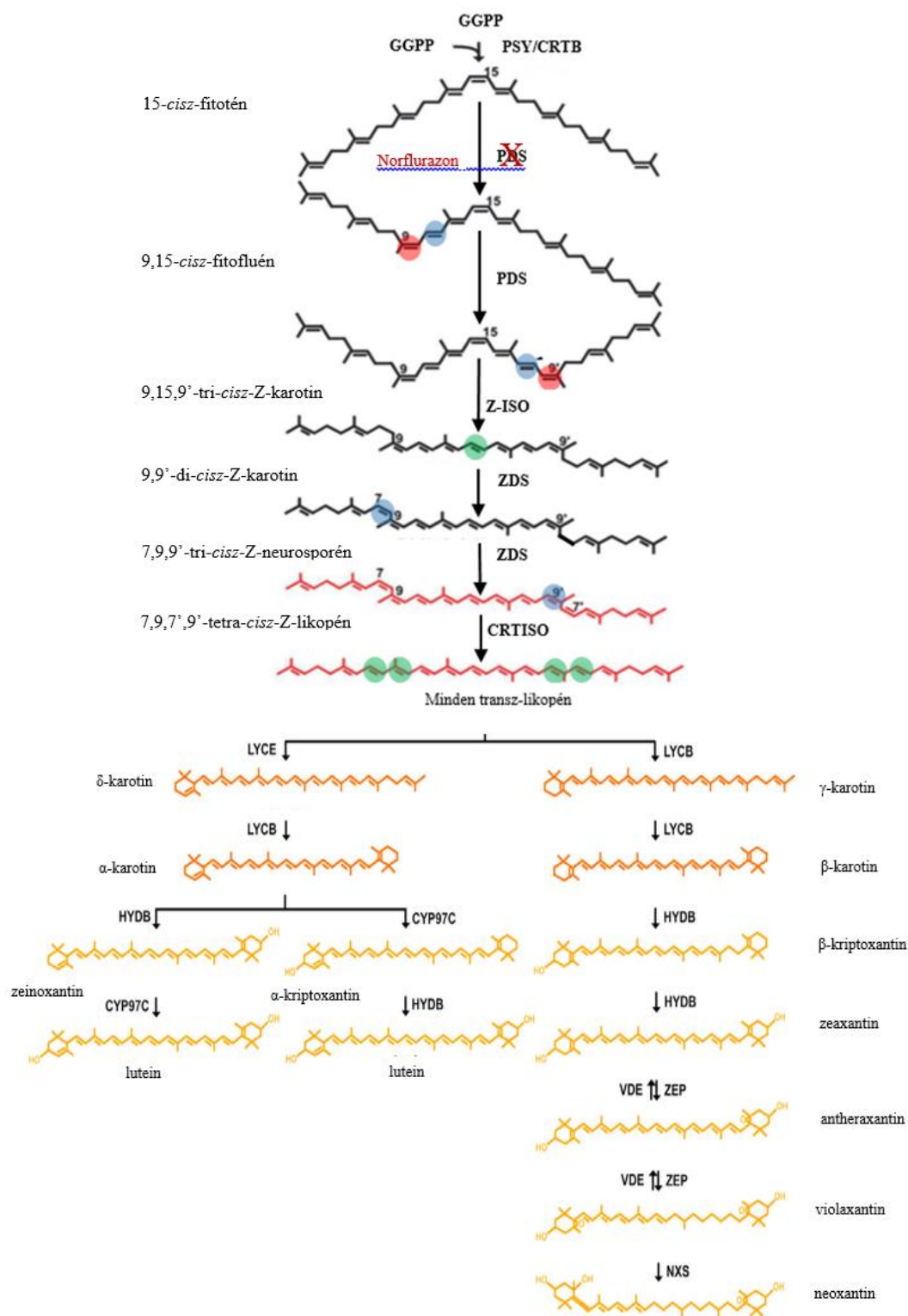
A karotinoidok a természetben a legelterjedtebb apoláros pigmentek, melyek nélkülözhetetlenek minden élőlény számára. A karotinoidok 40 szénatomos tetraterpenoidok, formailag nyolc izoprén egységből épülnek fel. A molekula vázát 7-15 konjugált kettős kötést tartalmazó poliénlánc alkotja, amelynek egyik vagy mindkét vége lineáris vagy gyűrűt tartalmazó. A poliénlánc biztosítja a karotinoidok jellegzetes fizikai és kémiai tulajdonságait. Oxigéntartalmú származékaik a polárisabb karakterű xantofillok (Maoka, 2020).

A karotinoidok kémiai és szerkezeti sokoldalúsága sokrétű funkciót biztosít számukra. A fő szerepeik:

1. Stabilizálják a fehérjék szerkezetét, illetve fontosak egyes fehérje-komplexek összeszerelésében, valamint a lipid kettősrétegű membránok integritásában és fluiditásának módosításában is szerepet játszanak.
2. A fotoszintézisben kiegészítő pigmentként részt vesznek a fénygyűjtési folyamatban, így kiszélesítve a hasznosítható fény spektrumát. A klorofillmolekulák triplett gerjesztett állapotait kiolthatják azáltal, hogy a felesleges gerjesztési energiát átveszik és hő formájában disszipálják (ezt a folyamatot nemfotokémiai kioltásnak nevezzük, 17. oldal); ez a szerep kulcsfontosságú a klorofill fotooxidációja elleni védelemben.
3. A sejtek és sejtorganellumok védelme az oxidatív károsodásokkal szemben, amit úgy valósítanak meg, hogy kölcsönhatásba lépnek szingulett oxigénmolekulákkal vagy megkötik a peroxigyököket, így akadályozva meg a reaktív oxigénformák felhalmozódását (Frank és Cogdell, 1996).
4. A karotinoidok élénk színeket, illatokat és ízeket biztosítanak a virágok és termések számára, amelyek vonzzák az állatokat a beporzás és a magvak terjesztése érdekében.
5. A karotinoidok enzimatis hasítása apokarotinoidok termeléséhez vezet, amelyek számos biológiailag fontos szereppel rendelkező vegyületek előanyagai, amelyek közé tartoznak a fitohormonok, a retinal, valamint az aromás illékony anyagok (Marasco és mtsai, 2006).

A karotinoidok felhalmozódása a sejtekben függ a szintézis és lebomlás sebességétől és raktározási kapacitástól (Shumskaya és mtsai, 2013). Minden oxigéntermelő fotoszintetikus szervezetben a karotinoid-szintézis kezdeti lépései azonosak. A növényekben a karotinoidok a kloroplasztiszbán képződnek, a sejtmagban kódolt enzimek segítségével (Cuttriss és mtsai, 2011).

A karotinoidok bioszintézise egy színtelen karotinoid, a fitoén előállításával kezdődik. Ezután a fitoén lépésről lépésre átalakul, melyek mindegyikét más-más enzim katalizálja, különböző színű és tulajdonságú karotinoidot létrehozva. Ezek közül néhány az 5. ábrán látható.



5. ábra. A legfontosabb karotinoidok bioszintézise a növényekben. GGPP - geranil-geranil-pirofoszfát, PSY - fitoén szintáz, PDS – fitotén deszaturáz, Z-ISO – ζ -izpmeráz, ZDS - ζ -karotén deszaturáz, CRTISO, LYCE - epsilon-cikláz, LYCB - béta-cikláz, CYP97C - ϵ -karotin-hidroxiláz, HYDB - karotin- β -hidroxiláz, VDE - violaxantin-deepoxidáz, ZEP - zeaxantin-epoxidáz, NXS - neoxantin-szintáz. A lépések részletes leírása a szövegben található.

Az első lépés, ahol a karotinoid-szintézis elválik az egyéb terpenoidok szintézisétől, az a fitoén képződése két geranil-geranil pirofoszfát kondenzációjával. Ezt a lépést a fitoén szintáz (PSY) katalizálja, amely 15-cisz fitoént hoz létre, amely csak három konjugált kettős kötést tartalmaz (Shumskaya, és Wurtzel, 2013; Shumskaya és mtsai, 2012; Tran és mtsai, 2009). Ezt követi két újabb kettős kötés kialakítása a 11 és 11' pozícióban, amit a 9 és 9' pozíciójú kettős kötés cisz formává alakulása kísér, így egy tri-cisz ζ -karotin keletkezik. Ez a 15. pozícióban transz konfigurációvá izomerizálódik és di-cisz ζ -karotinoid jön létre. Ezután a 7 és a 7' pozícióban keletkezik két újabb telítetlen kötés, ami szintén cisz konfigurációjú, így tetra-cisz-likopén más néven prolikopén jön létre. Ez újabb izomerizációs lépések révén transz-likopénné alakul (5. ábra). Mindezen lépéseket baktériumokban, kivéve a kéalgákban egyetlen enzim katalizálja, a CrtI. Cianobaktériumokban és növényekben a kettős kötések kialakítását a fitoén-deszaturáz és a ζ -karotén deszaturáz végzi. Az izomerizációs lépéseket a Z-ISO és a crtH/CrtISO enzimek végzik. Ugyanakkor az izomerizációt a fény is hajtja, kisebb hatékonysággal és specificitással (Proctor és mtsai, 2022). Likopénből fajra és szövetre jellemző módon különböző karotinoidok jönnek létre. Növények levelében a likopén ciklizálódik α vagy β -karotinná és azokból oxigén beépülésével különböző xantofilok képződnek. A termésekben egyéb karotinoid-féleségek is képződhetnek.

A kloroplasztisban képződött karotinoidok ritkán fordulnak elő szabadon vagy a membránokban, hanem általában különböző fehérjestruktúrákhoz kötődnek. A membránban nagy mennyiségben felhalmozódó szabad karotinoid olyan mértékben megváltoztathatná a membrán fiziko-kémiai tulajdonságait, hogy az károsítaná a membránfunkciót. Ez okból kifolyólag a képződő karotinoidok különböző fehérjestruktúrákhoz kötődnek, és különböző fotoszintetikus komplexekbe, zárványokba, plasztoglobulusba (*Hematococcus*) és a fénybegyűjtő antennakomplexekbe épülnek be. Emellett a kromoplasztisokban fehérjékhez kötődve fibrilláris, globuláris, tubuláris és kristályos formában tárolódnak, pl. a sárgarépa gyökerében, paradicsom termésében stb. A *C. reinhardtii*-ban nincs kromoplaszt, ehelyett a szemfoltban és a burokmembránban kötődik meg karotin. A folyamatoknak összehangoltan kell végbe mennie és megfelelő egyensúly kialakítása szükséges a karotin szintézise és a karotin kötő fehérjék szintézise között (Tianhu és mtsai, 2018).

A karotinoidok lebontását specifikus oxigenázok végzik, amelyek a karotinoid molekulát megfelelően hasítva apokarotinoidokat hoznak létre. Az apokarotinoidok illékony

anyagok révén segítik a karotinoidok gyors eliminálását, illetve maguk is fontos bioaktív anyagokat alkotnak (növényi hormonok, mint pl. az ABA, a strigolaktonok, különböző aroma- és illatanyagok) (Simkin, 2021). A karotinoid-homeosztázis fenntartásához illetve a biotechnológiai termelés fokozásához ennek a három folyamatnak az összehangolt szabályozására van szükség.

A fotoszintetikus apparátusban jelen lévő kiegészítő pigment és védő funkcióikon túl (Frank és Cogdell, 1996) a karotinoidoknak szerkezeti szerepük van mind az antenna (Paulsen és mtsai, 1990), mind a reakciócentrum klorofillkötő fehérjéinek összeszerelődésében (Moskalenko és Karapetyan, 1996). Korábban megfigyelték, hogy a PSII összeszerelődése és a D1 fehérje gyors turnovere karotin bioszintézist igényel (Trebst és Depka, 1997).

Ismeretes, hogy erős fény hatására a violaxantin ciklus aktiválódik, amelyben a violaxantin deepoxidációja az anteraxantin és a zeaxantin felhalmozódásához vezet (Siefermann-Harms, 1977; Pfündel és Bilger, 1994; Latowski és mtsai., 2011). A violaxantin ciklusból származón túl további zeaxantin képződést figyeltek meg magasabb rendű növényekben (Demmig, 1990). Évtizedek óta ismert a β -karotin erős fényben történő lebomlása. Már az 1950-es években kimutatták, hogy a fotoinhibíció során a β -karotin mennyisége a klorofilok lebomlását megelőzően csökken, és e két pigment mennyisége jóval azelőtt elkezd csökkenni, mielőtt a xantofilok bomlása megkezdődne (Sironval és Kandler, 1958).

A PSII felépüléséhez elengedhetetlen a β -karotin. Amikor fehérjéhez kötődik a β -karotin, védett marad, és nem férhető hozzá könnyen egy másik karotinkötő fehérjére számára. A PSII javító mechanizmusainak (turnover) fenntartásához a folyamatos karotin bioszintézis elengedhetetlen. Erős fényben a karotinok bioszintézise fokozódik.

A violaxantin ciklus az antennában található zeaxantin általi felesleges fényenergia disszipációjában játszik fontos szerepet (Demmig, 1990; Frank és mtsai, 1994; Horton és mtsai, 1996; Havaux és Niyogi, 1999; Jahns és mtsai, 2012). Feltételezhető, hogy a reakciócentrumban a β -karotinból képződő zeaxantin szintén fotoprotektív szereppel bír (Adamska és mtsai, 1992; Levy és mtsai, 1993; Jahns és mtsai, 2009).

1.5. Mikrofluidika

A mikrofluidika a fizika, a kémia, a biológia, a folyadékdinamika, a mikroelektronika és az anyagtudomány egyesített elvein alapul. Különféle anyagok alkalmasak miniatürizált chipek előállítására: szilikon, üveg, polidimetil-sziloxán (PDMS) és papír. A mikrofluidikai eszközök csatornákat és kamrákat tartalmaznak μm -es mérettartományban. A mikrofluidikai eszközökbe bemeneti és kimeneti nyílásokon keresztül juttatjuk be és ki a folyadékokat, az áramlást pedig pumpák segítségével biztosítjuk.

A kívánt méretű, formájú és geometriájú platformok gyártásához a módszerek változatos repertoárja választható. Akár önmagukban, akár más eszközökkel kombinálva használhatjuk őket (Niculescu és mtsai, 2021). A kezdetekben üveget és szilikont használtak mikrofluidikai eszközök készítésére. A szilikon nagyfokú hővezető képességgel rendelkezik, kémiaiilag ellenálló. Hátrányai közé tartozik viszont, hogy a szilikonból készült mikrofluidikai eszközök elkészítése drága és nem kompatibilis az optikai képalkotással, ugyanis nem átlátszó. Ehhez képest az üveg mikrofluidikai eszközök előrelépést jelentettek, ugyanis nagy előnyük, hogy alkalmasak az optikai képalkotásra. Az üvegből készült eszközök kémiaiilag ellenállóak és mindemellett nyomásállóak is. Az üveg eszközök tartóssága kedvez a különböző lézeres technikák alkalmazásának, stabilitásuk pedig megakadályozza az eszközök deformálódását.

A PDMS jelenleg a legnépszerűbb szerves polimer a mikrofluidikai eszközök gyártásának területén. Kiemelkedő tulajdonságai miatt előnyt élvez a többi anyaggal szemben: előállítása olcsó, biokompatibilis, gázáteresztő és átlátszó, így optikai vizsgálatokhoz is alkalmas. A papírból készült eszközöknek is vannak előnyeik: költséghatékony az előállításuk, biokompatibilisak. A papír alapú mikrofluidikai eszközök alkalmasak szövetek mikrokörnyezetének modellezésére, illetve *in vitro* sejtkultúrák létrehozásához porózus szerkezetük, felületi tulajdonságaik, vastagságuk és merevségük miatt (Liu és mtsai, 2022).

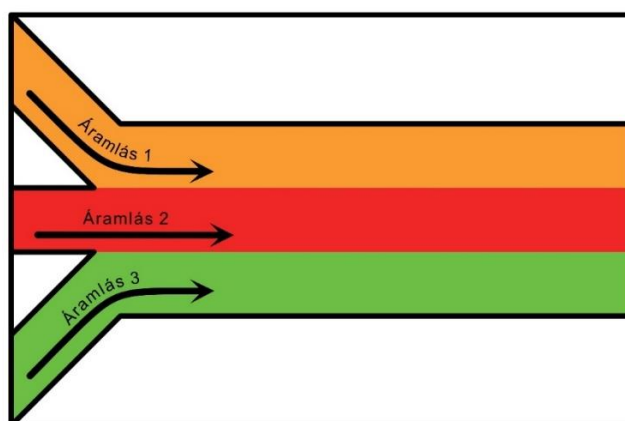
A mikrofluidikai eszközökben a folyadékok áramlása alacsony Reynolds számmal jellemezhető (1. egyenlet), ezért ezekben az eszközökben egyenletes lamináris áramlás van, és hiányoznak a turbulens áramlásokra jellemző kaotikus nyomás- és áramlási sebességváltozások. Ez lehetővé teszi az áramlási mező pontos tervezését az eszköz geometriáján és az áramlás létrehozásához kialakított nyomásokon keresztül. Egy

gondosan megtervezett és alkalmazott mikrofluidikai eszközzel a sejtek nyírófeszültsége minimálisra csökkenthető, ami lehetővé teszi az élettani kísérleteket (Kim és mtsai, 2007; Barber és mtsai, 2007). Ezen kívül az ilyen alacsony Reynolds-számú áramlásoknál a tehetetlenségi erők figyelmen kívül hagyhatóak.

$$Re = \frac{\rho u L}{\mu} = \frac{u L}{\nu}$$

1. egyenlet. A Reynolds szám (Re) leírja a viszkozus és az inercia erők közötti kapcsolatot. Az egyenletben ρ a folyadék sűrűsége, u a folyadék sebessége, L a csatorna szélessége, μ a dinamikus viszkozitás, ν a kinematikus viszkozitás. Nagy Re értéknél turbulencia jelenik meg, viszont alacsonynál az áramlás lamináris. A Reynolds szám a mikrofluidikában jellemzően extrém alacsony, $Re < 0.1$.

A mikrofluidikai eszközökre jellemző lamináris áramlás hatékony folyadékmanipulációt tesz lehetővé. Ezáltal több párhuzamos áramlás is vezethető egy csatornában, amelyek között csak diffúzióval lehetséges a keveredés (6. ábra). Ez a technika az oldatok, reagensek és a sejtvonalak kezelésének új lehetőségeit nyitotta meg.



6. ábra. Mikrofluidikai eszközben különböző színű festék oldatok áramlása. Megfigyelhető a három folyadék lamináris áramlása, közöttük pedig diffúzió játszódik le (Galajda és mtsai, 2015).

A mikrofluidika által az is elérhetővé vált, hogy laboratóriumi méretű berendezéseket egy mikroszkóp tárgylemezére kicsinyíthessünk, ami lehetővé tette a kísérletek

párhuzamosítását rendkívül kis mintatérfogat mellett, illetve az egysejt- szintű vizsgálatokat is (Song és mtsai, 2020; Squires és Quake, 2005).

Napjainkban a kutatók és mérnökök számára az egyik legnagyobb kihívást a költséghatékony, nagy teljesítményű technológiák kifejlesztése jelenti. Az is fontos, hogy hozzáférhető, megfizethető és jó minőségű legyen. Ebben az összefüggésben a mikrofluidika alapú eszközök hatékony platformokat kínálnak az automatizáláshoz és az összetett feladatok egyetlen chipbe történő integrálásához. A mikrofluidikai eszközök előnye a mintamennyiség és a minták és reagensek áramlási sebességének precíz szabályozásában rejlik, amely lehetővé teszi például különböző vegyületek nagy érzékenységgel kimutatását és mennyiségi meghatározását. Ezeknek a kiváló tulajdonságoknak köszönhetően a mikrofluidikát egyre általánosabban használják az egészségügyben, valamint különböző biológiai és orvosi területeken, a diagnosztikában, a környezetanalitikában, és élelmiszer- és mezőgazdasági kutatásokban (Solanki és mtsai, 2020). A mikrofluidikai chippek felhasználhatók többek között nanorészecskék előállítására, gyógyszerkapszulázására, ezek célba juttatására, sejtelemlzésre, diagnózisra és sejtenyésztésre (Niculescu és mtsai, 2021).

A mikrofluidikai és bioszenzoros technológiák integrálhatóak, ami lehetővé teszi a kémiai és biológiai komponensek egyetlen platformon történő elhelyezését, ami új lehetőségeket nyit meg a jövőbeni bioszenzoros alkalmazások területén, köszönhetően a hordozhatóságnak, a valós idejű észlelésnek, a példátlan pontosságnak és a különböző analitok egyetlen eszközben történő egyidejű elemzésének (Luka és mtsai, 2015). A mikrofluidika forradalmasíthatja a sejtbiológiai kutatásokhoz való hozzáállásunkat is. A mikrofluidika csatornák előnyei, hogy méreteik jó egyezést mutatnak a biológiai sejtek fizikai méretéhez, aminek köszönhetően képesek vagyunk a sejt mikrokörnyezetének paramétereit megfelelő méretben és időskálán szabályozni. Az utóbbi években jelentős előrelépések történtek a sejtek tenyésztésére, valamint az azt követő kezelésekre és elemzésekre szolgáló mikrofluidikai eszközök tervezése és alkalmazása terén (Young és mtsai, 2010).

1.5.1. Mikrofluidika alkalmazása az alga biotechnológiában

A mikroalgák a bioüzemanyag-előállítás egyik potenciális forrását jelentik olyan előnyeik miatt, mint például a nagy energiasűrűség, a szén-dioxid elnyelés, mely mérsékelheti a globális felmelegedést, valamint az, hogy nem verseng földterületekért az élelmiszertermeléssel. A sikeres bioüzemanyag-előállításhoz a magas lipidtartalma, nagy növekedési erejű és a környezeti paraméterekkel szemben nagy toleranciájú mikroalgákra van szükség, valamint rendkívül fontos a nevelési feltételek optimalizálása is. A mikrofluidikai technológia vonzó lehetőséget kínál különböző algafajok és törzsek gyors tesztelésére és stressztoleranciájuk vizsgálatára (Juang és Chang, 2016; Kim és mtsai., 2018; Bodenes és mtsai., 2019).

Az első mikrofluidikai sejt citométert, amely elemzi és megkülönbözteti a mikroalga sejteket Benazzi és munkatársai fejlesztették ki (Benazzi és mtsai, 2007). A mikrofluidikai eszközöket fel lehet használni a különböző mikroalga-fajok méret alapján történő szétválogatására (Honsvall és mtsai, 2016). A megtermelt biomassa mennyiségét és minőségét jelentősen csökkenti egyes inváziós mikroalgák jelenléte a kultúrákban. Ezért például kifejlesztettek olyan nagy hatékonyságú és költséghatékony spirális alakú mikrofluidikai kamrát, amely lehetővé teszi a *Tetraselmis suecica* (lipidben gazdag mikroalgák) elválasztását a *Phaeodactylum tricornutum*-tól, amely egy invazív kovamoszat. Az optimális áramlási sebességet alkalmazva a *P. tricornutum* sejtek akár 95%-át is elválasztották a tenyésztőtől anélkül, hogy a sejtek életképességét befolyásolták volna. Tehát az inerciális mikrofluidikában nagy potenciál rejlik a mikroalgák minimális méretkülönbséggel történő szétválogatására (Syed és mtsai, 2018, Li és mtsai, 2017). Algák esetében a mikrofluidikai platformok szisztematikus növekedési vizsgálatokra, tápoldat-szűrésre, fajkölcsonhatás-vizsgálatokra, valamint a fényfüggő növekedési kinetika precíz vizsgálatára is használhatóak (Westerwalbesloh és mtsai, 2019; Kim és mtsai, 2015).

Mikroalga és cianobaktérium törzsek hosszú távú megfigyelésére és képalkotásra is alkalmazzák a mikrofluidikát és így könnyedén megfigyelik a biológia rendszerek dinamikáját (Chung és mtsai, 2016). A mikroalgák különböző stresszhatásokra bekövetkezett válaszait is nyomon lehet követni a mikrofluidikai kamrákban, például sejtosztódási sebesség, klorofill-a fluoreszcencia, illetve Raman spektroszkópia alapján, de akár fluoreszcensen jelölt anyagokat is lehet alkalmazni (Zheng és mtsai, 2013).

