

PHT4 foszfát-transzporterek jellemzése zöldalgában

Doktori (PhD) értekezés

Tóth Dávid

Témavezető:

Dr. Tóth Szilvia Zita

**HUN
REN**



HUN-REN Szegei Biológiai Kutatóközpont

Növénybiológiai Intézet

Molekuláris Fotobioenergetikai Csoport

Szegei Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Biológia Doktori Iskola

2024

Szeged

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
2. BEVEZETÉS	7
2.1. A foszfor élettani szerepe növényekben	7
2.2. A foszfor előfordulása a talajban	7
2.3. A foszfor körforgása a talajban.....	8
2.4. Foszforfelvétel magasabb rendű növényekben.....	9
2.5. A transzporterek élettani jelentősége	10
2.6. Foszfát-transzporterek magasabb rendű növényekben	11
2.7. Foszfát-transzporterek zöldalgákban	14
2.8. A <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> nevű zöldalga, mint kedvelt modellszervezet.....	16
2.9. CRISPR/Cas rendszerek felfedezése és alkalmazásuk a célzott génszerkesztésben	18
2.10. Fotoszintézis	24
3. CÉLKITŰZÉS	28
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	29
4.1. A kísérletek során használt algatörzsek létrehozása	29
4.2. <i>C. reinhardtii</i> törzsek fenntartása és nevelése	30
4.3. Algatörzsek neveléséhez használt tápoldatok.....	30
4.4. A CrPHT4-7 szerkezetének előrejelzése és szekvencia illesztés.....	31
4.5. Genomi DNS izolálása <i>C. reinhardtii</i> -ből	31
4.6. <i>Crpht4-7</i> és <i>Crpht4-3</i> mutánsok genotípusának meghatározása	31
4.7. RNS izolálás és cDNS szintézis <i>C. reinhardtii</i> -ből	32
4.8. Kvantitatív valós idejű PCR (qRT-PCR).....	33
4.9. A CrPHT4-7 és CrPHT4-3 lokalizációjának meghatározása <i>C. reinhardtii</i> -ban.....	34
4.10. Algatörzsek növekedési paramétereinek vizsgálata	34
4.11. Algakultúrák sejtszámának és sejtméretének meghatározása.....	35
4.12. Algakultúrák klorofilltartalmának meghatározása.....	35
4.13. Gyors klorofill-a fluoreszcencia indukció (OJIP) mérése	35
4.14. Nem-fotokémiai kioltás (NPQ) mérése	35
4.15. <i>C. reinhardtii</i> és <i>S. cerevisiae</i> kultúrák aszkorbát tartalmának meghatározása.....	36
4.16. Aszkorbátkezelés hatása a <i>C. reinhardtii</i> gyors klorofill-a fluoreszcencia kinetikájára.....	37

4.17. Állapotátmenet mérése	37
4.18. Foszfortartalom meghatározása <i>C. reinhardtii</i> -ban	38
4.19. Algasejtek ATP koncentrációjának meghatározása.....	38
4.20. Transz-tilakoid protonmozgató erő (pmf) mérése	38
4.21. Foszformegvonás	39
4.22. Cseppteszt	39
4.23. CrPHT4-7-et és CrPHT4-3-at kifejező élesztőtörzsek létrehozása	40
4.24. Élesztőtörzsek nevelése CrPHT4-7 és CrPHT4-3 kifejeztetéshez.....	40
4.25. Aszkorbátfelvétel mérése <i>S. cerevisiae</i> -ben	41
4.26. Statisztikai elemzés.....	41
5. EREDMÉNYEK	43
5.1. A CrPHT4-7 transzporter részletes jellemzése	43
5.1.1. A CrPHT4-7 a kloroplasztisz burkolómembránjában helyezkedik el.....	43
5.1.2. A CrPHT4-7 szükséges a növekedéshez, különösen erős fényel történő megvilágítás esetén	45
5.1.3. A CrPHT4-7 szubsztrát-specifitása	50
5.1.4. Genetikai komplementáció és a CrPHT4-7 túltermeltetése	59
5.1.5. A CrPHT4-7 kifejeztetése foszfát-transzportereket nem tartalmazó élesztőtörzsben	63
5.2. A CrPHT4-3 transzporter jellemzése.....	65
5.2.1. A CrPHT4-3 a kloroplasztisz burkolómembránjában helyezkedik el.....	65
5.2.2. A CrPHT4-3 szükséges a növekedéshez, különösen erős fényel történő megvilágítás esetén	66
5.2.3. A CrPHT4-3 szubsztrát-specifitása	71
5.2.4. Genetikai komplementáció és a CrPHT4-3 túltermeltetése	75
5.2.5. A CrPHT4-3 kifejeztetése foszfát-transzportereket nem tartalmazó élesztőtörzsben	77
6. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	79
6.1. A CrPHT4-7 transzporter élettani jelentősége.....	79
6.2. A CrPHT4-3 transzporter élettani jelentősége.....	82
6.3. CrPHT4-7 és CrPHT4-3 transzporter részletes jellemzése során kapott eredmények összefoglalása	84
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	86
8. IRODALOMJEGYZÉK	87

9. ÖSSZEFOGLALÁS	101
10. SUMMARY	106
11. PUBLIKÁCIÓS LISTA	111
12. MELLÉKLETEK.....	113

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ATP	adenozin-5'-trifoszfát molekula
Asc	aszorbát (C-vitamin)
a.e.	abszolút egység
Cas	CRISPR asszociált fehérje
cDNS	komplementer DNS
CO ₂	szén-dioxid molekula
CRISPR	halmozottan előforduló, szabályos közökkel elválasztott palindromikus ismétlődések
crRNS	CRISPR RNS
DNS	dezoxiribonukleinsav
dNTP	dezoxi-ribonukleotid trifoszfát
DSB	kettős száltörés
DTT	ditiotritol (1,4-bisz-(szulfanil)-bután-2,3-diol)
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav dinátrium-só 2-hidrát
F _M	a klorofill-a fluoreszcencia maximális értéke
F _M ¹	az 1. állapotra jellemző maximális fluoreszcencia hatásfok
F _M ²	a 2. állapotra jellemző maximális fluoreszcencia hatásfok
FnCas12a	<i>Francisella novicida</i> Cas12a
F _V	változó klorofill-a fluoreszcencia (F _M -F ₀)
F _V /F _M	a PSII hatásfokát jellemző érték
F ₀	a klorofill-a fluoreszcencia indukció kezdeti értéke
HDR	homológia irányított javítás
HPLC	magasnyomású folyadék kromatográfia
HS	Sueoka féle magas sótartalmú tápoldat
H ₂ O	víz molekula
ICP-OES	induktív kapcsolású plazma-optikai emissziós spektrométer
LHCI	a PSI klorofill a/b fénybegyűjtő pigment-protein komplexe
LHCII	a PSII klorofill a/b fénybegyűjtő pigment-protein komplexe
NADPH	redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NADP ⁺	oxidált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
n.d.	nem detektálható

NHEJ	nem homológ végek összekapcsolása
NPQ	nem-fotokémiai kioltás
OD ₆₀₀	600 nm-en mért optikai denzitás
OD ₇₂₀	720 nm-en mért optikai denzitás
OEC	vízbontó komplex
OJIP	gyors klorofill-a fluoreszcencia indukció
O ₂	oxigén molekula
PAM	protospacer melletti szekvencia
PCR	polimeráz láncreakció
PHT	foszfát-transzporter
pmf	transz-tilakod protonmozgató erő
pre-crRNS	pre CRISPR RNS
PSI	első fotokémiai rendszer
PSII	második fotokémiai rendszer
PT	foszfát-transzporter
qRT-PCR	kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció
qE	az NPQ energiatülszóró komponense
qI	az NPQ fotoinhibíciós komponense
qT	az NPQ állapotátmenethez kapcsolódó komponense
qZ	az NPQ zeaxantin függő komponense
RNP	ribonukleoprotein
RNS	ribonukleinsav
r.e.	relatív egység
SE	standard hiba
SpCas9	<i>Streptococcus pyogenes</i> Cas 9
TAP	tris-acetát-foszfát tápoldat
TCEP	tris-(2-karboxietil)-foszfin
TP	tris-foszfát tápoldat
tracrRNS	transz-aktiváló crRNS
VDAC	feszültségfüggő anion csatorna
%(V/V)	térfogat százalék
%(m/V)	vegyes százalék

2. BEVEZETÉS

2.1. A foszfor élettani szerepe növényekben

A foszfor az élő szervezetek számára nélkülözhetetlen makroelem. Létfenntartású biomolekulák szerkezeti alkotóeleme, mint például az ATP, nukleinsavak, foszfolipidek, cukor-foszfátok és különböző koenzimek (Rocha és mtsai., 2019). Szerepet játszik az energiaháztartás és az anyagcsere szabályozásában, különböző jelátviteli folyamatokban és a fotoszintézisben (Berndt és Kumar, 2009). Az egyik legfontosabb növényi tápanyag, a növényi sejtek száraz tömegének 0,1-1,4 %-át teszi ki (Broadley és mtsai., 2004; Amtmann és mtsai., 2005). Napjainkban a foszforhiány a megművelt földterületek 70 %-át érinti, és jelentős mértékben csökkenti a terméshozamot, ezért a foszfortartalmú műtrágyák a modern mezőgazdaság nélkülözhetetlen kiegészítőivé váltak (Lynch, 2011; Herrera-Estrella és López-Arredondo 2016). Foszforhiány esetén a növények növekedése lelassul, az antociánok felhalmozódása miatt az idősebb levelek bíborlila elszíneződést mutatnak. Az energiaháztartás zavart szenved, szacharóz és keményítő halmozódik fel a levelekben, csökken a fotoszintézisben részt vevő számos gén expressziója, valamint a fotoszintetikus aktivitás is. A foszfor fontos szabályozója a reproduktív szervek fejlődésének. Hiánya esetén jellemző a késői virágzás és érés, valamint csökken a termés mennyisége és minősége (Bennett, 1993; Reuter és Robinson, 1997).

2.2. A foszfor előfordulása a talajban

A talajban a foszfor különféle vegyületek formájában fordul elő. A talaj szerves anyagainak bomlása, valamint a foszfortartalmú kőzetek mállása következtében szerves és szervetlen formában is előfordul (Shen és mtsai., 2011). A talaj foszfortartalmának 29-65 % szerves, 35-71 % pedig szervetlen formában van jelen. A talaj szerves foszfor frakciójában az inozitol-foszfátok a legmeghatározóbbak, de kis mennyiségben nukleinsavak, foszfolipidek és egyéb foszfát-észterek is jelen vannak, amelyek elsősorban különféle mikroorganizmusokból származnak (Berg és Joern, 2006). A különböző foszfortartalmú vegyületek a talaj típusától függően eltérő viselkedést mutatnak, amit a talaj összetétele, kémhatása és az ásványi részecskék mérete nagyban befolyásol (Shen és mtsai., 2011; Abdelrahman és mtsai., 2018). Számos a talajban előforduló foszfortartalmú vegyület közül a szervetlen foszfát (PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} és a H_2PO_4^-) a növények számára a legkönnyebben

hozzáférhető. Az hogy milyen szerves foszfát forma van jelen a talajoldatban nagyban függ a talaj kémhatásától. A H_3PO_4 2,1-es pK érténél H_2PO_4^- -tá és pK = 7,2-nél HPO_4^{2-} -tá alakul. Ebből az következik, hogy 6-os pH alatt a szerves foszfát főleg H_2PO_4^- formájában, míg a H_3PO_4 és HPO_4^{2-} csak kis mennyiségben lesz jelen (Ullrich-Eberius és mtsai., 1984; Furihata és mtsai., 1992). Savanyú talajban a szerves foszfát többnyire vas és alumínium oxidok, például hematit, gibbsit és goethit felületéhez kötődik az ionerősség miatt, így a szerves foszfátot a talaj nanopórusaiba zárja és ezáltal elérhetetlenné válik a növények számára (Shen és mtsai., 2011; Abdelrahman és mtsai., 2018). Meszes-semleges kémhatású talajban a szerves foszfát kalciummal kölcsönhatva kicsapódik, dikalcium-foszfátot hozva létre. Ez a növények számára hozzáférhető foszfát vegyület, azonban a dikalcium-foszfát is átalakulhat stabilabb formává. Ilyen például a hidroxipatit és az oktokalcium-foszfát, amelyek lúgos körülmények között kevésbé hozzáférhetőek a növények számára (Shen és mtsai., 2011).

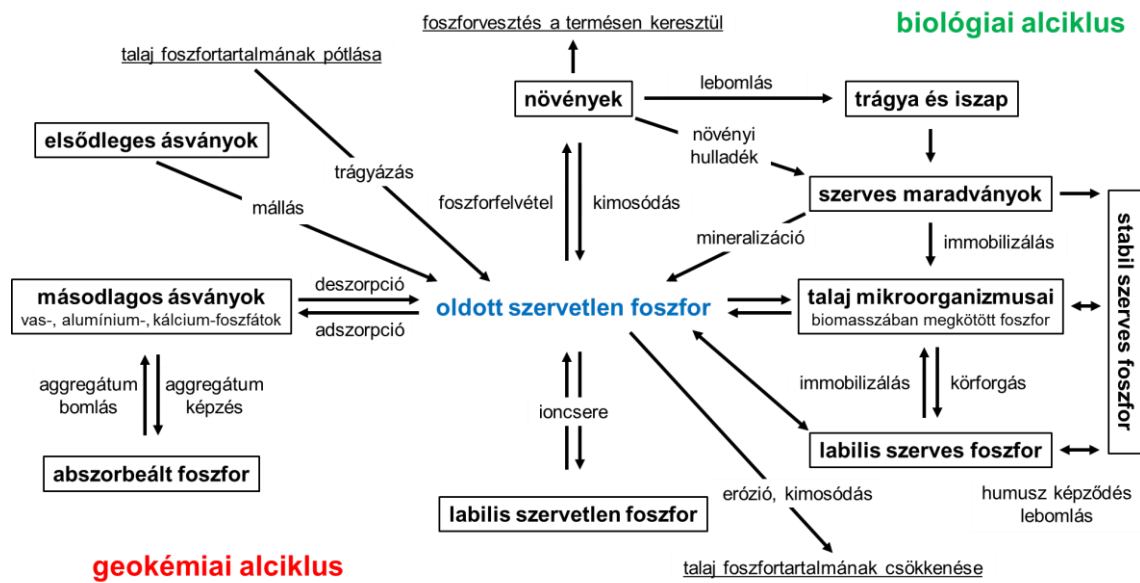
2.3. A foszfor körforgása a talajban

A foszfor körforgása a talajban geokémiai és biológiai alciklusokra osztható, ahol talajoldatban oldott szerves foszfor szolgál a teljes ciklus központi elemeként. Ez a szerves foszfor oldat ortofoszfát-forrásként szolgál a talaj mikroorganizmusai és a növények számára (Mullen, 2005).

A biológiai alciklusban az oldható ortofoszfátot vagy felveszik a növények, vagy immobilizálják a talaj mikroorganizmusai. Amennyiben szerves foszforforrásokat, például növényi maradványokat vagy szerves trágyát alkalmaznak a talaj foszfortartalmának a javítására, a foszfornek három lehetséges sorsa lehet. A szerves foszforvegyületek, különösen az inozitol-foszfátok, közvetlenül beépülhetnek a stabil humuszba, így szinte hozzáférhetetlenné válnak a növények és a talajlakó mikroorganizmusok számára. Amennyiben a talaj maradék foszfortartalma viszonylag magas a szénhez és nitrogénhez képest, akkor a szerves foszfor egy része a mikrobiális lebontás során ortofoszfátként mineralizálódik. Végül a maradék szerves foszfor egy része a bomlás során beépül a mikrobiális biomasszába. Az ilyen módon immobilizált foszfor a talaj mikroorganizmusainak elpusztulása, majd más mikroorganizmusok általi mineralizációja után újra hozzáférhetővé válhat (Mullen, 2005; Shen és mtsai., 2011; Wang és mtsai., 2022).

Míg a foszfor ciklusnak ez a modellje elkülöníti a biológiai aktivitást a geokémiai aktivitástól, meg kell jegyezni, hogy az apatitok és más másodlagos foszfortartalmú

ásványok oldódása a mikroorganizmusok és a növények metabolizmusa által fokozható. Oldás vagy oldódás során ezekből az ásványokból ortofoszfát jut a talajoldatba, ahol azt a növények és mikroorganizmusok hasznosíthatják. Természetesen ennek a foszfornak egy része ismét kicsapódik másodlagos foszforásványként, alumínium-, vas- és kalcium-foszfát vegyületek formájában (Mullen, 2005; Shen és mtsai., 2011; 1. ábra).



1. ábra A foszfor körforgása. A modell szemlélteti a foszfor kémiai és biológiai alciklusainak kapcsolatát az oldott ortofoszfáton keresztül (Mullen, 2005 nyomán).

2.4. Foszforfelvétel magasabb rendű növényekben

A növények számos stratégiát fejlesztettek ki annak érdekében, hogy növeljék hozzáférésüket talajoldatban található szervesetlen foszfáthoz és képesek legyenek átvészelni a foszforhiányos időszakokat (Hammond és mtsai., 2004a; 2004b). Foszforhiány esetén a növények megnövelik gyökérrendszerük felületét oly módon, hogy növelik a szénhidrátok mennyiségét a gyökerekben, ami felgyorsítja az oldalgyökerek keletkezését és növekedését, valamint növelik a gyökérszőrök számát és hosszát is (Forde és Lorenzo 2001; Jungk, 2001). A talajlakó gombákkal képzett mikorrhiza kapcsolatok száma szintén növekszik (Karandashov és Bucher, 2005). A növények továbbá protonokat, enzimeket és szerves savakat választanak ki a rizoszférába, hogy szervesetlen foszfátot szabadítsanak fel a talaj szerves és szervesetlen forrásaiból (Amtmann és mtsai., 2005).

A szervetlen foszfát meglehetősen alacsony, általában 1-10 μM -os koncentrációban van jelen a talajban (Yang és mtsai., 2017). Ezzel szemben a növényi sejtekben a koncentrációja már a mM-os tartományba esik (jellemzően 5-20 mM) (Hasan és mtsai., 2016). Ebből kifolyólag a szervetlen foszfátfelvétel koncentráció grádiens ellenében történik a sejtfaon és a plazmamembránon keresztül, ami igen energiaigényes folyamat. Ezen túlmenően a szervetlen foszfát anionoknak le kell győzniük a negatív membránpotenciált is ahhoz, hogy bejussanak a növényi sejtekbe (Schachtman és mtsai., 1998; Rausch és Bucher 2002). A legtöbb tanulmány szerint a magasabb rendű növények szervetlen foszfát felvétele 5-ös és 6-os pH között a leghatékonyabb, ami arra utal, hogy a felvétel főleg monovalens (H_2PO_4^-) formában történik (Ullrich-Eberius és mtsai., 1984; Furihata és mtsai., 1992). A foszfát felvétele kotranszporterek közreműködése révén valósul meg. Annak érdekében, hogy a növény elkerülje a membrán hiperpolarizációját, a H_2PO_4^- belépése a sejtekbe más kationokkal (például H^+ vagy Na^+) együtt történik (Schachtman és mtsai., 1998; Rausch és Bucher 2002).

Miután a szervetlen foszfát belép a gyökér szimplasztjába különböző utakon haladhat tovább. A sejtek citoplazmájában különféle szerves molekulákba épül, vagy a foszfor-homeosztázis fenntartása érdekében a vakuólumokban raktározódik. Kiválasztódhat a xilémbe és távolabbi szövetekbe, szervekbe szállítódik (Schachtman és mtsai., 1998; Rausch és Bucher 2002). A citoszol pH-ja 7,3 (Shen és mtsai., 2013), ami közel áll ahhoz a pK értékéhez, amin a H_2PO_4^- disszociációja bekövetkezik és HPO_4^{2-} -tá alakul. Következésképpen, a citoszolban található szervetlen foszfát egy- és kétértékű formája közel egyenlő arányban lesz jelen (Versaw és Garcia, 2017).

2.5. A transzporterek élettani jelentősége

A különböző transzporter funkcióval rendelkező fehérjék alapvető fontosságúak minden élő sejt számára. A különböző transzportfolyamatok nélkülözhetetlen részei az egyes élettani folyamatoknak, így például az anyagcserének, a sejten belüli és sejtek közötti kommunikációnak, valamint különböző anyagok bioszintézisének. Lehetővé teszik az esszenciális tápanyagok bejutását a sejtekbe és a sejt szervecskébe. Szabályozzák a különböző metabolitok koncentrációját a citoplazmában és más sejtorganellumokban. Megakadályozzák a különböző káros hatású elemek, vegyületek és toxinok felhalmozódását a sejtekben. Biztosítják az ionok fiziológiás koncentrációját a sejten belül, ami akár több nagyságrenddel is eltérhet a sejtek közötti térben mérhető koncentrációtól. Szerepet

játszanak különböző makromolekulák, mint például az összetett szénhidrátok, fehérjék, lipidek és DNS szállításában. Olyan jelmolekulák felvételét és exportját szabályozzák, amelyek elengedhetetlenek a sejtek közötti kommunikációhoz. Biológiailag aktív anyagok szállítása révén részt vesznek az úgynevezett biológiai hadviselésben (Saier 2000; Busch és Saier, 2002).

A jelenleg érvényben lévő, funkcionális és filogenetikai szempontok alapján történő osztályozás a transzporterek öt nagy családját különíti el. Ezek a következők: csatornák és pórusok, elektrokémiai potenciál által működtetett transzporterek (másodlagos aktív transzporterek), elsődleges aktív transzporterek, transzlokátorok, transzmembrán elektronszállítók (Busch és Saier, 2002).

A porterek az elektrokémiai potenciál által működtetett transzporterek (másodlagos aktív transzporterek) osztályába sorolható fehérjék. Közös jellemzőjük, hogy elektrokémiai grádienszt használnak a transzport folyamat meghajtásához. Az általuk szállított szubsztrát a koncentráció-grádiens ellenében, termodinamikailag kedvezőtlenebb irányba, miközben egy másik szubsztrát a koncentráció-grádienssel megegyező irányba szállítódik (Lemieux, 2008). Az alosztályon belül megkülönböztethetünk uniportereket, szimportereket, és antiportereket. Az uniporterek egy anyag egyirányú szállításában résztvevő fehérjék. Elősegítik az általuk szállított anyag membránon keresztül történő facilitált diffúzióját. Abban az esetben, ha az általuk szállított anyag töltéssel rendelkezik, működésük membránpotenciál függő folyamat. A szimporterek (vagy más néven kotranszporterek) kettő vagy több anyag azonos irányú szállításában játszanak szerepet, míg az antiporterek kettő vagy több anyag ellentétes irányú szállításában vesznek részt. Működésük kemiozmotikus energiát igényel. Ilyen típusú fehérjék minden élő szervezetben megtalálhatóak (Saier 2000; Busch és Saier, 2002).

2.6. Foszfát-transzporterek magasabb rendű növényekben

A szerves foszfát sejtmembránokon keresztül történő szállítása a felhasználás szabályozásának kritikus szakasza. Az elmúlt néhány évben számos olyan transzportert azonosítottak, amelyek a szerves foszfát szállításában játszanak szerepet. Lúdfűben (*Arabidopsis thaliana*) és a rizsben (*Oryza sativa*) öt nagy affinitású szerves foszfát-transzporter családot azonosítottak (PHT1, PHT2, PHT3, PHT4 és PHT5), amelyek fehérjeszekvenciáik, sejten belüli elhelyezkedésük és funkcióik alapján különíthetők el egymástól (Sun és mtsai., 2017).

A *PHT1* géncsalád fehérjéi a plazmamembránban elhelyezkedő H^+ /szervetlen foszfát szimporterek, amelyek a szervetlen foszfát talajból történő felvételében és növényen belüli elosztásában vesznek részt (Wang és mtsai., 2014; Sun és mtsai., 2017). Lúdfüben az *AtPHT1* géncsalád kilenc szervetlen foszfát-transzportert tartalmaz (*AtPHT1;1* - *AtPHT1;9*), amelyek közül az *AtPHT1;1*-től *AtPHT1;4*-ig főként a talajból történő szervetlen foszfát felvételben vesznek részt (Lapis-Gaza és mtsai., 2014). *Arabidopsis*-ban végzett génexpressziós vizsgálatok azt mutatták, hogy *AtPHT1;1*, *AtPHT1;2*, *AtPHT1;3* és az *AtPHT1;4* főleg különböző típusú gyökérsejtekben fejeződik ki, ami arra utal, hogy ezek a transzporterek hasonló és részben átfedő funkcióval rendelkeznek (Mudge és mtsai., 2002; Ayadi és mtsai., 2015). Megfelelő foszforellátottság mellett az *Arabidopsis atpht1;5-1* mutánsokban a hajtás szervetlen foszfáttartalma magasabb volt, mint a vad típusban, ami arra enged következtetni, hogy az *AtPHT1;5*-nek a foszfor-homeosztázis fenntartásában van szerepe (Nagarajan és mtsai., 2011). Lúdfüben az *AtPHT1;6* és *AtPHT1;7* a szervetlen foszfátnak a levelekből a pollenbe történő szállításában játszik szerepet foszforhiányos körülmények között, míg az *AtPHT1;8* és *AtPHT1;9* a szervetlen foszfátnak a gyökértől a hajtásokig történő transzlokációjában vesz részt (Mudge és mtsai., 2002; Nagarajan és mtsai., 2011; Lapis-Gaza és mtsai., 2014; 2. ábra).