Mikrofluidikus bioszenzoros rendszerekben a klorofill-a fluoreszcencia alapján gyorsan és pontosan lehet jellemezni az egyes mikroalgasejtek életképességét (Wang és mtsai, 2013). Kifejlesztettek olyan, ún. "PhenoChip" platformokat, amelyek a fenotípusok többparaméteres fotofiziológiai jellemzésére és kiválasztására alkalmasak egysejt-szinten, a felhasználó által beállított fizikai-kémiai körülmények között (Behrendt és mtsai, 2020; Lefèvre és mtsai, 2012). Peszticidek kimutatására is alkalmaznak mikroalga bioszencor chipeket (Kashem és mtsai, 2019).

2. Célkitűzés

Hagyományosan az algákat lombikokban nevelt folyadékkultúrákban szokták nevelni, amelyekben az egyes sejteket folyamatosan változó fényintenzitás, oxigénkoncentráció és a kultúra korának megfelelő tápanyagellátás éri. Ezen problémák egy része megoldható szinkronizált alga kultúrák használatával, a sejtszám azonos szinten történő tartásával és a tápoldat folyamatos cseréjével (Mettler és mtsai, 2014). Sok esetben azonban, például a fejlődésbiológiai kutatások alkalmával, előnyös lenne az egyes sejtek fenotípusait több órán keresztül vagy egész életük során, azonos élettani körülmények között tanulmányozni. Erre kínál ideális megoldást a mikrofluidika.

A *Chlamydomonas reinhardtii* egy növekvő biotechnológiai jelentőséggel bíró modellszervezet, életciklus-folyamatainak és fotoszintézisének egysejt-szintű értékelése azonban nagyrészt még megoldatlan. A morfológia és a fotokémia közötti kapcsolat tanulmányozásának megkönnyítése érdekében célul tűztük ki a mikrofluidika klorofill-a fluoreszcencia indukciós mérésekkel történő kombinációját. Olyan mikrofluidikai eszközöket terveztünk kifejleszteni, amelyek alkalmasak az egysejt-szintű morfológiai és fotoszintézis-vizsgálatokhoz.

A következő célokat tűztük ki:

- 1) Egyetlen sejt csapdázására alkalmas mikrofluidikai kamrák fejlesztése alga egysejt-analízis megalapozásához.
- 2) Sejtosztódás megfigyelésére alkalmas csapdák fejlesztése, ahol egyetlen algasejtet majd az utódsejteket (kis sejtpopuláció) is képesek vagyunk becsapdázni, illetve a csapdában tartani.
- 3) Morfológia és klorofill-a fluoreszcencia egyidejű vizsgálata csapdáinkban Microscopy Imaging PAM készülék segítségével.
- 4) A módszer alkalmazhatóságának bemutatása: *Crvtc2-1* aszkorbát-hiányos mutánsokon végzett klorofill-a fluoreszcencia mérések, sejtosztódás megfigyelése, indukálható *PSBO* amiRNS vonalak vizsgálata, valamint a karotinoidok szerepének vizsgálata a PSII aktivitásának fenntartásában.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Mikrofluidikai eszközök tervezése és kivitelezése a *Chlamydomonas. reinhardtii* sejtek számára

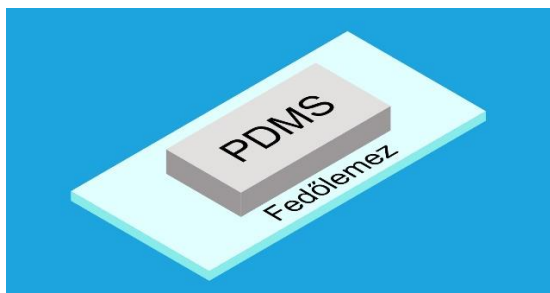
A mikrofluidikai eszközöket standard fotolitográfiai és lágy litográfiai technikákkal készítettük (Whitesides és mtsai, 2001). Az ún. „Tulipán” mikrofluidikai eszközöket Kovács Sándor (Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Növénybiológiai Intézet korábbi munkatársa) tervei alapján készítettem el a KLayout nyílt forráskódú szoftverrel (www.klayout.de). A különböző „Kehely” alakú csapdákat tartalmazó eszközök tervezését szintén a KLayout szoftverrel végeztem. Az öntőformákat Ábrahám Ágnes (Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biofizikai Intézet) készítette el standard fotolitográfiával. Az öntőformák készítéséhez egy szilícium lemezt vékony rétegben SU-8 negatív fotorezisztrel (Kayaku Advanced Materials, Inc., Westborough, MA, USA) vonunk be. A megtervezett eszköz negatívját ebbe a fényérzékeny anyagba rajzoljuk bele egy lézeríró segítségével (μ PG 101, Heidelberg Instruments Mikrotechnik GmbH, Heidelberg, Németország).

Az öntőforma az ún. „Tulipán” mikrofluidikai eszköz esetében egyetlen SU-8 rétegből készült (SU-8 2005 resin, Kayaku Advanced Materials, Inc., Westborough, MA, USA) 6,8 (SD = 0,8) μ m vastagságban.

Az SU-8 formákat egy éjszakán át szilanizáljuk vákuumban tridekafluor-1,1,2,2-tetrahidrooktil-triklór-szilánnal (Gelest Inc., Morrisville, PA, USA). A „Csésze” eszközhöz (14. ábra) két SU-8 2007 fotoreziszt réteget viszünk fel eltérő vastagságban, melynek segítségével megfelelő kamramélységet tudunk kialakítani, hogy megakadályozzuk az osztódó sejtek kiszökését a csapdákból. A „Csésze” csapdák felső rétege 3,8 (SD = 0,5) μ m vastag és keskeny nyílásokat/vájakat (<3 μ m) tartalmaz. A második réteg körülbelül 7,5 (SD = 0,6) μ m vastag, és nem tartalmaz nyílásokat.

A kísérletekhez használt mikrofluidikai eszközöket polidimetil-sziloxánból (PDMS) készítettem. A PDMS egy gumyszerű, biokompatibilis anyag, amely polidimetil-sziloxán bázis és az ún. iniciátor 10:1 arányú keveréke (Sylgard 184, Dow Inc., Midland, MI, USA). A PDMS-t az SU-8 öntőformákra öntöttük, és egy éjszakán át 40 °C-on állni hagytuk. A folyadékok beáramoltatására használt kimeneti és bemeneti csöveknek

megfelelő lyukakat vágtam a mikrofluidikai eszközbe. A lyukasztást követően a PDMS eszközt oxigén plazmakezeléssel irreverzibilisen egy fedőlemezhez kötöttem (7. ábra).



7. ábra. A PDMS réteg és fedőlemez egymáshoz való elhelyezkedésének sematikus ábrája.

Az így elkészült eszközt 85°C-on 30 percig hőkezelttem, hogy a kötést megerősítsük.

A kísérleteinkhez használt tápoldatokat és a sejt kultúrákat HPLC csövekkel (1,5 mm külső átmérő; 0,75 mm belső átmérő) juttattuk be a mikrofluidikai eszközeinkbe a bemeneti nyílásokon keresztül. Az áramlási sebességet fecskendőpumpával szabályoztuk (80 - 360 $\mu\text{L/h}$) (Model No. 4000, New Era Pump Systems Inc., Farmingdale, NY, USA).

3.2. A folyadékáramlás tulajdonságainak jellemzése modellszámításokkal és nyomkövető részecskékkel

A mikrofluidikai eszközökön belüli folyadékáramlás jellemzőit a Comsol Multiphysics 4.3a szoftverrel (COMSOL AB, Stockholm, Svédország) modellezte Ábrahám Ágnes (Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biofizikai Intézet). A sebesség-profilokat a „Lamináris áramlás” időfüggő modelljével vizsgáltuk. A „Tulipán” eszközre a „sekély csatorna” közelítést alkalmaztuk, hogy egy 3D-s modellt kapjunk az áramlási vonalakról. A „Csésze” csapdák esetében a kétrétegű geometriára vonatkoztatva (14. ábra) készítettük el a 3D-s modellt. A „Tulipán” és a „Csésze” mikrofluidikai eszközök 3, illetve 7 párhuzamos csatornából állnak, amelyeket figyelembe vettünk az áramlási sebességek megadásakor. Számításaink során 26,7 $\mu\text{L/h}$ -t áramlást használtunk a „Tulipán” és 17 $\mu\text{L/h}$ áramlást a „Csésze” alakú csapdák áramlási modelljéhez.

A szimulációk mellett fluoreszcens mikrogöngyöket (Fluoresbrite YG karboxilát mikrogöngyök, $d = 1\mu\text{m}$; Polysciences, Inc. Warrington, PA, USA) használtunk nyomkövető részecskékként, az áramlási vonalak megjelenítéséhez.

3.3. *Chlamydomonas reinhardtii* törzsek és nevelési körülményeik

3.3.1. *Crvtc2-1* aszkorbát-hiányos mutáns nevelése

A „Tulipán” mikrofluidikai eszköz tesztelésére egy, a CLiP gyűjteményből (<https://www.chlamylibrary.org/>) származó és korábban már részletesen jellemzett aszkorbát-hiányos *Crvtc2-1* mutáns törzset illetve annak vad típusú törzsét, a CC-4533-t használtunk (Vidal-Meireles és mtsai, 2020). A CC-4533 és a *Crvtc2-1* törzsek előkultúráit mixotróf körülmények között, Tris-acetát-foszfát (TAP) tápoldatban, 25 mL-es Erlenmeyer lombikokban, 22°C-on, $80\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ megvilágításon három napig tenyésztettük. Az előkultúrákat TAP tápoldatba vagy minimál (HSM) médiumba helyeztük át. A kísérlethez a kultúra kezdeti klorofill (a+b) tartalmát $0,1\mu\text{g/mL}$ értékre állítottuk be. A TAP, illetve HSM tápoldatban a növekedés harmadik, illetve negyedik napjára 2-4 millió sejt/mL sejtsűrűséget értünk el.

3.3.2. Nitrát-indukálható amiRNS vonalak előállítása és nevelése

A nitrát-indukálható *PSBO* mesterséges mikroRNS (amiRNS) transzformánsokat, amelyeket a kísérleteink során használtunk, csoportunk korábbi tagja, André Vidal-Meireles hozta létre a következő módon: A *C. reinhardtii* *PSBO* lókuszt megcélzó amiRNS-eket az ún. WMD2 szoftver segítségével tervezzük meg (Molnár és mtsai, 2009; Ossowski és mtsai, 2008). Az egyik amiRNS a *PSBO* kódoló régióját (CDS, *PSBO-A* törzsként jelölve), a másik a *PSBO* 3'UTR-jét célozza meg (*PSBO-B* törzsként jelölve). A szintetizált, Spel-kompatibilis végű szensz és antiszensz oligonukleotidokat forralással, majd lassú lehűtéssel, a Spel-el emésztett pMS539 vektorba ligáljuk. NIT1-promótere indukálja *PSBO* amiRNS-konstrukció expresszióját, amint a tápoldatban található nitrogénforrást ammóniáról nitrátra cseréljük (Schmollinger és mtsai, 2010). A plazmidot HindIII-mal végzett emésztéssel linearizáljuk, ami üveggyöngyökkel végzett vortexeléssel a megfelelő vonalba (cw15-325) transzformálható (Kindle, 1990). A megfelelő klónok kiválasztása Molnár és mtsai. (2009) és Schmollinger és mtsai. (2010)

módszerei alapján történt (Vidal-Meireles és mtsai, 2023). Kontrollként egy üres vektor (*EV31*) kontroll törzset használtunk.

A nitrát-indukálható *PSBO* amiRNS transzformánsokkal végzett kísérleteinkhez a „Tulipán” alakú csapdákat használtuk. Az *EV31* kontroll törzset a fentebb leírtak szerint neveltük. A *PSBO-A58* és *PSBO-B22* transzformáns törzsek nevelése annyiban tért el az előzőben leírtaktól, hogy az előkultúra és a főkultúra nevelésének második napján 469 μL 100 mM-os NH_4Cl -t adagoltunk a 25 mL-es Erlenmeyer lombikokban nevelt kultúrákhoz, melynek az volt a célja, hogy mérsékeljük az amiRNA konstrukció nemkívánt indukcióját.

3.3.3. CC-124 vonalak nevelése

A „Csésze” alakú csapdák tesztelésére és a karotinoidok szerepének vizsgálatához a széles körben alkalmazott CC-124 vad típusú törzset használtuk. Az előkultúrákat mixotróf módon TAP tápoldatban, 50 ml-es Erlenmeyer lombikokban, 22°C-on, 80 μmol foton $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ megvilágításon folyamatos rázatás mellett három napig neveltük. Az előkultúrákat kihígítottuk 0,1 μg klorofil(a+b)/mL-re TAP tápoldatban és 22°C-on, 200 μmol foton $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fényintenzitáson, 1%-os CO_2 tartalmú levegővel buborékoltatva, 18 óra fény és 6 óra sötét ciklust alkalmazva szinkronizáltuk egy Multi-Cultivator MC 1000-OD típusú bioreaktorban (Photon Systems Instruments, Brno, Czech Republic). A második napra a tenyészetek elérték a 4-7 μg /mL klorofil (a+b)-tartalmat, ami kb. 2-4 millió sejt/ml-nek felel meg.

3.4. A kultúrák betöltése, kezelése és tenyésztése a mikrofluidikai eszközökben

A „Tulipán” mikrofluidikai eszköz két különálló egységébe TAP vagy HSM tápoldatban, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kl(a+b) tartalomra beállított CC-4533 és *Crvtc2-1* kultúrákat töltöttünk be 80 $\mu\text{L}/\text{h}$ áramlási sebességgel, amelyet fecskendőpumpával biztosítottunk (Model No. 4000, New Era Pump Systems Inc., Farmingdale, NY, USA) (9. ábra). Az áramlási sebességet a kísérlet teljes ideje alatt állandó értéken tartottuk.

A β -karotin-hiány PSII-re gyakorolt hatásának vizsgálatához a „Tulipán” mikrofluidikai eszközbe fecskendő pumpa segítségével 80 $\mu\text{L}/\text{h}$ áramlási sebességgel töltöttük be a CC-

124 alga kultúrát 60 percen keresztül. Ezután a fecskendőpumpa tartalmát lecseréltük TAP tápoldatra a kontroll csoportban és 5 μM -os norflurazonos TAP tápoldatra a kezelt csoportban. Az áramlási sebességet ezzel egy időben 180 $\mu\text{L/h}$ -ra emeltük, majd a mérés teljes ideje alatt állandó értéken tartottuk. 250 μM -os linkomicin kezelés hasonló módon történt.

A *PSBO* amiRNS transzformánsokkal végzett kísérletekhez a „Tulipán” mikrofluidikai eszközbe fecskendő pumpa segítségével 80 $\mu\text{L/h}$ áramlási sebességgel töltöttük be az *EV31* és a *PSBO-A58* vagy *PSBO-B22* algakultúrát 30 percen keresztül. Ezután a fecskendőpumpa tartalmát lecseréltük TAP tápoldatra. Az áramlási sebességet ezzel egy időben 360 $\mu\text{L/h}$ -ra emeltük, majd 4 órán át ezen az értéken tartottuk. Ezután a fecskendőpumpa tartalmát lecseréltük TAP(KNO_3) tápoldatra és további 20 órán keresztül áramoltattuk.

A hét különböző „Csésze” alakú csapdát tartalmazó mikrofluidikai eszközökbe fecskendőpumpa segítségével 60 percen keresztül CC-124 alga kultúrát töltöttünk (1 μg Kl(a+b)/mL), 80 $\mu\text{L/h}$ áramlási sebességgel. Ezt követően a TAP tápoldattal történő ellátást a kísérlet végéig folyamatosan biztosítottuk, 180 $\mu\text{L/h}$ áramlási sebességgel. A II. és VI. típusú csapdákat tartalmazó „Csésze” alakú mikrofluidikai eszközök feltöltéséhez kezdetben 80 $\mu\text{L/h}$ áramlási sebességet biztosítottunk körülbelül 40 percig, majd átmostuk TAP tápoldattal a bevezető csövet, ezután 180 $\mu\text{L/h}$ áramlási sebességet használtunk a kísérlet végéig.

Az algakultúrák megvilágítását fehér LED spot mikroszkóp lámpával biztosítottuk, melynek intenzitása megközelítőleg 180 μmol foton $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ a mikrofluidikai eszköz felületén. 18 óra fény és 6 óra sötét ciklust állítottunk be. A bakteriális fertőzés megelőzése érdekében Hygromycin B-t (Duchefa Biochemie, Haarlem, Hollandia) és paromomicin-szulfátot (Sigma Aldrich, Burlington, MA, USA) adtunk a TAP tápoldathoz 1 $\mu\text{g/mL}$ végső koncentrációban, még a sejtek mikrofluidikai eszközbe töltése előtt.

3.5. Mikroszkópia és klorofill-a fluoreszcencia mérések

A mikroszkópos megfigyeléseket egy AxioScope A1 epifluoreszcens mikroszkóp (Zeiss GmbH) segítségével végeztük 20x (Zeiss, Fluar 20x/0.75) vagy 63x objektívet (Zeiss,

Plan-Neofluar 63x/1.25 Oil) használva. A fénymikroszkópos felvételek a mikroszkóphoz egy 60N-C 2/3" 0,63x videoadapterrel kapcsolt Axiocam 503 color CCD kamerával (Zeiss GmbH, Jena, Germany) készültek. A különböző fotoszintetikus paraméterek mérésére egy szintén a mikroszkóphoz kapcsolt Microscopy Imaging PAM klorofill-a fluorométer mikroszkópos változatát (Walz GmbH, Effeltrich, Germany) használtunk.

A sejteket a klorofill-a fluoreszcencia-mérések előtt 15 percig sötétadaptáltuk. A klorofill-a fluoreszcenciát impulzus amplitudó modulált kék (470 nm) fénnel indukáltuk, a kibocsátott fluoreszcens képet pedig egy 60N-C 2/3" 0.63x videoadapterrel a mikroszkóphoz csatolt IMAG-K6 CCD kamerával rögzítettük (Walz GmbH, Effeltrich, Germany). A klorofill-a fluoreszcencia F_0 szintjének meghatározásához a mérőfény fényintenzitását 2-es értékre, a frekvenciát pedig 2 Hz-re állítottuk be. Az erősítést a 20-as értékre, a csillapítást pedig 1-es, illetve 5-ös értékre állítottuk be a 20x és 63x objektívek esetében. Az F_M értékeket egy 820 ms-os telítési kék fényimpulzussal kaptuk meg 5-ös intenzitás mellett. A fotoszintetikus aktivitás jellemzésére használt F_V/F_M paramétert az $(F_M - F_0)/F_M$ összefüggés alapján számoltuk. Az NPQ indukcióhoz kék aktinikus fényt használtunk, körülbelül 151 és $383 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fotonáram sűrűség mellett, 30 percen keresztül és az F_M' értékeket percenként adott telítési impulzusokkal határoztuk meg. Az NPQ-t a következőképpen számoltuk: $(F_M - F_M')/F_M'$. Az aktinikus kék fény kikapcsolása után a sejteket folyamatos távoli vörös megvilágításnak tettük ki, amit külső LED-panellel biztosítottunk, és a fluoreszcencia paraméterek értékeinek helyreállítását 30 percig követtük.

A lombikokban nevelt folyadékkultúrák F_V/F_M -értékeit Handy-PEA készülékkel határoztuk meg (Hansatech Instruments Ltd., King's Lynn, Egyesült Királyság). A *Chlamydomonas reinhardtii* tenyészetek körülbelül 15 percig sötétadaptálódtak, majd $60 \mu\text{L}$ sejtszuszpenziót ($150 \mu\text{g KI(a + b)/mL}$) Whatman üveg-mikroszálalás szűrőre (GF/B) cseppentettünk, amelyet a Handy-PEA-ba készülék mintatartójába helyeztünk és felvettük a klorofill-a fluoreszcencia tranziens $3500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fotonáram sűrűség mellett, μs -os időfelbontásban, 1 s időtartam alatt.

A β -karotin PSII-be való beépülésének sebességét, illetve a β -karotin mennyiségének PSII turnoverre gyakorolt hatásának vizsgálatához 10 percig sötétadaptálással szakítottuk meg a $160 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fényintenzitással történő megvilágítást a fluoreszcencia mérés előtt. A mérés során 10 percenként meghatároztuk az F_V/F_M értékeket a korábban leírt

körülmények szerint, 63x-os objektívet használva. Egyes kísérletekben teljes sötétségben tartottuk a kultúráinkat a mérések alatt és között.

A *PSBO* amiRNS transzformánsokkal végzett kísérletek során 10 percig sötétadaptáltuk a sejteket a fluoreszcencia mérés előtt. A megvilágítás során $90 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fényintenzitást alkalmaztunk. Óránként meghatároztuk az F_v/F_m értékeket a korábban leírt paraméterek szerint, 63x-as objektívet használva.

3.6. Elektronmikroszkópia

A mikrofluidikai eszközök geometriai jellemzőit pásztázó elektronmikroszkóppal (SEM) Ábrahám Ágnes (Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biofizikai Intézet) vizsgálta meg. Ebből a célból a PDMS darabokat vékony aranyréteggel vonjuk be egy Quorum Q150T porlasztó bevonóval (100 mA, 120 s), majd egy JSM-7100F emissziós pásztázó elektronmikroszkóp segítségével megvizsgáljuk.

3.7. Statisztikai analízis

Minden kísérletet négy-tizenegy alkalommal megismételtünk, és az eredményeket átlagok és standard hibák ábrázolásával vagy reprezentatív példákon keresztül mutatjuk be. Az átlagértékek különbségeinek szignifikanciáját ($p < 0,05$) Student t-teszttel, egyfaktoros vagy kétfaktoros kevert elrendezésű ANOVA ill. Dunnett post-hoc tesztekkel határoztuk meg.

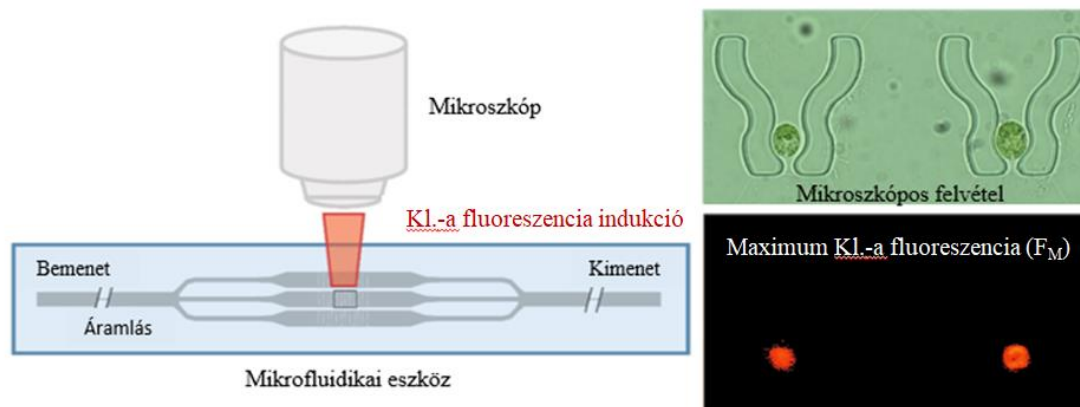
4. Eredmények

4.1. Mikrofluidikai eszközök fejlesztése

Napjainkban egyre elterjedtebb a mikrofluidikai eszközök használata, ugyanis nagyon kicsi a reagens igénye az ezekben végrehajtott méréseknek, így rendkívül költséghatékony. Ezen kívül nagyfokú párhuzamosítást tesz lehetővé, összetett feladatokat képesek vagyunk egyetlen eszközben végrehajtani, és precízen tudjuk szabályozni a minták és reagensek áramlási sebességét.

Célül tűztük ki a morfológiai vizsgálatok kombinálását klorofill-a fluoreszcencia indukciós mérésekkel a mikrofluidikai eszközeinkben. Olyan eszközöket szerettünk volna létrehozni, amelyek alkalmasak az egysejt-szintű morfológiai és fotoszintézis-vizsgálatokhoz.

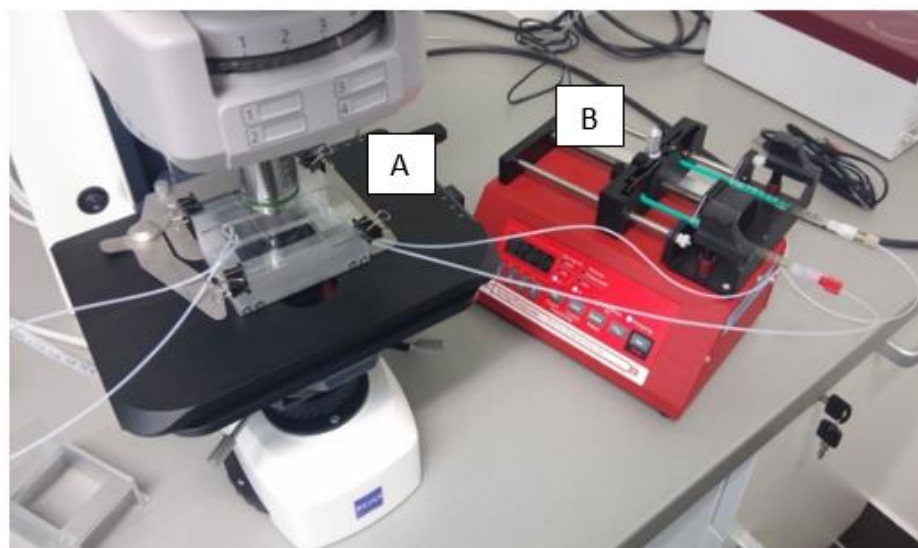
A mikrofluidikai eszközök készítéséhez lágy litográfiát alkalmaztunk, amely elterjedt technika a mikrofluidikában (Whitesides és mtsai, 2001; Qin és Xia, 2010). Először egy öntőformát készítettünk fotolitográfiával, majd erről polidimetilsziloxán (PDMS) öntvényeket állítottunk elő. A PDMS egy szilícium alapú rugalmas szerves polimer. Biológiaiilag inert, optikailag tiszta és vegyileg ellenálló. Gázáteresztő is, ezért elegendő oxigén, ill. szén-dioxid diffundál a sejtekhez. A PDMS átlátszó az UV, látható és közeli infravörös sugárzás számára, így alkalmas különféle mikroszkópos képalkotási technikákra. Viszonylag alacsony háttér-fluoreszcenciája mikroszkópos fluoreszcencia vizsgálatokra is alkalmassá teszi (Novo és mtsai, 2014; Tian és mtsai, 2019), beleértve a steady-state klorofill-a fluoreszcencia képalkotást is (Wang és mtsai, 2013; Juang és mtsai, 2016; Shapiro és mtsai, 2016). Mindezek alapján a *C. reinhardtii* morfológiai és a fotokémiai jellemzőinek vizsgálatához a mikrofluidikát klorofill-a fluoreszcencia indukciós mérésekkel terveztük kombinálni (8. ábra).



8. ábra. A) A mikrofluidikai eszköz a mikroszkóp alatt (sematikus ábra) B) Mikroszkópos felvétel a „Tulipán” csapdákbán elhelyezkedő sejtekről. C) Microscopy Imaging PAM készülékkel készült felvétel a maximum klorofill-a fluoreszcenciáról (F_M) (Széles és mtsai, 2022).

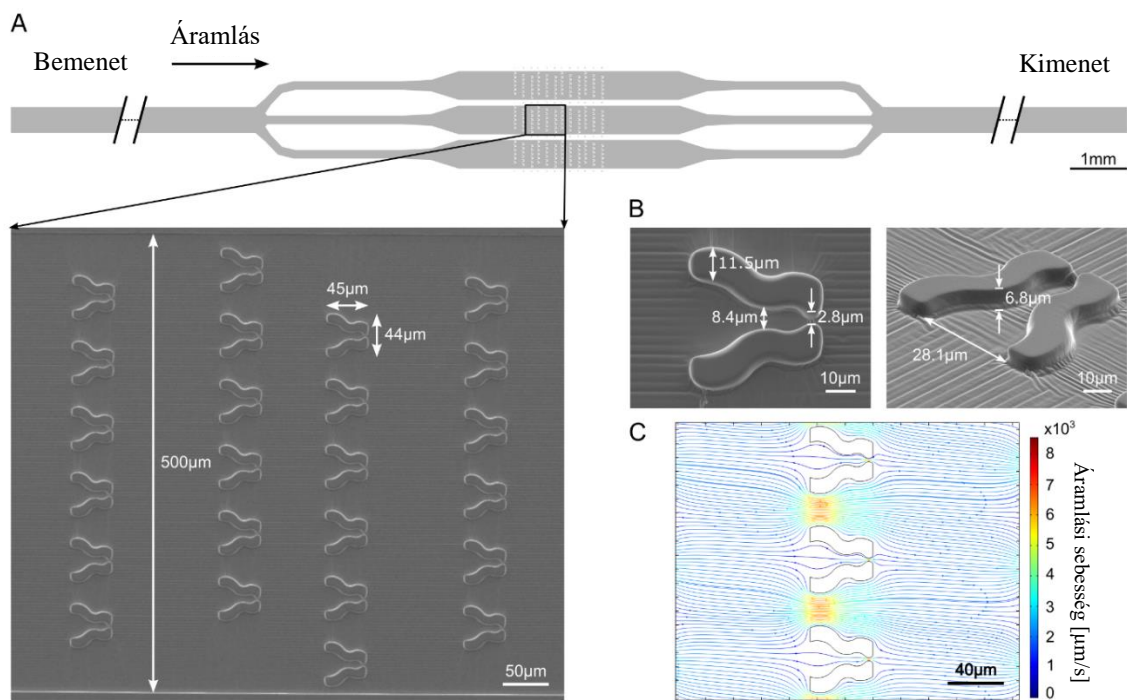
4.1.1. „Tulipán” mikrofluidikai eszköz egyetlen sejten végzett klorofill-a fluoreszcencia mérésekhez

A „Tulipán” csapdát tartalmazó mikrofluidikai eszköz megalkotásánál a fő célunk az volt, hogy egyenként csapdázzunk sejteket, majd azokat néhány órán át a csapdákban tartsuk, miközben kiváló minőségű klorofill-a fluoreszcencia méréseket tudunk végezni (8, 11. ábra).



9. ábra. Kísérleti elrendezés. A) Mikrofluidikai kamra a mikroszkóp alatt B) Fecskendőpumpa (saját felvétel).

Az eszköz három párhuzamos csatornából áll, amelyekben a csapdák az ábrán bemutatott módon vannak elrendezve (10A ábra). A csapdáknak viszonylag széles bevezető nyílásuk van (kb. $28\ \mu\text{m}$), a középső szakasz keskenyebb (körülbelül $8,5\ \mu\text{m}$ átmérőjű), a tápoldat kiáramlására szolgáló kivezető nyílások pedig körülbelül $3\ \mu\text{m}$ szélesek. Ez a méretezés megakadályozza a sejtek kiszökését a csapdákból (10B ábra). A csapdák magassága körülbelül $7\ \mu\text{m}$, hogy korlátozzuk a sejt függőleges irányú mozgását (10B ábra), ami elengedhetetlen a jó minőségű klorofill-a fluoreszcencia mérések készítéséhez. Ezek a csapdák több sorban vannak elrendezve, és az egymást követő sorok oldalirányban el vannak tolva egymáshoz képest. Ugyanazon mikrofluidikai eszközön belül két ilyen egységet építettünk fel, lehetővé téve a két algatörzs egyidejű vizsgálatát. Az $500\ \mu\text{m}$ széles csatornán belül 72 csapda van elhelyezve. Három ilyen csatornából áll egy egység, tehát 216 csapdát tartalmaz összesen (10A ábra).

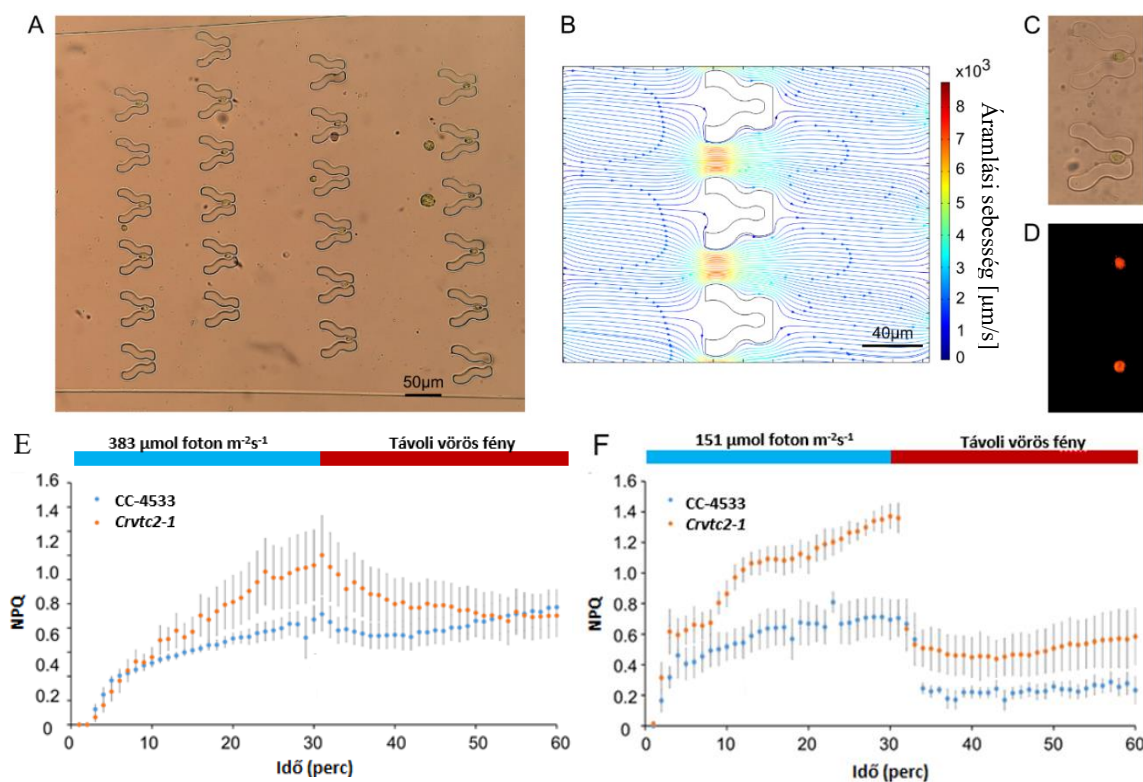


10. ábra. „Tulipán” mikrofluidikai eszköz, amely alkalmas egyedi *C. reinhardtii* sejtek csapdázására és rögzítésére, ezzel lehetővé téve fotoszintetikus aktivitásuk mérését. A) Az eszköz egységének vázlata és egy tartományáról pásztázó elektronmikroszkópal készült képe. Az áramlás irányát a nyíl jelzi. Egy mikrofluidikai eszközön két ilyen egység található. B) Pásztázó elektronmikroszkópos képek egyetlen „Tulipán” csapdáról. C) A készülékben folyó áramlás számítógépes modellje. Az áramvonalak sűrűsége és a színek jelenti az áramlás nagyságát (Széles és mtsai, 2022).

Az áramlás számítógépes modellezése kimutatta, hogy üres csapdák esetén az áramlási sebesség nagysága körülbelül 10-szer kisebb a csapda bejáratánál, mint a szomszédos csapdák között (10C ábra). Amiatt, hogy a csapdák közötti távolság és a csapdák bejáratainak szélessége hasonló, az áramlás körülbelül 10%-a halad át a csapdákon, lehetővé téve a csapdák sejtekkel való feltöltését. A csapdázási hatékonyságot tovább növeli a sorok egymáshoz viszonyított oldalirányú eltolása, mivel a csapdák közötti áramlás körülbelül 10%-os valószínűséggel eltalálja a következő sorban lévő csapdát (10C ábra).

A 11A ábrán szemléltetjük, hogy az eszközön átfolyó kultúrából a csapdák többsége (kb. 65-71%) egyetlen sejtet fog be, és a több sejtet csapdázott csapdák száma elhanyagolható. Ez annak a következménye, hogy a sejtet már csapdázott csapda hatékonyan blokkolja az áramlást a csapdában, ami drámaian csökkenti annak az esélyét, hogy egy újabb sejt

belépjen a csapdába (11B ábra). A csapdák középső szakaszukon körbeölelik a sejteket ezzel fizikailag immobilizálják őket. Ez a tulajdonság nagymértékben megkönnyíti a klorofill-a fluoreszencia pontos mérését (11C, D ábra).



11. ábra. A „Tulipán” mikrofluidikai eszközben csapdázott *C. reinhardtii* sejtek, illetve a rajtuk végzett nem-fotokémia kioltás (NPQ) mérések bemutatása. A) A csapdák megközelítőleg 70%-a csapdázott egyetlen sejtet az eszközön belül. A képek FLUAR 20x/0.75 objektívvel készültek. B) Áramlási modell a kimenetet blokkoló sejt esetén. Az áramvonalak sűrűsége és a színek jelenti az áramlás nagyságát. C) Fénymikroszkópos kép a becsapdázott sejtekről. A képek Plan-Neofluar 63x/1.25 inverziós olajos objektívvel készültek. D) Maximális klorofill-a fluoreszencia (F_m) mérések a „Tulipán” eszközben csapdázott sejteken. A kép a Microscopy Imaging PAM készülékkel, Plan-Neofluar 63x/1.25 inverziós olajos objektívvel készült. E) TAP tápoldatban, 383 $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ -en nevelt vad típusú (CC-4533) és aszkorbát-hiányos (*Crvtc2-1*) mutánsokon végzett egysejt-szintű NPQ mérések. F) HSM tápoldatban és 151 $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ -en nevelt vad típusú (CC-4533) és aszkorbát-hiányos (*Crvtc2-1*) mutánsokon végzett NPQ mérések. Az eredmények 5-7, egyetlen sejtben végzett mérés átlagát mutatják be.

A nemfotokémiai kioltás (NPQ) mérése Crvtc2-1 aszkorbát-hiányos Chlamydomonas mutánsokon

Ezt követően nemfotokémiai kioltás (NPQ) méréseket végeztünk a *Crvtc2-1* aszkorbát-hiányos mutánsokon, amelyek a vad típushoz (CC-4533) viszonyítva körülbelül 10%-nyi aszkorbátot tartalmaznak (Vidal-Meireles és mtsai, 2020). A nemfotokémiai kioltást először mixotróf módon nevelt kultúrákban határoztuk meg (TAP tápoldatban) és viszonylag erős kék fényben ($383 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Megfigyeltük, hogy az NPQ magasabb volt az aszkorbát-hiányos mutánsokban, mint a CC-4533 vad típusú törzsekben és az NPQ relaxáció nagyon lassú volt mindkét törzsben gyenge távoli vörös fényben – ezek a megfigyelések egyezést mutatnak a korábbi eredményekkel, amelyeket lombikokban nevelt folyadékkultúrákon kaptunk, vörös fényben (Vidal-Meireles és mtsai, 2020).

		CC-4533		<i>Crvtc2-1</i>	
		HS	TAP	HS	TAP
F _V /F _M	lombikban	0.429 ± 0.024	0.467 ± 0.016	0.426 ± 0.024	0.500 ± 0.024
		(n=4)	(n=9)	(n=4)	(n=8)
	egy sejten	0.448 ± 0.026	0.473 ± 0.016	0.469 ± 0.026	0.481 ± 0.017
		(n=4)	(n=9)	(n=4)	(n=8)
NPQ		0.705 ± 0.119	0.962 ± 0.105	1.360 ± 0.096*	1.868 ± 0.392*
		(n=4)	(n=9)	(n=4)	(n=5)

1. táblázat. A HSM, illetve TAP tápoldatban nevelt CC-4533 és *Crvtc2-1* kultúrákon végzett mérések F_V/F_M és NPQ értékei. Az F_V/F_M értékeket lombikban nevelt folyadékkultúrában Handy-PEA fluorométerrel ill. a „Tulipán” mikrofluidikai platform csapdáiban elhelyezkedő sejteken is megmértük. Az NPQ értékeket a „Tulipán” csapdákból 30 perc fényadaptáció után mértük, $383 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (TAP) vagy $151 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (HSM) fényintenzitáson. Nem volt kimutatható szignifikáns különbség az F_V/F_M értékek között a kétirányú ANOVA-val végzett számítás alapján $p < 0.05$ érték esetében. A * szignifikáns különbségeket jelent a CC-4533 és a *Crvtc2-1* mutáns NPQ értékei között, student t-próbával értékelve ($p < 0.05$).

Fotoautotróf körülmények között nevelve, HSM tápoldatban a *Crvtc2-1* mutánsok NPQ értéke körülbelül kétszer olyan magas volt, mint a vad típusban, $151 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ -en nevelve, kék fényben. (11F ábra, 1. táblázat). A fotoautotróf kultúrák NPQ relaxációja

gyors volt, összhangban Vidal-Meireles és mtsai (2020) eredményeivel. Technikai szempontból hangsúlyozzuk, hogy az NPQ értékek stabilak voltak a 60 perces mérések során.

Az F_v/F_m értékeket meghatároztuk lombikokban nevelt folyadékkultúrák és ugyanabból az algakultúrából származó, a mikrofluidikai platformunkban elhelyezett sejtek esetében is. Nem találtunk szignifikáns különbséget a CC-4533 és *Crvtc2-1* törzsek F_v/F_m értékei között, sem TAP, sem pedig HSM tápoldatban, akár folyadékkultúrákon, akár a csapdázott sejteken végezzük a méréseket (1. táblázat). Tehát a különálló sejteken végzett mérések és a lombikban, nagy sejtpopuláción mért F_v/F_m értékek egymással összhangban vannak.

Eredményeink alapján kijelenthető, hogy a „Tulipán” mikrofluidikai platform lehetővé tette az NPQ megbízható és egyetlen sejten történő mérését anélkül, hogy a sejteket szilárd hordozóhoz kellene kötnünk, amely általában szükséges az egysejt-szinten történő klorofill-a fluoreszcencia méréséhez, azzal a kockázattal, hogy károsítja vagy zavarja a sejtek élettani folyamatait. Lehetőség van több csatorna és csapda létrehozása a mikrofluidikai eszközön. Ez a fajta mikrofluidikai csapdázás különösen hasznos lehet a fotoszintetikus heterogenitás tanulmányozására egy adott sejtpopuláción belül.

Indukálható PSBO amiRNS vonalak fotoszintetikus aktivitásának nyomon követése nitráttal történő indukció hatására egysejt-szinten

A növényekben és zöldalgákban megtalálható vízbontó komplex működéséhez nélkülözhetetlen a PSBO. Stabilizálja a Mn-komplexet, szabályozza a Ca^{2+} , Cl^- valamint a víz és protonok hozzáférhetőségét a Mn-komplex számára és a protonok eltávolítását a komplexből (Loll és mtsai., 2005; Vinyard és Brudvig, 2017). A PSBO nélkülözhetetlen a PSII aktivitásának fenntartásához zöldalgákban, ugyanis hiányában a WOC nem működőképes. Ennek következtében fotoautotróf körülmények között az algasejtek nem növekednek, és nem érik el az osztódáshoz szükséges méretet (Vidal-Meireles és mtsai., 2023). A *Chlamydomonas reinhardtii*-ban a PSBO fehérjét egyetlen gén kódolja.

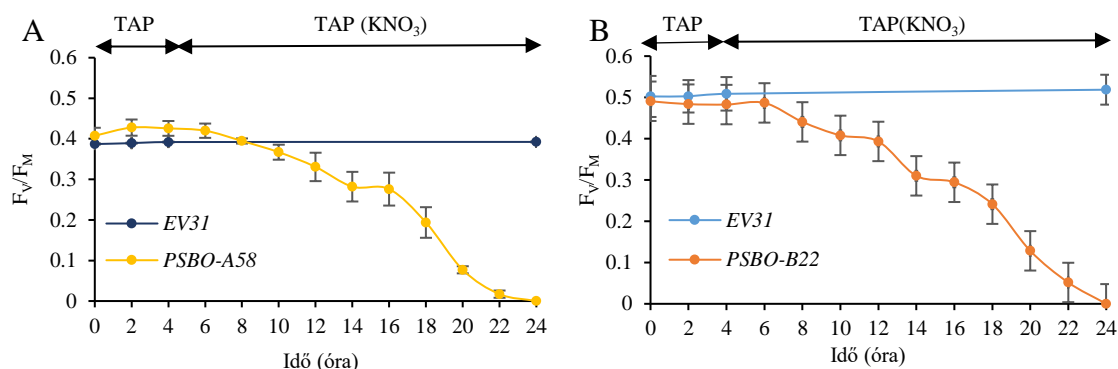
A PSBO szerepének és élettartamának részletes tanulmányozásához nitráttal indukálható PSBO amiRNS vonalakat hoztunk létre (Vidal-Meireles és mtsai, 2023). Megfigyeltük, hogy nem-indukáló körülmények között a transzformáns törzsek a kontroll törzshöz

(*EV31*) hasonlóan növekedtek és fotoszintetikus aktivitásuk összehasonlítható volt a kontroll törzsével (Vidal-Meireles és mtsai, 2023). Nitrát-indukció hatására a *PSBO* amiRNS kifejeződik, ami megakadályozza a *PSBO* fehérjének az átíródását. Acetát tartalmú tápközegekben a sejt *PSBO* fehérje szintje sötétben 60%-kal csökkent 24 órán belül, 75%-kal mérsékelt fényben, és erős fényben a fehérje teljesen lebomlott (Vidal-Meireles és mtsai, 2023). Következésképpen a fotoszintetikus apparátus erősen károsodott, valószínűleg a „donor-oldali fotoinhibíció” miatt, amit a különböző oxidáló hatású komponensek (Tyrz^+ , P680^+) felhalmozódása okoz (Jegerschöld és Styring, 1996). Megfigyeltük, hogy emellett a sejt ultrastruktúrája is jelentősen károsodott. Acetát hiányában azonban a *PSBO* figyelemremélően stabil volt minden fényintenzitás mellett, és kevésbé jelentős változások történtek a fotoszintetikus apparátus működésében. Mindezek mellett megfigyeltük, hogy az indukált *PSBO* amiRNS transzformánsokban – valószínűleg a fellépő oxidatív stressz következtében – a sejtméret-növekedés és a sejtosztódás leállt. Eredményeink alapján kijelenthető, hogy a *PSBO* élettartama erősen függ a fényintenzitástól és a szénforrás elérhetőségétől, ezáltal a sejtek metabolikus állapotától (Vidal-Meireles és mtsai, 2023).

A *PSBO* amiRNS transzformánsokat és a kontroll törzset a „Tulipán” mikrofluidikai eszközben csapdáztuk, hogy egysejt-szinten és nagy időbeli felbontás mellett megvizsgáljuk a *PSBO* alegység csendesítésének fotoszintetikus aktivitásra gyakorolt hatását. Ugyanazon mikrofluidikai eszközön belül két egységet építettünk fel, ami lehetővé tette a kontroll *EV31* törzs és *PSBO*-amiRNS transzformánsok párhuzamos vizsgálatát. 24 órán át végeztünk klorofill-a fluoreszencia méréseket a becsapdázott sejteken.

A PSII aktivitását az F_v/F_m paraméterrel jellemeztük a *PSBO-A58* és *PSBO-B22*-amiRNS vonalakon, amelyeket a kontroll törzshöz (*EV31*) viszonyítottunk. A F_v/F_m -t először mixotróf módon nevelt kultúrákban határoztuk meg (TAP tápoldatban). $90 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fényintenzitások tartottuk a törzseket, majd 10 percig sötétadaptáltuk a mérés előtt a mintákat. Ezt a kísérleti rendszert arra használtuk, hogy a „Tulipán” alakú csapdákat teszteljük, hogy mennyire hatékonyan cserélhető a tápoldat és milyen hatékonysággal lehet indukálni a *PSBO* amiRNS konstrukciót. Megfigyeltük, hogy a kísérlet kezdetén a *PSBO* transzformánsok és az *EV31* vad típusú törzsek F_v/F_m értékei 0.4 és 0.5 körüliek voltak (12. ábra); az eltérés az általunk használt kísérleti elrendezésben elfogadhatónak számít. Négy óra után lecseréltük a tápoldatot nitrát-tartalmú TAP

tápoldatra (TAP-KNO₃). A nitrát-indukálható amiRNS vonalak esetében a vízbontó komplex PSBO alegységének expressziója csendesítődik a tápoldat nitrogénforrásának ammóniáról nitrátra történő cseréjével, amelynek következtésben az F_V/F_M érték erőteljesen lecsökkent, 24 h alatt 0-ra (12. ábra).