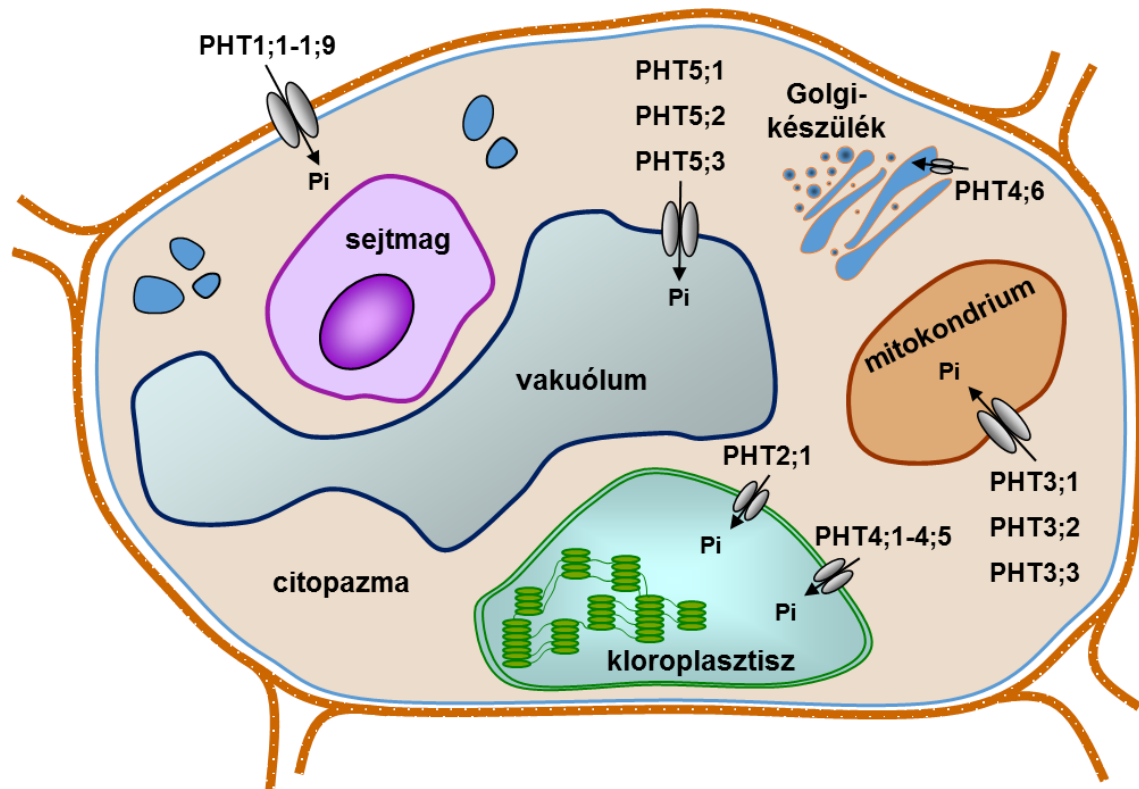
A *PHT2* transzporterek a kloroplastisz belső membránjában találhatóak. Élesztőben végzett funkcionális vizsgálatok arra engednek következtetni, hogy ezek a fehérjék H^+ /szervetlen foszfát szimporterként funkcionálnak. *Arabidopsis*-ban eddig a géncsalád egyetlen tagjának, az *AtPHT2;1*-nek az élettani jellemzését végezték el (Versaw és Harrison, 2002; Guo és mtsai., 2013). Az *AtPHT2;1* fehérje valószínűleg 12 transzmembrán hélixet tartalmaz, szerkezeti hasonlóságot mutat a *PHT1* géncsalád tagjaival, de szekvencia szinten jelentősen különbözik tőlük. A *PHT1* fehérjétől eltérően egy nagy hidrofil hurok található a 8. és 9. transzmembrán hélix között (Daram és mtsai., 1999; 2. ábra).

A szervetlen foszfor mitokondriumba történő szállítása nélkülözhetetlen az oxidatív foszforiláció révén megvalósuló ATP szintéziséhez. Állati sejtekben a feszültségfüggő anion csatornák (VDAC) segítik elő a szervetlen foszfor szállítását a mitokondrium külső membránján keresztül (Krammer és mtsai., 2015). Ilyen jellegű transzporter aktivitásról növényeknél még nem számoltak be, de homológ mitokondriális VDAC fehérjék jelen vannak *Arabidopsis*-ban is (Tateda és mtsai., 2011). A *PHT3/MPT* fehérjék szoros rokonságban állnak állati sejtek mitokondriumjának belső membránjában azonosított szervetlen foszfát-transzporterekkel. Heterológ rendszerekben végzett funkcionális vizsgálatok megerősítették, hogy a növényi *PHT3* fehérjéknek is van szervetlen foszfát-

transzporter funkciója (Takabatake és mtsai., 1999; Hamel és mtsai., 2004). Lúdfűben az *AtPHT3* géncsalád három tagját azonosították. Ezek nevezetesen az *AtPHT3;1*, *AtPHT3;2* és *AtPHT3;3*, melyek a szárban, levelekben és virágokban fejeződnek ki és feltételezhetően részt vesznek a szerves foszfor mitokondriumba történő szállításában (Zhu és mtsai., 2012; 2. ábra). Liu és munkatársai homológián alapuló elemzést végeztek és öt foszfát-transzporter (PT) gént azonosítottak rizsben, amelyek nagyfokú homológiát mutatnak az *AtPHT3* génekkel. Azonban ezek a rizs OsPT fehérjék nem a mitokondriumban, hanem más organellekben helyezkednek el. Az OsPT15, 17, 18 és 19 a peroxisómákban, az OsPT16 az endoplazmatikus retikulumban, az OsPT17 pedig a plazmamembránban található (Liu és mtsai., 2011).

A *PHT4* géncsalád hat tagját azonosították *Arabidopsis*-ban. Heterológ rendszerekben végzett funkcionális vizsgálatok kimutatták, hogy mind a hat fehérje H^+ vagy Na^+ /szerves foszfát kotranszporterként működik. A PHT4 fehérjék nagy hasonlóságot mutatnak az állati SLC17/I típusú szerves foszfát-transzporterekkel, melyek szerves foszfát, szerves anionok és klorid szállításában vesznek részt. Az *AtPHT4;1*, *AtPHT4;2*, *AtPHT4;3*, *AtPHT4;4* és *AtPHT4;5* transzporterek megtalálhatóak hajtás- és gyökérplasztiszokban, az *AtPHT4;6* pedig a Golgi-készülékben található (Guo és mtsai., 2008; 2. ábra). Érdekes módon az *AtPHT4;4*-ről kiderült, hogy az aszkorbát kloroplasztiszba történő szállításában is szerepet játszik (Miyaji és mtsai., 2015).

Növényi sejtekben a vakuólum a legnagyobb sejtsejtszervecske, és megfelelő foszforellátottság esetén az intracelluláris szerves foszfor 90 %-a itt raktározódik. A szerves foszfor vakuólumba történő be- és kilépése rendkívül fontos a citoplazmatikus foszfor-homeosztázis biztosítása érdekében (Wang és mtsai., 2012). Érdekes módon a vakuoláris szerves foszfor import és export egyaránt a PHT5/VPT/SPX-MFS transzporter család tagjainak tulajdonítható (Liu és mtsai., 2015; Wang és mtsai., 2015; Liu és mtsai., 2016). Lúdfűben a géncsalád három tagját azonosították és úgy tűnik, hogy mind a három fehérje szerepet játszik a szerves foszfor szállításában. Az *AtPHT5;1/VPT1* mutációja következtében csökkent a vakuólum szerves foszfát koncentrációja, míg az *AtPHT5;1/VPT1* túltermeltetése esetén megnőtt a vakuólumban raktározott foszfor mennyisége (Liu és mtsai., 2015; Liu és mtsai., 2016; 2. ábra).



2. ábra Szervetlen foszfát-transzporterek elhelyezkedése *Arabidopsis thaliana* sejtekben. A *PHT1* géncsalád tagjai a sejtmembránban helyezkednek el. A *PHT2;1* a kloroplasztisz membránjában, a *PHT3* géncsalád tagjai pedig a mitokondrium membránjában találhatóak. A *PHT4* géncsalád tagjai megtalálhatóak a plasztiszokban, valamint a Golgi-készülék membránjában is. A szervetlen foszfát vakuólumba történő szállításban a *PHT5* géncsalád tagjai játszanak szerepet.

2.7. Foszfát-transzporterek zöldalgákban

A foszfát-transzport mechanizmusát kevésbé tanulmányozták zöldalgákban, és meglepő módon egyetlen szervetlen foszfát-transzportert sem jellemeztek még részletesen. Wang és munkatársai (2020) 25 feltételezett foszfát-transzportert (PHT) kódoló gént azonosítottak a *Chlamydomonas reinhardtii* zöldalga genomjában. Ezeket négy alcsaládba sorolták: a PTA alcsalád négy, a PTB tizenegy, PHT3 egy, a PHT4 alcsalád pedig kilenc gént tartalmaz. Az azonosított gének által kódolt fehérjék hossza 351 és 1666 aminosav között változik. Becsült molekulásúlyuk körülbelül 37 és 172 kDa között változik, a legtöbbnek mintegy 60 kDa. Különböző bioinformatikai vizsgálatok alapján ezek a feltételezett foszfát-transzporterek 5-15 transzmembrán domént tartalmaznak, legtöbbjük 10-12-t (Wang és mtsai., 2020).

A PHT4 géncsalád egyik tagjának, a CrPHT4-3-nak az aminosav-szekvenciája 41,3 %-os homológiát mutat az *Arabidopsis thaliana*-ban azonosított és jellemzett PHT4;4 aszkorbát-transzporterrel, valamint 35,4-39,5 %-os hasonlóságot mutat az *Arabidopsis* PHT4 fehérjecsalád többi tagjával (a Phytozome 13-as verziója alapján), amelyek a Golgi-készülékben, a gyökér- és hajtásplasztiszokban található szerves foszfát-transzporterek. A CrPHT4-3 aminosav szekvenciája 32-42,3 %-os hasonlóságot mutat a PHT4 fehérjecsalád többi tagjával. A PHT4 géncsalád egy másik tagja, a CrPHT4-7, a fehérjeszekvenciák alapján szintén viszonylag nagyfokú homológiát mutat az AtPHT4;4 aszkorbát-transzporterrel (37,4 %).

A különböző előrejelző algoritmusok nem adnak egyértelmű választ arra vonatkozóan, hogy ezek a feltételezett foszfát-transzporterek a sejten belül hol találhatóak. A predikációs vizsgálatok azt mutatták, hogy a PTA alcsalád tagjai nagy valószínűséggel a plazmamembránban, míg a PTB fehérjék feltételezhetően az endoplazmatikus retikulumban és a Golgi-készülékben (a szekréciónál) helyezkednek el. Azonban kísérleti eredmények alapján a plazmamembránban találhatóak (Bonnot és mtsai., 2017), ami arra utal, hogy a szekréciónál keresztül juthatnak a plazmamembránba. A PHT3 alcsalád egyetlen eddig azonosított tagját alacsony megbízhatósággal a mitokondriumba prediktálták. A PHT4 alcsalád fehérjéinek többsége feltételezhetően a kloroplasztiszban található, a CrPHT4-2-t és CrPHT4-7-et a szekréciónálra valószínűsítik, a CrPHT4-5-nek pedig sincsen szignál peptid szekvenciája, így a sejten belüli elhelyezkedése is kérdéses (Wang és mtsai., 2020). A közelmúltban kifejlesztett PB-Chlamy fehérje-előrejelző program azt jósolja, hogy a PTA és PTB transzporterek többsége a szekréciónál lokalizálódik. A PHT3 géncsalád jelenleg ismert egyetlen tagját a mitokondriumba prediktálja, a PHT4 géncsalád tagjainak többsége a program szerint a kloroplasztiszban található (Wang és mtsai., 2023).

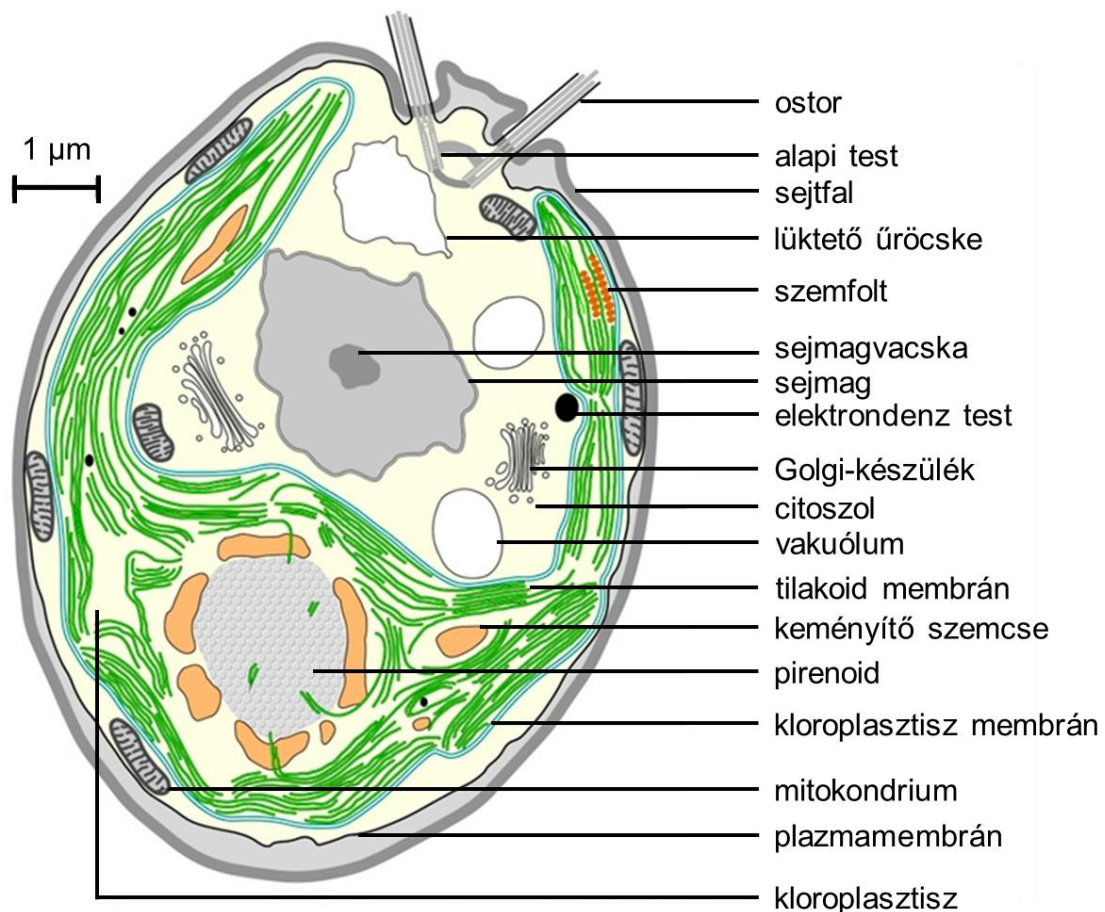
A szerves foszfátfelvétel és a sejten belüli eloszlás mechanizmusainak megértése rendkívül fontos, mivel a mikroalgák, így többek között a *C. reinhardtii* is nagy mennyiségű szerves foszfátot képesek felhalmozni és tárolni polifoszfát szemcsék formájában, specifikus vakuólumokban, úgynevezett acidokalciszómákban (Sanz-Luque és mtsai., 2020). Ez az úgynevezett „luxusfelvétel” (Riegman és mtsai., 2000) elősegítheti a szerves foszfát visszanyerését a szennyvízkezelés során (Shilton és mtsai., 2012), hogy ezt követően foszforban gazdag biotrágyákat állítsanak elő (Slocombe és mtsai., 2020). Így a mikroalgák szerves foszfátfelvételének és szállításának megértése fontos lehet a környezetvédelem és a vízgazdálkodás szempontjából.

2.8. A *Chlamydomonas reinhardtii* nevű zöldalga, mint kedvelt modellszervezet

A zöldalgák az eukarióta fotoautotróf élőlények egy nagy és igen változatos taxonját alkotják (Bellinger és Sigeo, 2010). Zöldalgák a világon mindenütt előfordulnak, beleértve olyan élőhelyeket is, mint a sarkkörü régiók, a sós- és édesvizek, valamint a különféle talajok a mérsékelt nedves területektől egészen a száraz területekig (Brodie és Lewis, 2007). Egyes becslések szerint legalább 600 nemzetségük és 10 000 fajuk létezik (Norton és mtsai., 1996). A *Chlamydomonas* az egyik legnagyobb zöldalga nemzetség, több mint 800 leírt fajjal, azonban mára felismerték, hogy polifiletikus taxonról van szó (jellemvonásaik hasonlóak, azok több ősrre vezethetők vissza, a hasonló tulajdonságok egymástól teljesen függetlenül jöttek létre a párhuzamos evolúció során), így a nemzetség alapos felülvizsgálatára van szükség (Harris, 2009).

A nemzetség jellegzetes és legjobban tanulmányozott képviselője a *Chlamydomonas reinhardtii*. A vad típusú *C. reinhardtii* sejtek ovális alakúak, jellemzően 10 μm hosszúak és 3 μm szélesek, az elülső végükön kettő, 10-12 μm hosszú ostor található. Az ostorok jellegzetes 9 + 2-es mikrotubuláris szerkezettel rendelkeznek és az alapi testekből erednek (Nickelsen, 2005). A sejtek számos kisebb mitokondriumot, és egyetlen csésze alakú kloroplasztiszt tartalmaznak, ami a sejtterefogat közel 40 %-át foglalja el (3. ábra).

A sejtek fotoautotróf (fényben, CO_2 -ot használva szénforrásként), mixotróf (fényben, szerves szénforrás jelenlétében) és heterotróf (sötétben, szerves szénforrás jelenlétében) körülmények között is képesek a növekedésre és az osztódásra (Rochaix, 1995). A haploid (n) vegetatív sejtek két eltérő párosodási típusú formában fordulnak elő (mt^+ és mt^-) és képesek mitózissal (ivartalanul) szaporodni (Harris, 2001; Goodenough és mtsai., 2007). A gametogenezist a kedvezőtlen környezeti körülmények indukálják, ilyen lehet például a nitrogénmegvonás. A folyamat során az ellentétes párosodási típusú ivarsejtek diploid ($2n$) zigótákká egyesülnek (ivaros szaporodás). A megtermékenyítés után néhány órán belül a zigóták négy ostora felszívódik és mozdulatlaná válnak. Néhány nap leforgása alatt ezek a zigóták rendkívül ellenálló, zigospórákká alakulnak át. A folyamat során erős, többrétegű sejtfal képződik és a klorofil lebomlik (Goodenough és mtsai., 2007). Amikor a környezeti feltételek javulnak, a zigóta meiózison megy keresztül, és négy haploid sejt szabadul fel. A haploid sejtekkel ezután újraindul a vegetatív szaporodás (Harris, 2001).



3. ábra A *Chlamydomonas reinhardtii* felépítése. A sejten kettő azonos hosszúságú ostor található. A sejt nagy részét egyetlen, csésze alakú kloroplasztisz foglalja el. A szemfolt a sejtmembrán és a kloroplasztisz találkozásánál helyezkedik el. A sejt elülső részén található a lüktető üröcske. Az ostorok alapjainál találhatóak az alapi testek. A sejt közepén helyezkedik el a sejtmag. Ezen kívül még Golgi-készülék, vakuólum, elektrondeuz test és mitokondriumok találhatóak a sejtben (Salomé és Merchant, 2019 nyomán).

Az elmúlt 25 évben az algák esetében is jelentősen megnövekedett a genomikai kutatások száma. Ennek kiemelkedő példája a *Chlamydomonas* genom projekt, ami a *C. reinhardtii* molekuláris feltérképezéséből, teljes génállományának megismeréséből állt (Brodie és Lewis, 2007). Napjainkban a mitokondrium, a kloroplasztisz, valamint a sejtmag genomjának is ismert a teljes DNS szekvenciája, és nyilvános adatbázisokon keresztül elérhető (Blaby és mtsai., 2014). Mint modellszervezetet, intenzíven használják a nitrogén-anyagcsere, a légzés és a csillómozgás tanulmányozására. Kiválóan alkalmas a fotoszintetikus pigmentek és klorofill-fluoreszcencia változásainak, valamint az oxidatív stresszhatások tanulmányozására. A *C. reinhardtii*-t a lipid-anyagcsere kutatás területén is fontos modellként tartják számon (Fan és mtsai. 2011). A zsírsav bioszintézis az algasejtek

kloroplasztiszában és az endoplazmatikus retikulumban megy végbe, éppen úgy, mint a hajtásos növényeknél (Zhang és mtsai., 2011). Mixotróf nevelési körülmények között a *C. reinhardtii* kiváló modellszervezet a kloroplasztisz biogenezésének és a fotoszintézis folyamatának a tanulmányozására is (Harris, 2001). A *C. reinhardtii* modellszervezetként való alkalmazásának további előnye, hogy ez az egyetlen fotoszintetizáló szervezet, amelyben egyaránt megvalósítható a sejtmag, a kloroplasztisz és a mitokondriumok genetikai transzformációja (Nickelsen, 2005). Napjainkban számos molekuláris biológiai módszer áll rendelkezésre, ami lehetővé teszi a *C. reinhardtii* genetikai módosítását. Ezek közül érdemes kiemelni a közelmúltban kifejlesztett CRISPR/Cpf1 technikát, ami célzott, hatékony és nukleotid pontosságú módosításokat tesz lehetővé a *C. reinhardtii* genomjában (Ferenczi és mtsai., 2017; Greiner és mtsai., 2017).

2.9. CRISPR/Cas rendszerek felfedezése és alkalmazásuk a célzott génszerkesztésben

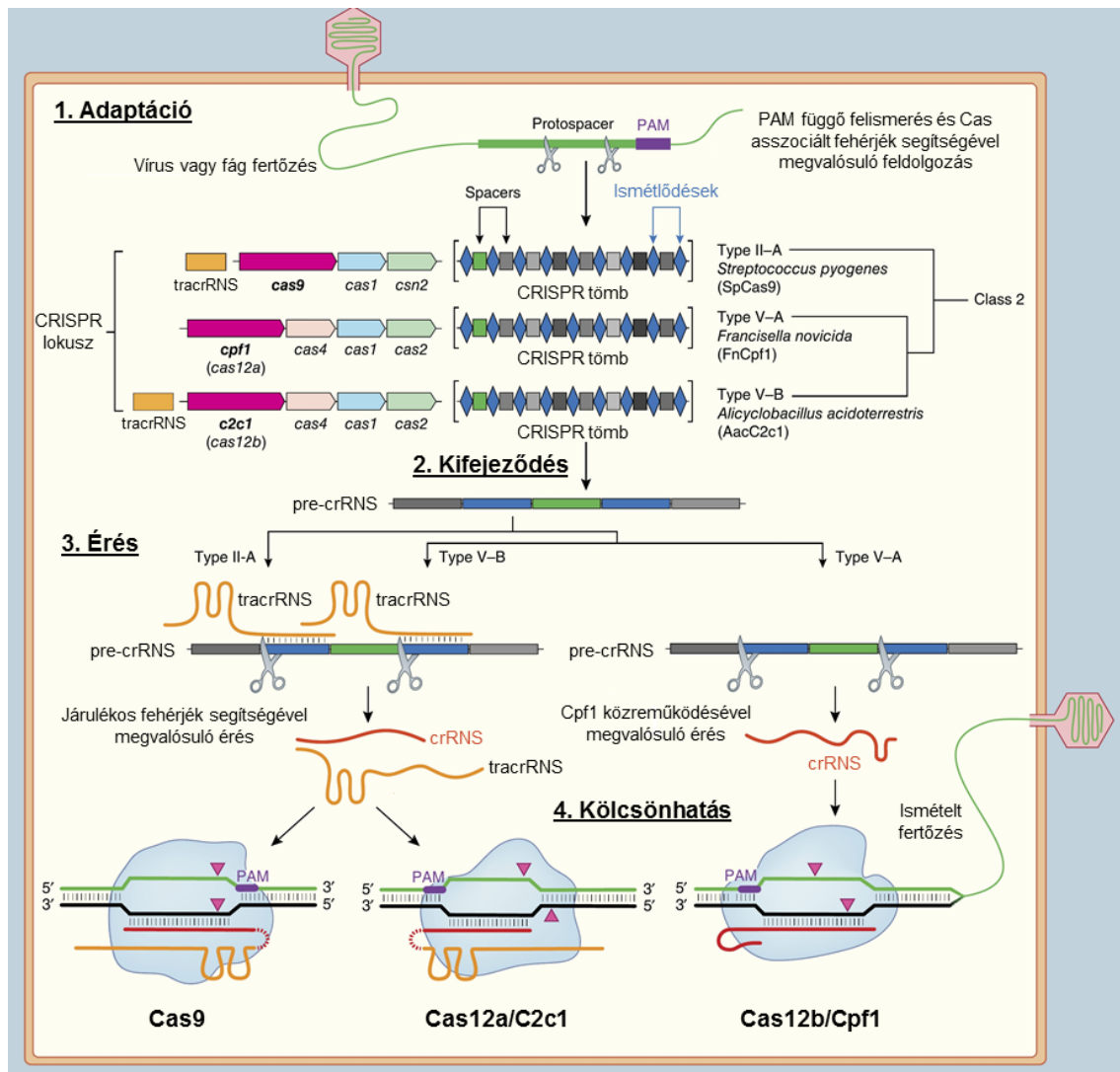
1987-ben rövid ismétlődő szekvenciákat fedeztek fel *Escherichia coli* törzsek örökítőanyagában, amelyeknek a funkciója ismeretlen volt (Ishino és mtsai., 1987). Ezt követően számos más ősbaktérium (archea) és baktérium törzs genomjában is találtak ilyen rövid, ismétlődő, egymást követő szekvenciákat (Mojica és mtsai., 2000). Ezeket a szekvenciákat később „halmozottan előforduló, szabályos közökkel elválasztott palindromikus ismétlődéseknek” (CRISPR: clustered regularly interspaced short palindromic repeats) nevezték el (Jansen és mtsai., 2002). Azóta kiderült, hogy ezek a rövid, változóképes, jellemzően 20-50 bázispárnnyi beékelődött (spacer) szekvenciák a legtöbb esetben vírus vagy bakteriofág eredetűek. Ez a felfedezés vezetett ahhoz a felismeréshez, hogy a beékelődött szekvenciák genetikai memóriaelemek a baktériumok immunitásában (Bolutin és mtsai., 2005). A CRISPR szekvenciák mellett Cas (CRISPR asszociált) géneket találtak, melyek által kódolt fehérjék képesek kitekerni a DNS-t és el is tudják hasítani (Haft és mtsai., 2005). Ma már tudjuk, hogy a CRISPR/Cas rendszerek ősbaktériumok és baktériumok adaptív védekező rendszerét alkotják, amelyek megvédik a gazdasejtet az őt megtámadó mobilis genetikai elemektől, mint például a plazmidoktól és fágoktól.

A jelenleg érvényben lévő felosztás szerint a CRISPR/Cas rendszerek két osztályba sorolhatóak, amelyek összesen hat típusra vannak felosztva. Az első osztályba tartozó (I., III. és IV. típusú) rendszerek sok alegységből (több Cas fehérjéből) álló effektor komplexszel rendelkeznek, míg a második osztályba sorolható rendszerek (II., V. és VI. típusú) egyetlen Cas fehérjét használnak (Nishimasu és Nureki, 2017). Az első osztályba

tartozó CRISPR/Cas rendszerek ősbaktériumokban és baktériumokban is megtalálhatók, az összes azonosított CRISPR/Cas lokusz körülbelül 90 %-át teszik ki. A második osztályba tartozó CRISPR/Cas rendszerek szinte kizárólag baktériumokban fordulnak elő (Shmakov és mtsai., 2017).