12. ábra. Nitrát-indukálható *PSBO* amiRNS vonalak fotoszintetikus aktivitásának nyomonkövetése indukció során. A) *PSBO-A58* transzformáns sejteken mért F_V/F_M értékek átlagai (90 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 45 perc megvilágítás 15 perc sötétperiódussal megszakítva, 24 órán keresztül), B) illetve a *PSBO-B22* transzformánsok sejtein mért értékek átlagai, standard hibával ábrázolva.

Az F_V/F_M érték csökkenése mértéke még erőteljesebb volt, mint a lombikban nevelt kultúrák esetében (Vidal-Meireles és mtsai, 2023), aminek valószínűleg az az oka, hogy a sejtek egy rétegben helyezkednek el, és folyamatosan éri őket az intenzív megvilágítás. A „Tulipán” mikrofluidikai platformban képesek voltunk tehát a *PSBO*-amiRNS transzformánsok fotoszintetikus aktivitásának nyomon követésére egysejt-szinten, nagy időbeli felbontás mellett.

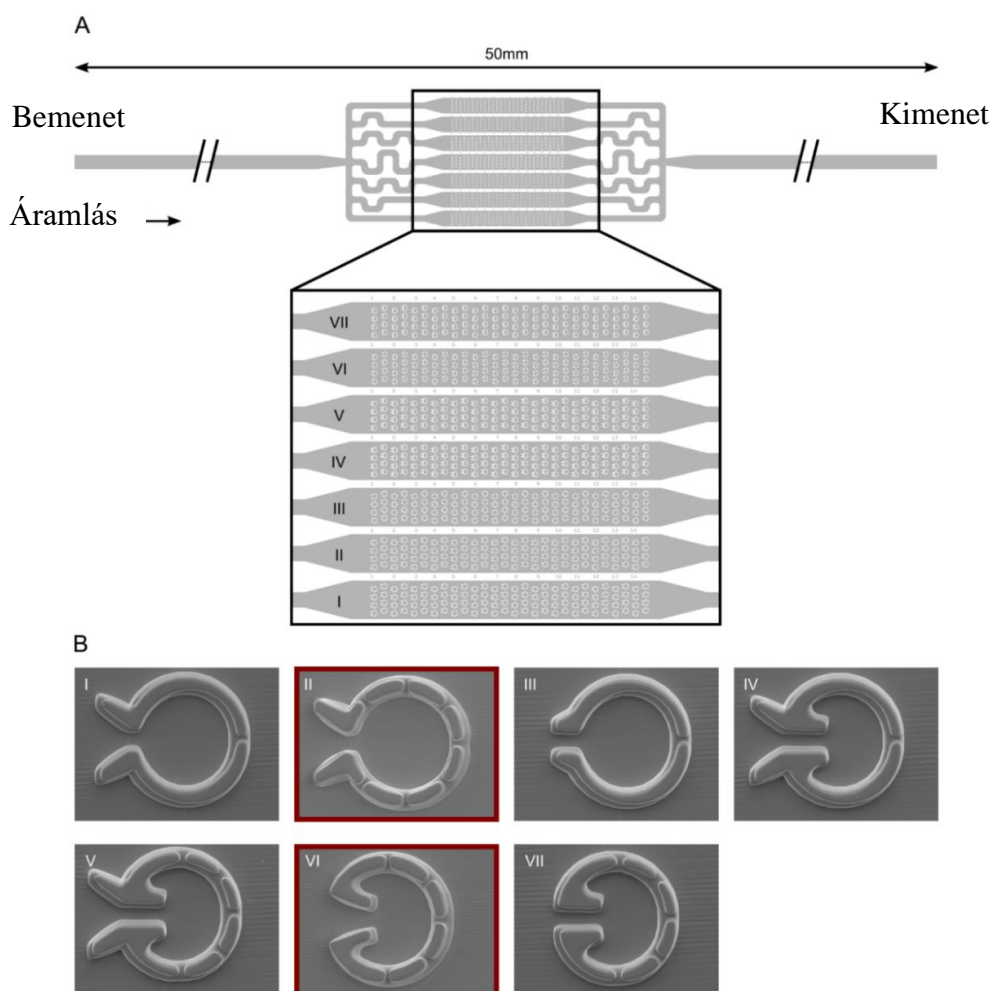
4.1.2. Sejtosztódás megfigyelésére alkalmas „Csésze” alakú csapdákat tartalmazó mikrofluidikai platformok fejlesztése

Az „anyasejt” növekedésének, osztódásának és az utódsejtek fejlődésének megfigyelése általában szinkronizált kultúrákban zajlik, amelyekben a sejtek többsége a sejtciklus ugyanazon fázisaiban találhatóak (pl. Cross és mtsai, 2015; Heldt és mtsai, 2020). Bár az ilyen típusú kutatások értékes betekintést nyújtottak a sejtciklus működésébe, azonban az egyedi sejtek vizsgálata további részleteket szolgáltat a sejtosztódás folyamatáról. A

morfológiai megfigyelések és a klorofill-a fluoreszcencia indukciós mérések kombinálása információt szolgáltathat például arról, hogy hogyan változik a fotoszintetikus aktivitás a sejtciklus során.

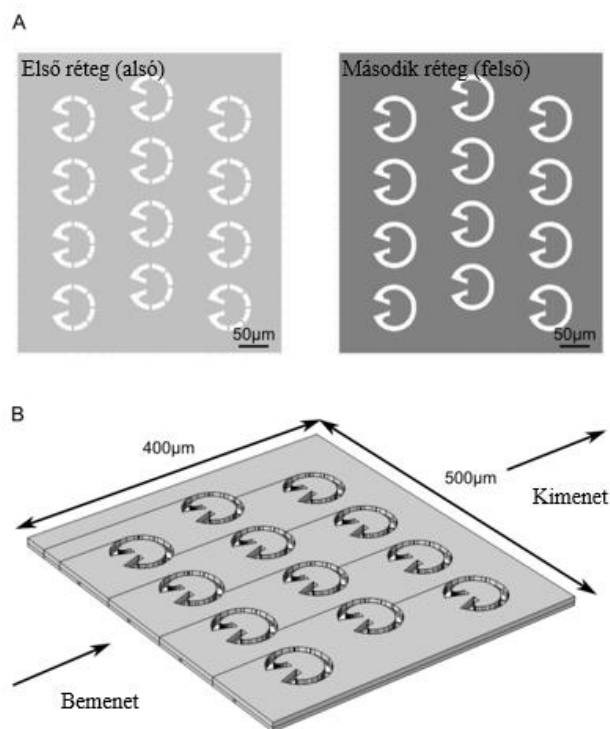
A sejtosztódás tanulmányozására szolgáló mikrofluidikai eszközök tervezése során nagy kihívást jelentett az anyasejtek és a leánysejtek befogása és megtartása ugyanazon csapdákon belül. Az érett *C. reinhardtii* sejt átmérője 8-10 μm a leánysejtek pedig sokkal kisebbek (Kropat és mtsai, 2011, Li és mtsai, 2016).

Hétféle úgynevezett „Csésze” alakú csapdát terveztünk, amelyeket egy mikrofluidikai eszközben párhuzamos csatornákon belül helyeztünk el (13. ábra). Ezek a csapdák a bemeneti geometriában és a kimeneti rések számában különböznek.



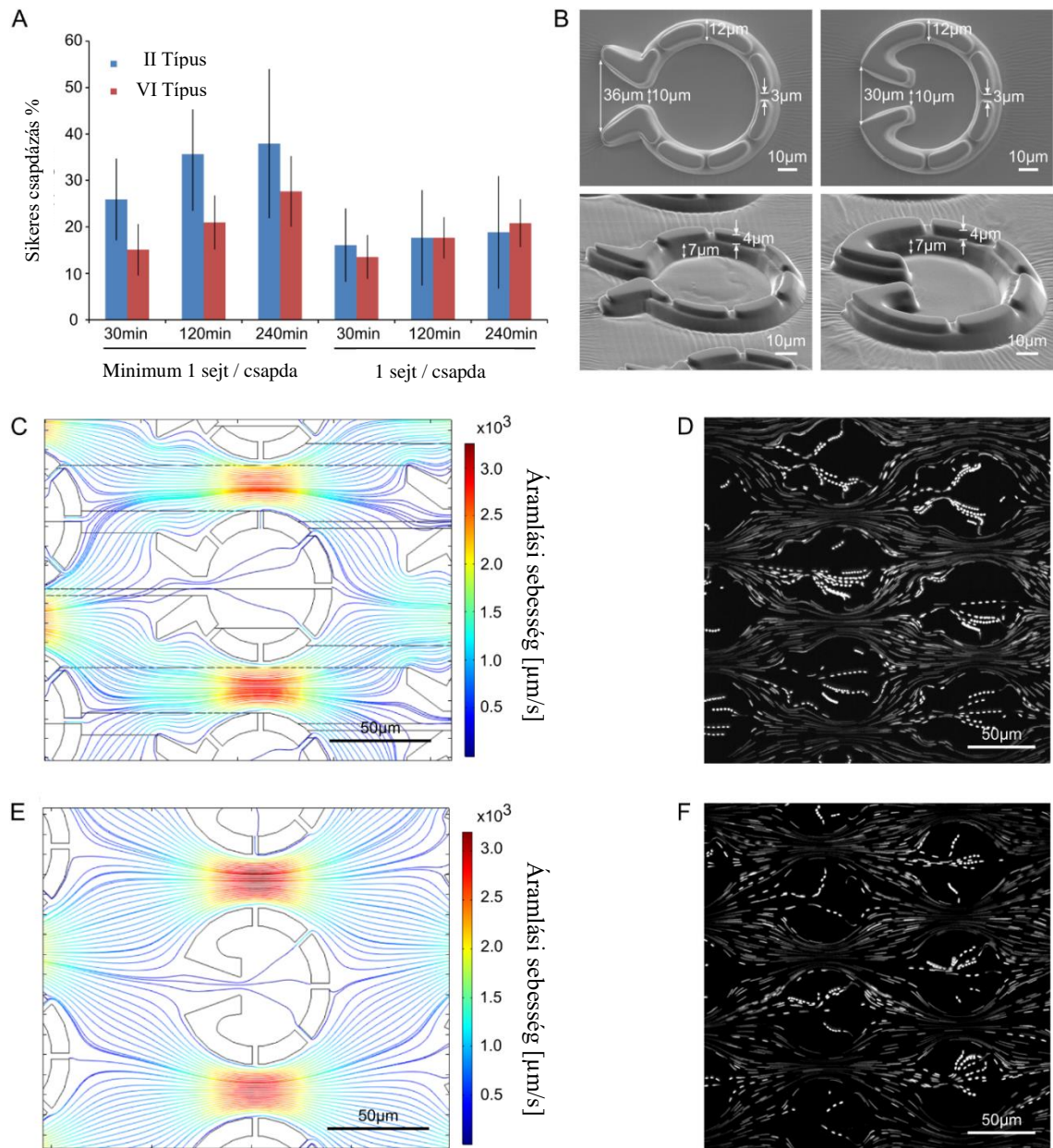
13. ábra. Egyetlen sejt becsapdázására alkalmas „Csésze” alakú csapdák, lehetővé téve a sejtek csapdában történő osztódását és fotoszintetikus aktivitásuk mérését. A) Az eszköz vázlatja a párhuzamos csatornákról, amelyekben hét különböző csapda helyezkedik el. B) Pásztázó elektronmikroszkópos képek a különböző csapdákról (Széles és mtsai., 2022).

Két rétegből építettük fel a csapdákat 4, illetve 7,5 μm vastagságban: az egyik réteg tartalmazott kimeneti réseket, míg a másik nem (14. ábra). Ily módon a kimeneti rések szélességét és mélységét alacsonyan lehetett tartani (kb. 3-4 μm), hogy bent tartsuk a kisebb leánysejteket, míg a teljes mélység 12 μm volt, így az anyasejteket nem érhetette különösebb fizikai stresszhatás.



14. ábra. A kétrétegű „Csésze” mikrofluidikai eszköz 3D számítógépes modelljének sematikus ábrázolása. A) A VI. típusú kamra két rétegének sémája. B) Az alkalmazott geometria a Comsol szimulációkban a réteges szerkezet és a folyadékáramlás irányát mutatja.

A csapdákat az egyetlen sejtet befogó csapdák százalékos aránya alapján értékeltük. Az előkísérletek alapján a leghatékonyabb geometriájúnak a II. és VI. típusú csapdák bizonyultak; a legkevésbé hatékony az I. típusú volt, a többi pedig köztes tulajdonságokat mutatott. A II. típusban a legalább egy sejtet befogó csapdák százalékos aránya körülbelül 25% volt 30 perccel a betöltés után; 240 perccel a betöltés után ez az érték körülbelül 35%-ra nőtt (15A ábra). A VI. típusú csapdákban a legalább egy sejtet befogó csapdák aránya valamivel alacsonyabb volt (köribelül 15% és 28% 30 perccel, illetve 240 perccel a betöltés után). A pontosan egy sejtet befogott csapdák aránya egyenlő a II. és VI. típusban (15-20%, 15A ábra).



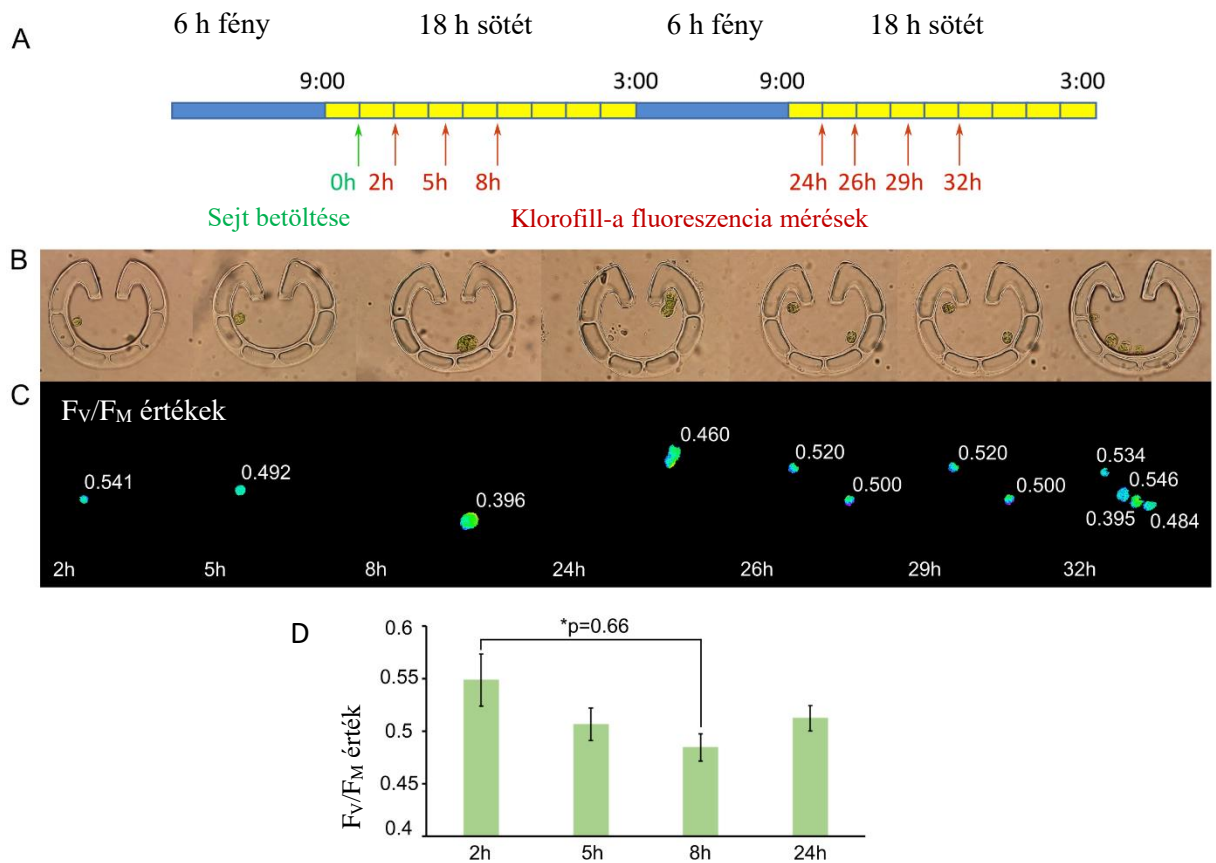
15. ábra. A II. és VI. típusú „Csésze” alakú csapdák összehasonlítása. A) A csapdázási hatékonyság összehasonlítása. A sejtek betöltése 60 percig tartott és a csapdázási hatékonyságot 30, 120 és 240 perc után mértük. Az eredmények három független kísérlet átlagai és a standard hiba került feltüntetésre. A II. és VI. típusú csapdák között nem volt szignifikáns különbség (Student *t*-teszt $p < 0.05$). B) Pásztázó elektronmikroszkópos képek felülnézetből és ferdeszögben. C) A II. típusú csapda áramlási modellje. Az áramvonalak sűrűsége és a színek az áramlás nagyságát jeleníti meg. D) A folyadékáramlás áramvonalait fluoreszcens mikroyönggyel (1 μm) tettük láthatóvá a II. típusú csapdában. E) A VI. típusú csapda áramlási modellje. Az áramvonalak sűrűsége és a színek az áramlás nagyságát jeleníti meg. F) A folyadékáramlás áramvonalait fluoreszcens mikroyönggyel (1 μm) vizualizáltuk a VI. típusú csapdában.

Mindkét csapdatípus viszonylag széles tölcser alakú (36 és 30 μm) nyílással rendelkezik, és több kimeneti rése van, amelyek körülbelül 3 μm szélesek és körülbelül 4 μm mélyek (15B ábra). Ezenkívül mindkettő homorú geometriával rendelkezik a bejárat belső oldalán, hogy elterelje a csapdában lévő úszó sejteket a bemeneti nyílástól. Azt figyeltük meg, hogy az egy vagy több sejtet csapdázott csapdák aránya százalékban kifejezve a II-es típusban valamivel magasabb volt, ami azzal magyarázható, hogy ez a típus szélesebb bevezető nyílással, valamint két extra kivezető réssel rendelkezett (7 kivezető rés a II-es és 5 kivezető rés a VI-os geometriájú csapdákban). A szélesebb nyílás növelheti annak esélyét, hogy egy sejt bejusson a bemeneti csatornába. Ugyanakkor a rések számának növelése kis mértékben növeli a csapdán keresztüli áramlást, ami szintén növelheti a befogási hatékonyságot.

Az áramlási mezők számítási modellezése (15C,E ábra) és nyomjelző részecskékkel végzett mérések (1 μm átmérőjű mikrogöngyökkel, 15D,F ábra) azt mutatják, hogy mindkét csapdánál a tápoldat áramlása nagyon gyors a csapdák között, míg a nyílásnál és különösen a csapdákon belül, sokkal lassabb. Ez a csapdák kis rései között fellépő áramlási ellenállásnak köszönhető.

Mivel annak a valószínűsége, hogy csapdánként csak egy sejt csapdázódjon (és nem több sejt, 15A ábra) valamivel magasabb a VI típusú esetben, ezért úgy döntöttünk, hogy ezt a típusú kamrát használjuk a későbbiekben.

A sejtciklust szinkronizált sejteken követtük nyomon, amelyeket fény-sötét ciklusok váltakozása alatt neveltünk 48 órán keresztül. Miután feltöltöttük a mikrofluidikai eszközünket (16A ábra) a sejtek mérete növekedni kezdett. Ezzel párhuzamosan az F_v/F_m értékük csökkent a 8. órára (körülbelül 0,4-re; egy reprezentatív példa látható az 16C ábrán, az 16D ábrán pedig az átlagok láthatóak). A sejtosztódás a betöltést követő 24. órában történt, és a leánysejtek a csapdákban maradtak; F_v/F_m értékük viszonylag magas volt (kb. 0,51). Ezek az adatok azt mutatják, hogy a *C. reinhardtii* sejtciklusát a fotoszintetikus hatékonyságban bekövetkező változások kísérik.



16. ábra. *C. reinhardtii* sejtosztódása a VI. típusú „Csésze” alakú csapdában. A) A sötét-fény ciklus sematikus ábrája, a sejt betöltéssel (zöld nyíl) és a klorofil-a mérések időpontjaival (piros nyilak) együtt ábrázolva. B) A megjelölt időpontokban készült fénymikroszkópos felvételek. A képek Plan-Neofluar 63x/1.25 inverziós olajos objektívvel készültek C) F_v/F_m értékek a megjelölt időpontokban mérve, egy reprezentatív példával bemutatva. D) F_v/F_m értékek (n= 10-13), hasonlóan meghatározva, mint a C ábrán, hat mérésből átlagolva. A One-way ANOVA Dunnett többszörösen összehasonlító teszt a 2. órás mérést kontrollként használva szignifikáns különbséget jelzett; $p < 0.1$.

4.2. A karotinoid-hiány PSII aktivitásra gyakorolt hatásának vizsgálata „Tulipán” alakú csapdákbán

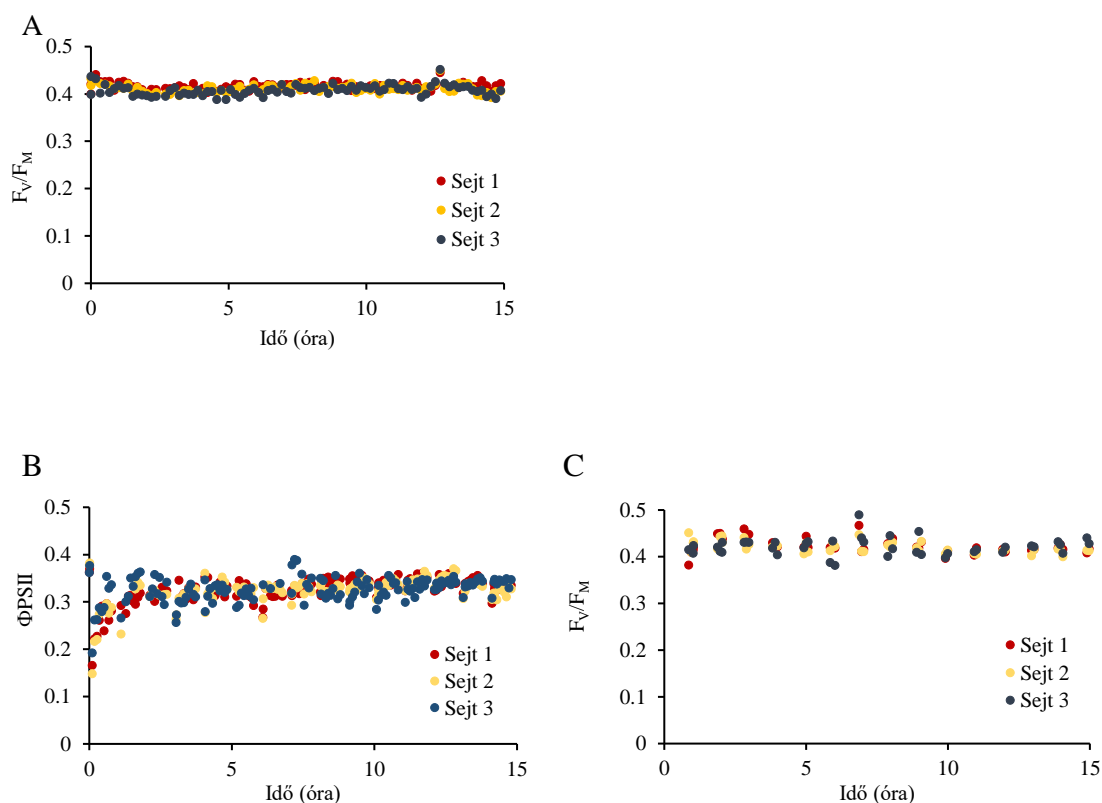
Ismert, hogy a PSII felépüléséhez β -karotinra van szükség (Sozer és mtsai., 2011). Meg kívántuk vizsgálni, hogy a PSII-ben a β -karotin hiánya hogyan befolyásolja a PSII aktivitását és élettartamát különböző élettani körülmények között.