A CRISPR/Cas rendszer általi immunitás három fő, egymást követő lépésből áll: alkalmazkodás, kifejeződés-érés és kölcsönhatás. Mindegyik lépéshez specifikus Cas fehérjékre van szükség, amelyeket *Cas* gének kódolnak a CRISPR tömb közelében, más járulékos fehérjékkel együtt (van der Oost és mtsai., 2014; Amitai és Sorek, 2016; Wright és mtsai., 2016). Az alkalmazkodás szakasza magában foglalja a protospacer (a sejtbe bejutott idegen örökítőanyag rövid szakasza) azonosítását és kinyerését a behatoló örökítőanyagából, valamint az azt követő beépítést a CRISPR tömbbe. Ez a folyamat a Cas1-Cas2 adaptációs komplex révén valósul meg (Amitai és Sorek, 2016). A kifejeződés-érés során a CRISPR tömbből egy hosszú pre-CRISPR RNS (pre-crRNS) molekula íródik át. A pre-crRNS-ből rövidebb crRNS molekulák keletkeznek, melyek mindegyike tartalmaz egy spacer szekvenciát és ismétlődő szekvencia részletet. Utolsó lépésként kölcsönhatás léphet fel (ismételt fertőzés esetén), miután a crRNS komplexet képez az effektor fehérjével. A protospacer melletti szekvencia (PAM) felismerése után a crRNS hibridizál a cél DNS-sel a távtartó (spacer) szekvenciáján keresztül, és végül az endonukleáz fehérje elvágja a cél DNS szekvenciát (Nishimasu és Nureki, 2017; Stella és mtsai., 2017a; 4. ábra).

Streptococcus pyogenes nevű baktériumból izolált CRISPR/Cas rendszer a második osztályba, annak is a II./A altípusába sorolható, működéséhez a SpCas9 fehérjét használja. A Cas9 volt az első olyan Cas fehérje, amelyet génszerkesztésre használtak (Jinek és mtsai., 2012), napjainkban széles körben elterjedt eszköze a célzott génszerkesztésnek. Különböző mikroorganizmusok genomszekvenálásai nagymértékben hozzájárulnak új CRISPR/Cas rendszerek felfedezéséhez. Ilyen újonnan azonosított rendszer a *Lachnospiraceae* baktériumban felfedezett, ami működéséhez a Cas12a, vagy más néven Cpf1 fehérjét használja. Hasonlóan a SpCas9-hez, ez a fehérje is második osztályba, annak pedig a V./A altípusába sorolható. A Cas12a fehérje homológjai megtalálható más baktériumok, mint például *Francisella novicida*, *Prevotella sp.*, *Acidaminococcus sp.* genomjában is (Dong és mtsai., 2016; Yamano és mtsai., 2016; Stella és mtsai., 2017a).



4. ábra Különböző baktériumokban található CRISPR/Cas rendszerek működésének lépései (Stella és mtsai., 2017a nyomán).

A Cas9 és a Cas12a feltűnő funkcionális hasonlóságokkal rendelkeznek, de egymástól függetlenül fejlődtek ki és működésükben is számos különbség figyelhető meg. Az effektor fehérjék hasonló méretűek (a SpCas9 1368 aminosav, míg a FnCas12a 1307 aminosav hosszúságú), mindkettő többdoménos felépítésű. A Cas9 működéséhez két RNS molekula szükséges: egy tracrRNS és egy crRNS, míg a Cas12a csak egyetlen RNS molekulát (crRNS) igényel. A Cas9 kettő nukleinsav hasítóhellyel rendelkezik (a RuvC és a HNH doméneken), míg a Cas12a csak egyet tartalmaz a RuvC doméneken. Ezenkívül a Cas12a rendelkezik egy RNS feldolgozó hellyel is (Doudna és Charpentier, 2014; Sternberg és mtsai., 2014; Fonfara és mtsai., 2016).

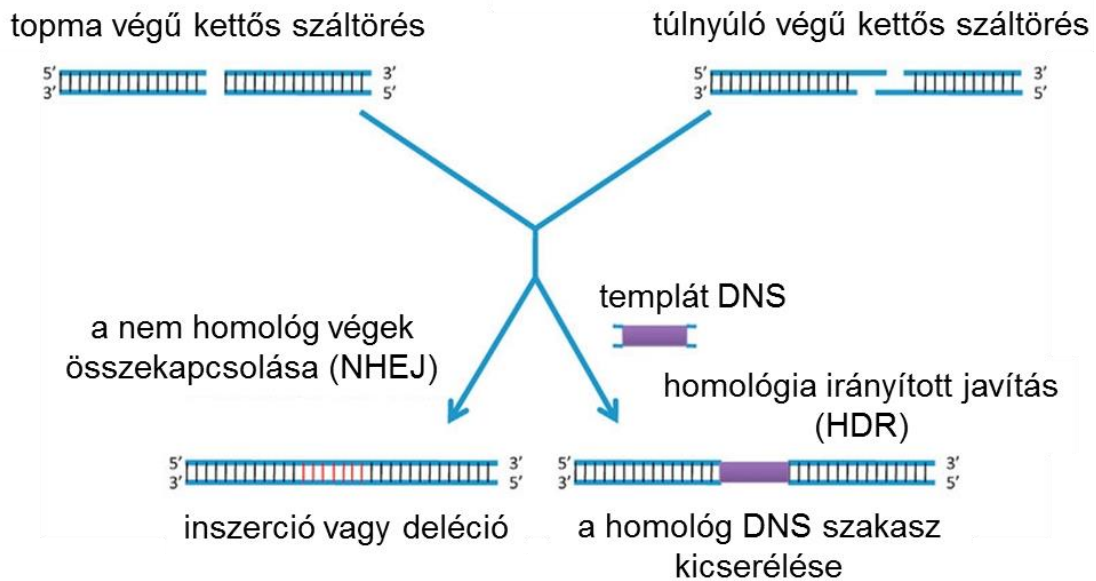
Miután a CRISPR tömbről átíródott egy hosszú pre-crRNS-molekula, érett crRNS-ekké kell alakulnia mielőtt komplexet képezhetnek az endonukleázzal. A Cas9 esetében

először a tracrRNS-nek hibridizálnia kell a pre-crRNS-sel, majd ezt a hibrid RNS-RNS duplex szerkezetet ismeri fel a Cas9, miután a gazdaszervezet RNáz III enzime elhasítja a duplexet. Így körülbelül 75 nukleotid hosszúságú tracrRNS és egy 39-42 nukleotid hosszúságú crRNS marad, amely aztán a cél DNS felismeréséért és hasításáért felelős ribonukleoprotein (RNP) komplexet alkotja (Deltcheva és mtsai., 2011; Jiang és mtsai., 2015; Jiang és mtsai., 2016). Ezzel szemben a Cas12a nem igényel tracrRNS-t vagy RNáz III-at, mivel a fehérje képes feldolgozni a crRNS-t a saját ribonukleáz katalitikus helyén (Fonfara és mtsai., 2016). A Cas9 estében cél DNS szekvencia, a PAM 3' irányban található a távtartó szekvenciától a nem templát szálon. Ezt a PI domén ismeri fel, ami jellemzően 5'-NGG-3' PAM szekvenciát képes felismerni (Anders és mtsai., 2014; Jiang és mtsai., 2015). Ezzel szemben a Cas12a A-T gazdag PAM szekvenciát ismer fel, ami jellemzően 5'-TTTV-3' és a távtartó szekvencia előtt (5' irányban) található. A PAM szekvencia felismerése során a cél DNS kicsomagolódik és végbemegy DNS-RNS hibridizáció. Mindkét enzim számára létezik egy kulcsfontosságú magszekvencia a PAM mellett, ami meghatározza a RNP-nek cél DNS szekvenciához történő kötődését. A Cas9 magszekvenciája körülbelül 10 nukleotid hosszú, míg a Cas12a esetében ez körülbelül 5-6 nukleotid (Jinek és mtsai., 2012; Zetsche és mtsai., 2015; Fonfara és mtsai., 2016; Swarts és mtsai., 2017). Amikor a DNS hibridizációja az RNS-sel teljes, Cas9 elhasítja a templát és a nem templát DNS szálakat a HNH és a RuvC doménjeiben található katalitikus helyeknél, rendszerint tompa, kettős szálú száltörést (DSB) hozva létre. A hasítási hely 3 bázispárral feljebb található a PAM szekvenciától (Jinek és mtsai., 2012). A Cas12a esetében csak egy nukleotid hasítóhely található, emiatt a DNS szálak ugyanazon a helyen vágódnak el. Ugyanakkor bebizonyosodott, hogy a két DNS szál különböző útvonalakat követve éri el a katalitikus helyet, ami megmagyarázza a Cas12a által létrehozott túlnyúló végekkel rendelkező kettős száltörést (Zetsche és mtsai., 2015; Stella és mtsai., 2017b).

	Cas12a	Cas9
A fehérje mérete	~ 1300 aminosv	1000-1600 aminosav
Szükséges RNS molekula	crRNS	crRNS és tracrRNS
Nukleinsav hasítóhely	RuvC domén	RuvC és HNH domének
A DNS hasítás eredménye	túlnyúló végek	tompa végek
PAM szekvencia	T gazdag szekvencia 3-4 nukleotid	G gazdag szekvencia 3-5 nukleotid
pre-crRNS feldolgozása	nem igényel további enzimet és RNS-t	RNáz III enzim és tracrRNS szükséges

1. táblázat A Cas12a és a Cas9 fehérjék közötti különbségek (Paul és Montoya, 2020 nyomán).

A célzott génszerkesztés lényegében a következő lépéseket tartalmazza: DSB létrehozása előre meghatározott genomi régióban (például Cas9 vagy Cas12a nukleáz segítségével), a hibás gén javítása külső forrásból származó templát DNS segítségével, végül a kettős száltörés javítása. Eukariótákban kettő DNS száltörést javító mechanizmus működik: a nem homológ végek összekapcsolása (NHEJ) és a homológia irányított javítás (HDR). A nem homológ végek összekapcsolása során a hibajavításban résztvevő fehérjék újra összeligálják az eltört DNS szálakat. Ez nem igényel homológ DNS szálakat, de gyakran inszerciók vagy deléciók kialakulását eredményezi (Bibikova és mtsai., 2002; Hefferin és Tomkinson, 2005). Az NHEJ a sejtciklus bármely fázisában lejátszódhat és az elsődleges celluláris DSB javító mechanizmus. Ezzel ellentétben, a HDR homológ DNS szálakat használ a kettős száltörés pontos javításhoz (Capecchi, 1989; Takata és mtsai., 1998). A HDR jellemzően a késői S vagy G2 fázisban fordul elő, amikor egy testvér kromatida szolgál javítási sablonként. Ezzel szemben a célzott génszerkesztés során egy kívülről bejuttatott egy- vagy kétszálú DNS molekula szolgál sablonként a száltörések javítása során (Lino és mtsai., 2018; 5. ábra).



5. ábra DNS kettős száltörés javításának lehetőségei (Ouedraogo és Tsang, 2020 nyomán).

Annak ellenére, hogy a Cas9 széles körben elterjed molekuláris biológiai eszköz, alkalmazhatóságának vannak korlátai is. Kimutatták, hogy a Cas9 genomszerkesztésre való felhasználhatósága bizonyos baktériumokban korlátozott, a sejtekre gyakorolt toxikus hatása miatt. *C. reinhardtii*-ban hasonló, toxikus hatásról számoltak be Jiang és mtsai. (2014). A FnCas12a kevésbé bizonyult toxikusnak és hatékony genomszerkesztést tett lehetővé cianobaktériumokban (Ungerer és Pakrasi, 2016; Yan és mtsai., 2017). Az LbCas12a által közvetített, hatékony genomszerkesztést sikerül megvalósítani *C. reinhardtii* nevű zöldalgában (Ferenczi és mtsai., 2017). Kimutatták, hogy az FnCas12a, AsCas12a és LbCas12a használhatóak genomszerkesztésre magasabb rendű növényekben is, mint például dohányban, szójababban és rizsben. A Cas12a-t és a crRNS-t expresszáló plazmidok bevihetők növényi sejtekbe (Endo és mtsai., 2016; Begemann és mtsai., 2017; Hu és mtsai., 2017; Tang és mtsai., 2017; Xu és mtsai., 2017), vagy alternatívaként a Cas12a-crRNS komplexek közvetlenül bejuttathatók a növényi sejtekbe (Kim és mtsai., 2017). Figyelemre méltó, hogy a Cas12a által közvetített genomszerkesztés hatékonyabbnak tűnik, amennyiben a Cas12a-t pre-crRNS-sel látják el, mint amikor már érett crRNS-ekkel (Xu és mtsai., 2017). Ezek az eredmények összhangban vannak annak az *in vitro* vizsgálatnak az eredményével, amelyben a Cas12a nagyobb kötődési affinitást mutatott a pre-crRNS-ekhez (Fonfara és mtsai., 2016) Egyéb *in vivo* adatok arra utalnak, hogy a crRNS 3' vége fontos a hatékony genomszerkesztéshez (Hu és mtsai., 2017). Ezek az eredmények azt sugallják, hogy

növényekben az éretlen pre-crRNS használata fokozhatja a Cas12a által közvetített genomszerkesztés hatékonyságát.

A Cas12a későbbi felfedezése ellenére ma már számos tanulmány foglalkozik az alternatív genomszerkesztő eszközként történő alkalmazhatóságával. A célzott genomszerkesztés során a Cas9 és a Cas12a nukleázok aktivitását és az ebből eredő DNS hibajavítás eredményét a sejt típusa, a célszekvencia, valamint a genomi környezet mind-mind befolyásolják. Mivel ezek a tényezők, valamint a Cas9 és a Cas12a eltérő működési mechanizmusai együttesen határozzák meg, hogy a két CRISPR effektor enzim közül melyik a legalkalmasabb bizonyos genomszerkesztési célokra, levonhatjuk azt a következtetést, hogy a Cas9, Cas12a és módosított változataik nagymértékben kiegészítik egymást és együtt egy sokoldalúan használható molekuláris biológiai eszköztárat alkotnak (Swarts és Jinek, 2018).

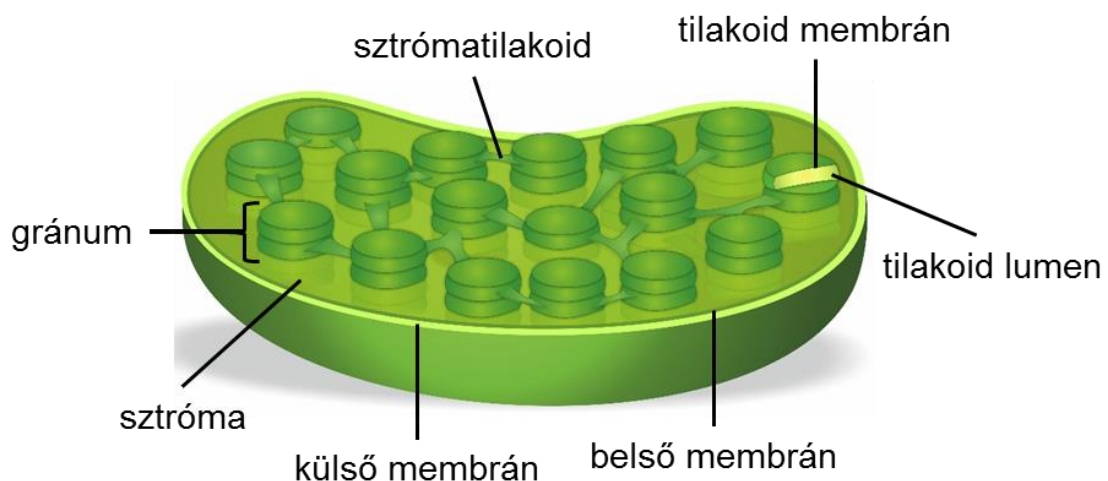
2.10. Fotoszintézis

A fotoszintézis a legfontosabb fényindukált folyamat, ami lehetővé teszi a prokarióta és eukarióta élőlények számára, hogy a fényenergiát kémiai energiává alakítsák (Mirkovic és mtsai., 2017). A fotoszintetizáló élőlények két csoportra oszthatók: oxigéntermelőkre és nem oxigéntermelőkre (Blankenship, 2001). Az első csoportba tartoznak a cianobaktériumok, a zöldalgák és a növények, amelyek a szén-dioxid (CO_2) asszimilációjához a vizet (H_2O) használják fel elektrondonorként és a víz oxidációja során oxigén (O_2) szabadul fel. A második csoportba tartoznak a bíborbaktériumok, a zöld kénbaktériumok és a helikobaktériumok, amelyek azon kívül, hogy nem termelnek oxigént, abban is különböznek az előző csoporttól, hogy víz helyett egyéb szervetlen vagy szerves anyagokat használnak elektrondonorként (Blankenship, 1992; Nelson és Ben-Shem, 2004).

Az oxigéntermelő élőlények esetében a fotoszintézis folyamata fényfüggő fotofizikai és fotokémiai folyamatokból, valamint a Calvin-Benson-Bassham ciklusból áll (Raines, 2022). A fotoszintetikus elektrontranszport révén a begyűjtött fényenergia kémiai energiává alakul, ami ATP és NADPH formájában raktározódik. A Calvin-Benson-Bassham ciklus során történik a CO_2 felvétele és annak szénhidrát formájában történő megkötése. Az ehhez szükséges energiát az ATP és NADPH biztosítja. Ezen folyamatok a kloroplasztiszokban mennek végbe (Nelson és Ben-Shem, 2004).

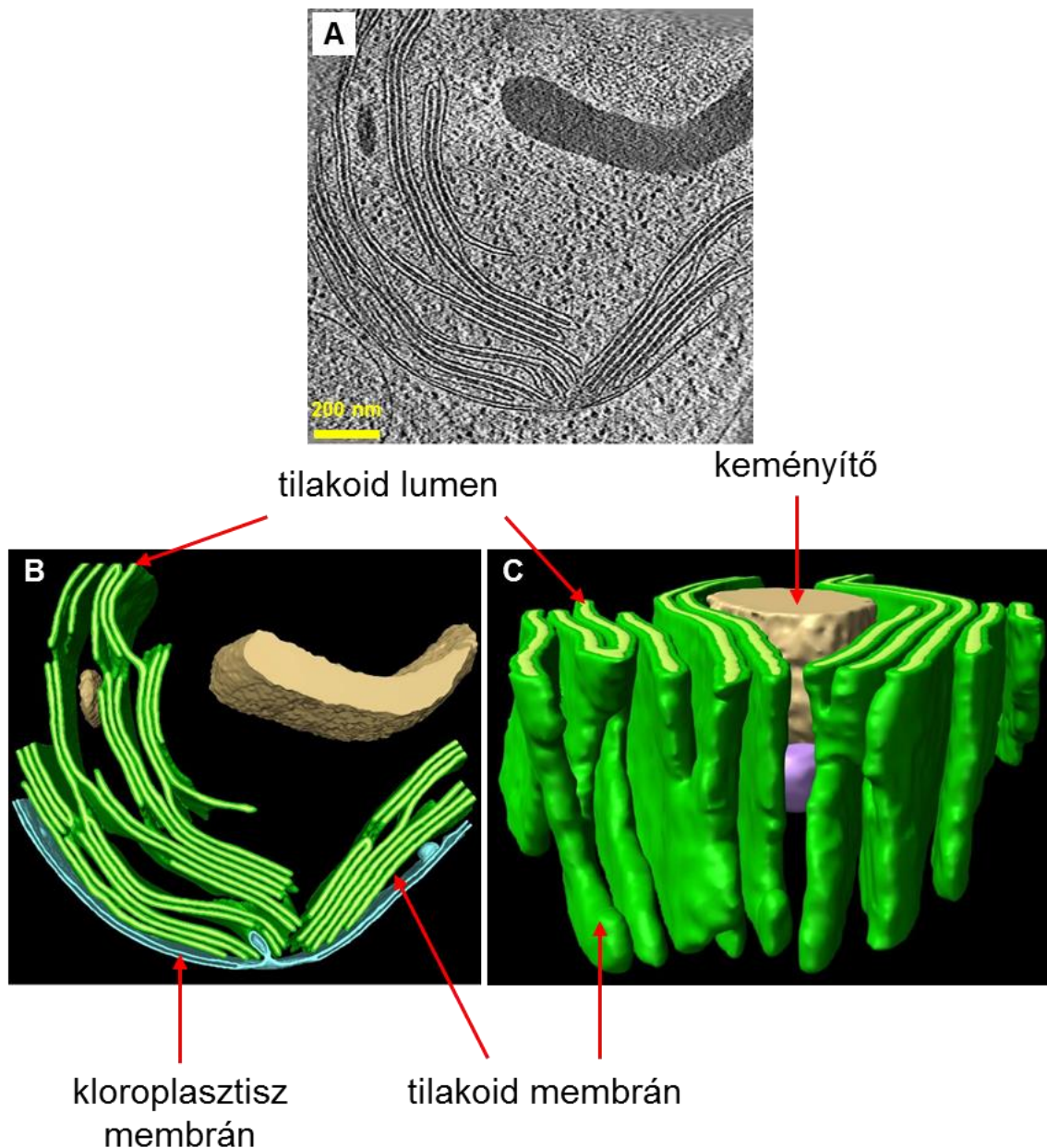
A kloroplasztisz legtöbb esetben lencse alakú, zöldalgákban és magasabb rendű növényekben kettős membránnal (Staehelin, 2003; Austin és Staehelin, 2011),

kovamoszatokban és vörösalgákban többszörös membránnal határolt sejtszervecske (Kroth és Strotmann, 1999; McFadden és van Dooren 2004). A belső membránnal körülvelt részt sztrómának nevezzük. Itt található a kloroplasztisz DNS-e, keményítő és számos enzim, melyek alapvető szerepet játszanak a kloroplasztisz anyagcseréjében. A kloroplasztisz sztrómájába beágyazódva helyezkedik el a tilakoid membrán, amely a kloroplasztisz belső membránrendszerét képezi. Magasabb rendű növényekben a tilakoid membránok helyenként szorosán összetapadva henger alakú gránumokat hoznak létre. A gránumok átmérője átlagosan 400-600 nm, egy gránum 5-20 tilakoid membrán rétegből áll (Mustárdy és Garab, 2003; Mullineaux, 2005; Pribil és mtsai., 2014). A gránumokhoz helikális elrendezésben sztrómatilakoidok csatlakoznak (Mustárdy és Garab, 2003; Mustárdy és mtsai., 2008; Kouřil és mtsai., 2011). Ezáltal a sztrómatilakoidok és a gránumok egy összefüggő membránrendszert hoznak létre (Shimoni és mtsai., 2005; Mustárdy és mtsai., 2008). A tilakoid membrán belső vizes fázisát lumennek nevezzük (6. és 7. ábrák).



6. ábra A kloroplasztisz sematikus felépítése.

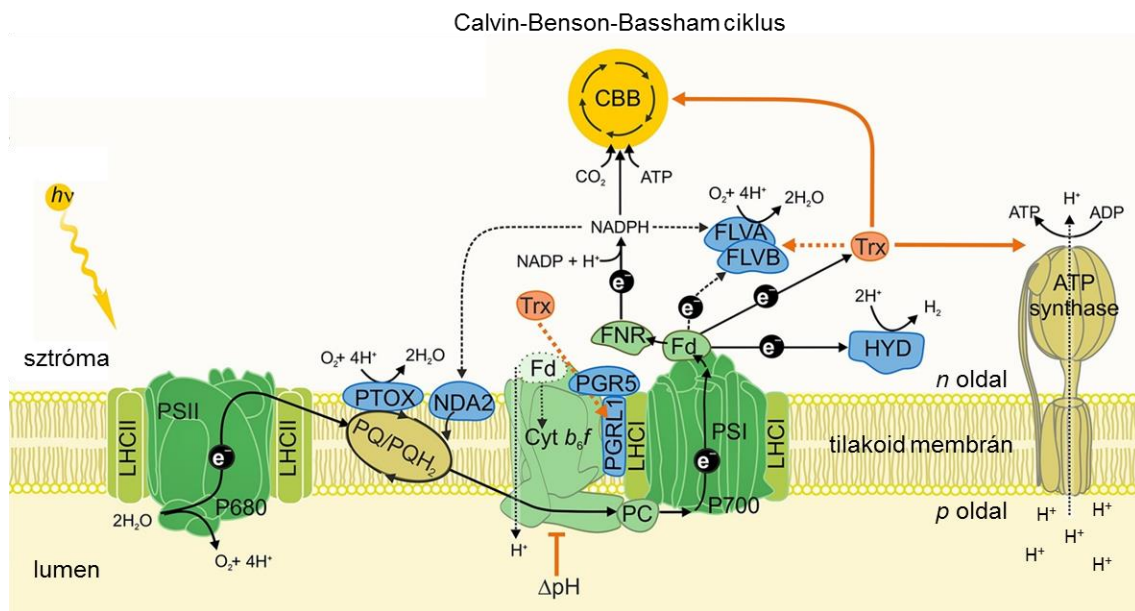
(<https://www.agrisera.com/dokument/bibliotek/Image/11.-Chloroplast.jpg>)



7. ábra A *C. reinhartii* kloroplasztiszának szerkezete. **A)** A kloroplasztiszról készült transzmissziós elektronmikroszkópos kép. **B-C)** A kloroplasztisz sematikus felépítése. (Engel és mtsai., 2015 nyomán).

Minden fotoszintetizáló szervezetben megtalálhatók a tilakoid membránba ágyazódott vagy ahhoz kapcsolódó különböző pigment-fehérje komplexek, amelyek a fény abszorpciójára képes klorofillmolekulákat és különböző kísérő pigmenteket tartalmaznak. A fotoszintetikus elektrontranszportlánc komponenseit alkotó fő fehérjekomplexek a következők: a második fotokémiai rendszer (PSII), a citokróm b_6f komplex, az első fotokémiai rendszer (PSI) és az ATP-szintáz (Nelson és Ben-Shem, 2004). A fényfüggő reakciók a kloroplasztisz tilakoid membránjaiban játszódnak le, pontosabban az PSII-ben és

a PSI-ben, amelyekhez fénybegyűjtő komplexek (LHCII és LHCI) kapcsolódnak, amelyek fehérjékből, klorofilokból, karotinoidokból és egyéb alkotóelemekből épülnek fel. A két fotokémiai rendszer és a citokróm b_6f komplex egymással sorba kapcsolva a fényenergia felhasználásával egy kémiai potenciálgrádienssel szembeni elektrontranszportot valósít meg, amely a víz oxidációjától a NADP^+ redukciójáig tart. Az elektrontranszport a tilakoid membrán két oldala közötti protontranszferhez kapcsolt, amely a sztrómából protonokat juttat a tilakoid lumenébe. Ez a protontranszport a víz oxidációjából származó protonokkal együtt megnöveli a protonkoncentrációt a lumenben. Az így létrejött protonmotoros erő (proton grádiens és elektromos tér) biztosítja az energiát az ATP képződéséhez (Nelson és Yocum, 2006). A CO_2 megkötése a kloroplasztisz sztrómájában történik. Ennek során három CO_2 molekula megkötése révén egy trióz-foszfát (gliceraldehid-3-foszfát) molekula képződik. A folyamat során 9 ATP és 6 NADPH molekula használódik fel. Az így előállított gliceraldehid-3-foszfát molekula különböző anyagcsere útvonalakon keresztül gyorsan aminosavak, lipidek vagy cukrok bioszintézisére fordítható (Johnson, 2016; 8. ábra).



8. ábra A fotoszintetikus elektrontranszportlánc felépítése és szerveződése *C. reinhardtii*-ban (Nikkanen és mtsai., 2021 nyomán).

3. CÉLKITŰZÉS

A foszfor nélkülözhetetlen az élő szervezetek számára. A növényi sejt minden részében megtalálható, a nukleinsavak és foszfolipidek szerkezeti alkotóeleme, nélkülözhetetlen a jelátviteli és energiaátviteli reakciókban, valamint a fotoszintézisben. A növények a sejtfalon és a plazmamembránon keresztül szervesen foszfát formájában veszik fel a talajból a foszfort, amely aztán a különböző sejtszervecskébe kerül. A PHT család tagjai a legjobban tanulmányozott foszfát-transzporterek az edényes növényekben. Jól ismertek a talajból történő szervesen foszfátfelvételben és a növényen belüli szállításban betöltött szerepükről. A foszfát-transzport mechanizmusai kevésbé ismertek zöldségekben, és meglepő módon egyetlen szervesen foszfát-transzporterüket sem jellemezték még részletesen.

Munkám során célul tűztük ki *Chlamydomonas reinhardtii* nevű zöldalga két lehetséges foszfát-transzporterének (CrPHT4-3 és CrPHT4-7) részletes jellemzését és élettani szerepének meghatározását. A munkafolyamat a következő lépésekből állt:

- CRISPR/Cas12a technika segítségével funkcióvesztéses *C. reinhardtii* mutánsok létrehozása. A kísérletek során használt mutánsokat kérésünkre az edinburgh-i egyetemen Dr. Molnár Attila és kutatócsoportja hozta létre, és bocsájtotta a rendelkezésünkre.
- A CrPHT4-3 és a CrPHT4-7 transzporterek sejten belüli elhelyezkedésének meghatározása. Ehhez olyan algatörzsek létrehozása, amelyek Vénusz fluoreszcens fehérjével jelölt transzportereket fejeznek ki.
- *pht4-3*, *pht4-7*, valamint *pht4-3 pht4-7* dupla mutánsok segítségével a fehérjék élettani szerepének a tisztázása, különös tekintettel a fotoszintetikus aktivitásra.
- Az általunk vizsgált CrPHT4-3 és CrPHT4-7 transzporterek szubsztrát-specifitásának meghatározása *C. reinhardtii*-ban végzett élettani mérések alapjá és élesztősejtekben történő kifejeztetéssel.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. A kísérletek során használt algatörzsek létrehozása

A *Crpht4-3#1*, *Crpht4-3#4*, *Crpht4-7#7*, *Crpht4-7#9*, *Crpht4-3 Crpht4-7 #10* és *Crpht4-3 Crpht4-7 #14* mutáns vonalakat a korábban publikált CRISPR/Cas12a módszer segítségével kérésünkre az edinburgh-i egyetemen Dr. Molnár Attila és kutatócsoportja (University of Edinburgh, Egyesült Királyság) hozta létre, és bocsájtotta a rendelkezésünkre, háttértörzsként a vad típusú CC-1883-as *Chlamydomonas reinhardtii* törzset használva (Ferenczi és mtsai., 2017).

A komplementált és a túltermelő vonalak létrehozásához a *CrPHT4-7* gén (*Cre16.g663600*) és a *CrPHT4-3* gén (*Cre03.g187050*) kódoló szekvenciáját megszintetizáltattuk (GeneCust) NdeI és EcoRI restriktions hasítóhellyel az 5' és 3' végükön. Az NdeI és EcoRI restriktions enzimekkel (Thermo Fisher Scientific) megemésztett fragmenteket a hasonlóképpen emésztett pJR39 vektorba (paromomicin rezisztencia gént tartalmaz) klónoztuk (Neupert és mtsai., 2009), T4 DNS ligáz enzim (Thermo Fisher Scientific) segítségével, létrehozva a pJR101 (*CrPHT4-7*-et tartalmaz) és pJR103 (*CrPHT4-3*-at tartalmaz) transzformáló vektorokat. A CC-1883-as törzs, valamint a *Crpht4-7#7* és a *Crpht4-3#1* mutáns vonalak sejtmagi transzformációját üveggyöngyös módszerrel végeztük (Neupert és mtsai., 2012). A transzformálás előtt a transzformáló vektort ScaI restriktions enzim (Thermo Fisher Scientific) segítségével linearizáltuk (ez a lépés növeli a transzformáció hatékonyságát). A szelekciót 10 µg/ml paromomicinnel (Sigma-Aldrich) kiegészített tris-acetát-foszfát (TAP) táplemezekon végeztük.

A Vénusz fluoreszcens fehérjével jelölt CrPHT4-7-et kifejező UVM11-es és CC-4533-as (más néven cMJ030) törzsek sejtmagi transzformációját a pLM005-CrPHT4-7 plazmiddal (paromomicin rezisztencia gént tartalmaz) üveggyöngyös módszer segítségével (Neupert és mtsai., 2012) végeztük el. A transzformálás előtt a plazmidot ScaI restriktions enzim (Thermo Fisher Scientific) segítségével linearizáltuk. A szelekciót 10 µg/ml paromomicinnel (Sigma-Aldrich) kiegészített TAP táplemezekon végeztük.

A Vénusz fluoreszcens fehérjével jelölt CrPHT4-3-et kifejező CC-4533-as (más néven cMJ030) törzs transzformálását az előző bekezdésben leírtak szerint végeztük.

4.2. *C. reinhardtii* törzsek fenntartása és nevelése

A kísérletek során használt alगतörzseket mixotróf módon TAP tartalmú szilárd táptalajon, 23 °C-on, $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fotonáram-sűrűségű folyamatos fényben neveltük, alganevelő kamrában. Amennyiben szükséges volt (a komplementált, a CrPHT4-7-et túltermelő, a CrPHT4-3-at túltermelő, a Vénusz fluoreszcens fehérjével jelölt CrPHT4-7-et kifejező, valamint a Vénusz fluoreszcens fehérjével jelölt CrPHT4-3-at kifejező törzsek esetében) a táplemezek 10 $\mu\text{g/ml}$ paromomicint (Sigma-Aldrich) is tartalmaztak.

A kísérletekhez a sejteket steril körülmények között a szilárd táptalajról 50 ml-es Erlenmeyer-lombikokba oltottuk (melyek 25 ml TAP tápoldatot tartalmaztak), majd a lombikokat alganevelő kamrába helyeztük. A nevelési körülmények az alábbiak voltak: 23 °C, $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fotonáram-sűrűségű folyamatos megvilágítás, 130 fordulat/perc sebességű rázatás. Az így nevelt előkultúrákból három nap elteltével 0,5-2 ml-t oltottunk át, az egyes kísérletektől függően 50 vagy 100 ml-es Erlenmeyer-lombikokba (amelyek 25 vagy 50 ml TAP tápoldatot tartalmaztak). Az így elkészített kísérleti kultúrák kiindulási klorofill(a+b) tartalma minden esetben 0,5 $\mu\text{g/ml}$ volt. Ezt követően a kísérleti kultúrákat három napon át 23 °C-on, 80, 200 vagy 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fotonáram-sűrűségű folyamatos fényben, 130 fordulat/perc sebességgel rázatva neveltük. Az élettani méréseket és a mintagyűjtéseket néhány kivételtől eltekintve három napos kísérleti kultúrákból végeztük.

4.3. Alगतörzsek neveléséhez használt tápoldatok

A TAP tápoldat összetétele a következő volt: 2,42 g/l tris, 108 mg/l K_2HPO_4 , 56 mg/l KH_2PO_4 , 400 mg/l NH_4Cl , 100 mg/l $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 50 mg/l $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 50 $\mu\text{g/l}$ EDTA, 22 $\mu\text{g/l}$ $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 11,4 $\mu\text{g/l}$ H_3BO_3 , 5,06 $\mu\text{g/l}$ $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$, 4,99 $\mu\text{g/l}$ $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 1,61 $\mu\text{g/l}$ $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, 1,57 $\mu\text{g/l}$ $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$, 1,1 $\mu\text{g/l}$ $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4 \text{H}_2\text{O}$, 0,1 % (V/V) ecetsav. A tápoldat pH-ját sósavval 7,0-ra állítottuk be (Hutner és mtsai., 1950; Gorman és Levine, 1965).

A TP tápoldat receptje megegyezik a TAP-nak a receptjével, azzal a lényeges különbséggel, hogy nem tartalmaz ecetsavat.

A HS tápoldat összetétele a következő volt: 1,44 g/l K_2HPO_4 , 0,72 g/l KH_2PO_4 , 0,5 g/l NH_4Cl , 20 mg/l $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 10 mg/l $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 50 $\mu\text{g/l}$ EDTA, 22 $\mu\text{g/l}$ $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 11,4 $\mu\text{g/l}$ H_3BO_3 , 5,06 $\mu\text{g/l}$ $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$, 4,99 $\mu\text{g/l}$ $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 1,61 $\mu\text{g/l}$

CoCl₂ x 6 H₂O, 1,57 µg/l CuSO₄ x 5 H₂O, 1,1 µg/l (NH₄)₆Mo₇O₂₄ x 4 H₂O. A tápoldat pH-ját sósavval 6,8-ra állítottuk be (Hutner és mtsai., 1950; Sueoka 1960).

Táplemezek esetén ezeket a recepteket 15 g/l agar-agarral egészítettük ki. Az itt felsorolt vegyszerek a Molar Chemicals Kft., a Reanal Laborvegyszer Kft., a Sigma-Aldrich és a VWR termékei voltak.

4.4. A CrPHT4-7 szerkezetének előrejelzése és szekvencia illesztés

A CrPHT4-7 transzmembrán héliceinek előrejelzésére a TMHMM Server 2.0 (Krogh és mtsai., 2001; <https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>), a Deep TMHMM 1.0.24 (Hallgren és mtsai., 2022; <https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM>) és a Phyre² 2.0 (Kelley és mtsai., 2015; <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>) online programokat használtuk. Az aminosav szekvenciák illesztését MultAlin online program (Corpet, 1988; <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) segítségével végeztük.

4.5. Genomi DNS izolálása *C. reinhardtii*-ből

TAP táplemezeken nevelt alगतörzsekből kis mennyiséget 50 µl, 10 mM-os EDTA-ban (pH = 8,0; Molar Chemicals Kft.) felfuszpendáltunk, majd 10 másodpercig vortexeltük őket maximális sebességgel. Ezt követően a mintákat 10 percig 100 °C-on, majd 1 percig 4 °C-on inkubáltuk, majd ismét vortexeltük őket 10 másodpercig maximális sebességgel. Végül lecentrifugáltuk a mintákat (1000 g, 1 perc, 25 °C) és a felülúszókat (ami a genomi DNS-t tartalmazza) Eppendorf csövekbe pipettáztuk át. Felhasználásig -20 °C-on tároltuk a mintákat.

4.6. *Crpht4-7* és *Crpht4-3* mutánsok genotípusának meghatározása

A CrPHT4-7 célszekvenciáját polimeráz láncreakció (PCR) segítségével sokszoroztuk fel. A reakció során az 5'-ACAGTCATGTGCACGGAATAGG-3' és az 5'-GACATCGATAACCCCTCCAGTC-3' primerpárt használtuk. A PCR reakciót Veriti 96 Well Thermal Cycler típusú készülékben (Applied Biosystems) végeztük az alábbi programot használva: 5 perc kezdeti denaturáció 95 °C-on; 40 ciklusban ismételve: 20 másodperc denaturáció 95 °C-on, 20 másodperces primer hibridizáció 67 °C-on, 30

másodperces DNS szintézis 72 °C-on; 1 perc végső DNS szintézis 72 °C-on. A reakcióelegy összetétele a következő volt: 2 µl genomi DNS minta, 0,3 µl dNTP mix (10 mM-os; Carl Roth GmbH), 0,3 µl MgCl₂ (25 mM-os; Solis BioDyne), 0,3-0,3 µl a primerpár mindkét tagjából (10 mM-osak), 10,1 µl DNS és RNS mentes víz (Lonza), 1,5 µl DreamTaq Green Puffer (10-szer tömény; Thermo Fisher Scientific) és 0,2 µl DreamTaq DNS polimeráz (5 U/µl-es; Thermo Fisher Scientific).

A CrPHT4-3 célszekvenciáját polimeráz láncreakció (PCR) segítségével sokszoroztuk fel. A reakció során az 5'-GGCTTCTCTCGACGCAAGATAAG-3' és az 5'-CTGCATCAGCAAGAAGTTGCAT-3' primerpárt használtuk. A PCR reakciót Veriti 96 Well Thermal Cycler típusú készülékben (Applied Biosystems) végeztük az alábbi programot használva: 5 perc kezdeti denaturáció 98 °C-on; 40 ciklusban ismételve: 30 másodperc denaturáció 98 °C-on, 30 másodperces primer hibridizáció 69 °C-on, 30 másodperces DNS szintézis 72 °C-on; 1 perc végső DNS szintézis 72 °C-on. A reakcióelegy összetétele megegyezett a fentebb leírtakkal.

A PCR reakciót követően a kapott termékek méretét agaróz gélelektroforézis segítségével ellenőriztük. Ehhez 0,75 %(m/V)-os agaróz (VWR) gélt használtunk, ami 0,4 µg/ml etídium-bromidot (Sigma-Aldrich) tartalmazott. A megfelelő méretű PCR terméket GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével izoláltuk a gélből, követve a gyártó utasításait. Az izolált PCR termékek nukleotid sorrendjét szekvenálással határoztuk meg.

4.7. RNS izolálás és cDNS szintézis *C. reinhardtii*-ből

2 ml *C. reinhardtii* sejt kultúrát lecentrifugáltunk (21130 g, 1 perc, 4 °C), a felülúszót leöntöttük és folyékony nitrogénben lefagyasztottuk a sejteket. A mintákat feltárássig -80 °C-on tároltuk. RNS izolálásához Direct-Zol RNA MiniPrep kitet (Zymo Research) használtunk követve a gyártó utasításait. Az esetlegesen előforduló DNS szennyezés eltávolítása érdekében az izolált RNS mintákat DNázI enzimmel (Zymo Research) kezeltük. Az izolált RNS integritását 0,8 %(m/V)-os denaturáló agaróz (VWR) gélen ellenőriztük.

A cDNS szintézishez 1 µg RNS használtunk kiindulásként, amelyet FIREScript reverz transzkriptáz segítségével írtunk át, követve a gyártó utasításait. A reakcióelegy összetétel a következő volt: 1 µg RNS, 1 µl random hexamer (50 ng/µl-es), 1 µl dNTP mix (10 mM-os; Carl Roth GmbH), 22 µl nukleáz mentes víz (Solis BioDyne), 4 µl DTT tartalmú

reverz transzkriptáz reakció puffer (10-szer tömény; Solis BioDyne), 1 µl RiboGrip RNáz inhibitor (40 U/ µl; Solis BioDyne) és 1 µl FIREScript reverz transzkriptáz (200 U/µl; Solis BioDyne).

4.8. Kvantitatív valós idejű PCR (qRT-PCR)

A qRT-PCR analízist Bio-Rad CFX384 Touch Real-Time PCR Detection System készülékben végeztük, az alábbi programot használva: 12 perc kezdeti denaturáció 95 °C-on; 40 ciklusban ismételve: 15 másodperc denaturáció 95 °C-on, 1 perc 60 °C-on. A cDNS detektálását HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne) segítségével végeztük követve a gyártó utasításait. A qRT-PCR analízishez szükséges primereket az NCBI Primer Blast Tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) online program segítségével terveztük meg. Az olvadási hőmérsékletet 60 °C-ra, az amplikon hosszát 100 és 130 bp közé állítottuk (2. táblázat). A referenciagénekhez (*aktin* [Cre13.g603700], *β-Tub2* [Cre12.g549550], *CBLP* [Cre06.g278222], *UBQ2* [Cre09.g396400]) használt primereket korábban már publikálták Vidal-Meireles és mtsai., (2017). Az adatokat az mRNS transzkript-szintjének többszörös változásaként mutatjuk be, a referenciagének átlagára normalizálva és a vadtypushoz (CC-1883) viszonyítva. A standard hibákat (\pm SE) a független biológiai ismétlésekben mért eltérő transzkriptum mennyiségek alapján számoltuk ki.

2. táblázat qRT-PCR-hoz használt oligonukleotidok listája.

Primer neve	Primer szekvenciája	Amplikon hossza (bp)	Specifitás
<i>Actin</i> forward <i>Actin</i> reverz	GCGCTAACGACGGAGGAT CCATGACCCGCTCCTCATATC	59	<i>aktin</i> referencia gén
<i>β-Tub2</i> forward <i>β-Tub2</i> reverz	ACTGGCTGTGATTGTGCTTCAGG TGTCTGCTGCTGCACCTTTACG	71	<i>β-Tub2</i> referencia gén
<i>UBQ2</i> forward <i>UBQ2</i> reverz	GCGATTTCTCGTTGGGCAGT TGGCCCATCCACTTGTCTT	156	<i>UBQ2</i> referencia gén
<i>CBLP</i> forward <i>CBLP</i> reverz	ATCAAGATCTGGGACCTGGAGAGC CTTGCTGGTGATGTTGAACTCGGG	72	<i>CBLP</i> referencia gén
<i>CrPHT4-7</i> forward <i>CrPHT4-7</i> reverz	CAACTGGGGCTACTACACGC GGTCATGGCAATGTAGGGGA	115	<i>CrPHT4-7</i>

4.9. A CrPHT4-7 és CrPHT4-3 lokalizációjának meghatározása *C. reinhardtii*-ban

A CrPHT4-7-Vénusz fehérjét és a CrPHT4-3-Vénusz fehérjét kifejező algatörzsek előkultúráit mixotróf módon neveltük TAP tápoldatban, 25 ml-es Erlenmeyer-lombikokban három napon át 23 °C-on, $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fotonáram-sűrűségű folyamatos fényben, 130 fordulat/perc sebességgel rázatva. A sejteket ezután tris-foszfát (TP) tápoldatba tettük át és 16 órán keresztül tovább neveltük a fentebb leírt körülmények között. A sejteket a fluoreszcens jel detektálása előtt immobilizáltuk 0,8 %-os alacsony olvadáspontú agarózban (Carl Roth GmbH). A képalkotást Leica TCS SP8 konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal végeztük hibrid detektorral. Egyedi optikai metszeteket készítettünk HCPLAPO CS2 63x (NA: 1.2) vízbemerülő objektívvel, 0,3 mm-es munkatávolsággal. A mikroszkóp beállításai a következők voltak: pásztázási sebesség: 200; sorátlagolás: 4; szkennelési mód: egyirányú; zoom: 7x; gerjesztés: 514 nm (Vénusz), 552 nm (klorofill autofluoreszcencia). A Vénusz fluoreszcenciát 520-540 nm, a klorofill autofluoreszcenciát pedig 650-750 nm között detektáltuk. HyD SP GaAsP detektort használtunk a Vénusz jel detektálására. A képeket Leica LAS AF szoftverrel (2.6-os verzió) és ImageJ-vel (1.53k-s verzió) elemeztük és a színeket utólag módosítottuk.

4.10. Algatörzsek növekedési paramétereinek vizsgálata

A *C. reinhardtii* törzsek növekedési paramétereinek vizsgálatához Multi-Cultivator MC 1000-OD készüléket (Photon Systems Instruments) használtunk. A kultúrákat mixotróf (TAP tápoldatban) vagy fotoautotróf (magas sótartalmú [HS] tápoldatban) körülmények között neveltük három napon át. A nevelés körülményei az alábbiak voltak: 23 °C, 60, 80, 300 vagy $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fotonáram-sűrűségű, folyamatos fényel történő megvilágítás, légköri levegővel (mixotróf körülmények esetén) vagy 1 %(V/V) CO₂ + 99 %(V/V) szintetikus levegő elegyével (fotoautotróf körülmények esetén) buborékolatva a kultúrákat. Az algakultúrák kiindulási klorofill(a+b) tartalma minden esetben 0,5 $\mu\text{g/ml}$ volt. A műszer 30 percenként mérte a kultúrák optikai denzitását 680 és 720 nm-en.

4.11. Algakultúrák sejtszámának és sejtméretének meghatározása

A méréseket LUNA-FL™ Dual Fluorescence Cell Counter készülékkel (Logos Biosystems) végeztük. A sejtszám és sejtméret meghatározásához 10 µl algakultúrát pipettáztunk rá a sejtszámláló lemezre és a méréseket három ismétléssel végeztük.

4.12. Algakultúrák klorofilltartalmának meghatározása

C. reinhardtii kultúrák klorofill(a+b) tartalmának meghatározásához 800 µl 100 %-os acetonhoz (VWR) hozzápipettáztunk 200 µl algakultúrát, vortexeléssel alaposan összekevertük, majd 5 percen keresztül inkubáltuk sötétben. Egy centrifugálási lépést követően (13500 rpm, 3 perc, 25 °C) megmértük a felülúszó abszorbanciáját 663 és 646 nm hullámhosszúságon NanoDrop 2000C spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific). Az algakultúrák klorofilltartalmát Porra és munkatársainak módszere alapján számoltuk ki (Porra és mtsai., 1989; Porra, 2002).

4.13. Gyors klorofill-a fluoreszcencia indukció (OJIP) mérése

A fluoreszcencia méréseket Handy-PEA készülékkel (Hansatech Instruments Ltd) végeztük. Az algakultúrákat mérés előtt 15 percig sötétadaptáltuk, 140 fordulat/perc sebességgel rázatva őket. Ezt követően 40 µg klorofill(a+b) tartalmú algakultúrát GF/B szűrőpapírra (Macherey-Nagel GmbH) szűrtünk. A Handy-PEA készülék a minták 3500 µmol m⁻² s⁻¹ fotonáram-sűrűségű vörös (650 nm hullámhosszúságú) fényvel világítja meg. Az első megbízható klorofill-a fluoreszcencia mérési pont a 20 µs-nál mért érték, ezt a pontot tekintjük F₀-nak. Az általunk végzett mérések hossza 5 s volt. A Handy-PEA készülék 0 és 0,3 ms között 10 µs-onként méri a fluoreszcencia intenzitását, míg 0,3 és 3 ms között már 100 µs-onként, 3 és 30 ms között 1 ms-onként, 30 és 300 ms között pedig 10 ms-onként.

4.14. Nem-fotokémiai kioltás (NPQ) mérése

Az NPQ mérésekhez Dual-PAM 100-as műszert (Heinz Walz GmbH) használtunk. Az algakultúrákat mérés előtt 30 percig sötétadaptáltuk, 140 fordulat/perc sebességgel rázatva őket. Ezt követően 40 µg klorofill(a+b) tartalmú algakultúrát GF/B szűrőpapírra (Macherey-Nagel GmbH) szűrtünk és a mintákat két mikroszkóp-tárgylemez közé helyeztük

egy távtartóval, hogy lehetővé tegyük a gázcserét. Az NPQ indukciójához a fényadaptáció 30 perces, $532 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fotonáram-sűrűségű aktinikus vörös fényvel történt megvilágításból, majd 12 perces sötét adaptációból állt, amelyet $3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fotonáram-sűrűségű telítési fényimpulzusok szakítottak meg.

4.15. *C. reinhardtii* és *S. cerevisiae* kultúrák aszkorbát tartalmának meghatározása

2 ml *C. reinhardtii* sejt kultúrát lecentrifugáltunk (21130 g, 1 perc, 4 °C), a felülúszót leöntöttük és folyékony nitrogénben lefagyasztottuk a sejteket. A mintákat feltárásiig -80 °C-on tároltuk. A feltárás során a mintákhoz 200 μl feltárási puffert adtunk, ami 2 mM EDTA-t (Molar Chemicals Kft.), 20 mM TCEP-t (Carl Roth GmbH) és 5 % (V/V) orto-foszforsavat (VWR) tartalmazott. A hatékonyabb feltárási érdekében a felszuszpendált sejteket 80 μl üvegyönggyel (212-300 μm átmérőjű, Sigma-Aldrich) együtt 30 másodpercig vortexeltük maximális fordulattal. Miután a sejtek barna színűvé váltak (2-3 perc, szobahőmérsékleten) ismét lecentrifugáltuk a mintákat (21130 g, 30 perc, 4 °C-on). Az aszkorbátot tartalmazó, üvegyönggyel és sejttörmelékmentes felülúszót Eppendorf csövekbe pipettáztuk át, folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és a HPLC mérésekig -80 °C-on tároltuk.

50 ml *S. cerevisiae* sejt kultúrát lecentrifugáltunk (3000 g, 1 perc, 4 °C) és leöntöttük a felülúszót. A sejteket háromszor mostuk 40 ml, 4 °C-os szintetikus tápoldattal, ami 20 g/l glükózt (Molar Chemicals Kft.) és 6,7 g/l aminosav mentes élesztő nitrogénforrást (Sigma-Aldrich) tartalmazott. Ezt követően mintákat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és feltárásiig -80 °C-on tároltuk. A feltárási során a mintákhoz 200 μl feltárási puffert adtunk, ami 2 mM EDTA-t (Molar Chemicals Kft.), 20 mM TCEP-t (Carl Roth GmbH) és 5 % (V/V) orto-foszforsavat (VWR) tartalmazott. A hatékonyabb feltárási érdekében a felszuszpendált sejteket 80 μl üvegyönggyel (212-300 μm átmérőjű, Sigma-Aldrich) együtt 30 másodpercig vortexeltük maximális fordulattal. Miután a sejtek barna színűvé váltak (2-3 perc, szobahőmérsékleten) ismét lecentrifugáltuk a mintákat (21130 g, 30 perc, 4 °C-on). Az aszkorbátot tartalmazó tiszta, üvegyönggyel és sejttörmelékmentes felülúszót Eppendorf csövekbe pipettáztuk át, folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és a HPLC mérésekig -80 °C-on tároltuk.

A sejt kultúrák aszkorbát tartalmának meghatározását Shimadzu Nexera X2 diode Array detektáló egységgel felszerelt Shimadzu Prominence HPLC rendszerrel végeztük (az aszkorbát adszorpciós maximuma 244 nm-en van). Az aszkorbát tartalom meghatározásához

Phenomenex Synergi Hydro-RP 250 x 4,6 mm-es, 4 μm részecskeméretű és 80 Å pórusméretű HPLC oszlopot használtunk. Az izokratikus eluáláshoz 50 mM KH_2PO_4 (pH = 2,5; Molar Chemicals Kft.) mozgófázist alkalmaztunk, az áramlási sebessége 1 ml/perc volt. Az oszlopot 20 °C-on, a mintatartót pedig 4 °C-on tartottuk. Az aszkorbát koncentrációját a csúcsterület alapján határoztuk meg standardok segítségével (Kovács és mtsai., 2016).