A mikrofluidikai kamrákban egysejt-szinten kiválóan lehet mérni a PSII aktivitásában bekövetkezett változásokat. A PSII komplex felépülését direkt és indirekt módon gátoltuk. A linkomicin a kloroplasztiszbán kódolt gének fehérjeszintézisét gátolja

transzláció szintjén, a norflurazon pedig a PSII felépüléséhez szükséges β -karotin képződését akadályozza meg (1.4. fejezet). A PSII lebomlását és felépülését az aktivitásának csökkenésével és helyreállításával követjük, melyet az F_V/F_M és a Φ_{PSII} és paraméterekkel jellemzünk.

4.2.1. A mikrofluidikai kamrákban csapdázott sejtek fotoszintézise órákon át fenntartható

Előkísérletek segítségével bemutattuk, hogy a csapdában húsz óráig tartó sötétben nem változnak az F_V/F_M értékek (17A ábra). A Φ_{PSII} meghatározásához folyamatos megvilágítást alkalmaztunk ($160 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$), amelyet 15 perces sötétperiódussal óránként megszakítottunk az F_V/F_M meghatározásához. A fluoreszcencia-mérések 10 percenként történtek, 16 órán keresztül. A 17B és a 17C ábrán látható, hogy az Φ_{PSII} és a F_V/F_M értékek sem változtak jelentősen ez idő alatt.



17. ábra. A PSII aktivitásának alakulása a „Tulipán” alakú mikrofluidikai kamrákban. A) A kísérlet teljes időtartama alatt sötétben tartott sejteken mért F_V/F_M értékek. B) A megvilágítási ciklus ($160 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$) 45 perces fényperiódusaiban mért Φ_{PSII} és C) a 15 perces sötétperiódusaiban mért F_V/F_M értékek.

Tehát a csapdázás 16 óráig alatt nem okozott jelentős változást a fotoszintetikus paraméterekben, így a mikrofluidikai rendszer alkalmas a PSII időbeli változásainak követésére.

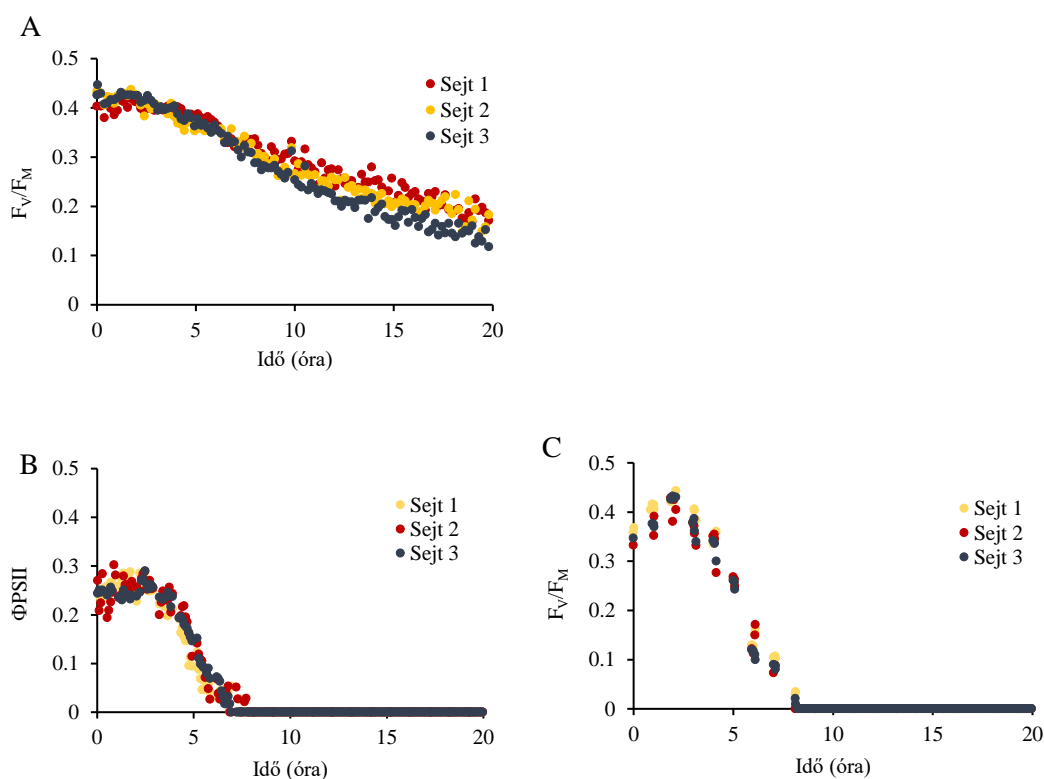
4.2.2. Norflurazon kezelés hatása a *Chlamydomonas reinhardtii* sejtekre

A folyamatos sejtosztódás és az egyes fehérje alegységek véges élettartama miatt a szükséges PSII mennyiségének fenntartásához az egyes alegységek állandó újraszintézisére van szükség. A PSII alegységek közül a legrövidebb élettartama a D1 fehérjének van, mivel élettani fényviszonyok mellett is elkerülhetetlen a fehérje fotooxidációja, így a megfelelő PSII aktivitás biztosításához a sérült D1 protein eltávolítása és újonnan szintetizált fehérje alegységgel való cseréjének ciklikus folyamata szükséges. A D1 protein mellett gyakran a D2, CP43 és PsbH alegységek de novo szintézisére is szükség van, míg a többi alegység általában reciklizálódik (Aro és mtsai, 1993; Depka és mtsai, 1998; Yamamoto 2001; Cai és mtsai, 2022).

Zöld növényekben jelentős mennyiségű karotinoid található a fotoszintetikus komplexekben, amelyek elengedhetetlenek a szerkezeti stabilitáshoz és a fénystressz elleni védelemhez (Demmig és mtsai, 1990; Havaux és Niyogi 1999; Jahns és Holzwarth 2012). A PSII reakciócentrumában 2 β -karotin található. A belső antennaként működő CP43 és CP47 alegység 5, illetve 3-4 β -karotin molekulát köt (Ruban és Johnson, 2010). A β -karotin a strukturális szerepe mellett védi a PSII-t a fotodegradáció ellen nagy intenzitású fényviszonyok esetén. β -karotin hiányában a PSII fényérzékeny lesz, gyorsabban degradálódik (Aro és mtsai, 1993; Cai és mtsai, 2022). Mivel a PSII javításához és újraszintéziséhez egyéb kofaktorok mellett szabad β -karotinra is szükség van, ezért az alacsony β -karotin szint a PSII újraképződésének korlátozó tényezője lehet (Yamashita és mtsai. 2008; Jahns és Holzwarth 2012). A PSII-be beépíthető β -karotin mennyiségét a β -karotin bioszintézisének, degradációjának vagy xantofillekké alakulásának, ill. más fehérjékbe való beépülésének aránya szabja meg. Mivel β -karotin hiányában funkcióképes PSII nem tud felépülni, az F_v/F_m értékeken keresztül figyelemmel lehet kísérni a karotinoidok PSII komplexből történő kiürülésének, ill. a komplexbe való beépülésének folyamatát.

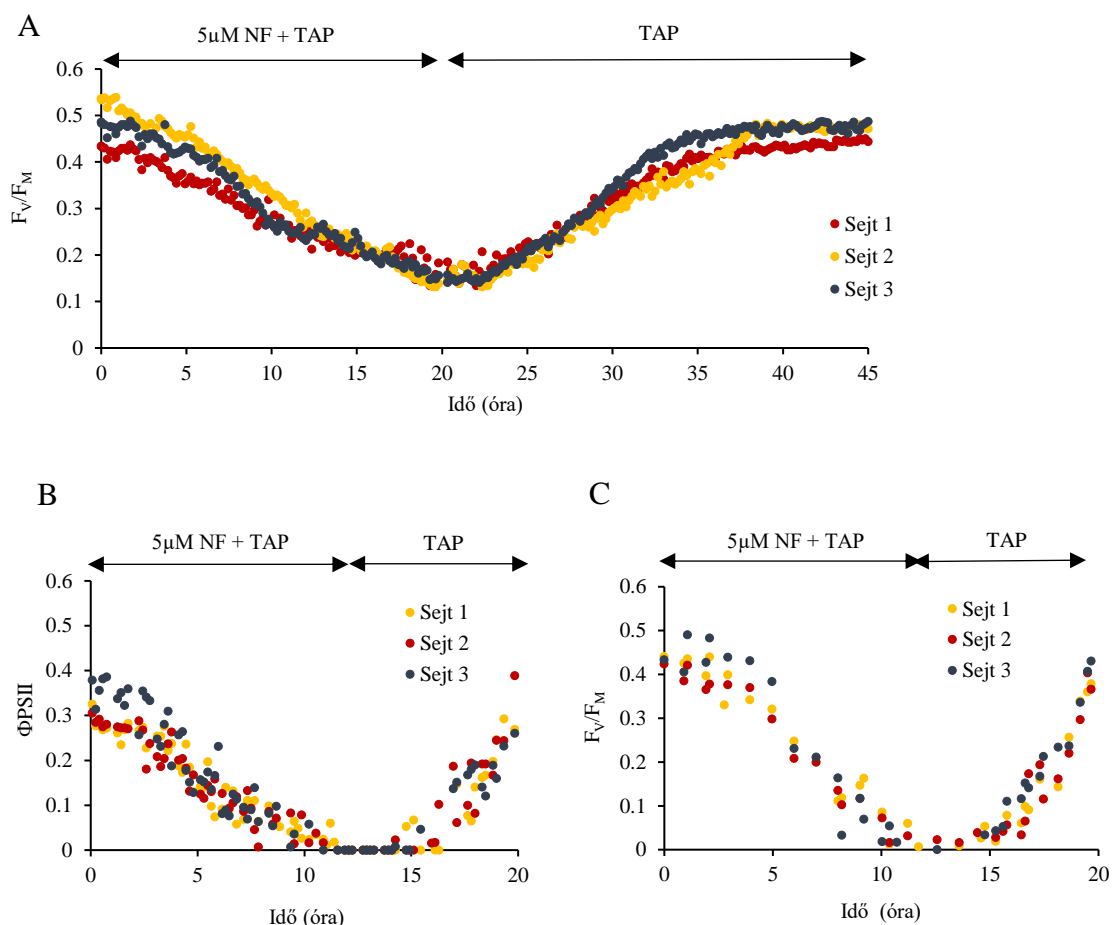
A norflurazon (NF) a piridazinonok csoportjába tartozik; a karotin-bioszintézist a fitoén-deszaturáz (PDS) enzim gátlásával a 15-*cisz*-fitotén és 9,15-*cisz*-fitofluén átalakulás között állítja le (5. ábra), így a fitoén kivételével más karotinoidok, többek között β -karotin sem képződik. Előkísérletekben HPLC analízis segítségével megállapítottuk, hogy 5 μ M-os NF kezelés teljes mértékben leállítja *C. reinhardtii*-ban a karotenoid-bioszintézist. Ennek köszönhetően NF jelenlétében a PSII aktivitásán keresztül vizsgálhatjuk a β -karotin hiányának a PSII élettartamára gyakorolt hatását.

Ehhez NF jelenlétében meghatároztuk a PSII inaktivációjának sebességét sötétben és folyamatos fényben. A sötétben tartott sejteken megfigyeltük, hogy NF kezelés hatására az F_V/F_M érték jelentősen csökken, a kezdeti 0,4-es értékről 15 óra alatt 0,2-es értékre (18A ábra). Ezzel szemben a PSII aktivitásának csökkenése jóval gyorsabb és erőteljesebb volt megvilágítás alatt: a Φ_{PSII} és a F_V/F_M érték már mintegy 7 óra alatt 0-ra csökkent (18B, C ábra).



18. ábra. Norflurazon hatása a PSII aktivitására *C. reinhardtii* CC124 sejteken az idő függvényében. A sejteket 5 μ M norflurazonnal (NF) kezeltük „Tulipán” csapdákbán és 20 percenként mértük a PSII-aktivitást. A) A kísérlet teljes időtartama alatt sötétben tartott sejteken mért F_V/F_M értékek. B) A megvilágítási ciklus ($160 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$) 45 perces fényperiódusaiban mért Φ_{PSII} és C) a 15 perces sötétperiódusai alatt mért F_V/F_M értékek.

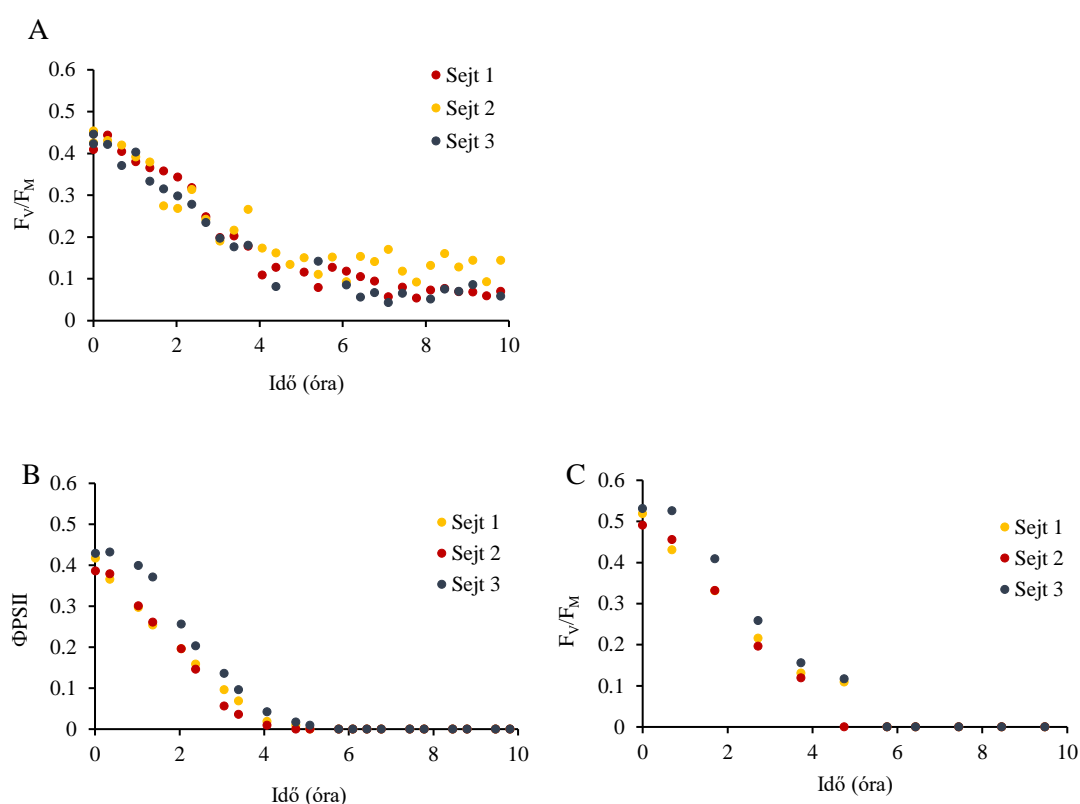
Megvizsgáltuk azt is, hogy a NF kezelést követően, amennyiben már nem adagoljuk tovább a gátlószert, helyreáll-e az F_V/F_M , illetve a Φ_{PSII} érték, vagyis megjelennek-e aktív PSII reakciócentrumok, ami a β -karotin beépülését jelezné az újonnan képződött reakciócentrumokba (19. ábra). Azt tapasztaltuk, hogy megközelítőleg 16 óra leforgása alatt a kiindulásihoz közeli F_V/F_M ill. Φ_{PSII} értékeket mutatnak a sötétben tartott sejtek, míg a megvilágított sejtekben ez a helyreállítás már 8 óra alatt bekövetkezett.



19. ábra. A norflurazon PSII aktivitására gyakorolt hatása és annak reverzibilitása *C. reinhardtii* CC124 sejtekben az idő függvényében. „Tulipán” csapdát tartalmazó mikrofluidikai kamrákba algasejteket jutattunk, majd 5 μ M norflurazont tartalmazó TAP tápoldattal áramoltattuk és 20 percnként mértük a PSII aktivitást. 10 h kezelés után norflurazon-mentes TAP tápoldatra cseréltük a tápoldatot és folytattuk a méréseket. A) A kísérlet teljes időtartama alatt sötétben tartott sejteken mért F_V/F_M értékek. B) A megvilágítási ciklus (160 μ mol foton $m^{-2}s^{-1}$) 45 perces fényperiódusaiban mért Φ_{PSII} és C) a 15 perces sötétperiódusai alatt mért F_V/F_M értékek. A NF kezelés és helyreállítás időtartamát nyilak jelzik az ábrán.

4.2.3. Linkomicin kezelés *Chlamydomonas reinhardtii* sejtekre gyakorolt hatása

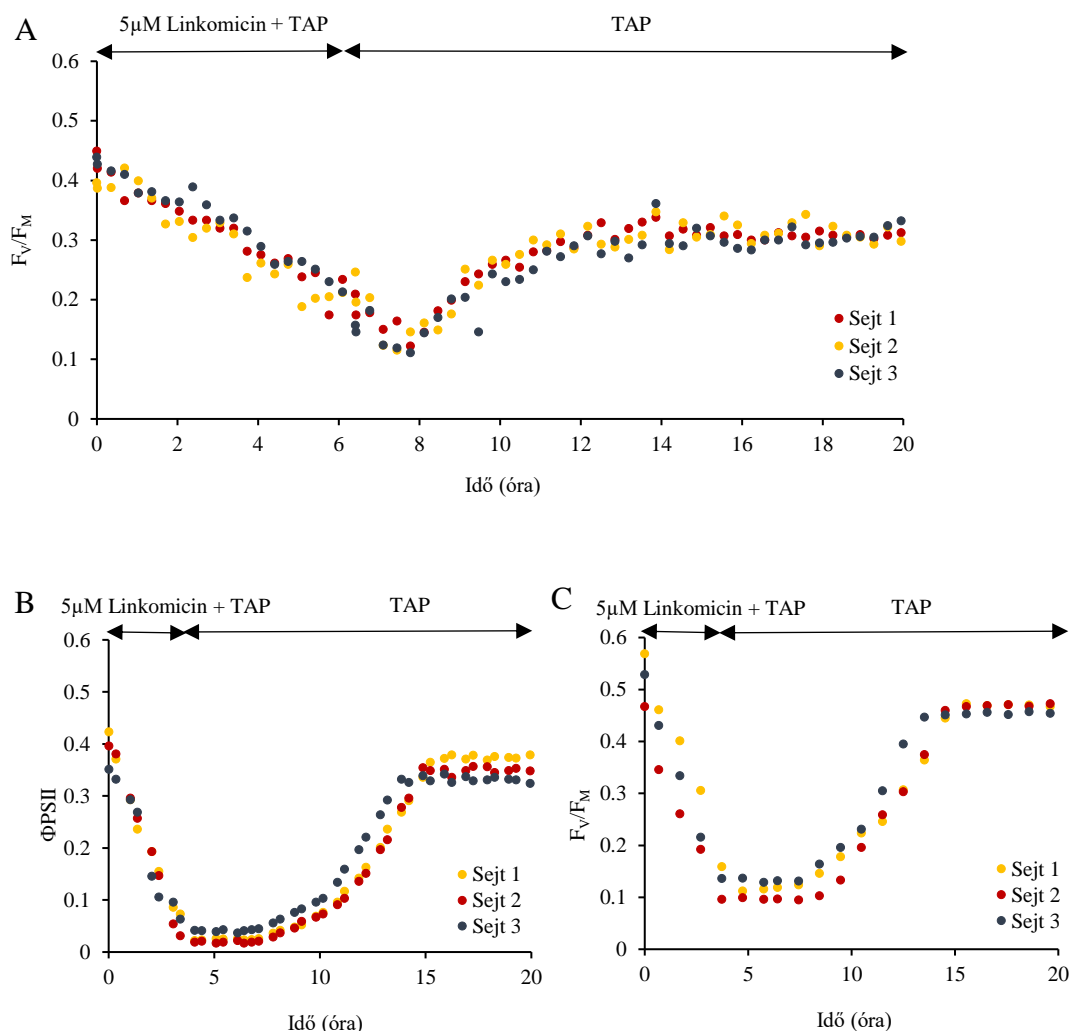
A linkomicin a prokarióta típusú fehérjetranszláció gátlószere, ezért csak a kloroplasztiszban zajló fehérjeszintézist gátolja, a nukleárisan kódolt fotoszintetikus alegységeket nem. A PSII reakciócentrumát és belső antennáját alkotó alegységek a kloroplasztiszban kódoltak, így a PSII linkomicin-szenzitív, jelenlétében a PSII nem tud felépülni, ami a PSII aktivitásának folyamatos csökkenésében nyilvánul meg. Ezt kihasználva a linkomicinnel kezelt sejteken mért Φ_{PSII} és F_V/F_M értékek változásával meghatároztuk a PSII élettartamát. Azt tapasztaltuk, hogy sötétben az F_V/F_M érték 5-6 óra alatt kb. 0,1-re csökkent, és a Φ_{PSII} érték 4-5 óra alatt 0-ra csökkent (20. ábra).



20. ábra. Linkomicin hatása a PSII aktivitására *C. reinhardtii* CC124 sejteken az idő függvényében. "Tulipán" csapdát tartalmazó mikrofluidikai kamrákba algakultúrát töltöttünk, majd 250 μ M linkomicint tartalmazó TAP tápoldattal áramoltattuk és 20 percenként mértük a PSII aktivitást. A) A kísérlet teljes időtartama alatt sötétben tartott sejteken mért F_V/F_M értékek. B) A megvilágítási ciklus ($160 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$) 45 perces fényperiódusaiban mért Φ_{PSII} és C) a 15 perces sötétperiódusai alatt mért F_V/F_M értékek.

Megvizsgáltuk a linkomicin kezelés reverzibilitását is a mikrofluidikai kamrán átáramló tápoldat linkomicin-mentes tápoldatra történő cseréjével (21. ábra). Azt tapasztaltuk,

hogy megközelítőleg 8-10 óra leforgása alatt a kiindulási értékhez közeli Φ_{PSII} és F_V/F_M értékeket kaptunk a megvilágított sejtekben (21 B,C ábra), jelezve a PSII de novo szintézisét. Sötétben a helyreállítás gyorsabban indult, azonban nem volt teljes mértékű a kísérlet 20. órájára sem (21A ábra).



21. ábra. Linkomicin PSII aktivitására gyakorolt hatása és annak reverzibilitása *C. reinhardtii* CC-124 sejteken az idő függvényében. "Tulipán" csapdát tartalmazó mikrofluidikai kamrákba algakultúrát töltöttünk, majd 250 μ M linkomicint tartalmazó TAP tápoldattal áramoltattuk és 20 percnként mértük a PSII aktivitást. 4-6 h kezelés után linkomicin-mentes TAP tápoldatot kezdtünk áramoltatni és folytattuk a méréseket. A) A kísérlet teljes időtartama alatt sötétben tartott sejteken mért F_V/F_M értékek. B) A megvilágítási ciklus (160 μ mol foton $m^{-2}s^{-1}$) 45 perces fényperiódusaiban mért Φ_{PSII} és C) a 15 perces sötétperiódusai alatt mért F_V/F_M értékek. A linkomicin-kezelés és a helyreállítás időtartamát nyilak jelzik az ábrán.

A kísérletek alapján megállapíthatjuk, hogy a két gátlószer hatása részben reverzibilis. A linkomicinnel és norflurazonnal végzett kísérleteket összehasonlítva látható, hogy a NF sokkal lassabban hat, mint a linkomicin és az NF-el kezelt sejtek teljesen a kiindulási értékeikre képesek regenerálódni sötétben is, viszont a linkomicinnel kezelt sejtek nem érik el a kezdeti értékeiket.