4.16. Aszkorbátkezelés hatása a *C. reinhardtii* gyors klorofill-a fluoreszcencia kinetikájára

C. reinhardtii törzsek előkultúráit mixotróf módon neveltük TAP tápoldatban, 50 ml-es Erlenmeyer-lombikokban három napon át, 23 °C-on, 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fotonáram-sűrűségű folyamatos fényben, 130 fordulat/perc sebességgel rázatva. Három nap után a kultúrák klorofill(a+b) tartalmát 10 $\mu\text{g/ml}$ -re állítottuk (ehhez friss TAP tápoldatot használtunk). A kihígított kultúrákat két órán át, 23 °C-on, 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fotonáram-sűrűségű folyamatos fényben inkubáltuk, 20 mM Na-aszkorbáttal (Carl Roth GmbH) vagy anélkül. A ráztatás sebessége 130 fordulat/perc volt. Az inkubációs idő letelte után megmértük az aszkorbáttal kezelt és a kontroll kultúrák gyors klorofill-a fluoreszcencia indukcióját (OJIP kinetika) a fentebb leírt módon.

4.17. Állapotátmenet mérése

A mérésekhez Dual-PAM 100-as műszert (Heinz Walz GmbH) használtunk. Az algakultúrákat mérés előtt 15 percig sötétadaptáltuk, 140 fordulat/perc sebességgel rázatva őket. Ezt követően 3 ml-t kultúrát 1 cm fényút hosszúságú műanyag küvettába (Kartell S.p.A.) pipettáztunk és a mérés során 200 fordulat/perc sebességgel kevertettük. Az állapotátmenet (state transition) méréséhez a sötétadaptált algakultúrákat aktinikus vörös fényvel (15 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$) és távoli vörös fényvel (255 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$) világítottuk meg 15 percig (1. fázis). Ezt követően a távoli vörös fényt lekapcsoltuk és 15 percig csak vörös fényt használtunk a 2. állapot indukálásához (2. fázis). Végül ismét vörös és távoli vörös fény kombinációját alkalmaztuk 15 percig a 2. állapotból az 1. állapotba történő átmenet kiváltásához (3. fázis). A mérés során percenként adott telítési fényimpulzusok (8000 $\mu\text{mol fotont m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 600 ms-ig) segítségével határoztuk meg az éppen aktuális maximális fluoreszcencia hatásfokot. A qT paramétert az alábbi képlet segítségével

számoltuk ki: $qT = (F_M^1 - F_M^2)/F_M^2$, amelyben az F_M^1 -et a 3. fázis végén, az F_M^2 -t pedig a 2. fázis végén határoztuk meg (Cutolo és mtsai., 2023).

4.18. Foszfortartalom meghatározása *C. reinhardtii*-ban

Az algasejtek teljes foszfortartalmát induktív kapcsolású plazma-optikai emissziós spektrométer (ICP-OES) segítségével határoztuk meg. A liofilizált minták előkészítését, a műszeres méréseket, valamint a mérési eredmények kiértékelését Dr. Szentmihályi Klára (HUN-REN Természettudományi Kutatóközpont) végezte (Nagy és mtsai., 2018; Szentmihályi és mtsai., 2020).

4.19. Algasejtek ATP koncentrációjának meghatározása

Háromnapos *C. reinhardtii* kultúrákból centrifugálással (21130 g, 1 perc, 4 °C) 3×10^7 sejtet gyűjtöttünk össze és egyszer mostuk őket 40 ml, 4 °C-os desztillált vízzel. Ezt követően a mintákat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és feltárásig -80 °C-on tároltuk. A fagyott sejtekhez 250 µl steril, 4 °C-os desztillált vizet, valamint 80 µl kvarchomokot (Reanal Laborvegyszer Kft.) adtunk és szobahőmérsékleten 2 percig vortexeltük őket maximális fordulattal. Vortexelés után a mintákat lecentrifugáltuk (21130 g, 1 perc, 4 °C), majd 200 µl felülúszót EZ-10-es szűrőoszlopra (Bio Basic Inc.) pipettáztunk és lecentrifugáltuk (21130 g, 1 perc, 4 °C). Az ATP koncentráció meghatározásáig a mintákat jégen tartottuk.

Az ATP koncentráció meghatározását Adenozin 5'-trifoszfát (ATP) Biolumineszcens Kit segítségével végeztük (Sigma-Aldrich), követve a gyártó utasításait. A lumineszcens jel detektálását BioTek Synergy H1 Multimode Reader készülék (Agilent Technologies, Inc.) segítségével végeztük. A sejtterfogat meghatározáshoz az szolgált alapul, hogy egy *C. reinhardtii* sejt becsült térfogata 140 femtoliter (Craigie és Cavalier-Smith, 1982; Urzica és mtsai., 2012).

4.20. Transz-tilakoid protonmozgató erő (pmf) mérése

A pmf mérésekhez Dual-PAM 100-as műszert (Heinz Walz GmbH) használtunk, a P515/535 kiterjesztett emitter-detektor modulokkal (Schreiber és Klughammer, 2008). Az algakultúrákat mérés előtt 10 percig sötétadaptáltuk, 140 fordulat/perc sebességgel rázatva

őket. Ezt követően 40 µg klorofill(a+b) tartalmú algakultúrát GF/B szűrőpapírra (Macherey-Nagel GmbH) szűrtünk és a mintákat két mikroszkóp-tárgylemez közé helyeztük egy távtartóval, hogy lehetővé tegyük a gázcserét. A mintákat $190 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fotonáram-sűrűségű aktinikus vörös fényvel világítottuk meg két percig, majd az aktinikus fényt lekapcsoltuk. Az abszorbancia változását 515 nm-en az 535 nm-es referencia hullámhosszhoz képest a fény-sötét átmenet során rögzítettük (Kramer és Sacksteder, 1998; Cruz és mtsai., 2001). A jel változását $\Delta I/I$ egységekben fejeztük ki (Schreiber és Klughammer, 2008).

4.21. Foszformegvonás

C. reinhardtii törzsek előkultúráit mixotróf módon neveltük TAP tápoldatban, 50 ml-es Erlenmeyer-lombikokban három napon át, 23 °C-on, $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fotonáram-sűrűségű folyamatos fényben, 130 fordulat/perc sebességgel rázatva. Három nap után a sejteket centrifugálással (1200 g, 1 perc, 25 °C) összegyűjtöttük, háromszor mostuk 0,5 % foszfort tartalmazó TAP tápoldattal. A TAP tápoldat foszfor koncentrációját 0,5 %-ra csökkentettük a szokásos TAP-ban található koncentrációhoz (1,02 mM) képest. Az így elkészített TAP tápoldat 5,08 µM foszfort tartalmazott. A kísérleti kultúrák klorofill(a+b) tartalmát 0,5 µg/ml-re állítottuk 0,5 % (5,08 µM) foszfort tartalmazó TAP tápoldattal. Ezeket a kultúrákat hat napon át neveltük 23 °C-on, $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fotonáram-sűrűségű folyamatos fényben, 130 fordulat/perc sebességgel rázatva.

4.22. Cseppteszt

A törzsek növekedési jellemzőit különböző mennyiségű foszfort (2,04 µM - 0,2 %; 20,4 µM - 2 %; 255 µM - 25 %; 1,02 mM - 100 %; 2,04 mM - 200 %; 5,1 mM - 500 %) tartalmazó TAP táplemezeken teszteltük. A különböző törzsek előkultúráit mixotróf módon neveltük TAP tápoldatban, 50 ml-es Erlenmeyer-lombikokban három napon át, 23 °C-on, $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fotonáram-sűrűségű folyamatos fényben, 130 fordulat/perc sebességgel rázatva. Három nap után a sejteket centrifugálással (1200 g, 1 perc, 25 °C) összegyűjtöttük, háromszor mostuk 0,5 % (5,08 µM) foszfort tartalmazó TAP tápoldattal. A kísérleti kultúrák klorofill(a+b) tartalmát 0,5 µg/ml-re állítottuk 0,5 % (5,08 µM) foszfort tartalmazó TAP tápoldattal. Ezt követően minden algatörzsből 10 µl-t pipettáztunk az táplemezekre és steril

fülkében megvártuk, hogy beszáradjanak a cseppek. A lemezeket hat napon át, 23 °C-on, 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fotonáram-sűrűségű folyamatos fényben inkubáltuk.

4.23. CrPHT4-7-et és CrPHT4-3-at kifejező élesztőtörzsek létrehozása

CrPHT4-7-et és CrPHT4-3-at kifejező élesztőtörzsek létrehozásához az EY57-es (MATa *ade2-1 trp1-1 can1-100 leu2-3,112 his3-11,15 ura3*) és az EY917-es (MATa *ade2-1 trp1-1 can1-100 leu2-3,112 his3-11,15 ura3 pho84::HIS3 pho87::CgHIS3 pho89::CgHIS3 pho90::CgHIS3 pho91::ADE2 pGAL1-PHO84* [EB1280]) *Saccharomyces cerevisiae* törzseket használtuk, amelyeket Dr. Dennis Wykoff (Villanova University, Egyesült Államok) bocsátott a rendelkezésünkre (Wykoff és O'Shea, 2001).

A *CrPHT4-7* gén kódoló szekvenciáját, ami az 5' végén BamHI, a 3' végén pedig EcoRI restrikciós hasítóhelyet tartalmaz, megemésztettük a fentebb említett restrikciós enzimekkel (Thermo Fisher Scientific). A p426-TEF vektort (ami *URA3* szelekciós markert tartalmaz) szintén megemésztettük EcoRI és BamHI restrikciós enzimekkel. Ezt követően T4 DNS ligáz (Thermo Fisher Scientific) segítségével összeligáltuk a *CrPHT4-7* gén kódoló szekvenciáját a p426-TEF vektorral, létrehozva a transzformáló plazmidot. Az EY57 és EY917 *S. cerevisiae* törzsek transzformálását Gietz és Schiestl (2007) protokollját követve végeztük el. A szelekciót uracilt nem tartalmazó, szintetikus táplemezekon végeztük.

A táplemezek összetétel a következő volt: 20 g/l agar (VWR), 20 g/l galaktóz (Duchefa Biochemie), 6,7 g/l aminosav mentes élesztő nitrogénforrás (Sigma-Aldrich), 20 mg/l adenin, 20 mg/l arginin, 50 mg/l fenilalanin, 20 mg/l hisztidin, 120 mg/l leucin, 60 mg/l lizin, 20 mg/l metionin, 40 mg/l treonin, 20 mg/l triptofán és 20 mg/l tirozin (Duchefa Biochemie).

A *CrPHT4-3* gén kódoló szekvenciáját, ami az 5' végén EcoRI, a 3' végén pedig HindIII restrikciós hasítóhelyet tartalmaz, megemésztettük a fentebb említett restrikciós enzimekkel (Thermo Fisher Scientific). A p426-TEF vektort (ami *URA3* szelekciós markert tartalmaz) szintén megemésztettük EcoRI és HindIII restrikciós enzimekkel. Ezt követően a fentebb leírt módon elvégeztük a ligálást, valamint a *S. cerevisiae* törzsek transzformálását.

4.24. Élesztőtörzsek nevelése CrPHT4-7 és CrPHT4-3 kifejeztetéshez

Az EY917-es törzs (*pGAL1-PHO84*-et tartalmazó) növekedésének biztosítása érdekében mindkét törzs (EY57 és EY917) előkultúráit uracilt nem tartalmazó szintetikus

élesztő tápoldatban neveltük egy napig, 30 °C-on, 140 fordulat/perc sebességgel rázatva a kultúrákat. A tápoldat összetétele a következő volt: 20 g/l galaktóz (Duchefa Biochemie), 6,7 g/l aminosav mentes élesztő nitrogénforrás (Sigma-Aldrich), 20 mg/l adenin, 20 mg/l arginin, 50 mg/l fenilalanin, 20 mg/l hisztidin, 120 mg/l leucin, 60 mg/l lizin, 20 mg/l metionin, 40 mg/l treonin, 20 mg/l triptofán és 20 mg/l tirozin (Duchefa Biochemie). A *PHO84* expressziójának megakadályozása érdekében az előkultúrákat lecentrifugáltuk (3000 g, 1 perc, 25 °C), kétszer mostuk, majd glükózt (Molar Chemicals Kft.) tartalmazó szintetikus élesztő tápoldattal hígítottuk $OD_{600} = 0,1$ -re. A mosáshoz és a hígításhoz használt tápoldat összetétele megegyezett a korábban leírtakkal, azzal a lényeges különbséggel, hogy galaktóz helyett glükózt tartalmazott szerves szénforrásként. A kultúrákat két napig neveltük, 30 °C-on, 140 fordulat/perc sebességgel rázatva.

4.25. Aszkorbátfelvétel mérése *S. cerevisiae*-ben

Az élesztő törzsek előkultúráit 20 g/l glükózt (Molar Chemicals Kft.) és szükséges aminosavakat (Duchefa Biochemie) tartalmazó, uracilmentes szintetikus élesztő tápoldatban neveltük egy napig, 30 °C-on, 140 fordulat/perc sebességgel rázatva a kultúrákat. Egy nap elteltével megmértük az előkultúrák OD_{600} értékeit. A törzseket exponenciális fázisig ($OD_{600} = 0,7 - 1,5$) neveltük, majd a kultúrákat $OD_{600} = 0,8$ értékre hígítottuk, amihez friss, glükóztartalmú tápoldatot használtunk. Ezt követően 2, 5, 10, 20 mM aszkorbáttal (Carl Roth GmbH) vagy anélkül 15 percen át inkubáltuk őket, 30 °C-on, 140 fordulat/perc rázatás mellett. Az inkubációs idő letelte után a sejteket centrifugálással (3000 g, 1 perc, 4 °C) gyűjtöttük össze és háromszor mostuk 40 ml, 4 °C-os szintetikus tápoldattal, ami 20 g/l glükózt és 6,7 g/l aminosav mentes élesztő nitrogénforrást (Sigma-Aldrich) tartalmazott. Ezt követően a mintákat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és feltárásig -80 °C-on tároltuk.

4.26. Statisztikai elemzés

A bemutatott eredmények minden esetben legalább három független kísérlet méréseiből számolt átlagok, szórásként a standard hiba (\pm SE) van feltüntetve. A statisztikai szignifikanciát Welch párosítatlan t-próba (GraphPad Prism 10.0.2.232 verziójú online program; <https://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1/?format=SD>), Tukey post-hoc teszt (OriginPro 2020b program), vagy Dunette post-hoc teszt (IBM SPSS Statistics 25.0

program) segítségével határoztuk meg. A változásokat $p < 0,05$ vagy $p < 0,1$ értéknél tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

5. EREDMÉNYEK

5.1. A CrPHT4-7 transzporter részletes jellemzése

5.1.1. A CrPHT4-7 a kloroplasztisz burkolómembránjában helyezkedik el

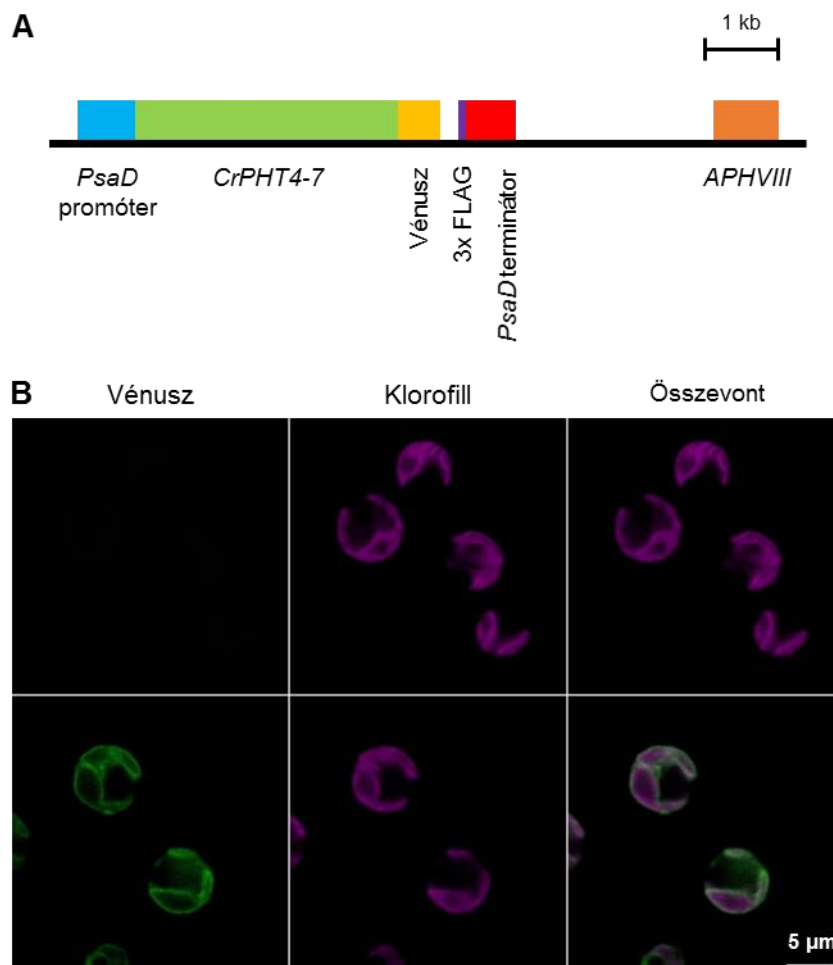
Kutatócsoportunk régóta foglalkozik az aszkorbát metabolizmusával és élettani szerepével lúdfüben és *Chlamydomonas reinhardtii* nevű zöldalgában. Mivel a CrPHT4-3 és a CrPHT4-7 transzporter aminosav szekvenciái viszonylag nagyfokú hasonlóságot mutatnak a lúdfüben azonosított és jellemzett AtPHT4;4 aszkorbát-transzporterével, ezért úgy döntöttünk, hogy megvizsgáljuk ennek a két fehérjének az élettani szerepét. Elsőként a CrPHT4-7 transzporterrel kapcsolatos eredményinket mutatom be.

A CrPHT4-7 a PHT4-es transzporterek családjába tartozik, és hasonlóságot mutat az SLC17A transzporterekkel (állati sejtekben azonosított, nátrium-függő, szerves foszfát kotranszporterek). A CrPHT4-7 42,6 %-ban hasonlít az *Arabidopsis thaliana*-ban található AtPHT4;5 (AT5G20380) szerves foszfát-transzporterhez, és körülbelül 29-36 %-ban hasonlít a PHT4 fehérjecsalád többi tagjához, nevezetesen az AtPHT4;1-hez, 4;2-höz, 4;3-hoz és a 4;6-hoz. A CrPHT4-7 viszonylag magas, 37,4 %-os hasonlóságot mutat a kloroplasztiszban található aszkorbát-transzporterrel, az AtPHT4;4-gyel (AT4G00370) (a Phytozome 13-as verziója alapján, a szekvencia illesztéseket lásd az 1. mellékletben).

Arabidopsis-ban az AtPHT4 transzporterek a kloroplasztisz burkolómembránjában, a tilakoid membránokban és a Golgi-készülékben helyezkednek el (Fabiańska és mtsai., 2019). A különböző előrejelző algoritmusok nem adnak egyértelmű választ arra vonatkozóan, hogy a CrPHT4-7 a sejten belül hol található. A DeepLoc 1.0 (Thumuluri és mtsai., 2022) szerint a CrPHT4-7 a Golgi-készülékben található. A LocTree 3 (Goldberg és mtsai., 2014) azt jósolja, hogy az érett fehérje a kloroplasztiszban helyezkedik el. Ezzel szemben a ChloroP 1.1 (Emanuelsson és mtsai., 1999) azt jelzi, hogy a CrPHT4-7 nem a kloroplasztiszban található, a PredAlgo 1.0 (Tardif és mtsai., 2012) pedig, azt hogy sem a kloroplasztiszban, a mitokondriumban, sem pedig a szekréciós útvonalon található. Wang és munkatársainak *in silico* analízise (2020) azt valószínűsíti, hogy a CrPHT4-7 a szekréciós útvonalon lokalizálódik. Ezzel szemben a közelmúltban kifejlesztett PB-Chlmy fehérje-előrejelző program azt jósolja, hogy a CrPHT4-7 a kloroplasztiszban található (Wang és mtsai., 2023).

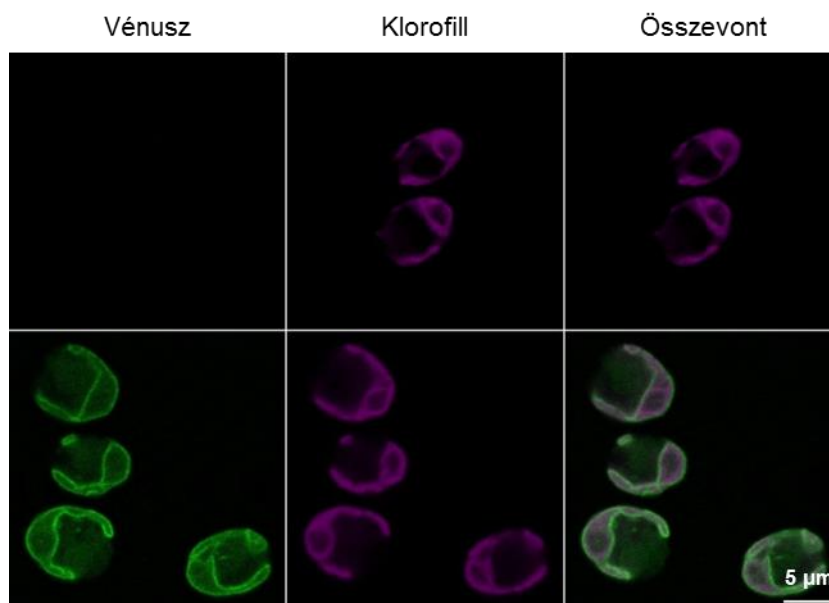
A CrPHT4-7 sejten belüli elhelyezkedésének meghatározásához a CrPHT4-7-et Vénusz fluoreszcens markerrel jelöltük meg a C-terminális végén, majd az így kapott

konstrukciót (pLM005-CrPHT4-7; 9. A ábra) bejuttattuk az UVM11-es törzsbe, amelyről kimutatták, hogy elősegíti a transzgének fokozott kifejeződését (Neupert és mtsai., 2009; Neupert és mtsai., 2020). A Vénusz egy sokoldalúan használható fluoreszcens jelölő fehérje (Nagai és mtsai., 2002); a pLM005 pedig egy alap plazmid, amit Wang és mtsai., (2023) is használtak. Ezzel párhuzamosan a konstrukciót bevittük a *C. reinhardtii* CC-4533-as törzsbe is (más néven cMJ030), amelyet a Chlamydomonas Library Projectben használtak gazdatörzsként (Fauser és mtsai., 2022; Wang és mtsai., 2023). Mind az UVM11-es, mind a CC-4533-as törzsben kimutatható volt a Vénusz jelölt CrPHT4-7 fehérje fluoreszcens jele (9. B és 10. ábrák). Az UVM11-es törzs esetében a vizsgált 93 transzformált klónból 41-ben volt kimutatható a jel (ez 44 %-nak felel meg). A Vénusz-jelöléssel ellátott CrPHT4-7 és a klorofill-a autofluoreszcenciájának egyesített képei (9. B és 10. ábrák) azt mutatják, hogy a CrPHT4-7 a kloroplasztisz burkolómembránjában helyezkedik el.



9. ábra A CrPHT4-7 a kloroplasztisz burkolómembránjában található. **A)** A pLM005-CrPHT4-7 plazmid térképe, amiről Vénusz fluoreszcens fehérjével jelölt CrPHT4-7 kifejeződik. **B)** Reprezentatív fluoreszcens mikroszkópos képek az UVM11-es törzsről (felső sor) és a pLM005-

CrPHT4-7-et kifejező UVM11-es törzsről (alsó sor). A Vénusz fluoreszcenciát 520 és 540 nm között, a klorofill autofluoreszcenciát pedig 650 és 750 nm között detektáltunk. Az összevont (Vénusz fluoreszcencia + klorofill autofluoreszcencia) képek a jobboldali oszlopban láthatók. A méretskála az összes képen 5 μ m.

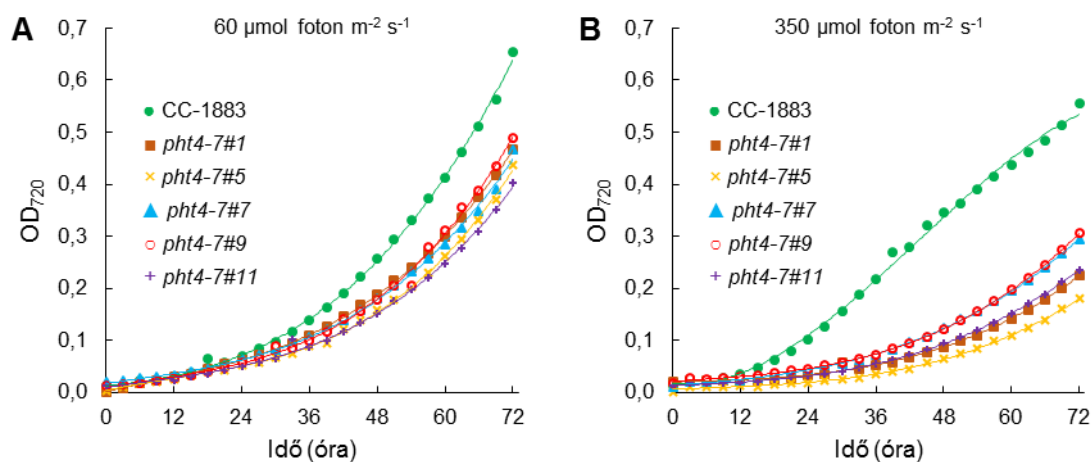


10. ábra A CrPHT4-7 sejten belüli lokalizációja CC-4533-as törzsből. Reprezentatív fluoreszcens mikroszkópos képek az CC-4533-as (más néven cMJ030) törzsről (felső sor) és a pLM005-CrPHT4-7-et kifejező CC-4533-as törzsről (alsó sor). A Vénusz fluoreszcenciát 520 és 540 nm között, a klorofill autofluoreszcenciát pedig 650 és 750 nm között detektáltunk. Az összevont (Vénusz fluoreszcencia + klorofill autofluoreszcencia) képek a jobboldali oszlopban láthatók. A méretskála az összes képen 5 μ m.

5.1.2. A CrPHT4-7 szükséges a növekedéshez, különösen erős fénytel történő megvilágítás esetén

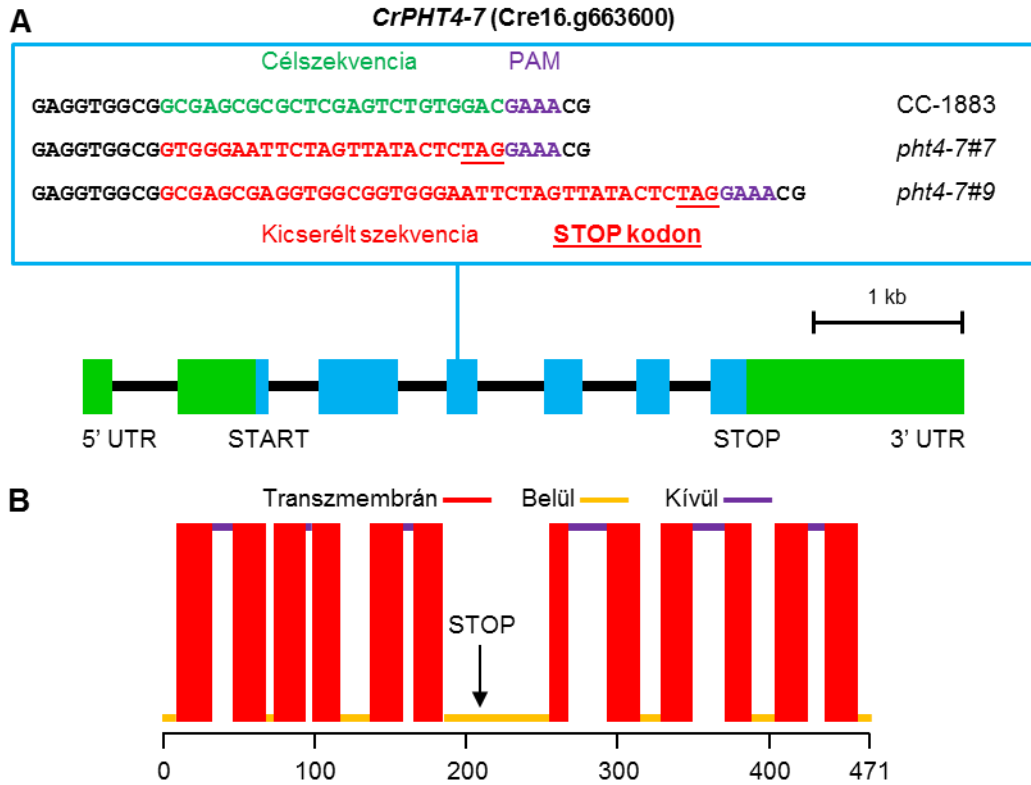
A CrPHT4-7 élettani szerepének megállapítása céljából *pht4-7* funkcióvesztéses mutánsokat vizsgáltunk, amelyeket CRISPR/Cas12a által közvetített genomszerkesztéssel kérésünkre az edinburgh-i egyetemen Dr. Molnár Attila és kutatócsoportja hozta létre, és bocsájtotta a rendelkezésünkre (Ferenczi és mtsai., 2017). A kezdeti mutáns-szűrés során a *pht4-7* mutánsok kisebb telepeket alkottak, mint a vad típusú (CC-1883) sejtek (Ferenczi és mtsai., 2017). Ezzel a megfigyeléssel összhangban a Multi-Cultivator fotobioreaktorban nevelve öt független mutáns vonal hasonló, lassabb növekedési fenotípust mutatott a

vadtípushoz képest. Az algakultúrák növekedési sebességét 720 nm-en mért abszorbancia (OD_{720}) alapján becsültük meg (Thoré és mtsai., 2021; 11. ábra).



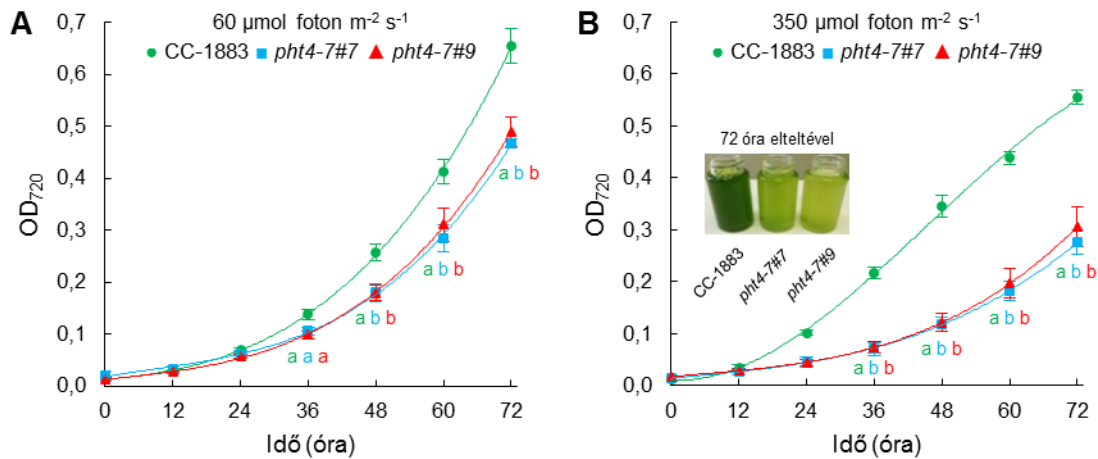
11. ábra CRISPR/Cas12a módszerrel létrehozott független *pht4-7* mutáns vonalak növekedése Multi-Cultivator fotobioreaktorban. **A)** A *pht4-7* mutáns vonalak növekedése $60 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erősségű folyamatos megvilágítás mellett. **B)** A *pht4-7* mutáns vonalak növekedése $350 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erősségű folyamatos megvilágítás mellett. Az algakultúrákat TAP tápoldatban, $23 \text{ }^\circ\text{C}$ -on neveltük, 72 órán keresztül, Multi-Cultivator fotobioreaktorban, légköri levegővel buborékolatva a tenyészeteket. A kultúrák kiindulási klorofilltartalmát minden esetben $0,5 \mu\text{g klorofill(a+b)/ml}$ -re állítottuk be. Az ábrákon szereplő növekedési görbék a genotípusokra jellemző példák.

Az öt vonal közül véletlenszerűen kiválasztottunk két független mutánst, nevezetesen a *pht4-7#7* és a *pht4-7#9* vonalakat és a részletes élettani méréseket ezekkel végeztük. A CRISPR/Cas12a által közvetített genomszerkesztés során a *CrPHT4-7* gén kódoló szekvenciájába juttatott korai stop kodon jelenlétét szekvenálással ellenőriztük (12. A ábra). A stop kodon jelenléte a *CrPHT4-7* harmadik exonjában megakadályozza a C-terminális transzmembrán hélixek translációját (12. B ábra). Következésképpen a *pht4-7#7* és *pht4-7#9* mutánsok minden valószínűség szerint a *CrPHT4-7* erősen csonkolt, működésképteken formáját fejezik ki.



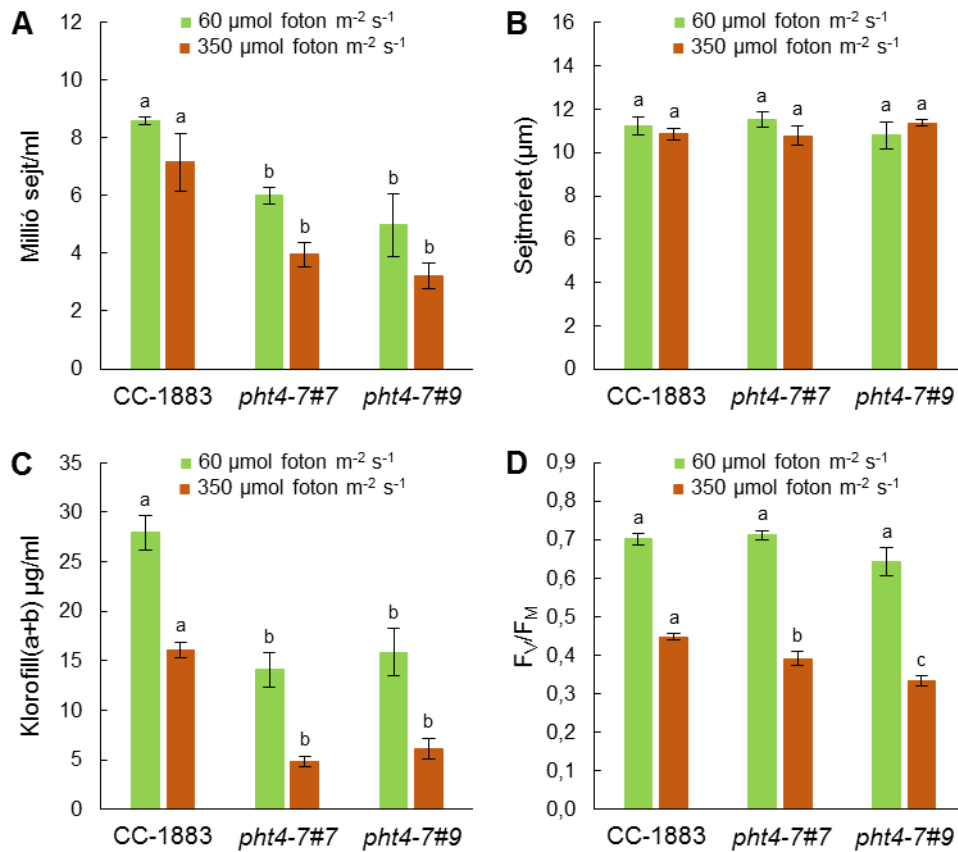
12. ábra A CRISPR/Cas12a technikával előállított *pht4-7* mutánsok genotípusa. **A)** A *CrPHT4-7* fizikai térképe (a Phytozome 13-as verziója alapján). A *pht4-7#7* és *pht4-7#9* mutánsok harmadik exonjába egy korai stop kodon lett beépítve. Az exonokat kék négyzetek, az intronokat fekete vonalak, az 5' és 3' UTR régiókat pedig zöld négyzetek jelölik. **B)** A *CrPHT4-7* transzmembrán héliceinek előrejelzése a Deep TMHMM online program 1.0.24-es verziójával történt. A predikció alapján a korai stop kodon beépítése hat transzmembrán hélix transzlációját akadályozza meg.

Az előzetes kísérletek eredményeivel összhangban jelentős különbséget figyeltünk meg a biomassza felhalmozódásban (az OD_{720} alapján) a vad típus és a *pht4-7* mutáns vonalak között, amikor normál fényben ($60 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$) neveltük a kultúrákat (13. A ábra). Ez a különbség még nagyobb lett erős fényben ($350 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 13. B ábra). Ennek megfelelően három napos nevelést követően a sejtszám és a klorofill koncentráció szignifikánsan alacsonyabb volt a mutánsokban a vad típusban mért értékekhez képest 60 és $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fotonáram-sűrűségű megvilágítás esetén is (14. A és C ábrák). A mutánsok és a vad típus sejtméretei nagyon hasonlóak voltak normál és erős fényben nevelt tenyészetek esetében is (14. B ábra).



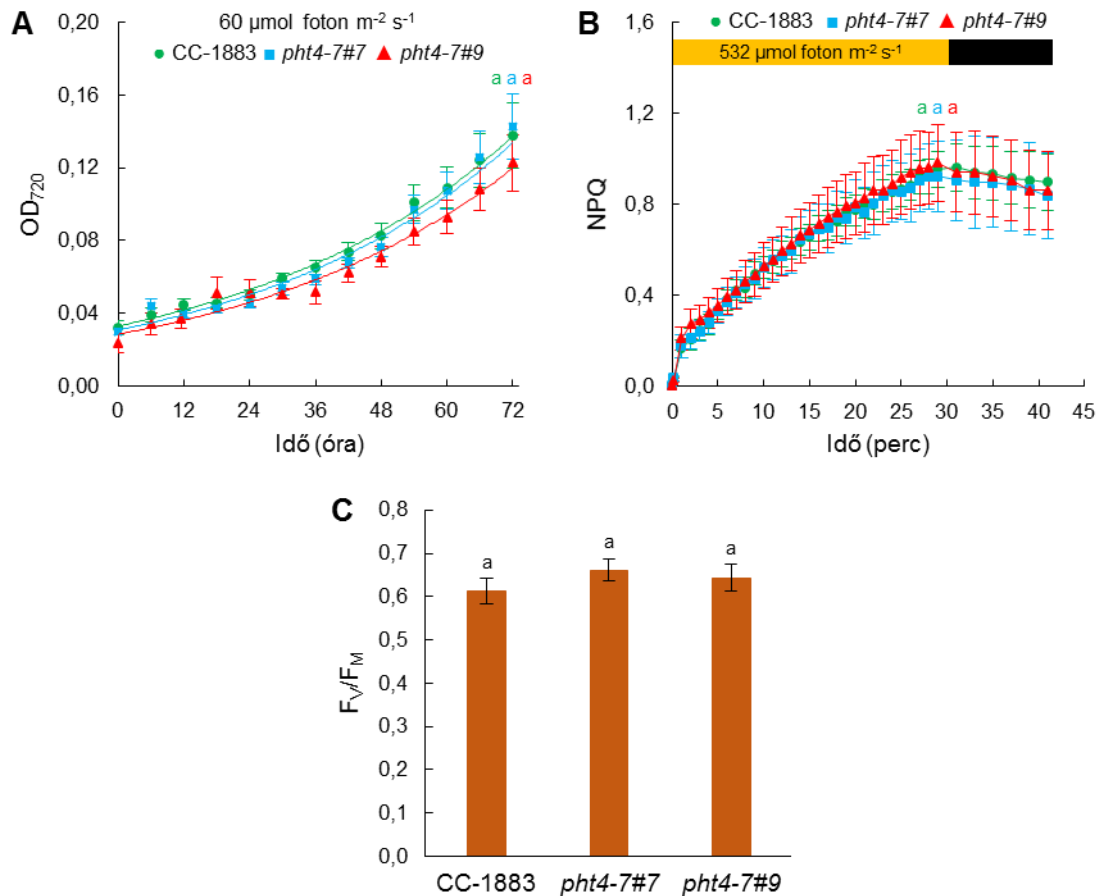
13. ábra A *pht4-7* mutánsok növekedési fenotípusa. **A)** A vad típus (CC-1883) és a *pht4-7* mutánsok növekedése 60 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erősségű folyamatos megvilágítás mellett. **B)** A vad típus (CC-1883) és a *pht4-7* mutánsok növekedése 350 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erősségű folyamatos megvilágítás mellett. Az algakultúrákat TAP tápoldatban, 23 °C-on neveltük, 72 órán keresztül, Multi-Cultivator fotobioreaktorban, légköri levegővel buborékolatva a tenyészeteket. A kultúrák kiindulási klorofilltartalmát minden esetben 0,5 $\mu\text{g klorofill(a+b)/ml}$ -re állítottuk be. Az ábrán szereplő adatok 4 független biológiai ismétlés átlagát mutatják, szórásként a standard hibák (\pm SE) vannak feltüntetve. Az átlagok közötti különbségek szignifikanciáját ANOVA-val határoztuk meg, Tukey post-hoc teszttel. A különböző betűkkel jelölt átlagok szignifikánsan különböznek egymástól ($p < 0,05$).

Az F_V/F_M érték, amely a PSII fotokémiai hatékonyságáról szolgáltat információt (Schansker és mtsai., 2014; Sipka és mtsai., 2021), körülbelül 0,65-0,70 volt minden normál fényben nevelt vonalban (14. D ábra), ami a *C. reinhardtii*-ra tipikusan jellemző érték (Bonente és mtsai., 2012; Santabarbara és mtsai., 2019). Erős fényben nevelt kultúrákban az F_V/F_M értéke körülbelül 0,45-re csökkent a vad típusban, ami a fotoszintetikus elektrontranszport leszabályozására és esetleges fotoinhibícióra utal. A fotoszintézis hatékonyságának csökkenése szignifikánsan nagyobb volt a *pht4-7* mutánsokban, mint a vad típusú törzsből (14. D ábra). Ezekből az adatokból arra a következtetésre jutottunk, hogy a CrPHT4-7 szükséges a sejtek stressztűrő képességének fenntartásához, különösen erős fényvel történő megvilágítás esetén.



14. ábra Fotobioreaktorban nevelt *pht4-7* mutánsok élettani paramétereit 3 nap nevelés után. **A)** Sejtszám mérések eredményei. **B)** A vad típus (CC-1883) és a *pht4-7* mutánsok sejtméretei. **C)** Az algakultúrák klorofilltartalma. **D)** F_v/F_M értékek. Az algakultúrákat TAP tápoldatban, 23 °C-on neveltük, 72 órán keresztül, 60 és 350 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erősségű folyamatos megvilágítás mellett, Multi-Cultivator fotobioreaktorban, légköri levegővel buborékolatva a tenyészeteket. A kultúrák kiindulási klorofilltartalmát minden esetben 0,5 $\mu\text{g klorofill(a+b)/ml}$ -re állítottuk be. Az ábrán szereplő adatok 4-5 független biológiai ismétlés átlagát mutatják, szórásként a standard hibák (\pm SE) vannak feltüntetve. Az átlagok közötti különbségek szignifikanciáját ANOVA-val határoztuk meg, Tukey post-hoc teszttel. A különböző betűkkel jelölt átlagok szignifikánsan különböznek egymástól ($p < 0,05$).

Méréseket végeztünk fotoautotróf körülmények között nevelt algakultúrákon is. Az algatorzseket magas sótartalmú (HS) tápoldatban, normál fényintenzitáson neveltük, 1 % (V/V) CO_2 + 99 % (V/V) szintetikus levegő keverékével buborékolatva a kultúrákat. Az OD_{720} értékek alapján a *pht4-7* mutánsok hasonló növekedési fenotípust mutattak, mint a vad típus. Ezekből az eredményekből arra a következtetésre jutottunk, hogy a fotoautotróf körülmények nem fokozták a mutánsok stressz-érzékenységét normál fényintenzitás mellett (15. ábra).

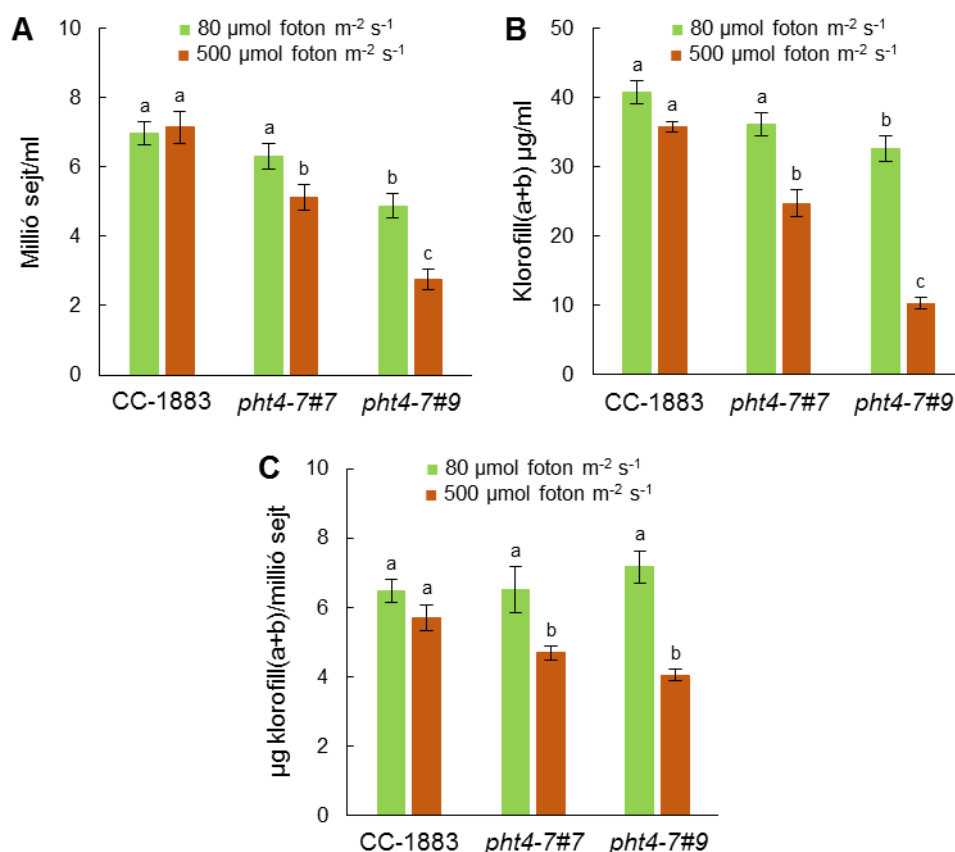


15. ábra A *pht4-7* mutánsok fenotípusai fotoautotróf nevelési körülmények között. **A)** A vad típus (CC-1883) és a *pht4-7* mutánsok növekedési fenotípusa az OD₇₂₀ értékek alapján. **B)** Az algakultúrák NPQ értékei. **C)** Az algakultúrák F_v/F_M értékei. Az algakultúrákat HS tápoldatban, 23 °C-on neveltük, 72 órán keresztül, 60 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erősségű folyamatos megvilágítás mellett, Multi-Cultivator fotobioreaktorban, 1 % (V/V) CO₂ + 99 % (V/V) szintetikus levegő elegyével buborékoltatva a tenyészeteket. A kultúrák kiindulási klorofilltartalmát minden esetben 0,5 μg klorofill(a+b)/ml-re állítottuk be. Az ábrán szereplő adatok 4-5 független biológiai ismétlés átlagát mutatják, szórásként a standard hibák (\pm SE) vannak feltüntetve. Az átlagok közötti különbségek szignifikanciáját ANOVA-val határoztuk meg, Tukey post-hoc teszttel. Az **A)** panel esetében az átlagok közötti különbségek szignifikanciáját 72 óránál, a **B)** panel esetében a megvilágítási szakasz végén határoztuk meg. A különböző betűkkel jelölt átlagok szignifikánsan különböznek egymástól ($p < 0,05$).

5.1.3. A CrPHT4-7 szubsztrát-specifitása

Mivel a CrPHT4-7 aminosav szekvenciája hasonlóságot mutat az AtPHT4;4 aszkorbát-transzporterével, ezért úgy döntöttünk, hogy az aszkorbát metabolizmussal és funkciójával kapcsolatos vizsgálatokat végzünk. Ezeket a vizsgálatokat Erlenmeyer-

lombikban történő nevelést követően végeztük, három napos kultúrákon. Az algakultúrák sejtszámának és klorofilltartalmának meghatározása megerősítette korábbi, fotobioreaktorban végzett megfigyelésünket, miszerint a *pht4-7* mutánsok sejt kultúrái lassabban nőnek, mint a vad típus, különösen erős fényvel történő megvilágítás esetén (16. ábra).

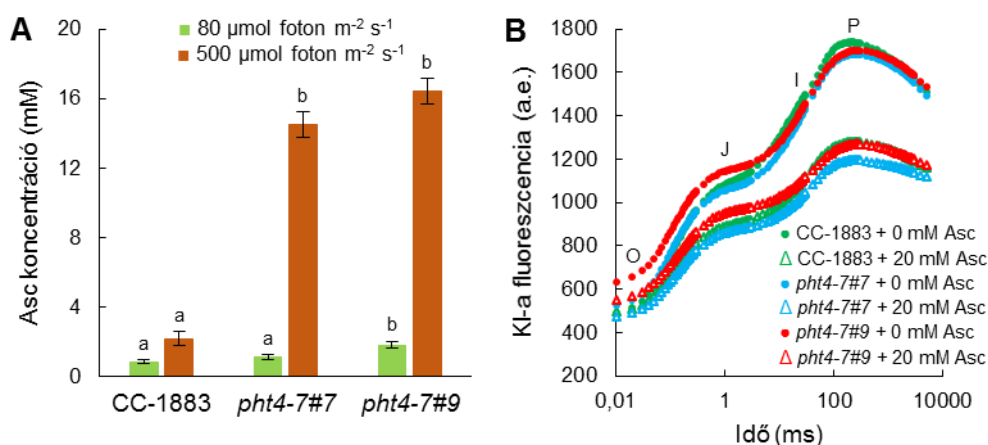


16. ábra Erlenmeyer-lombikokban nevelt algakultúrák sejtszáma és klorofilltartalma. **A)** Sejtszám mérések eredményei. **B)** Az algakultúrák klorofilltartalma. **C)** µg klorofill(a+b)/millió sejt értékek. A kultúrákat Erlenmeyer-lombikokban, TAP tápoldatban neveltük, 72 órán keresztül, 80 és 500 µmol foton m⁻² s⁻¹ erősségű folyamatos megvilágítás mellett. A kultúrák kiindulási klorofilltartalmát minden esetben 0,5 µg klorofill(a+b)/ml-re állítottuk be. Az ábrán szereplő adatok 28-40 független biológiai ismétlés átlagát mutatják, szórásként a standard hibák (± SE) vannak feltüntetve. Az átlagok közötti különbségek szignifikanciáját ANOVA-val határoztuk meg, Tukey post-hoc teszttel. A különböző betűkkel jelölt átlagok szignifikánsan különböznek egymástól (p < 0,05).

A Multi-Cultivátorban történt neveléssel összehasonlítva a mutánsok és a vad típus közötti különbség kisebb volt, ami azt jelzi, hogy a rázatott lombikos nevelés kevesebb

stresszhatással jár a sejtek számára, mint a Multi-Cultivátorban történő nevelés (a technikai részletek az Anyagok és módszerek című részben szerepelnek).

Az aszkorbát koncentrációja körülbelül 0,8 mM volt a CC-1883-as törzsben, amikor $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fotonáram-sűrűségű megvilágítást használtunk (17. A ábra). Ez az érték ugyanabban a tartományban van, mint amit korábban más vad típusú *C. reinhardtii* törzsben mértek (Vidal-Meireles és mtsai., 2017; Vidal-Meireles és mtsai., 2020). A *pht4-7#7* mutánsban az aszkorbát koncentrációja körülbelül 1,1 mM, a *pht4-7#9* vonalban pedig körülbelül 1,8 mM volt. $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fotonáram-sűrűségű megvilágítás esetén az aszkorbát koncentráció háromszorosára nőtt a vad típusban, míg körülbelül tízszeres növekedést figyeltünk meg mindkét *pht4-7* mutánsban, elérve a körülbelül 15 mM-os aszkorbát koncentrációt a sejtekben (17. A ábra).