Eredmények megvitatása

Napjainkban az algák élettani vizsgálatát leggyakrabban milliliterenként néhány millió sejtet tartalmazó lombikokban nevelt folyadékkultúrákon végzik és ezeknek a heterogén sejtpopulációknak (amelyekben az egyedi sejtek különféle sejtciklusban lehetnek, és/vagy eltérő környezeti feltételeknek lehetnek kitéve) az átlagából nyerik a makroszkopikus paramétereket. Ez az átlagolás elfedhet olyan jellemzőket, amelyek elengedhetetlenek lehetnek a vizsgált élettani folyamatok megértéséhez. A hagyományos nevelési módszerekkel és mérésekkel szemben a mikrofluidikai eszközök kiváló alternatívát jelentenek az egyedi sejtek vagy kisszámú sejtpopulációk tanulmányozásához jól meghatározott környezetben *in situ* és valós időben. A mikrofluidikai technológia másik fő jellemzője, hogy precízen és dinamikusán tudjuk szabályozni a kamrákban a mikrokörnyezetet; ez jelentős előny a lombikokban tartott folyadékkultúrákhoz képest, amelyekben a tápoldat-csere stresszhatást jelent az algasejtek számára. Az áramlási citometriával szemben legnagyobb előnye, hogy lehetővé teszi az algák lényeges jellemzőinek, mint például a sejtosztódási sebesség és különféle élettani paraméterek vizsgálatát (Kim és mtsai, 2017). Továbbá az áramlási citometriás válogatás során nagy hidrodinamikai feszültség alakul ki, ami alacsony regenerálódási sebességet eredményezhet a szortírozás után (Kim és mtsai, 2017).

Számos mikrofluidikai eszközt fejlesztettek ki algák számára (pl. Kim és mtsai, 2018). Ide tartoznak a különböző formájú, méretű algasejtek osztályozására szolgáló platformok, a fototaxis megfigyelésére, a szisztematikus növekedési vizsgálatok elvégzéséhez, a tápoldatok szűrésére és az algák baktériumoktól való elválasztására alkalmasak eszközök (Benazzi és mtsai, 2007; Schaap és mtsai, 2016; Kim és mtsai, 2016; Sung és mtsai, 2017; Syed és mtsai, 2018; Yuan és mtsai, 2019; Korensky és mtsai, 2020). Létrehoztak olyan

összetett mikrofluidikai platformokat is, amelyek képesek egyetlen *C. reinhardtii* sejt befogására és elengedésére (Kim és mtsai, 2015).

Az algasejtek steady-state klorofill-a fluoreszcenciájának monitorozása különösen hasznos peszticidek kimutatására (Tahirbegi és mtsai, 2017; Lefèvre és mtsai, 2012) és a fertőzöttség mértékének meghatározására (Gosset és mtsai, 2018). A mikrofluidikai eszközök steady-state klorofill-a fluoreszcencia mérésekkel kombinálva alkalmasak a növekedési dinamika és a biomassza különbségek mérésére és összehasonlítására különböző fajok között, valamint a mikroalgák sejtfejlődésének tanulmányozására (Wang és mtsai, 2019; Westerwalbesloh és mtsai, 2019; Wang és mtsai, 2021).

Behrendt és munkatársai (2020) kifejlesztettek egy ún. „PhenoChip”-et, amely egy kompakt és sokoldalú mikrofluidikai platform, ami lehetővé teszi *Symbiodinium* sejtek és cianobaktériumok gyors és nagy áteresztőképességű fenotipizálását fotoszintetikus paramétereik alapján, meghatározott környezeti feltételek mellett. Az Imaging PAM M sorozatú klorofill-a fluorométer Microscopy változatának alkalmazásával meg tudták határozni az egyes *Symbiodinium* sejtek F_v/F_m értékeit, és ezt felhasználták magas hőmérséklettel szemben ellenálló sejtek azonosítására. Bashir és munkatársai (2022) olyan mikrofluidikai platformot fejlesztettek ki, amely lehetővé tette protoplasztok izolálását az egyedileg csapdázott *Symbiodinium* sejtekből, sejtfal emésztő enzimek (celluláz és macerozim) pontosan beállított áramoltatásával.

A *C. reinhardtii* számára elérhető mikrofluidikai eszközök eddig csak steady-state fluoreszcencia méréseket tettek lehetővé és szinte kizárólag mikropopulációk tanulmányozásra voltak alkalmasak (pl. Bae és mtsai, 2013) és csak ritkán egysejt-szintű elemzésre (Matsumura és mtsai, 2003). Hogy ezt a hiányt pótoljuk, kétféle mikrofluidikai eszközt készítettünk kifejezetten a *C. reinhardtii* számára, lehetővé téve a fotoszintézis vizsgálatát egysejt-szinten. Készülékeink viszonylag könnyen elkészíthetőek és összeszerelhetők, egyszerű áramlásszabályozási technikákkal működtethetők és nem igénylik pneumatikus alkatrészek nyomásszabályozását.

A folyadékáramlással működő mikrofluidikai sejtcspadák esetében két követelmény van. A csapda üres állapotában a folyadékáramlás jelentős részének át kell haladnia a csapdán. Ez a keresztirányú áramlás sejteket szállíthat a csapdába a bevezető nyíláson keresztül. A már sejtet tartalmazó csapdán keresztüli áramlásnak azonban kicsinek kell lennie egyszerre több sejt csapdázási esélyének a minimalizálása érdekében. A „Tulipán”

mikrofluidikai eszköz esetében a kultúra a széles bevezető nyíláson folyik át és egy keskeny résen keresztül távozik, amely egy „üvegnyak” alakot formáz az áramlás számára. Míg a rés méretei meghatározzák az effektív áramlási sebességet a „Tulipán” csapdán keresztül, a csapda szélességét és mélységét a *C. reinhardtii* átlagos sejtméretének figyelembevételével kell beállítani. A „Tulipán” eszköz csapdái nagyon hatékonyan bizonyultak az egysejtű algák befogására az átáramló kultúrából. A széles bemeneti rész tölcserként működik, és a sejteket a csapda belseje felé vezeti. A „befogott” sejtek hatékonyan blokkolják az áramlást magán a csapdán keresztül, megakadályozva további sejtek befogását a csapdában. A csapdázott sejteket szorosan átölelik az íves falak, és nagyon stabil pozíciót biztosítanak, elhanyagolható transláció és forgó mozgás mellett. A „Tulipán” csapdák korlátozzák a sejtek függőleges mozgását is, ezáltal a klorofill-a fluoreszcencia mérések kiváló minősége és reprodukálhatósága biztosított. Így az egyes sejtek immobilizálása nélkül valósul meg, hogy el kellene távolítani a flagellákat vagy a sejteket szilárd felülethez rögzíteni, ami súlyos stresszhatásokat okozhat.

Kiváló minőségű NPQ kinetikát mértünk egyesével csapdázott *C. reinhardtii* sejteken (11. ábra), különböző gátlószerek hatását vizsgáltuk (18-21. ábra), illetve különböző algal törzsek fotokémiai hatékonyságát is meg tudtuk határozni egysejt-szinten. A jövőben a „Tulipán” eszköz különösen hasznos lehet a populáció heterogenitásának tanulmányozására, hogy megvizsgáljuk milyen hatással vannak különböző kezelések és inhibitorok, szennyező anyagok és egyéb hatások az adott *C. reinhardtii* sejt morfológiájára és fotoszintézisére. Nyilván nem csak NPQ, de bármely más paraméter, amely elérhető az Imaging PAM M-sorozat klorofill-a fluorométerének szoftverében megmérhető ezeken a sejteken és különböző időtartamú mérések végezhetőek a pár másodpercestől a több óráig terjedőig.

A „Tulipán” alakú csapdáinkban nemfotokémiai kioltás (NPQ) méréseket végeztünk a *Crvtc2-1* aszkorbát-hiányos mutánsokon. Megfigyeltük, hogy az NPQ magasabb volt az aszkorbát-hiányos mutánsokban, mint a CC-4533 vad típusú törzsekben és az NPQ relaxáció nagyon lassú volt mindkét törzsben gyenge távoli vörös fényben – ezek a megfigyelések egyezést mutatnak a korábbi eredményekkel, amelyeket lombikokban nevelt folyadékkultúrákon mértünk, vörös fényben. Fotoautotróf körülmények között nevelve, HSM tápoldatban a *Crvtc2-1* mutáns NPQ értéke körülbelül kétszer olyan magas volt, mint a vad típusban, $151 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ -en nevelve, kék fényben. A fotoautotróf

kultúrák NPQ relaxációja gyors volt, összhangban Vidal-Meireles és mtsai (2020) korábbi eredményeivel. Eredményeink alapján kijelenthető, hogy a „Tulipán” mikrofluidikai platform lehetővé tette az NPQ megbízható és egyetlen sejten történő mérését anélkül, hogy a sejteket szilárd hordozóhoz kellene kötnünk, amely általában szükséges az egysejt-szinten történő klorofill-a fluoreszcencia méréséhez, azzal a kockázattal, hogy károsíthatja vagy zavarhatja a sejtek élettani folyamatait.

A „Tulipán” mikrofluidikai eszközeinkben képesek voltunk egyidejűleg több különböző törzset vizsgálni egysejt-szinten és nitrát-indukálható *PSBO*-amiRNS transzformánsok fotoszintetikus aktivitását követni. A PSII egyik legfontosabb része a vízbontó komplex (WOC), amely az oxigén fejlődéséért felelős. A lumen felőli oldalon fehérje alegységek veszik körbe ezt: PSBO, PSBP, és PSBQ. A csoportunkban előállított nitrát-indukálható *PSBO*-amiRNS transzformánsokban az ammóniatartalmú TAP tápoldat lecserélése nitrát-tartalmúra a vízbontó komplex PSBO alegységének csendesítésével jár, aminek következtében az F_v/F_m paraméter erőteljesen lecsökkent a transzformáns törzsekben.

A „Csésze” mikrofluidikai eszközt egyetlen sejt befogására és utódsejtjeinek huzamosabb ideig megtartására terveztük (egy vagy két sejtciklus erejéig). A sejtciklus különböző fázisaiban lévő sejtek átmérője 3-10 μm . A sejtek mozdulatlanok az osztódás során, de akár 40 $\mu\text{m/s}$ sebességgel is képesek úszni a sejtciklus más fázisaiban (Folcik és mtsai, 2020). Több utódsejt megtartására is képesek ezek a csapdák; kis „csésze” alakjukkal alkalmasabbak erre a feladatra, mint a szűk, egysejt méretű üregek. Azonban hasonlóan a „Tulipán” alakú csapdákhoz, a széles nyílás és a kivezető rések lehetővé teszik a szükséges folyadék-áramlást és a sejtek betöltését a csapdákba. Különböző geometriák tesztelésekor a bejövő áramlással szembenéző tölcsér alakú bevezető nyílás és az ellentétes oldalon elhelyezkedő több kis kivezető rés bizonyult a leghatékonyabbnak. A bevezető nyílás belső oldalán kis íves falszegmenseket alkalmaztunk, hogy elvezesse a sejteket a bejárattól, és csökkentse a sejtek kiúszásának esélyét a csapdából. A „Tulipán”-csapdákhoz hasonlóan a rések játsszák a fő szerepet az áramlási ellenállásban a csapdákon keresztül. Több rés nagyobb áramlási sebességet tesz lehetővé a csapdákon keresztül, ami növeli a sejtbefogás valószínűségét a kezdeti betöltési folyamat során. A tartósan fenntartott áramlás ellensúlyozza a sejtek mozgását, csökkentve annak esélyét, hogy sejtek kiúsznak a csapdából. Annak érdekében, hogy a kis leánysejtek a csapdákban maradjanak, a kivezető rések méretét minimalizáltuk a mikrofluidikai eszköz két rétegben történő öntésével. A csapdák magassága elég nagy (kb. 11 μm) ahhoz, hogy a sejtek

körbeforogjanak és a sejtosztódáshoz is jut hely. Az alapvető F_0 , F_M és F_v/F_M paraméterek (illetve ezek a fényadaptált állapotban mért megfelelői) mérése lehetséges ezekben a csapdáknak, de nem alkalmas hosszú időtartamú klorofill-a fluoreszcencia mérésekre.

A „Csésze” mikrofluidikai eszköz segítségével bemutattuk a fotoszintetikus hatékonyságok változását a sejtciklus során, ami összhangban van a korábbi fotoszintetikus aktivitás-mérésekkel (Pokora és mtsai, 2017) és a transzkriptomikai adatokkal (Tulin és Cross, 2015; Stenkert és mtsai, 2019). Stenkert és munkatársai (2019) megfigyelték, hogy a klorofill-bioszintézis gének expressziójának csúcspontja a nap első felére esik és megelőzi a sejt klorofilltartalmának növekedését. A legtöbb fotoszintetikus elektrontranszportban résztvevő gén nappal is kifejeződik, mielőtt a sejtosztódás a sötétben megtörténne. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy a fotoszintetikus apparátus valamilyen átalakuláson megy keresztül a sejt és a kloroplaszt osztódása közben. Úgy gondoljuk, hogy a mikrofluidikai eszközökben elvégzett egysejt-analízis hatékony módszer lehet ennek a hipotézisnek a tesztelésére, fenotípusos képanalízissel és statisztikai eszközökkel kombinálva (pl. Smith és mtsai, 2018).

Az értekezésemben bemutatott eszközök nem teszik lehetővé az egyes sejtek kinyerését az mikrofluidikai kamrákból. Előzetes kísérleteink és irodalmi adataink alapján azt feltételezzük, hogy az egyes sejtek begyűjtésének a legegyszerűbb módja a lézeres csipesszel való megfogásuk (McCord és mtsai, 2005) és a mikrofluidikai készüléken belüli apró tartályokba helyezésük, ahonnan később visszanyerhetők további elemzések céljából.

A „Tulipán” csapdákat tartalmazó mikrofluidikai eszköz alkalmasnak bizonyult a PSII degradációjának és felépülésének követésére is. A PSII lebomlását a kloroplasztiszban kódolt alegységek transzlációjának gátlásával, illetve a β -karotin tartalmú alegységek esetén a karotinoid-bioszintézis kezdeti lépésének gátlását követő PSII-aktivitás csökkenését mérve vizsgáltuk. A PSII komplex felépülését a gátlószer eltávolítása után a PSII funkcióinak visszaállásával követtük nyomon. A PSII dinamikáját sötétben és közepes fényintenzitáson is tanulmányoztuk. Linkomicinnel a kloroplasztiszban kódolt fehérjék transzlációját gátolva mértük a PSII természetes élettartamát, míg NF-nal a karotinoid bioszintézis gátlásán keresztül, a β -karotin PSII felépülésében játszott szerepét vizsgáltuk.

Kimutattuk, hogy linkomicinnel kezelt sejtekben a PSII inaktivációja sokkal gyorsabb, mint NF kezelés esetén, mind fényben, mind sötétben. Előzetes HPLC vizsgálatok alapján tudjuk, hogy az általunk használt 5 μM koncentrációban a NF a PDS enzimet teljesen gátolja, β -karotin-szintézis nem történik. Az új PSII alegységek felépüléséhez β -karotin csak a már meglévő készletekből tud beépülni. Az a tény, hogy a NF jelenlétében a PSII aktivitásának a csökkenése lassabb, mint linkomicin jelenlétében, azt mutatja, hogy az NF gátlás során a PSII lassabban inaktiválódik, mint az a PSII alegységek élettartama alapján várható lenne. Így azt kell feltételeznünk, hogy az NF gátlás alatt a PSII felépülés és lebomlás egyensúlya a lebomlás irányába tolódik el, de még jelentős PSII felépülés is van. Ez azonban csak addig lehetséges, míg a PSII alegységek számára elérhető β -karotin készlettel rendelkezik a sejt. Így módon a PSII regenerációját és *de novo* szintézisét az elérhető β -karotin mennyisége korlátozza és a PSII-aktivitás csökkenése közvetett módon a β -karotin készlet fokozatos kimerülését mutatja. Ennek a készletnek a forrása a szabad- β -karotin ill. a lebomló pigment tartalmú fehérjékből felszabaduló β -karotin reciklizációja lehet, ugyanakkor a β -karotin xantofilleké való transzformációja ill. fotooxidációja csökkenti azt. Továbbá kompetíció van a β -karotinért a PSII alegységek és egyéb pigment tartalmú fehérje alegységek (PSI, Cytb₆/f komplex) között is. Továbbá a kezelés tartama alatt a sejtek térfogata növekszik és ez tovább csökkenti a sejtre vonatkoztatott karotin koncentrációt.

Megfigyeltük, hogy linkomicin jelenlétében az F_v/F_m csökkenése sötétben és közepes fényben hasonló ütemű volt, ami azt mutatja, hogy az általunk alkalmazott kísérleti körülmények között a 160 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ még nem okoz jelentős fotooxidációt. Ezzel szemben az NF gátlást követő PSII aktivitás csökkenés fényen jelentősen gyorsabb volt. Ez valószínűleg azzal magyarázható, hogy a β -karotin fotooxidációval szembeni védő hatásának hiányában, a D1 protein is sokkal fényérzékenyebb lesz, és az általunk alkalmazott közepes fényintenzitás, mely linkomicines kísérleteinkben még nem indukált degradációt a sötétkezeléshez képest, NF jelenlétében már jelentős mértékűvé válik.

A gátlószerek eltávolításával a PSII aktivitása fokozatosan helyreállt (19, 21. ábra). Linkomicinnel történő kezelés esetén a visszaállás sebessége az általunk alkalmazott mérsékelt fényben és sötétben hasonló volt. A *Chlamydomonas* acetát jelenlétében sötétben is képes a PSII szintézisére (Roach és mtsai, 2013). NF-kezelés után a visszaállás kinetikája sötétben lassabb, mint linkomicin kezelés után, ami szintén azt mutatja, hogy a β -karotin limitálja a PSII felépülését. Méréseink alapján sötétben a β -karotin készlet

helyreállítása lassabb, mint a *de novo* fehérje szintézis, a β -karotin elérhetősége a korlátozó tényező a PSII felépülésében. Ismert, hogy a karotinoid-szintézis enzimei fényreguláltak (Bohne és Linden, 2002), ezért a megvilágítás növeli a karotinoid-szintézis egyes kulcsenzimeinek az expresszióját. Ez lehet a magyarázata annak, hogy fényben a NF-fel történő kezelés utáni helyreállítás gyorsul és közel azonos sebességű, mint amit a linkomicin-kezelés után mértünk. Ilyenkor már a PSII alegységek szintézise válik limitáló tényezővé a PSII felépülésében.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek, Dr. Tóth Szilvia Zitának, aki tanácsaival, útmutatásával segítette munkám eredményességét és a PhD hallgatói éveim alatt végig segített fenntartani a motivációt különböző konferenciákkal, pályázatokkal és ötletekkel.

Külön köszönet illeti Dr. Kovács Lászlót, akikkel bármikor fordulhattam és szakmai tudásával nagyban hozzájárult doktori disszertációm létrejöttéhez.

Köszönöm a Növénybiológia Intézet munkatársainak, hogy segítették a kutatásomat.

Ezen kívül köszönettel tartozom Kovács Sándornak, aki bevezetett a mikrofluidika rejtelmeibe, megszerettette velem, és a laboratóriumi munkafolyamatok pontos megismertetésével nyújtott segítséget a diplomamunkámhoz szükséges kísérletek elvégzésében.

Dr. Galajda Péternek, Dr. Nagy Krisztinának és Ábrahám Ágnesnek is szeretnék köszönetet mondani az öntőformák készítése, a felmerülő problémák kreatív megoldásában való részvétel és a folyamatos együttműködés miatt.

Végtelenül nagy hálával és köszönettel tartozom a tanulmányaimat mindig elkötelezetten és áldozatosan támogató családomnak.

A munkát a Hotchkiss Alapítvány és Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (GINOP-2.3.2-15-2016-00026) támogatta.

Irodalomjegyzék

- Adamska I., Kloppstech K., Ohad I. (1992) UV light stress induces the synthesis of the early light-inducible protein and prevents its degradation. *J. Biol. Chem.* 267: 24732-24137.
- Allahverdiyeva Y., Suorsa M., Rossi F., Pavesi A., Kater M.M., Antonacci A., Tadini L., Pribil M., Schneider A., Wanner G., Leister D., Aro E.M., Barbato R., Pesaresi P. (2013) Arabidopsis plants lacking PsbQ and PsbR subunits of the oxygen-evolving complex show altered PSII super-complex organization and short-term adaptive mechanisms. *Plant J.* 75: 671-684.
- Allen J.F., de Paula W.B., Puthiyaveetil S., Nield J. (2011) A structural phylogenetic map for chloroplast photosynthesis. *Trends Plant Sci.* 16: 645-655.
- Andersson B., Anderson J.M. (1980) Lateral heterogeneity in the distribution of chlorophyll protein complexes of the thylakoid membranes of spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 593: 427-440.
- Aro E.M., Virgin I., Andersson B. (1993) Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim. Biophys. Acta* 1143: 113-134.
- Austin J.R. II, Staehelin L.A. (2011) Three-dimensional architecture of grana and stroma thylakoids of higher plants as determined by electron tomography. *Plant Physiol.* 155: 1601-1611.
- Avenson T.J., Ahn T.K., Zigmantas D., Niyogi K.K., Li Z., Ballottari M., Bassi R., Fleming G.R. (2008) Zeaxanthin radical cation formation in minor light-harvesting complexes of higher plant antennae. *J. Biol. Chem.* 283: 3550-3558.
- Bae S., Kim C.W., Choi J.S., Yang J.W., Seo T.S. (2013) An integrated microfluidic device for the high-throughput screening of microalgal cell culture conditions that induce high growth rate and lipid content. *Anal. Bioanal. Chem.* 405: 9365-9374.
- Baker N.R. (2008) Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 89-113.

- Barber J. (2008) Crystal structure of the oxygen-evolving complex of photosystem II. *Inorg. Chem.* 47: 6.
- Barber J. (2003) Photosystem II: the engine of life. *Q. Rev. Biophys.* 36: 71-89.
- Barber R.W., Emerson D.R. (2007) Optimal design of microfluidic networks using biologically inspired principles. *Microfluid. Nanofluid.* 4: 179-191.
- Bashir F., Kovács S., Ábrahám Á., Nagy K., Ayaydin F., Valkony-Kelemen I., Ferenc G., Galajda P., Tóth S.Z., Sass L., Kós P.B., Vass I., Szabó M. (2022) Viable protoplast formation of the coral endosymbiont alga *Symbiodinium* spp. in a microfluidics platform. *Lab Chip* 22: 2986-2999.
- Behrendt L., Salek M.M., Trampe E.L., Fernandez V.I., Lee K.S., Kühl M., Stocker R. (2020) A single-cell phenomic platform for high-throughput photophysiological analyses of microalgae. *Sci. Adv.* 6: eabb2754.
- Benazzi G., Holmes D., Sun T., Mowlem M.C., Morgan H. (2007) Discrimination and analysis of phytoplankton using a microfluidic cytometer. *IET Nanobiotechnol.* 1: 94-101.
- Benedetti M., Vecchi V., Barera S., Dall'osto L. (2018) Biomass from microalgae: the potential of domestication towards sustainable biofactories. *Microb. Cell Fact.* 17: 173.
- Benning C. (2015) Fueling research on *Chlamydomonas* *Plant J.* 82: 363-364.
- Bhola V., Swalaha F., Kumar R.R., Singh M., Bux F. (2014) Overview of the potential of microalgae for CO₂ sequestration. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 11: 2103-2118.
- Blankenship R.E. (2001) Molecular evidence for the evolution of photosynthesis. *Trends Plant Sci.* 6: 4-6.
- Blankenship R.E. (1992) Origin and early evolution of photosynthesis. *Photosynth. Res.* 33: 91-111.
- Bodénès P., Wang H.Y., Lee T.H., Chen H.Y., Wang C.Y. (2019) Microfluidic techniques for enhancing biofuel and biorefinery industry based on microalgae. *Biotechnol. Biofuels* 12: 33.