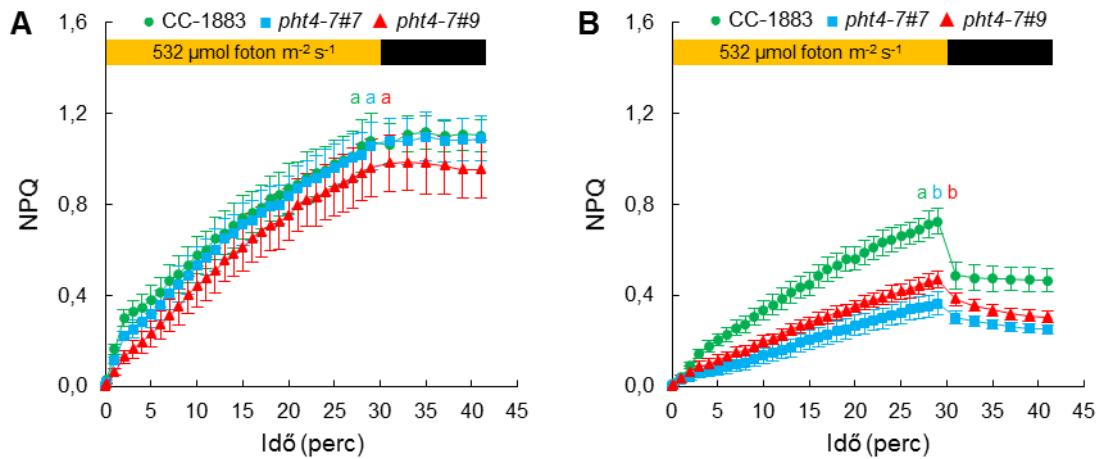


17. ábra A *pht4-7* mutánsokban nagymértékű aszkorbát felhalmozódás figyelhető meg erős fényben, ami nem befolyásolja a kloroplasztisz aszkorbát felvételét. **A)** A *pht4-7* mutánsok és a vad típus (CC-1883) aszkorbát tartalma 3 napos nevelést követően 80 és $500 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erősségű folyamatos megvilágítás mellett. **B)** Gyors klorofill-a fluoreszcencia (OJIP) tranziensek aszkorbátkezelte (20 mM) és kezeletlen vad típusban (CC-1883) és a *pht4-7* mutánsokban. A görbék 4-6 független mérés átlagai. A kultúrákat Erlenmeyer-lombikokban, TAP tápoldatban neveltük. Az **A)** panelen szereplő adatok 16-22 független biológiai ismétlés átlagát mutatják, szórásaként a standard hibák (\pm SE) vannak feltüntetve. Az átlagok közötti különbségek szignifikanciáját ANOVA-val határoztuk meg, Tukey post-hoc teszttel. A különböző betűkkel jelölt átlagok szignifikánsan különböznek egymástól ($p < 0,05$).

Ezt követően az aszkorbátkezelés hatását vizsgáltuk a gyors klorofill-a fluoreszcencia kinetikájára, amely egy érzékeny módszer a fotoszintetikus elektrontranszport lánc működésében bekövetkező változások kimutatására (Schansker és

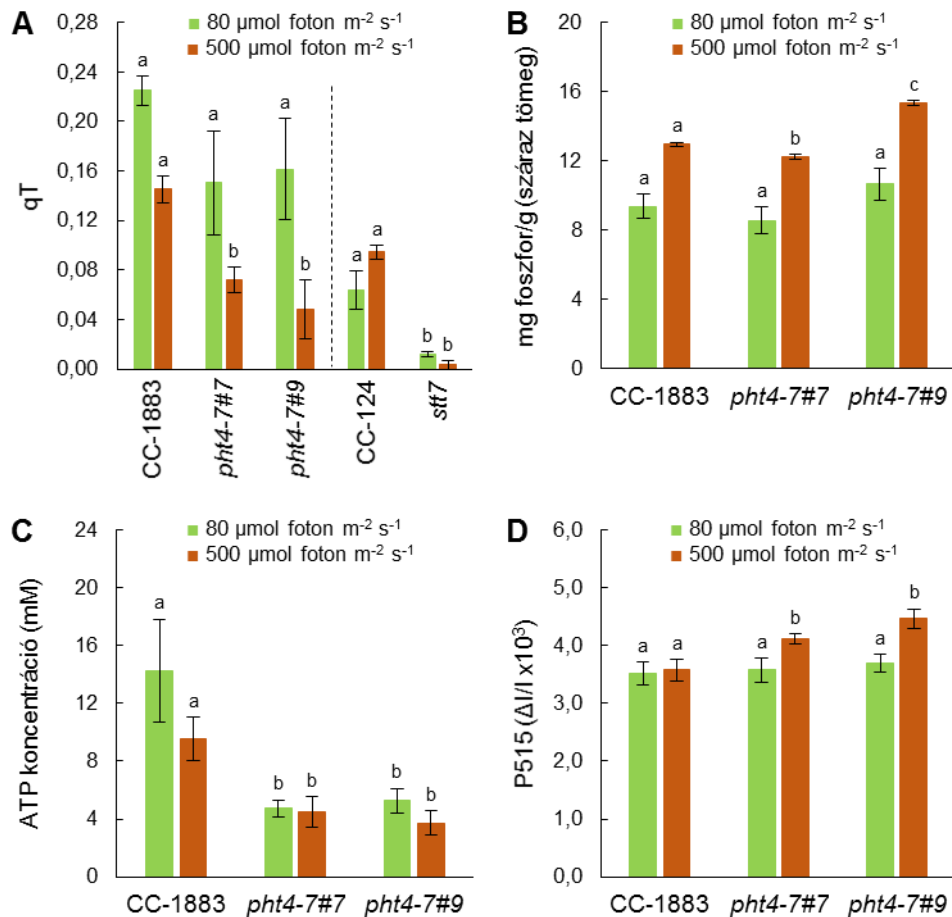
mtsai., 2014). Korábban kimutatták, hogy 10-20 mM-os aszkorbátkezelés jelentős, körülbelül hússzoros növekedést eredményez a celluláris aszkorbáttartalomban (Nagy és mtsai., 2016). Ilyen magas koncentráció esetén az aszkorbát inaktíválhatja a *C. reinhardtii* vízbontó komplexét (OEC), ami csökkenti a változó klorofill-a fluoreszcenciát (Nagy és mtsai., 2016; Nagy és mtsai., 2018). Feltételeztük, hogy ha a CrPHT4-7 aszkorbát-transzporterként működik a kloroplasztisz burkolómembránjában, akkor hiányában az aszkorbát bejutása a kloroplasztiszba kevésbé hatékony, következésképpen az aszkorbátkezelés során az OEC kevésbé károsodna. Ahogy az várható volt, a 20 mM-os aszkorbátkezelés a változó klorofill-a fluoreszcencia csökkenését eredményezte, normál fényben nevelt kultúrákban, de nem volt jelentős különbség a vad típus és a *pht4-7* mutánsok között (17. B ábra). Ez az eredmény azt jelzi, hogy a CrPHT4-7 nem vesz részt jelentős mértékben az aszkorbát kloroplasztiszba történő szállításában.

Edényes növényekben az aszkorbát a nem-fotokémiai kioltásban (NPQ) résztvevő violaxantin-depoxidáz redukálószerre (Saga és mtsai., 2010; Hallin és mtsai., 2016), de nem szükséges a zöldalga-típusú violaxantin-depoxidázok működéséhez (Li és mtsai., 2016; Vidal-Meireles és mtsai., 2020). Ehelyett *C. reinhardtii*-ban az aszkorbát mérsékli az NPQ oxidatív stresszel kapcsolatos fotoinhibíciós komponensét (qI), ezért az NPQ fokozódik aszkorbáthiány esetén (Vidal-Meireles és mtsai., 2020). Ahogy az várható volt, amikor a kultúrákat normál fényben, TAP tápoldatban neveltük, az NPQ gyorsan kialakuló energiafüggő komponense (qE) igen alacsony volt, és az NPQ főképpen egy lassú fázisból állt, amely magában foglalja a zeaxantin függő komponensét (qZ), az állapotátmenethez kapcsolt kioltást (qT) és a fotoinhibíciós komponensét (qI) (Xue és mtsai., 2015; Vidal-Meireles és mtsai., 2020). Normál fényben nevelt kultúrák esetében a *pht4-7* mutánsok és a vad típus NPQ kinetikája hasonló volt (18. A ábra). Erős fényben nevelt *pht4-7* mutánsokban az NPQ jelentősen csökkent a vad típuséhoz képest (18. B ábra). Mivel a kloroplasztiszban kialakuló aszkorbáthiány hatására megnövekedett NPQ figyelhető meg a qI növekedése miatt (Vidal-Meireles és mtsai., 2020), ezért az eredményünk arra utal, hogy az aszkorbát transzportja a kloroplasztiszba nem változott meg a *pht4-7* mutánsokban.



18. ábra A CrPHT4-7 hiánya megváltoztatja a fotoszintetikus redox homeosztázist. **A)** 80 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erősségű folyamatos megvilágítás mellett nevelt algakultúrák NPQ értékei. **B)** 500 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erősségű folyamatos megvilágítás mellett nevelt algakultúrák NPQ értékei. Az NPQ indukciójához 30 perc hosszú, 532 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erősségű folyamatos megvilágítást használtunk, amit 12 perces sötétadaptáció követett, megszakítva 3000 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erősségű telítési fényimpulzusokkal. A kultúrákat Erlenmeyer-lombikokban, TAP tápoldatban neveltük, 72 órán keresztül. Az ábrán szereplő adatok 6-11 független biológiai ismétlés átlagát mutatják, szórásként a standard hibák (\pm SE) vannak feltüntetve. Az átlagok közötti különbségek szignifikanciáját a fényszakasz végén ANOVA-val határoztuk meg, Tukey post-hoc teszttel. A különböző betűkkel jelölt átlagok szignifikánsan különböznek egymástól ($p < 0,05$).

Annak érdekében, hogy meghatározzuk, miért csökkent az NPQ a *pht4-7* mutánsokban, állapotátmenet méréseket végeztünk egymást követő vörös és távoli vörös fényvel történő megvilágítás alkalmazásával (Ruban és Johnson, 2009 alapján; a reprezentatív klorofill-a fluoreszcencia görbéket a 2. mellékletben mutatjuk be). A *pht4-7* mutánsokban csökkent q_T értékeket mértünk, különösen erős fényvel történt megvilágítás esetén (19. A ábra), hasonlóan, de kisebb mértékben, mint azt az *stt7* (állapotátmenetre nem képes) mutáns esetében (Fleischmann és mtsai., 1999). Ez az eredmény felveti annak a lehetőségét, hogy a kloroplasztisz szeretlen foszfát koncentrációja alacsony a *pht4-7* mutánsokban, mivel korábban már leírták, hogy az állapotátmenetet korlátozhatja a szeretlen foszfát hiánya az elégtelen LHCI foszforiláció miatt (Petrou és mtsai., 2008).



19. ábra A CrPHT4-7 hiánya megváltoztatja a fotoszintetikus redox homeosztázist. **A)** Állapotátmenet mérések eredményei (qT, a mérések kivitelezésének részletes leírása az Anyagok és módszerek című részben szerepel, a reprezentatív klorofill-a fluoreszcencia görbéket a 2. mellékletben mutatjuk be). **B)** Teljes foszfortartalom. **C)** Intracelluláris ATP tartalom. **D)** A teljes protonmozgató erő, az 515 nm-en mért abszorbancia változása alapján az 535 nm-es referencia hullámhosszhoz képest, $\Delta I/I$ egységekben kifejezve. A kultúrákat Erlenmeyer-lombikokban, TAP tápoldatban neveltük, 72 órán keresztül, 80 és 500 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erősségű folyamatos megvilágítás mellett. Az ábrán szereplő adatok 3-36 független biológiai ismétlés átlagát mutatják, szórásként a standard hibák (\pm SE) vannak feltüntetve. Az átlagok közötti különbségek szignifikanciáját ANOVA-val határoztuk meg, Tukey post-hoc teszttel. A különböző betűkkel jelölt átlagok szignifikánsan különböznek egymástól ($p < 0,05$). Az **A)** panelen minden mutánst a saját vadtypusával hasonlítottunk össze.

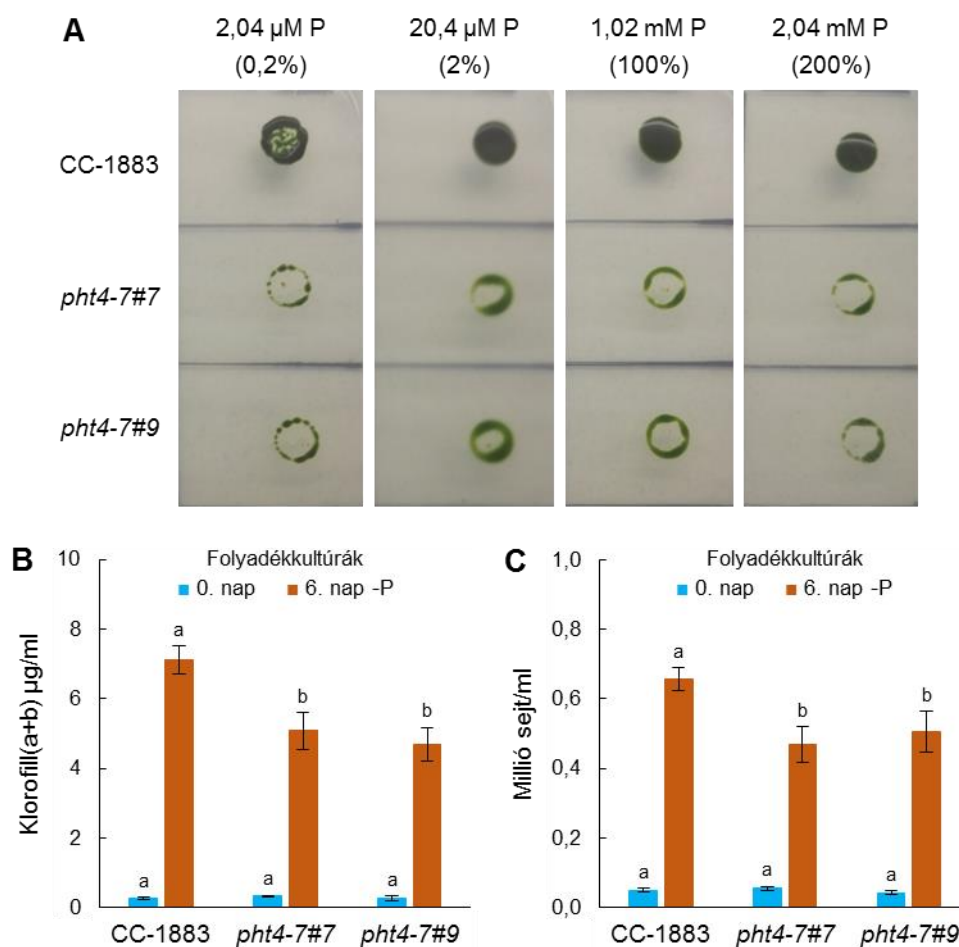
Ezt követően a foszfát homeosztázisra vonatkozó méréseket végeztünk. Az edényes növények és a zöldságak is a foszfort leginkább szervetlen formában veszik fel a környezetükből, ezért a sejtekbe történő csökkent szervetlen foszfát-transzport csökkenti mind a szervetlen, mind a szerves foszfortartalmat. ICP-OES technikát használtunk a sejt

teljes foszfortartalmának meghatározására, és azt találtuk, hogy normál fényben nevelt kultúrák esetében a teljes foszfortartalom változatlan volt a *pht4-7* mutánsokban. Erős fényben nevelt kultúrák esetében a teljes foszfortartalom enyhén csökkent a *pht4-7#7* mutánsban és kismértékben megnövekedett a *pht4-7#9* mutánsban a vad típusban mért értékhez képest (19. B ábra). Ezek az adatok arra engednek következtetni, hogy a CrPHT4-7 hiánya nem hat jelentősen a sejtek foszfor felvételére. Másrészt a szerves foszfát elengedhetetlen az ATP szintézishez, és ha a CrPHT4-7 szerves foszfát-transzporterként működik kloroplasztisz burkolómembránjában, akkor hiánya korlátozhatja az ATP szintézist. Valóban azt találtuk, hogy a celluláris ATP tartalom mindkét *pht4-7* mutánsban jelentősen csökkent, mind normál, mind erős fényvel történt megvilágítás során (19. C ábra).

A kloroplasztisz ATP termelését a transz-tilakoid protonmozgató erő (pmf) hajtja, ami ΔpH -ként és membránpotenciálként ($\Delta\Psi$) tárolódik (Cruz és mtsai., 2005). A kloroplasztisz szerves foszfát koncentrációjának csökkenése, ezáltal az ATP termelés csökkenése (Carstensen és mtsai., 2018) várhatóan megnövekedett pmf-hez vezet a tilakoid membránon keresztül, különösen erős fényvel történő megvilágítás esetén (Cruz és mtsai., 2005). Amint a 19. D ábrán látható, a teljes pmf mindkét *pht4-7* mutánsban megnőtt, amikor erős fényben neveltük őket, ami alátámasztja ezt a forgatókönyvet.

Következő lépésként a mutánsok foszformegvonással szembeni érzékenységet vizsgáltuk. Cseppesztet végeztünk, szerves foszfort különböző koncentrációkban (2,04 μM - 0,2 %; 20,4 μM - 2 %; 1,02 mM - 100 % és 2,04 mM - 200 %) tartalmazó TAP táplémezeken. Eredményeink azt mutatják, hogy a *pht4-7* mutáns vonalak növekedése jelentősen lelassult a vad típushoz képest, függetlenül a tápközeg foszfortartalmától. Ezt a lassú növekedési fenotípust nem lehetett helyreállítani a tápközeg foszfortartalmának megduplázásával (20. A ábra).

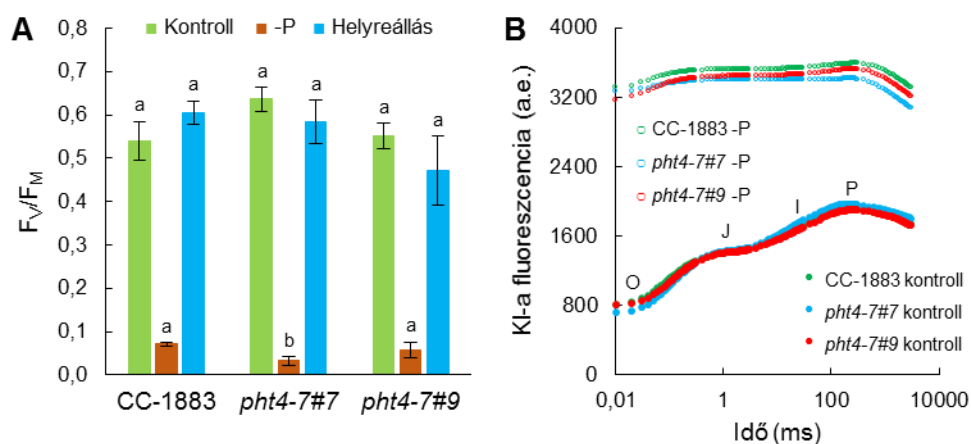
0,5 % (5,1 μM) szerves foszfort tartalmazó TAP táplédatban nevelt *pht4-7* mutánsok szignifikánsan lassabban nőttek (körülbelül 30 %-kal) a vad típushoz képest. Ezt a megfigyelésünket a sejt kultúrák csökkent klorofilltartalma és sejtszáma (sejt/ml) is alátámasztja (20. B és C ábrák). Fontosnak tartjuk azonban megemlíteni, hogy a *pht4-7* mutánsok lassú növekedési fenotípusát normál foszforellátottság esetén is megfigyeltük (16. ábra; 20. A ábra).



20. ábra A foszformegvonás hatásai a *pht4-7* mutánsokra és a vad típusra. **A)** A *pht4-7* mutánsok és a vad típus (CC-1883) növekedési tesztje különböző mennyiségű foszfort tartalmazó TAP agarlemezekken. A képek 6 nappal a ráoltás után készültek. **B)** Az algakultúrák klorofilltartalma a foszformegvonás kezdetekor (0. nap) és 6 napos foszformegvonás után (6. nap -P). **C)** Sejtszám mérések eredményei a foszformegvonás kezdetekor (0. nap) és 6 napos foszformegvonás után (6. nap -P). A **B)** és **C)** paneleken bemutatott mérésekhez az algatörzseket Erlenmeyer-lombikokban neveltük, 80 μmol foton m^{-2} s^{-1} erősségű folyamatos megvilágítás mellett, normál (1,02 mM), illetve 0,5 % (5,1 μM) foszfort tartalmazó TAP tápoldatban. Az ábrán szereplő adatok 4-11 független biológiai ismétlés átlagát mutatják, szórásként a standard hibák (\pm SE) vannak feltüntetve. Az átlagok közötti különbségek szignifikanciáját ANOVA-val határoztuk meg, Tukey post-hoc teszttel. A különböző betűkkel jelölt átlagok szignifikánsan különböznek egymástól ($p < 0,05$).

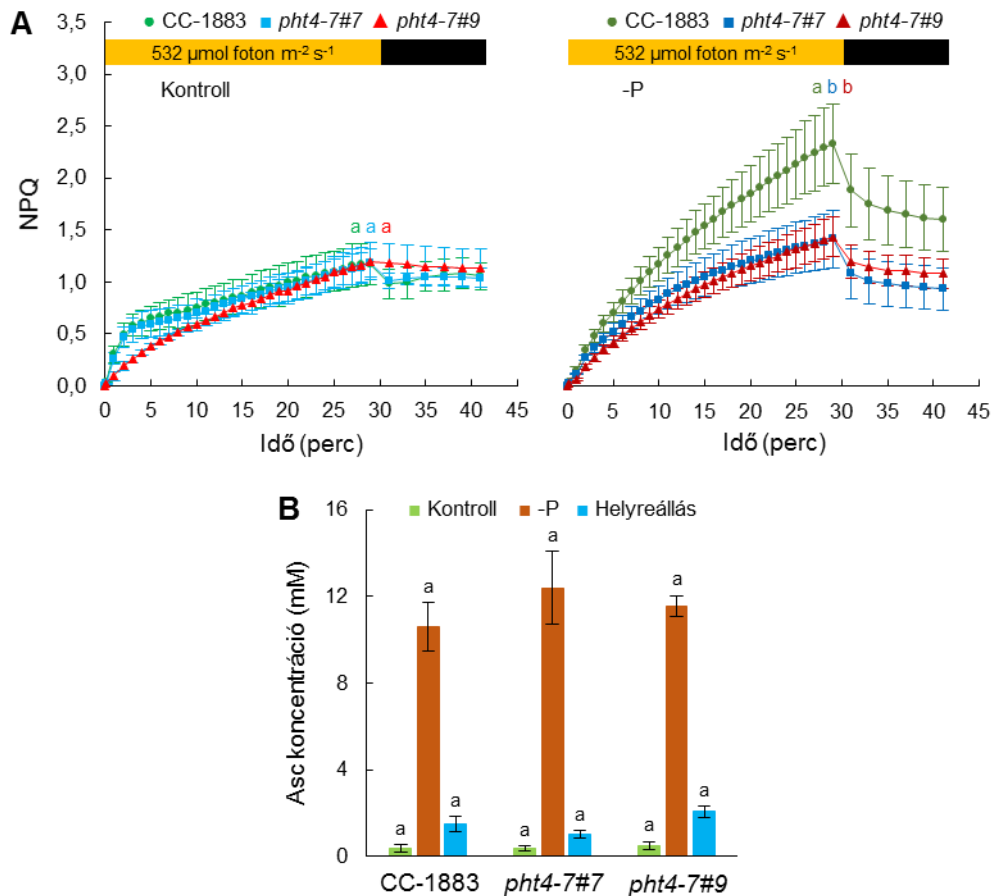
A fotoszintetikus aktivitást illetően azt találtuk, hogy a hatnapos foszformegvonás nagyon erősen (körülbelül 0,1-re) csökkentette az F_v/F_M értékeket és a csökkenés mértéke valamivel nagyobb volt a mutánsokban, mint a vad típusban (21. A ábra). Fontosnak tartjuk megemlíteni, hogy az F_v/F_M csökkenését az F_0 értékének nagymértékű növekedése okozta (21. B ábra), ami arra utal, hogy a fotoszintetikus elektrontranszport hatásfoka mérséklődött

a foszformegvonás alatt, valószínűleg az ATP hiány miatt (19. C ábra), ezáltal pedig csökkent a Calvin-Benson-Bassham ciklus aktivitása.



21. ábra A fotoszintetikus aktivitás változásai foszformegvonás hatására. **A)** 6 napig TAP tápoldatban (kontroll) és 0,5 % (5,1 μM) foszfort tartalmazó TAP tápoldatban (-P) nevelt algakultúrák F_v/F_M értékei. A helyreálláshoz a 0,5 % (5,1 μM) foszfort tartalmazó TAP tápoldat foszfortartalmát 100 %-ra (1,02 mM) növeltük és 1 nap elteltével megmértük a kultúrák F_v/F_M értékeit. **B)** Gyors klorofill-a fluoreszcencia (OJIP) tranziensek. Minden görbe 3-4 független mérés átlagából készült. A kultúrákat Erlenmeyer-lombikokban neveltük, 80 μmol foton $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erősségű folyamatos megvilágítás mellett. Az ábrán szereplő adatok 3-6 független biológiai ismétlés átlagát mutatják, szórásként a standard hibák (\pm SE) vannak feltüntetve. Az átlagok közötti különbségek szignifikanciáját ANOVA-val határoztuk meg, Tukey post-hoc teszttel. A különböző betűkkel jelölt átlagok szignifikánsan különböznek egymástól ($p < 0,05$).

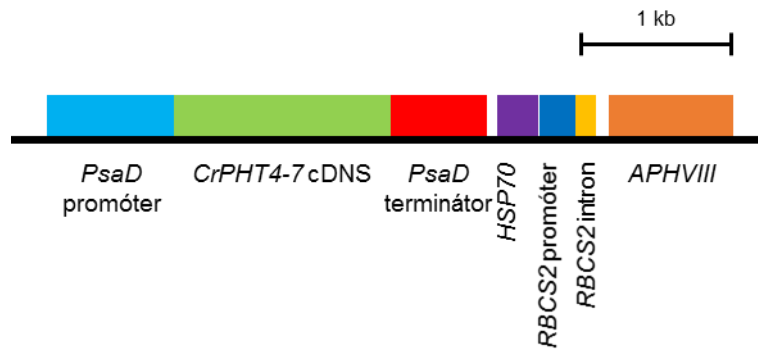
A normál mennyiségű foszfor újbóli hozzáadása után az F_v/F_M szinte teljesen helyreállt 24 órán belül, ami azt mutatja, hogy a fotoszintetikus aktivitás csökkenése reverzibilis volt (21. A ábra). Ezenkívül a foszformegvonás hatására az NPQ megnőtt, de a növekedés kisebb mértékű volt a *pht4-7* mutánsokban, mint a vad típusban (22. A ábra). Ezen túlmenően, az aszkorbát sejten belüli koncentrációjának nagymértékű (körülbelül húsz-harmincszoros) növekedését észleltük foszformegvonás során minden törzsben, ami lényegében visszaállt a kontroll szintre 24 órával a normál mennyiségű foszfor hozzáadását követően (22. B ábra). Ezek az adatok azt mutatják, hogy a foszformegvonás erős aszkorbát felhalmozódáshoz vezet, hasonlóan az oxidatív stresszel járó kénmegvonáshoz (Nagy és mtsai., 2018), és ennek a stresszhatásnak a megszűnését követően az aszkorbát tartalom gyorsan visszaáll az eredeti szintre.