- Bold H.C., Wynne M.J. (1985) Introduction to the algae: structure and reproduction. *Prentice-Hall*
- Cai W.H., Zheng X.Q., Liang Y.R. (2022) High-light-induced degradation of photosystem II subunits' involvement in the albino phenotype in tea plants. *Int. J. Mol. Sci.* 23: 8522
- Cross F.R., Umen J.G. (2015) The *Chlamydomonas* cell cycle. *Plant J.* 82: 370-392.
- Cuttriss A.J., Cazzonelli C.I., Wurtzel E.T., Pogson B.J. (2011) Biosynthesis of vitamins in plants. *Elsevier Academic Press* 58: 1-36.
- Demirbas A. (2009) Progress and recent trends in biodiesel fuels. *Energ. Conv. Manag.* 50: 14-34.
- Demmig-Adams B. (1990) Carotenoids and photoprotection in plants: A role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochim. Biophys. Acta* 1020: 1-24.
- Demmig-Adams B., Garab G., Adams W.W. III, Govindjee, Sharkey T.D. (2014) Nonphotochemical quenching and energy dissipation in plants, algae and cyanobacteria. *Springer* 40: 129-156.
- Depka B., Jahns P., Trebst A. (1998) Beta-carotene to zeaxanthin conversion in the rapid turnover of the D1 protein of photosystem II. *FEBS Lett.* 424: 267-270.
- Dutcher S.K., O'Toole E.T. (2016) The basal bodies of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Cilia* 5: 18.
- Eu Y.J., Park H.S., Kim D.P., Wook Hong J. (2014) A microfluidic perfusion platform for cultivation and screening study of motile microalgal cells. *Biomicrofluidics* 8: 024113.
- Fabris M., Abbriano R.M., Pernice M., Sutherland D.L., Commault A.S., Hall C.C., Labeeuw L., McCauley J.I., Kuzhiuparambil U., Ray P., Kahlke T., Ralph P.J. (2020) Emerging technologies in algal biotechnology: toward the establishment of a sustainable, algae-based bioeconomy. *Front. Plant Sci.* 11: 279.
- Ferenczi A., Pyott D.E., Xipnitou A., Molnar A. (2017) Efficient targeted DNA editing and replacement in *Chlamydomonas reinhardtii* using Cpf1 ribonucleoproteins and single-stranded DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 114: 13567-13572.

- Folcik A.M., Haire T., Cutshaw K., Riddle M., Shola C., Nassani S., Rice P., Richardson B., Shah P., Nazamoddini-Kachouie N., Palmer A. (2020) Computer-assisted tracking of *Chlamydomonas* species. *Front. Plant Sci.* 10: 1616.
- Foley J.A., Ramankutty N., Brauman K.A., Cassidy E.S., Gerber J.S., Johnston M. (2011) Solutions for a cultivated planet. *Nature* 478: 337-342.
- Frank H.A., Cogdell R.J. (1996) Carotenoids in photosynthesis. *Photochem. Photobiol.* 63: 257-264.
- Frank H.A., Cua A., Chynwat V., Young A., Gosztola D., Wasielewski M.R. (1994) Photophysics of the carotenoids associated with the xanthophyll cycle in photosynthesis. *Photosynth. Res.* 41: 389-395.
- Galajda P., Kelemen L., Végh G.A. (2015) Micro- and nanotechnology for cell biophysics. *Acta Biol. Szeged.* 59: 303-321.
- Ghirardi M.L. (2015) Implementation of photobiological H₂ production: the O₂ sensitivity of hydrogenase. *Photosynth. Res.* 125: 383-393.
- Gosset A., Durrieu C., Renaud L., Deman A.L., Barbe P., Bayard R., Chateaux J.F. (2018) Xurography-based microfluidic algal biosensor and dedicated portable measurement station for online monitoring of urban polluted samples. *Biosens. Bioelectron.* 117: 669-677.
- Guiry M.D. (2012) How many species of algae are there? *J. Phycol.* 48: 1057-1063.
- Harris E.H. (2001) *Chlamydomonas* as a model organism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 363-406.
- Havaux M., Niyogi K.K. (1999) The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 8762-8767.
- Heldt F.S., Tyson J.J., Cross F.R., Novák B. (2020) A single light-responsive sizer can control multiple-fission cycles in *Chlamydomonas*. *Curr. Biol.* 30: 634-644.
- Holt N.E., Zigmantas D., Valkunas L., Li X.P., Fleming G.R. (2005) Carotenoid cation formation and the regulation of photosynthetic light harvesting. *Science* 307: 433-436.

- Holub O., Seufferheld M.J., Gohlke C., Govindjee, Heiss G.J., Clegg R.M. (2007) Fluorescence lifetime imaging microscopy of *Chlamydomonas reinhardtii*: non-photochemical quenching mutants and the effect of photosynthetic inhibitors on the slow chlorophyll fluorescence transient. *J. Microsc.* 226: 90-120.
- Honsvall B.K., Altin D., Robertson L.J. (2016) Continuous harvesting of microalgae by new microfluidic technology for particle separation. *Biores. Technol.* 200: 360-365.
- Horton P., Ruban A.V., Walters R.G. (1994) Regulation of light harvesting in green plants (Indication by nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence). *Plant Physiol.* 106: 415-420.
- Horton P., Ruban A.V., Walters R.G. (1996) Regulation of light harvesting in green plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 655-684.
- Horváth F., Wodala B. (2012) Fotoszintézis gyakorlatok. *Jate Press Szeged*
- Jahns P., Holzwarth A.R. (2012) The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 1817: 182-193.
- Jahns P., Latowski D., Strzalka K. (2009) Mechanism and regulation of the violaxanthin cycle: The role of antenna proteins and membrane lipids. *Biochim. Biophys. Acta* 1787: 3-14.
- Jegerschöld C., Styring S. (1996) Spectroscopic characterization of intermediate steps involved in donor-side-induced photoinhibition of photosystem II. *Biochemistry.* 35: 7794-7801.
- Jensen P.E., Bassi R., Boekema E.J., Dekker J.P., Jansson S., Leister D., Robinson C., Scheller H.V. (2007) Structure, function and regulation of plant photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta* 1767: 335-352.
- Johnson M.P. (2016) Photosynthesis. *Essays Biochem.* 60: 255-273.
- Juang Y.J., Chang J.S. (2016) Applications of microfluidics in microalgae biotechnology: A review. *Biotechnol. J.* 11: 327–335.
- Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A., Stevens P.F., Donoghue M.J. (2002) Plant systematics: a phylogenetic approach. *Syst. Biol.* 167: 156.

- Kashem M.A., Kimoto K., Iribe Y., Suzuki M. (2019) Development of microalgae biosensor chip by incorporating microarray oxygen sensor for pesticides sensing. *Biosensors* 9: 133.
- Kim H.S., Devarenne T.P., Han A. (2015) A high-throughput microfluidic single-cell screening platform capable of selective cell extraction. *Lab Chip* 15: 2467-2475.
- Kim H.S., Devarenne, T.P.; Han, A. (2018) Microfluidic systems for microalgal biotechnology: A review. *Algal Res.* 30: 149-161.
- Kim H.S., Hsu S.C., Han S.I., Thapa H.R., Guzman A.R., Browne D.R., Tatli M., Devarenne T.P., Stern D.B., Han A. (2017) High-throughput droplet microfluidics screening platform for selecting fast-growing and high lipid-producing microalgae from a mutant library. *Plant Direct* 1: e00011.
- Kim J.Y., Kwak H.S., Sung Y.J., Choi H.I., Hong M.E., Lim H.S., Lee J.H., Lee S.Y., Sim S.J. (2016) Microfluidic high-throughput selection of microalgal strains with superior photosynthetic productivity using competitive phototaxis. *Sci. Rep.* 6: 21155.
- Kim L., Toh Y.C., Voldman J., Yu H. (2007) A practical guide to microfluidic perfusion culture of adherent mammalian cells. *Lab Chip* 7: 681-694.
- Kindle KL. (1990) High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 1228-1232.
- Kok B., Forbush B., McGloin M. (1970) Cooperation of charges in photosynthetic O₂ evolution – I. A linear four step mechanism. *Photochem. Photobiol.* 11: 457-475.
- Komsich-Buchmann K., Wöstehoff L., Becker B. (2014) The contractile vacuole as a key regulator of cellular water flow in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot. Cell* 13: 1421-1430.
- Korensky G., Chen X., Bao M., Miller A., Lapizco-Encinas B., Park M., Du K. (2020) Single *Chlamydomonas reinhardtii* cell separation from bacterial cells and auto-fluorescence tracking with a nanosieve device. *Electrophoresis* 42: 95-102.
- Kouřil R., Oostergetel G.T., Boekema E.J. (2011) Fine structure of granal thylakoid membrane organization using cryo electron tomography. *Biochim. Biophys. Acta.* 1807: 368-374.

- Koyande A.K., Chew K.W., Rambabu K., Tao Y., Chu D.T., Showa P.L. (2019) Microalgae: a potential alternative to health supplementation for humans. *Food Sci. Hum. Wellness*. 8: 16-24.
- Kropat J., Hong-Hermesdorf A., Casero D., Ent P., Castruita M., Pellegrini M., Merchant S.S., Malasarn D. (2011) A revised mineral nutrient supplement increases biomass and growth rate in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* 66: 770-780.
- Kroth P., Strotmann H. (1999) Diatom plastids: Secondary endocytobiosis, plastid genome and protein import. *Physiol. Plant.* 107: 136-141.
- Ku C.S., Yang Y., Park Y., Lee J. (2013) Health benefits of blue-green algae: prevention of cardiovascular disease and nonalcoholic fatty liver disease. *J. Med. Food* 16: 103-11.
- Naselli-Flores L., Barone R. (2009) Green algae. In: Gene E. Likens (Editor) *Encyclopedia of inland waters*. Oxford University Press Vol. 1, pp. 166-173.
- Latowski D., Kuczyńska P., Strzalka K. (2011) Xanthophyll cycle-a mechanism protecting plants against oxidative stress. *Redox Rep.* 16: 78-90.
- Lefèvre F., Chalifour A., Yu L., Chodavarapu V., Juneau P., Izquierdo R. (2012) Algal fluorescence sensor integrated into a microfluidic chip for water pollutant detection. *Lab Chip* 12: 787-793.
- Levy H., Tal T., Shaish A., Zamir A. (1993) Cbr, an algal homolog of plant early light-induced proteins, is a putative zeaxanthin binding protein. *J. Biol. Chem.* 268: 20892-20896.
- Li Y., Liu D., López-Paz C., Olson B.J., Umen, J.G. (2016) A new class of cyclin dependent kinase in *Chlamydomonas* is required for coupling cell size to cell division. *Elife* 5: e10767.
- Li M., Muñoz H., Goda K., Carlo D. (2017) Shape-based separation of microalga *Euglena gracilis* using inertial microfluidics. *Sci. Rep.* 7: 10802.
- Litchman E. (2007) Resource competition and the ecological success of phytoplankton. In: Falkowski P.G., Knoll A.H. (Editors): *Evolution of primary producers in the sea*. Academic Press, Chapter 16, pp. 351-375.

- Liu Y., Fan Z., Qiao L., Liu B. (2022) Advances in microfluidic strategies for single-cell research. *TRAC-Trend. Anal. Chem.* 157: 116822.
- Loll B., Gerold G., Slowik D., Voelter W., Jung C., Saenger W., Irrgang K.D. (2005) Thermostability and Ca²⁺ binding properties of wild type and heterologously expressed PsbO protein from cyanobacterial photosystem II. *Biochem.* 44: 4691-4698.
- Luka G., Ahmadi A., Najjaran H., Alocilja E., DeRosa M., Wolthers K., Malki A., Aziz H., Althani A., Hoorfar M. (2015) Microfluidics Integrated Biosensors: A Leading Technology towards Lab-on-a-Chip and Sensing Applications. *Sensors (Basel)* 15: 30011-30031.
- Luke C.S., Selimkhanov J., Baumgart L., Cohen SE., Golden SS., Cookson NA., Hasty J. (2016) A microfluidic platform for long-term monitoring of algae in a dynamic environment. *ACS Synth. Biol.* 5: 8-14.
- Mackinder L.C., Meyer M.T., Mettler-Altmann T., Chen V.K., Mitchell M.C., Caspari O., Freeman Rosenzweig E.S., Pallesen L., Reeves G., Itakura A., Roth R., Sommer F., Geimer S., Mühlhaus T., Schroda M., Goodenough U., Stitt M., Griffiths H., Jonikas M.C. (2016) A repeat protein links Rubisco to form eukaryotic carbon-concentrating organelle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113: 5958-5963.
- Maoka T. (2020) Carotenoids as natural functional pigments. *J. Nat. Med.* 74: 1-16.
- Marasco E.K., Vay K. (2006) Schmidt-Dannert C., Identification of carotenoid cleavage dioxygenases from Nostoc sp. PCC 7120 with different cleavage activities. *J. Biol. Chem.* 281: 31583-31593.
- Matsumura K., Yagi T., Yasuda K. (2003) Role of timer and sizer in regulation of *Chlamydomonas* cell cycle. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 306: 1042-1049.
- McCord R.P., Yukich J.N., Bernd K.K. (2005) Analysis of force generation during flagellar assembly through optical trapping of free-swimming *Chlamydomonas reinhardtii*. *Cell Motil. Cytoskeleton* 61: 137-144.
- McFadden G.I., van Dooren GG. (2004) Evolution: red algal genome affirms a dispatch common origin of all plastids. *Curr. Biol.* 14: 514-516.

- Melis A., Zhang L., Forestier M., Ghirardi M.L., Seibert M. (2000) Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 122: 127-135.
- Mettler T., Mühlhaus T., Hemme D., Schöttler M.A., Rupprecht J., Idoine A., Veyel D., Kumar Pal S., Yaneva-Roder L., Winck F.V., Sommer F., Vosloh D., Seiwert B., Erban A., Burgos A., Arvidsson S., Schönfelder S., Arnold A., Günther M., Krause U., Lohse M., Kopka J., Nikoloski Z., Mueller-Roeber B., Willmitzer L., Bock R., Schroda M., Stitt M. (2014) Systems analysis of the response of photosynthesis, metabolism, and growth to an increase in irradiance in the photosynthetic model organism *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* 26: 2310-2350.
- Mir, R.R., Reynolds M., Pinto F., Khan M. A., Bhat, M.A. (2019) High-throughput phenotyping for crop improvement in the genomics era. *Plant Sci.* 282: 60-72.
- Molnár A., Bassett A., Thuenemann E., Schwach F., Karkare S., Ossowski S., Weigel D., Baulcombe D. (2009) Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* 58: 165-174.
- Moskalenko Andrey A., Karapetyan Navassard V. (1996) Structural role of carotenoids in photosynthetic membranes. *Z. Naturforsch.* 51c: 763-771.
- Muller P., Li X.P., Niyogi K.K. (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol.* 125: 1558-1566.
- Mullineaux CW. (2005) Function and evolution of grana. *Trends Plant Sci.* 10: 521-525.
- Mustárdy L., Buttle K., Steinbach G., Garab G. (2008) The three-dimensional network of the thylakoid membranes in plants: quasi-helical model of the granum-stroma assembly. *Plant Cell* 20: 2552-2557.
- Mustárdy L., Garab G. (2003) Granum revisited. A three-dimensional model - where things fall into place. *Trends Plant Sci.* 8: 117-122.
- Müh F., Glöckner C., Hellmich J., Zouni A. (2012) Light-induced quinone reduction in photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 1817: 44-65.
- Nagy V., Podmaniczki A., Vidal-Meireles A., Tengölics R., Kovács L., Rákhely G., Scoma A., Tóth S.Z. (2018) Water-splitting-based, sustainable and efficient H₂

production in green alga as achieved by substrate limitation of the Calvin-Benson-Bassham cycle. *Biotechnol. Biofuels* 11: 69.

Nagy V., Vidal-Meireles A., Tengölics R., Rákhely G., Garab Gy., Kovács L., Tóth S.Z. (2016) Ascorbate accumulation during sulphur deprivation and its effects on photosystem II activity and H₂ production of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Environ.* 39: 1460-1472.

Nelson N., Ben-Shem A. (2004) The complex architecture of oxygenic photosynthesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 971-982.

Nickelsen J. (2005) Cell biology: The green alga *Chlamydomonas reinhardtii* - A genetic model organism. *Botany* 66: 66-89.

Niculescu A.G., Chircov C., Bîrcă A.C., Grumezescu A.M. (2021) Fabrication and applications of microfluidic devices: A review. *Int. J. Mol. Sci.* 22: 2011.

Novo P., Chu V., Conde J.P. (2014) Integrated fluorescence detection of labeled biomolecules using a prism-like PDMS microfluidic chip and lateral light excitation. *Lab Chip* 14: 1991-1995.

Ossowski S., Schwab R., Weigel D. (2008) Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs. *Plant J.* 53: 674-690.

Paulsen H., Rumler U., Ruediger W. (1990) Reconstitution of pigment-containing complexes from light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein overexpressed in *Escherichia coli*. *Planta* 181: 204-211.

Pfündel E., Bilger W. (1994) Regulation and possible function of the violaxanthin cycle. *Photosynth. Res.* 42: 89-109.

Podmaniczki A., Nagy V., Vidal-Meireles A. (2021) Ascorbate inactivates the oxygen-evolving complex in prolonged darkness. *Physiol. Plant.* 171: 232- 245.

Pokora W., Aksmann A., Bascik-Remisiewicz A., Dettlaff-Pokora A., Rykaczewski M., Gappa M., Tukaj Z. (2017) Changes in nitric oxide/hydrogen peroxide content and cell cycle progression: Study with synchronized cultures of green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Plant Physiol.* 208: 84-93.

- Pribil M., Labs M., Leister D. (2014) Structure and dynamics of thylakoids in land plants. *J. Exp. Bot.* 65: 1955-1972.
- Proctor M.S., Morey- Burrows F.S., Canniffe D.P., Martin E.C., Swainsburry D.J.K., Johnson M.P., Hunter C.N., Sutherland G.A., Hitchcock A. (2022) Zeta-carotene isomerase (Z-ISO) is required for light-independent carotenoid biosynthesis in the cyanobacterium *synechocystis* sp. PCC 6803. *Microorganisms* 10: 1730.
- Qin D., Xia Y., Whitesides G.M. (2010) Soft lithography for micro- and nanoscale patterning. *Nat. Protoc.* 5: 491-502.
- Rasala B.A., Mayfield S.P. (2015) Photosynthetic biomanufacturing in green algae; production of recombinant proteins for industrial, nutritional, and medical uses. *Photosynth. Res.* 123: 227-239.
- Roach T., Sedoud A., Krieger-Liszkay A. (2013) Acetate in mixotrophic growth medium affects photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii* and protects against photoinhibition. *Biochim. Biophys. Acta* 1827: 1183-1190.
- Ruban A.V., Johnson M. P. (2010) Xanthophylls as modulators of membrane protein function. *Arch. Biochem. Biophys.* 504: 78-85.
- Salomé P.A., Merchant S.S. (2019) A series of fortunate events: Introducing *Chlamydomonas* as a reference organism. *Plant Cell* 31: 1682-1707.
- Sasso S., Stibor H., Mittag M., Grossman AR. (2018) The Natural History of Model Organisms: From molecular manipulation of domesticated *Chlamydomonas reinhardtii* to survival in nature. *eLife* 7: e39233.
- Scaife M.A., Nguyen G.T.D.T., Rico J., Lambert D., Helliwell K.E., Smith A.G. (2015) Establishing *Chlamydomonas reinhardtii* as an industrial biotechnology host. *Plant J.* 82: 532-546.
- Schaap A., Dumon J., Toonder J. (2016) Sorting algal cells by morphology in spiral microchannels using inertial microfluidics. *Microfluid. Nanofluid.* 20: 125.
- Schansker G., Tóth S.Z., Holzwarth A.R. Garab Gy. (2014). Chlorophyll *a* fluorescence: beyond the limits of the Q_A model. *Photosynth. Res.* 120: 43–58.

- Schmollinger S., Strenkert D., Schroda M. (2010) An inducible artificial microRNA system for *Chlamydomonas reinhardtii* confirms a key role for heat shock factor 1 in regulating thermotolerance. *Curr. Genet.* 56: 383-389.
- Schreiber U. (2004) Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) Fluorometry and saturation pulse method: an overview. *Adv. Photosynth. Resp.* 19: 279-319.
- Shapiro O.H., Kramarsky-Winter E., Gavish A.R., Stocker R., Vardi A. (2016) A coral-on-a-chip microfluidic platform enabling live-imaging microscopy of reef-building corals. *Nature Comm.* 7: 10860.
- Shimoni E., Rav-Hon O., Ohad I., Brumfeld V., Reich Z. (2005) Threedimensional organization of higher-plant chloroplast thylakoid membranes revealed by electron tomography. *Plant Cell* 17: 2580-2586.
- Shumskaya M., Bradbury L.M., Monaco R.R. (2012) Wurtzel E.T., Plastid localization of the key carotenoid enzyme phytoene synthase is altered by isozyme, allelic variation, and activity *Plant Cell* 24: 3725-3741.
- Shumskaya M., Wurtzel, E.T. (2013) The carotenoid biosynthetic pathway: thinking in all dimensions. *Plant Sci.* 208: 58-63.
- Siefermann-Harms D. (1977) The xanthophyll cycle in higher plants. In: Tevini, M., Lichtenthaler, H.K. (Editors) *Lipids and lipid polymers in higher plants*. Springer. Pp. 218-230.
- Simkin A.J. (2021) Carotenoids and apocarotenoids in Planta: Their role in plant development, contribution to the flavour and aroma of fruits and flowers, and their nutraceutical benefits. *Plants (Basel)* 10: 2321.
- Sipka G., Magyar M., Mezzetti A., Akhtar P., Zhu Q., Xiao Y., Han G., Santabarbara S., Shen J.R., Lambrev P.H., Garab G. (2021) Light-Adapted Charge-Separated State of Photosystem II: Structural and Functional Dynamics of the Closed Reaction Center. *The Plant Cell* 33:1286-1302.
- Sironval C.; Kandler O. (1958) Photooxidation processes in normal green Chlorella cells: I. The bleaching process. *Biochim. Biophys. Acta* 29: 359-368.
- Smetacek V. (1999) Diatoms and the ocean carbon cycle. *Protist* 150: 25-32.

- Smith K., Piccinini F., Balassa T., Koos K., Danka T., Azizpour H., Horvath P. (2018) Phenotypic image analysis software tools for exploring and understanding big image data from cell-based assays. *Cell Syst.* 6: 636-653.
- Solanki S., Pandey C.M., Gupta R.K., Malhotra B.D. (2020) Emerging trends in microfluidics based devices. *Biotechnol. J.* 15: 1900279.
- Song K., Li G., Zu X., Du Z., Liu L., Hu Z. (2020) The fabrication and application mechanism of microfluidic systems for high throughput biomedical screening: A review. *Micromachines* 11: 297.
- Sozer O., Kis M., Gombos Z., Ughy B. (2011) Proteins, glycerolipids and carotenoids in the functional photosystem II architecture. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* 16: 619-643.
- Spreitzer R.J., Mets L. (1981) Photosynthesis-deficient mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* with associated light-sensitive phenotypes. *Plant Physiol.* 67: 565-569.
- Squires, T.M., Quake S.R. (2005) Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale. *Rev Mod Phys.* 77: 977-1026.
- Staehelein L.A. (2003) Chloroplast structure: from chlorophyll granules to supra-molecular architecture of thylakoid membranes. *Photosynth. Res.* 76: 185-196.
- Stirbet A., Lazár D., Guo Y. (2020) Govindjee G., Photosynthesis: basics, history and modelling. *Ann. Bot.* 126: 511-537.
- Strenkert D., Schmollinger S., Gallaher S.D., Salomé P.A., Purvine S.O., Nicora C.D., Mettler-Altmann T., Soubeyrand E., Weber A.P.M., Lipton M.S., Basset G.S., Merchant S.S. (2019) Multiomics resolution of molecular events during a day in the life of *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 116: 2374-2383.
- Sun T., Yuan H., Cao H., Yazdani M., Tadmor Y., Li L. (2018) Carotenoid Metabolism in Plants: The Role of Plastids. *Mol. Plant* 11: 58-74.
- Sung Y. J., Kim J.Y.H., Choi H.I., Kwak H.S., Sim S.J. (2017) Magnetophoretic sorting of microdroplets with different microalgal cell densities for rapid isolation of fast growing strains. *Sci. Rep.* 7: 10390.

Syed, M. S., Rafeie, M., Vandamme, D., Asadnia, M., Henderson, R., Taylor, R. A., Warkiani, M. E. (2018) Selective separation of microalgae cells using inertial microfluidics. *Bioresour. Technol.* 252: 91-99.

Széles E., Nagy K., Ábrahám Á., Kovács S., Podmaniczki A., Nagy V., Kovács L., Galajda P., Tóth S.Z. (2022) Microfluidic platforms designed for morphological and photosynthetic investigations of *Chlamydomonas reinhardtii* on a single-cell level. *Cells* 11: 285.

Tahirbegi I.B., Ehgartner J., Sulzer P., Zieger S., Kasjanow A., Paradiso M., Strobl M., Bouwes D., Mayr T. (2017) Fast pesticide detection inside microfluidic device with integrated optical pH, oxygen sensors and algal fluorescence. *Biosens. Bioelectron.* 88: 188-195.

Tian R., Li K., Shi W., Ding C., Lu C. (2019) *In situ* visualization of hydrophilic spatial heterogeneity inside microfluidic chips by fluorescence microscopy. *Lab Chip* 19: 934-940.

Tóth S.Z., Nagy V., Puthur J.T., Kovács L., Garab G. (2011) The physiological role of ascorbate as photosystem II electron donor: protection against photoinactivation in heat-stressed leaves. *Plant Physiol.* 156: 382-392.

Tóth S.Z., Oukarroum A., Schansker G. (2020) Probing the photosynthetic apparatus noninvasively in the laboratory of Reto Strasser in the countryside of Geneva between 2001 and 2009 *Photosynthetica* 58: 560-572.

Tóth S.Z., Puthur J.T., Nagy V., Garab G. (2009) Experimental evidence for ascorbate-dependent electron transport in leaves with inactive oxygen-evolving complexes. *Plant Physiol.* 149: 1568-1578.

Trampe E., Kolbowski J., Schreiber U., Kühl M. (2011) Rapid assessment of different oxygenic phototrophs and single-cell photosynthesis with multicolour variable chlorophyll fluorescence imaging. *Mar. Biol.* 158: 1667-1675.

Tran D., Haven J., Qiu W.G., Polle J.E. (2009) An update on carotenoid biosynthesis in algae: phylogenetic evidence for the existence of two classes of phytoene synthase. *Planta* 229: 723-9.

- Trebst A., Depka B. (1997) Role of carotene in the rapid turnover and assembly of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett.* 400: 359-361.
- Tulin F., Cross F.R. (2015) Cyclin-dependent kinase regulation of diurnal transcription in *Chlamydomonas*. *Plant Cell* 27: 2727-2742.
- Vavitsas K., Fabris M., Vickers C.E. (2018) Terpenoid metabolic engineering in photosynthetic microorganisms. *Genes (Basel)* 9: 520.
- Vidal-Meireles A., Tóth D., Kovács L., Neupert J., Tóth S.Z. (2020) Ascorbate deficiency does not limit nonphotochemical quenching in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 182: 597-611.
- Vinyard D.J., Brudvig G.W. (2017) Progress toward a molecular mechanism of water oxidation in photosystem II. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 68: 101-116.
- Wang J., Sun J., Song Y., Xu Y., Pan X., Sun Y., Li D. (2013) A label-free microfluidic biosensor for activity detection of single microalgae cells based on chlorophyll fluorescence. *Sensors (Basel)* 13: 16075-89.
- Wang Y., Wang J., Zhou C., Ding G., Chen M., Zou J., Wang G., Kang Y., Pan, X. (2019) A microfluidic prototype system towards microalgae cell separation, treatment and viability characterization. *Sensors (Basel)* 19: 4940.
- Wang Y., Zhao H., Liu X., Lin W., Jiang Y., Li J., Zhang Q., Zheng G. (2021) An integrated digital microfluidic bioreactor for fully automatic screening of microalgal growth and stress-induced lipid accumulation. *Biotechnol. Bioeng.* 118: 294-304.
- Westerwalbesloh C., Brehl C., Weber S., Probst C., Widzgowski J., Grünberger A., Pfaff C., Nedbal L., Kohlheyer D. (2019) A microfluidic photobioreactor for simultaneous observation and cultivation of single microalgal cells or cell aggregates. *PLoS One* 14: e0216093.
- Whitesides G.M., Ostuni E., Takayama S., Jiang X., Ingber D.E. (2001) Soft lithography in biology and chemistry. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 3: 335-373.
- Wingler A., Brownhill E., Pourtau N. (2005) Mechanisms of the light-dependent induction of cell death in tobacco plants with delayed senescence. *J. Exp. Bot.* 56: 2897-2905.

- Wurtzel E.T., Vickers C.E., Hanson A.D., Millar A.H., Cooper M., Voss-Fels K.P. (2019) Revolutionizing agriculture with synthetic biology. *Nat. Plants*. 5: 1207-1210.
- Yamamoto H. Y., Nakayama T. O., Chichester C. O. (1962) Studies on the light and dark interconversions of leaf xanthophylls. *Arch. Biochem. Biophys.* 97: 168-173.
- Yamamoto Y. (2001). Quality control of photosystem II. *Plant Cell Phys.* 42, 121-128.
- Yamashita A., Nijo N., Pospíšil P., Morita N., Takenaka D., Aminaka R., Yamamoto Y., Yamamoto Y. (2008) Quality control of Photosystem II: reactive oxygen species are responsible for the damage to Photosystem II under moderate heat stress. *J. Biol. Chem.* 283: 28380-28391.
- Young E.W., Beebe D.J., (2010) Fundamentals of microfluidic cell culture in controlled microenvironments. *Chem. Soc. Rev.* 39: 1036-1048.
- Yuan D., Zhao Q., Yan S., Tang S.Y., Zhang Y., Yun G., Nguyen N.T., Zhang J., Li M., Li W. (2019) Sheathless separation of microalgae from bacteria using a simple straight channel based on viscoelastic microfluidics. *Lab Chip* 19: 2811-2821.
- Zheng G., Wang Y., Wang Z., Zhong W., Wang H., Li Y. (2013) An integrated microfluidic device in marine microalgae screening application. *Mar. Pollut. Bull.* 72: 231-243.
- Zhu Y., Romain C., Williams C.K. (2016) Sustainable polymers from renewable resources. *Nature* 540: 354-362.

Saját közlemények:

Széles E., Nagy K., Ábrahám Á., Kovács S., Podmaniczki A., Nagy V., Kovács L., Galajda P., Tóth S.Z. (2022) Microfluidic platforms designed for morphological and photosynthetic investigations of *Chlamydomonas reinhardtii* on a single-cell level. *Cells* 11: 285. <https://doi.org/10.3390/cells11020285>; impakt faktor: 7,666.

Vidal-Meireles A., Kuntam S., Széles E., Tóth D., Neupert J., Bock R., Tóth S.Z. (2023) The lifetime of the oxygen-evolving complex subunit PSBO depends on light intensity and carbon availability in *Chlamydomonas*. *Plant Cell Environ.* 46: 422-439. <https://doi.org/10.1111/pce.14481>; impakt faktor: 7,947.

Poszterek és előadások:

2022 Mikrofluidikai eszközök fejlesztése zöldalgák egysejt-szintű morfológiai és fotoszintetikus vizsgálataihoz. Előadás; Straub-Napok; Szeged.

2022 Microfluidic platforms designed for morphological and photosynthetic investigations of *Chlamydomonas reinhardtii* on a single cell level. Online előadás; Magyar Növénybiológiai Társaság FIAtal NÖvénybiológusok ELŐadássorozata; I. helyezés.

2022 Microfluidic platforms designed for morphological and photosynthetic investigations of *Chlamydomonas reinhardtii* on a single-cell level. Poszter és előadás; Elevating Nordic Algal Biotechnology Conference; Turku, Finnország.

2021 Microfluidic platforms designed for morphological and photosynthetic investigations of *Chlamydomonas reinhardtii* on a single cell level. Online előadás; Magyar Biofizikai Társaság Fotobiológiai Miniszimpoziuma.

2021 Development of microfluidic devices for single cell studies on *Chlamydomonas*. Poszter; Chlamy 2020+1 Conference; Iles des Embiez, Franciaország.

2021 Mikrofluidikai kamrák fejlesztése algák egysejt-analíziséhez. Online előadás; Magyar Növénybiológiai Társaság FIAtal NÖvénybiológusok ELŐadássorozata.

- 2019 Development of microfluidic chambers for investigation of green algae. Poszter; Photosynthesis and Hydrogen Energy Research for Sustainability Conference; St. Petersburg, Oroszország.
- 2019 Development of microfluidic chambers for investigation of green algae. Poszter; Straub-Napok; Szeged.
- 2019 Mikrofluidikai kamrák fejlesztése zöldalgák megfigyeléséhez. Poszter; Előadás; 49. Membrán-Transzport Konferencia; Sümeg; Poszter díj.
- 2018 The effect of alginate immobilization on the *Symbiodinium microadriaticum* microalgae. Poszter; Straub-Napok; Szeged.

Díjak és ösztöndíjak:

- **Magyar Növénybiológiai Társaság FIAtal NÖVénybiológusok ELŐadássorozata, I. helyezés (2022).** Előadás címe: Microfluidic platforms designed for morphological and photosynthetic investigations of *Chlamydomonas reinhardtii* on a single cell level.
- **Hotchkiss díj (2022).** Folyóiratcikk: Széles és mtsai; Microfluidic platforms designed for morphological and photosynthetic investigations of *Chlamydomonas reinhardtii* on a single-cell level. *Cells* 11: 285.
- **Poszter díj, 49. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg (2019).** Poszter címe: Mikrofluidikai kamrák fejlesztése zöldalgák megfigyeléséhez.
- **TDK Biokémia Szekció; továbbjutás OTDK-ra (2016).** Előadás címe: Opioid-kannabinoid bivalens ligandumok receptor kötődési tulajdonságainak vizsgálata.
- **ERASMUS ösztöndíj (2013).** Tampere University of Technology, Finnország.

Összefoglalás

A zöldalgák egyre növekvő ökológiai és biotechnológiai jelentőséggel bírnak. Alkalmasak többek között biostimulánsok, értékes vegyületek, bioüzemanyagok előállítására. A *Chlamydomonas reinhardtii* a zöldalgák kiváló modellszervezete. Egysejtű, haploid és az egyetlen fotoszintetizáló szervezet, amelynek sejtmagi, kloroplasztisz- és mitokondriális genomja is transzformálható. A *C. reinhardtii*-t gyakran használják a fotoszintézis és a kloroplasztisz biogenezésének tanulmányozására. Fotoautotróf, heterotróf és mixotróf életmódra is képes.

A hagyományos lombikos nevelési és mérési módszerekkel szemben a mikrofluidikai eszközök kiváló lehetőséget jelentenek egyedi sejtek vagy kisszámú sejtpopulációk tanulmányozásához, precízen és dinamikusan szabályozható környezetben *in situ* és valós időben. A mikrofluidikai csapdákba lamináris áramlás segítségével csapdázzuk és tartjuk benn a sejteket. A mikrofluidikai eszközök kialakítása gondos tervezést igényel az eszköz geometriáját és a benne kialakított áramlási és nyomásviszonyokat illetően. Megfelelő tervezéssel a sejtekre ható nyírófeszültség minimálisra csökkenthető, ami lehetővé teszi élettani kísérletek kivitelezését. A mikrofluidikai eszközökre jellemző lamináris áramlás hatékony folyadékmanipulációt és gyors folyadékcserét tesz lehetővé. A mikrofluidika számos előnnyel bír a hagyományos nevelési rendszerekkel szemben, például a fejlődésbiológiai kutatások terén, hiszen így az egyes sejtek fenotípusait több órán keresztül vagy a sejtek egész élete során, azonos élettani körülmények között tanulmányozhatjuk. A mikrofluidikai eszközök alkalmasak a sejtsztódási sebesség és a biomassa-növekedés mérésére, különböző kezelések hatásának összehasonlítására, valamint a mikroalgák sejtfejlődésének tanulmányozására.

Napjainkban a mikrofluidika egyre nagyobb teret hódít, ugyanis kis reagensigénye miatt költséghatékony és nagyfokú párhuzamosítást tesz lehetővé. Számos mikrofluidikai eszközt fejlesztettek ki algák tanulmányozására, mint például különböző morfológiájú algasejtek osztályozására szolgáló platformokat, a fototaxis megfigyelésére, a szisztematikus növekedési vizsgálatok elvégzéséhez és az algák baktériumoktól való elválasztására alkalmas eszközöket. Újabban steady-state klorofill-a fluoreszcencia mérésekkel kombinálva lehetővé vált egyes élettani paraméterek tanulmányozása is.

Dolgozatom célja olyan mikrofluidikai rendszerek létrehozása volt, amelyek lehetővé teszik egyetlen *C. reinhardtii* sejt csapdázását, valamint a morfológiai vizsgálatok mellett a fotoszintetikus aktivitás párhuzamos mérését, egysejt-szinten.

A következő eredményeket értük el kutatásaim során:

- Kétféle mikrofluidikai eszközt terveztünk kifejezetten a *C. reinhardtii* számára: „Tulipán” és „Csésze” alakúakat. A mikrofluidikai eszközökön belüli folyadékáramlás jellemzőit számítógépes szimulációval modelleztük és az áramlási vonalak megjelenítéséhez fluoreszcens mikrogöngyöket használtunk nyomkövető részecskékként.
- A „Tulipán” eszköz csapdái nagyon hatékonyan bizonyultak egyedi algasejtek befogására és szilárd felülethez rögzítés nélküli egy helyben tartására. A „Csésze” alakú kamrák szintén alkalmasak egyedi sejtek befogására, valamint az utódsejtek felnevelésére. A morfológiai megfigyelések mellett az általunk készített mikrofluidikai kamrák klorofill-a mérések végzésére is alkalmasak, a Microscopy Imaging PAM készülék segítségével.
- A „Tulipán” alakú csapdáinkban nemfotokémiai kioltás (NPQ) méréseket végeztünk a *Crvtc2-1* aszkorbát-hiányos mutánsokon egysejt-szinten. Megfigyeltük, hogy az aszkorbát-hiányos mutánsok NPQ értéke magasabb volt, mint a CC-4533 vad típusú törzsé, fotoautotróf és mixotróf körülmények között is. Eredményeink összhangban vannak Vidal-Meireles és mtsai. (2020) korábbi megfigyeléseivel, amelyeket lombikban nevelt kultúrákon kaptak. Tehát a „Tulipán” mikrofluidikai platform lehetővé tette az NPQ megbízható és egyetlen sejten történő mérését anélkül, hogy a sejteket szilárd hordozóhoz kellene kötnünk, amely általában szükséges az egysejt-szinten történő klorofill-a fluoreszcencia méréséhez, azzal a kockázattal, hogy károsítja vagy zavarja a sejtek élettani folyamatait.
- A „Tulipán” mikrofluidikai eszközeink alkalmasak voltak nitrát-indukálható *PSBO*-amiRNS transzformánsok megfigyelésére. Az ammónia tartalmú tápoldat nitrát-tartalmúra történő lecserélése a vízbontó komplex *PSBO* alegységének csendesítésével jár, ennek következtében a *PSBO*-amiRNS vonalak F_v/F_m értékei rövid idő alatt erőteljesen lecsökkentek. Tehát a „Tulipán” mikrofluidikai eszköz

alkalmas volt a tápoldat gyors cseréjére és a fotoszintetikus aktivitásban fellépő változások nagy időbeli felbontással történő követésére.

- A „Csésze” mikrofluidikai eszköz segítségével egysejt-szinten kimutattuk, hogy a fotoszintetikus hatékonyság változik a sejtciklus során, ami összhangban van a korábbi, sejt kultúra szintű fotoszintetikus-aktivitás mérésekkel és transzkriptomikai eredményekkel. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy a fotoszintetikus apparátus szerkezeti és funkcionális átalakuláson megy keresztül a sejt és a kloroplasztisz osztódása közben.
- A „Tulipán” csapdát tartalmazó mikrofluidikai eszköz alkalmasnak bizonyult a PSII felépülésének és lebomlásának követésére is egysejt-szinten. A kloroplasztiszban kódolt fehérjék szintézisét linkomicinnel gátoltuk, majd az F_v/F_m és a Φ_{PSII} érték segítségével követtük PSII inaktiválódását. A karotinoid-bioszintézist norfluorazonnal gátolva a PSII szintén inaktiválódott, amely a β -karotin a PSII felépülésében játszott szerepének tulajdonítható. A PSII felépülését a gátlószerek eltávolítása után az F_v/F_m és a Φ_{PSII} érték helyreállításával követtük nyomon. A PSII inaktiválódását és felépülését sötétben és alacsony fényintenzitáson is tanulmányoztuk. Ki tudtuk mutatni egysejt-szinten, hogy a PSII regenerációját és *de novo* szintézisét az elérhető β -karotin mennyisége limitálja és a PSII aktivitás csökkenése a β -karotin készlet fokozatos kimerülését jelzi.

A jövőben a „Tulipán” mikrofluidikai eszköz különösen hasznos lehet algapopulációk heterogenitásának tanulmányozására, valamint különböző kezelések, inhibitorok és szennyező anyagok a sejtek morfológiájára és fotoszintézisére gyakorolt hatásának vizsgálatára. Az F_v/F_m , a Φ_{PSII} és az NPQ érték mellett az Imaging PAM M-sorozat klorofill-a fluorométerének szoftverében elérhető bármely más paraméter is mérhető a kamrában befogott sejteken, a pár másodpercesektől kezdve a több óráig terjedőig.

Röviden összefoglalva, az általunk tervezett mikrofluidikai kamrák alkalmasak egyedi sejtek befogására, kiváló minőségű klorofill-a fluoreszcencia mérések egysejt-szinten történő végzésére, különböző gátlószerek hatásának vizsgálatára, illetve különböző alga törzsek fotokémiai hatékonyságának időbeli követésére.

Úgy gondoljuk, hogy a mikrofluidikai eszközökben végzett egysejt-analízis alkalmas lehet a sejtosztódás közben fellépő változások nyomon követésére, a fenotípusos képanalízist számítógépes modellezéssel és statisztikai eszközökkel kombinálva.

A disszertációmban bemutatott eszközök nem teszik lehetővé az egyes sejtek összegyűjtését az elemzések után. Előzetes kísérleteink és irodalmi adataink alapján azonban úgy gondoljuk, hogy a legegyszerűbb módja az egyes sejtek begyűjtésének a lézeres csipesszel való megfogásuk és a mikrofluidikai készüléken belüli apró tartályokba helyezésük, ahonnan később visszanyerhetők további elemzések céljából.

Summary

Green algae have an increasing ecological and biotechnological importance. They are suitable, among other things, for the production of biostimulants, valuable chemicals, and biofuels. *Chlamydomonas reinhardtii* is an excellent model organism for green algae. Unicellular, haploid, and the only photosynthesizing organism whose nuclear, chloroplast, and mitochondrial genomes can be transformed. *C. reinhardtii* is often used to study photosynthesis and chloroplast biogenesis. It is capable of photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic lifestyles.

In contrast to traditional batch cultures and measurement methods, microfluidic devices provide an excellent platform to study individual cells or small cell populations in a precisely and dynamically controllable environment *in situ* and in real time. Cells are trapped and held in microfluidic traps using laminar flow. The design of microfluidic devices requires careful planning regarding the geometry of the device and the flow and pressure conditions created within it. With proper design, the shear stress of the cells can be reduced to a minimum, which makes physiological experiments possible. The laminar flow characteristic of microfluidic devices enables efficient liquid manipulation and rapid fluid exchange. Microfluidics have many advantages over traditional batch cultures, for example in the field of developmental biology research, since the phenotypes of individual cells can be studied for several hours or throughout their lifetime under the same physiological conditions. Microfluidic devices are suitable for measuring the rate of cell division and biomass growth, comparing the effects of different treatments, and studying the cell development of microalgae.

Nowadays, the field of microfluidics is growing and expanding, because it is very cost-effective due to the need for small reagents and allows for a high degree of parallelization. Several microfluidic tools have been developed to study algae for example platforms for classifying algal cells with different morphologies, platforms for observing phototaxis, performing systematic growth studies and separating algae from bacteria. More recently, in combination with steady-state chlorophyll-*a* fluorescence measurements, it has become possible to study physiological parameters.

The goal of my thesis was to create microfluidic platforms that enable the trapping of single *C. reinhardtii* cells, as well as the parallel measurement of photosynthetic activity, at the single-cell level, in addition to morphological studies.

The following results were achieved during my research:

- We designed two types of microfluidic devices specifically for *C. reinhardtii* that are called "Tulip" and "Pot" accordingly to the shape of their traps. The characteristics of the fluid flow inside the microfluidic devices were modeled by computer simulation and fluorescent microbeads were used as tracer particles to visualize the flow field.
- The traps of the "Tulip" device have proven to be very effective in capturing individual algal cells and holding them in place without attaching them to a solid surface. "Pot"-shaped chambers are also suitable for capturing individual cells and rearing progeny cells. In addition to morphological observations, the microfluidic chambers we have made are also suitable for measuring chlorophyll-*a* fluorescence using the Microscopy Imaging PAM device.
- Non-photochemical quenching (NPQ) measurements were performed on *Crvtc2-1* ascorbate-deficient mutants at the single-cell level in our "Tulip"-shaped traps. We observed that the NPQ value of the ascorbate-deficient mutants was higher than that of the wild-type strain CC-4533, both under photoautotrophic and mixotrophic conditions. Our results are in line with Vidal-Meireles et al. (2020) with previous observations obtained on batch cultures. Thus, the "Tulip" microfluidic platform enabled reliable and single-cell measurement of NPQ without the need to attach the cells to a solid support, which is usually required to measure chlorophyll-*a* fluorescence at the single-cell level, with the risk of damaging or interfering with the physiological processes of cells.
- Our "Tulip" microfluidic devices were suitable for observing nitrate-inducible *PSBO*-amiRNA transformants. The replacement of the ammonia-containing nutrient solution with a nitrate-containing one results in the silencing of the *PSBO* subunit of the water-splitting complex, as a result of which the F_V/F_M values of the *PSBO*-amiRNA lines decreased strongly and rapidly. Thus, the "Tulip"

microfluidic device was suitable for rapid replacement of the nutrient solution and for monitoring changes in photosynthetic activity with high temporal resolution.

- Using the "Pot" microfluidic device, we demonstrated the change in photosynthetic efficiencies during the cell cycle, which is consistent with previous photosynthetic activity measurements and transcriptomic data obtained on batch cultures. This raises the possibility that the photosynthetic apparatus undergoes a structural and functional transformation during cell and chloroplast division.
- The microfluidic device containing "Tulip" traps proved to be suitable for monitoring the degradation and recovery of PSII at the single-cell level. The synthesis of the proteins encoded in the chloroplast was inhibited by lincomycin, and the inactivation of PSII was monitored using the F_v/F_m and Φ_{PSII} parameters. By inhibiting carotenoid biosynthesis with norfluorazone, PSII was also inactivated, which can be attributed to the role of β -carotene in the biogenesis of PSII. The recovery of PSII was followed by the F_v/F_m and Φ_{PSII} parameters after the removal of the inhibitors. The inactivation and recovery of PSII were studied both in the dark and at low light intensity. We were able to demonstrate at the single-cell level that the regeneration and *de novo* synthesis of PSII is limited by the amount of available β -carotene and that the decrease in PSII activity indicates the gradual depletion of the β -carotene pool.

In the future, the "Tulip" microfluidic device may be particularly useful for studying the heterogeneity of algal cell populations, as well as the effects of different treatments, inhibitors and pollutants on cell morphology and photosynthesis. In addition to the F_v/F_m , Φ_{PSII} and NPQ values, any other parameter available in the software of the Imaging PAM M-series chlorophyll-*a* fluorometer can be measured on the cells captured in the chamber, starting from a few seconds to several hours.

In summary, our designed microfluidic chambers are suitable for capturing individual cells, performing high-quality chlorophyll-*a* fluorescence measurements at the single-cell level, testing the effect of different inhibitors, and monitoring the photochemical efficiency of different algal strains over time.

We believe that single-cell analysis in microfluidic devices is a powerful method to monitor changes occurring during cell division, in combination with phenotypic image analysis, computer modeling and statistical tools.

The microfluidic devices presented in my dissertation do not allow the collection of individual cells after the analyses. However, based on our preliminary experiments and literature data, we suggest that the simplest way to collect individual cells is to capture them with laser tweezers and place them in small containers inside the microfluidic device, from which they can be retrieved later for further analysis.