22. ábra A fotoszintetikus aktivitás változásai foszformegvonás hatására. **A)** 6 napig TAP tápoldatban (kontroll) és 0,5 % (5,1 μM) foszfort tartalmazó TAP tápoldatban (-P), nevelt algakultúrák NPQ értékei (532 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erősségű fényel indukált). **B)** A *pht4-7* mutánsok és a vad típus (CC-1883) askorbát tartalma különböző nevelési körülmények között. A kultúrákat Erlenmeyer-lombikokban neveltük, 80 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erősségű folyamatos megvilágítás mellett. Az ábrán szereplő adatok 3-6 független biológiai ismétlés átlagát mutatják, szórásként a standard hibák (\pm SE) vannak feltüntetve. Az átlagok közötti különbségek szignifikanciáját ANOVA-val határoztuk meg, Tukey post-hoc teszttel. Az **A)** panel esetében az átlagok közötti különbségek szignifikanciáját a megvilágítási szakasz végén határoztuk meg. A különböző betűkkel jelölt átlagok szignifikánsan különböznek egymástól ($p < 0,05$).

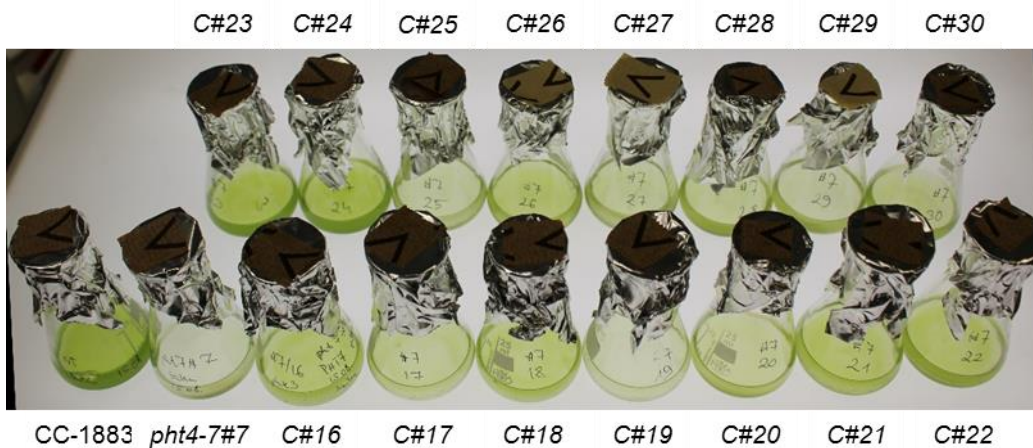
5.1.4. Genetikai komplementáció és a CrPHT4-7 túltermeltetése

A megfigyelt fenotípusok és a CrPHT4-7-et érintő mutáció közötti kapcsolatot megerősítés céljából genetikai komplementációs kísérleteket végeztünk. A CrPHT4-7 teljes hosszúságú cDNS-ét a *PSAD* gén promotor és terminátor szekvenciája közé klónoztuk, majd a *pht4-7* mutánsokat ezzel a konstrukcióval transzformáltuk (23. ábra).

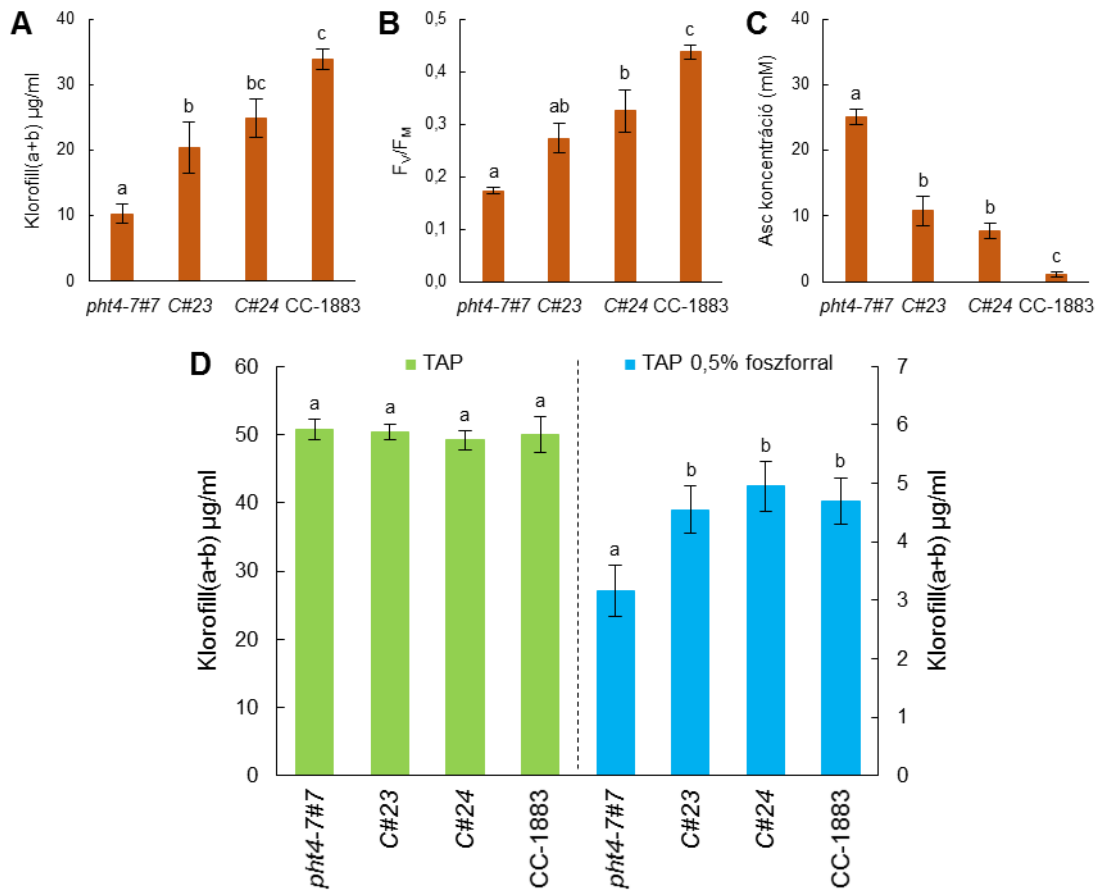


23. ábra A komplementált és túltermelő vonalak létrehozásához használt pJR101 plazmid térképe. A vektor *PSDA* promóter és terminátor szekvencia között tartalmazza a CrPHT4-7 cDNS szekvenciáját.

A komplementáció a tesztelt transzformánsok körülbelül 70 %-ánál helyreállította a vad típusra jellemző növekedési fenotípust. A véletlenszerűen kiválasztott komplementált vonalakat a 24. ábrán mutatjuk be. Erős fényben nevelt kultúrák esetében a helyreállított növekedési fenotípus magasabb klorofilltartalommal, javult fotoszintetikus teljesítménnyel (az F_V/F_M érték alapján) és az aszkorbát tartalom mérséklődésével járt együtt (25. A, B és C ábrák). Fontosnak tartjuk kihangsúlyozni, hogy a komplementált vonalak hasonlóan növekedtek a foszformegvonás során normál fényben, mint a vad típus (25. D ábra).



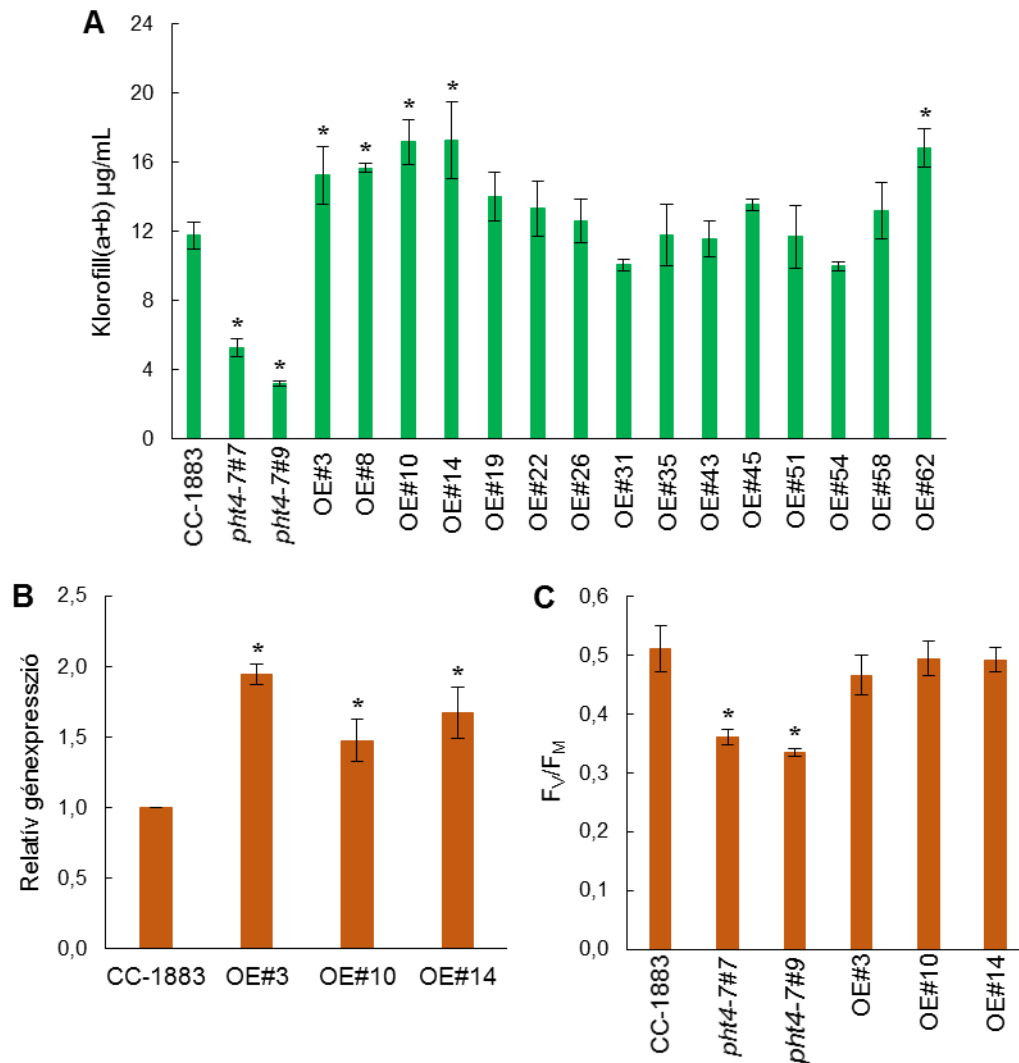
24. ábra A vad típusú CC-1883-as törzsről, a *pht4-7#7* mutánsról és több véletlenszerűen kiválasztott komplementált vonalról készített fénykép.



25. ábra CRISPR/Cas12a módszerrel létrehozott *pht4-7#7* mutáns komplementációja. **A)** A vad típus (CC-1883), a *pht4-7#7* mutáns és kettő komplementált vonal (C#23, C#24) klorofilltartalma. **B)** F_v/F_M értékek. **C)** Intracelluláris aszkorbát koncentrációk. A kultúrákat Erlenmeyer-lombikokban, TAP tápoldatban neveltük, 72 órán keresztül, $500 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erősségű folyamatos megvilágítás mellett. **D)** Az algakultúrák klorofilltartalma 6 nap foszformegvonás után és kontroll körülmények között. A kultúrákat Erlenmeyer-lombikokban neveltük, $80 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erősségű folyamatos megvilágítás mellett. A kultúrák kiindulási klorofilltartalmát minden esetben $0,5 \mu\text{g klorofill(a+b)/ml}$ -re állítottuk be. Az ábrán szereplő adatok 4-10 független biológiai ismétlés átlagát mutatják, szórásként a standard hibák (\pm SE) vannak feltüntetve. Az átlagok közötti különbségek szignifikanciáját ANOVA-val határoztuk meg, Tukey post-hoc teszttel. A különböző betűkkel jelölt átlagok szignifikánsan különböznek egymástól ($p < 0,05$).

A CC-1883-as törzset (vad típus) is transzformáltuk a korábban említett konstrukcióval, hogy CrPHT4-7-et túltermelő vonalakat hozzunk létre. Tizenöt véletlenszerűen kiválasztott vonal közül öt szignifikánsan gyorsabb növekedést mutatott a vad típushoz képest, amikor erős fényben neveltük a kultúrákat, amit a magasabb klorofilltartalom bizonyít (26. A ábra). A CrPHT4-7 gén relatív expressziója szignifikánsan megnövekedett a kiválasztott túltermelő vonalakban (26. B ábra). Erős fényben nevelt

vadtípusú és a túltermelő vonalak F_V/F_M értékei nem különböztek szignifikánsan (26. C ábra), ami azt jelzi, hogy a fotoszintetikus apparátus teljesítménye hasonló volt a túltermelő vonalakban és a vadtípusban.



26. ábra A CrPHT4-7 túltermeltetése növeli a vadtípus fénystressz-tűrő képességét. **A)** A vadtípus (CC-1883), a *pht4-7* mutánsok és számos véletlenszerűen kiválasztott CrPHT4-7-et túltermelő vonalak klorofilltartalma. **B)** A *PHT4-7* relatív génexpressziója a CC-1883-ban és a kiválasztott túltermelő vonalakban (OE#3, OE#10, OE#14). **C)** Ugyanazon kultúrákon mért F_V/F_M értékek. A kultúrákat Erlenmeyer-lombikokban, TAP tápoldatban neveltük, 48 órán keresztül, 500 μmol foton $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erősségű folyamatos megvilágítás mellett. A kultúrák kiindulási klorofilltartalmát minden esetben 0,5 μg klorofill(a+b)/ml-re állítottuk be. Az ábrán szereplő adatok 4-17 független biológiai ismétlés átlagát mutatják, szórásként a standard hibák (\pm SE) vannak feltüntetve. Az átlagok közötti különbségek szignifikanciáját ANOVA-val határoztuk meg, Dunnett post-hoc teszttel. A

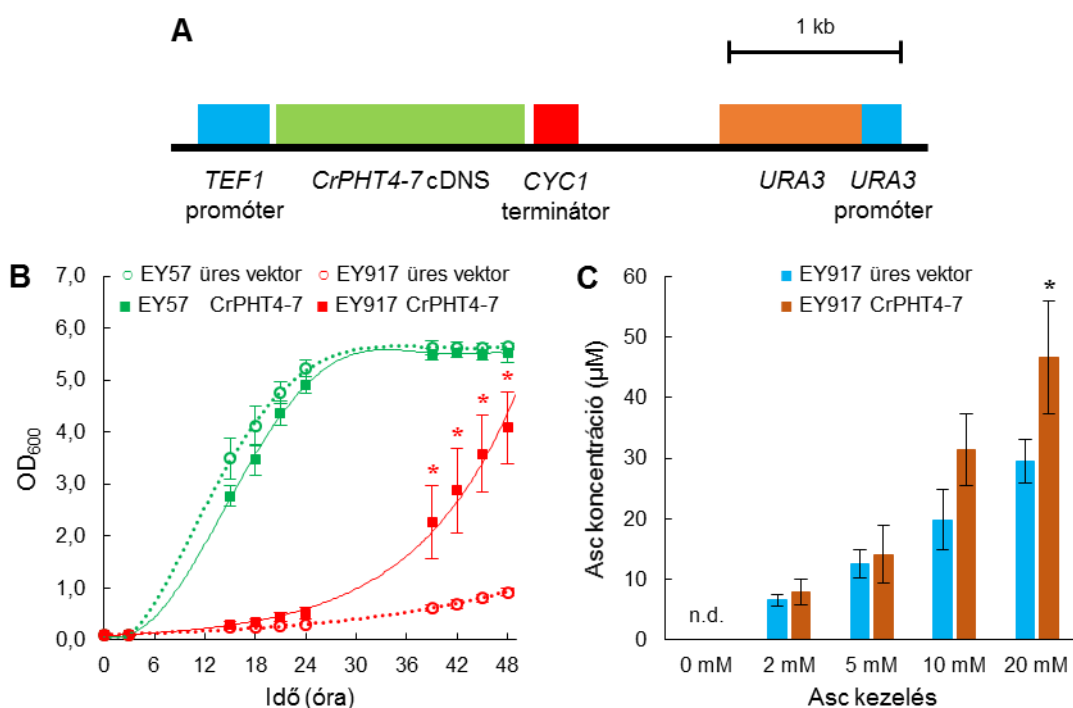
csillagokkal jelölt átlagok szignifikánsan különböznek a kontrollként használt vad típusú (CC-1883) törzs átlagától ($p < 0,05$).

5.1.5. A CrPHT4-7 kifejeztetése foszfát-transzportereket nem tartalmazó élesztőtörzsben

A CrPHT4-7 szubsztrát-specifitásának vizsgálatához az EY917-es élesztőtörzset használtuk, amelyben öt nagy affinitású szerves foszfát-transzporter (PHO84, PHO87, PHO89, PHO90, PHO91) inaktiválva van, és a PHO84 expresszióját a GAL1 promóter szabályozza, lehetővé téve a növekedést galaktóztartalmú tápközegben (Wykoff és O'Shea 2001). Az öt szerves foszfát-transzportert nem tartalmazó EY917-es törzset feltételesen letális fenotípusúnak tekintik, mivel a spórák galaktóz hiányában (vagyis normál, glükóztartalmú táptalajon) nem képesek kicsírázni. Növényi foszfát-transzportereket korábban már sikeresen vizsgáltak szerves foszfát-transzporter hiányos élesztőtörzsek felhasználásával (Wang és mtsai., 2015; Chang és mtsai., 2019). Az EY57-es (vad típus) és EY917-es törzseket a CrPHT4-7 gént tartalmazó p426-TEF plazmiddal transzformáltuk (27. A ábra). Kontrollként az üres vektorral transzformált EY57-es és EY917-es élesztőtörzseket használtuk. A CrPHT4-7 kifejeződésének az élesztőkultúrák növekedésére gyakorolt hatását ezután glükóztartalmú tápoldatban vizsgáltuk. Azt az eredményt kaptuk, hogy a CrPHT4-7-et kifejező élesztőtörzs növekedése jelentősen javult az üres vektorral transzformált EY917-es törzséhez képest. A CrPHT4-7 kifejeztetése a vad típusú EY57-es törzsben nem volt jelentős hatással annak növekedési tulajdonságaira összehasonlítva az üres vektorral transzformált EY57-es törzsszel (27. B ábra). Ezek az adatok azt mutatják, hogy a CrPHT4-7 szerves foszfát-transzporterként működik.

A CrPHT4-7 egy lehetséges aszkorbát-transzporter is, mivel a fehérje nagy hasonlóságot (37,4 %) mutat az AtPHT4;4 aszkorbát-transzporterrel. A fehérje aszkorbát-transzporter aktivitását élesztősejtekben vizsgáltuk. A CrPHT4-7-et és az üres vektort kifejező élesztőtörzseket 2, 5, 10 és 20 mM aszkorbát jelenlétében 15 percig inkubáltuk. A kontroll tenyészetek nem tartalmaztak aszkorbátot (27. C ábra). Ez az eredmény összhangban van azokkal a korábbi publikációkkal, amelyek szerint az élesztősejtek nem tartalmaznak aszkorbátot, hanem helyette eritroaszkorbátot (Spickett és mtsai., 2000). A két legalacsonyabb koncentráció estében (2 és 5 mM) nem volt szignifikáns különbség a kontroll (üres vektorral transzformált EY917-es törzs) és a CrPHT4-7-et kifejező élesztőtörzsek között (27. C ábra). 10 és 20 mM-os aszkorbát koncentrációnál a CrPHT4-7-et kifejező

törzsben a felvétel fokozottabb volt, mint a kontroll törzsben. Az intracelluláris aszkorbát koncentráció azonban csak kb. 20-50 μM volt (27. C ábra), ami a tápoldatban található aszkorbát koncentrációjának csupán a kb. 0,2 %-a. Ez azt mutatja, hogy az élesztősejtek aszkorbátfelvétele nagyon mérsékelt és a CrPHT4-7 jelenléte csak kismértékben képes ezt növelni. Itt érdemes megemlíteni, hogy a *C. reinhardtii* sejtekben az aszkorbát koncentrációja 0,1-1 mM-os tartományban van normál nevelési körülmények esetén (Vidal-Meireles és mtsai., 2017; 17. A ábra), ami valószínűtlenné teszi, hogy a CrPHT4-7 jelentősen hozzájáruljon a kloroplasztisz aszkorbát-ellátásához *C. reinhardtii*-ban. Ezek az adatok összhangban vannak a *Chlamydomonas* sejtekkel kapott eredményeinkkel (17. B ábra) és azt jelzik, hogy a CrPHT4-7 nem járul hozzá jelentősen az aszkorbát-transzporthoz.



27. ábra A CrPHT4-7 transzporter kifejeztetése élesztőtörzsekben. **A)** A p426-TEF-CrPHT4-7 plazmid térképe. **B)** Üres vektorral vagy *CrPHT4-7* cDNS szekvenciáját tartalmazó vektorral transzformált EY57-es és EY917-es (foszfát-transzporter hiányos) *S. cerevisiae* törzsek növekedési fenotípusa. **C)** Üres vektorral transzformált és *CrPHT4-7*-et kifejező EY917-es törzsek aszkorbátfelvétele. Az élesztő kultúrákat 0, 2, 5, 10 és 20 mM aszkorbáttal inkubáltuk 15 percig. Az ábrán szereplő adatok 3-4 független biológiai ismétlés átlagát mutatják, szórásként a standard hibák (\pm SE) vannak feltüntetve. Az átlagok közötti különbségek szignifikanciáját Welch-féle párosítatlan t-próba segítségével határoztuk meg. A csillagokkal jelölt átlagok szignifikánsan különböznek a kontrollként használt, üres vektorral transzformált törzs átlagától ($p < 0,05$).

5.2. A CrPHT4-3 transzporter jellemzése

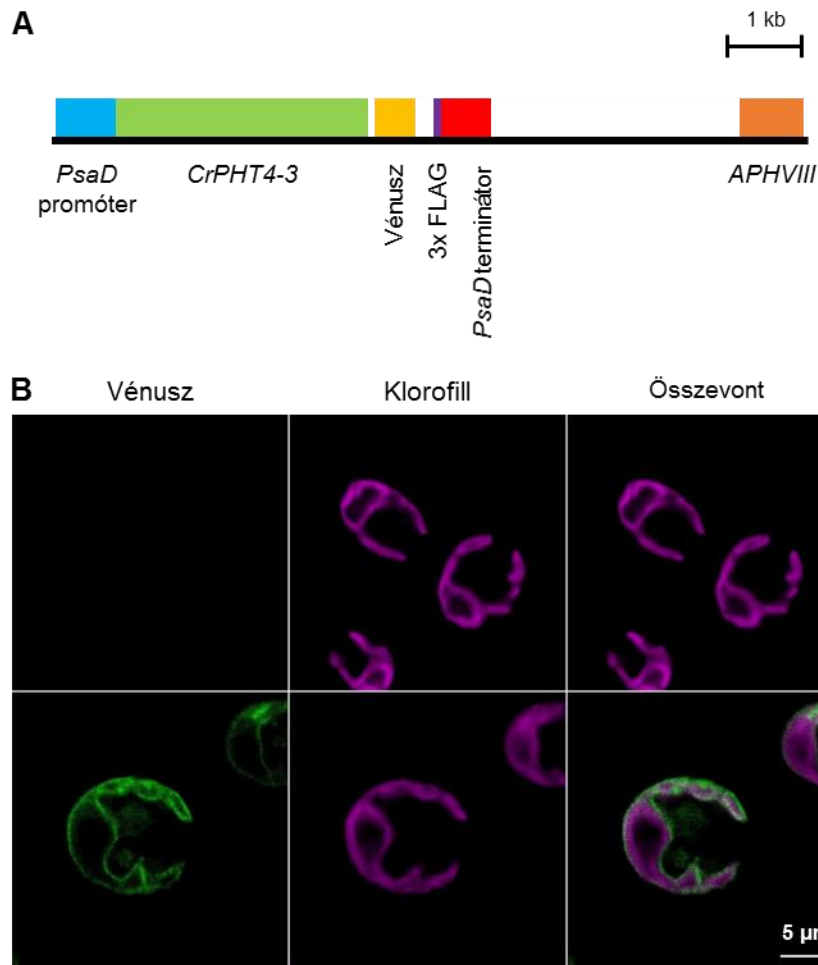
5.2.1. A CrPHT4-3 a kloroplasztisz burkolómembránjában helyezkedik el

A CrPHT4-3 is a PHT4-es transzporterek családjába tartozik, és szintén hasonlóságot mutat az SLC17A transzporterekkel (állati sejtekben azonosított, nátrium-függő, szervesen foszfát kotranszporterek). A CrPHT4-3 41,3 %-os hasonlóságot mutat az *Arabidopsis thaliana*-ban található AtPHT4;4-gyel (AT4G00370), ami a kloroplasztiszban található aszkorbát-transzporter. A PHT4 fehérjecsalád többi tagjához, nevezetesen az AtPHT4;1-hez, 4;2-höz, 4;3-hoz, 4;5-höz és a 4;6-hoz körülbelül 35-39 %-ban hasonlít (a Phytozome 13-as verziója szerint). Az aminosav-szekvencia illesztések az 1. mellékletben találhatók.

Arabidopsis-ban az AtPHT4 transzporterek a kloroplasztisz burkolómembránjában, a tilakoid membránokban és a Golgi-készülékben helyezkednek el (Fabiańska és mtsai., 2019). A különböző előrejelző algoritmusok nem adnak egyértelmű választ arra vonatkozóan, hogy a CrPHT4-3 a sejten belül hol található.

A DeepLoc 1.0 (Thumhuri és mtsai., 2022) szerint a CrPHT4-3 a kloroplasztiszban helyezkedik el. Ezzel szemben a ChloroP 1.1 (Emanuelsson és mtsai., 1999) azt jelzi, hogy a CrPHT4-3 nem a kloroplasztiszban található. A LocTree 3 (Goldberg és mtsai., 2014) szerint az érett fehérje a Golgi-készülékben helyezkedik el. Wang és munkatársainak *in silico* analízise (2020) azt valószínűsíti, hogy a CrPHT4-3 a kloroplasztiszban lokalizálódik. A közelmúltban kifejlesztett PB-Chlamy fehérje-előrejelző program szintén azt mutatja, hogy a CrPHT4-3 a kloroplasztiszban található (Wang és mtsai., 2023).

A CrPHT4-3 sejten belüli elhelyezkedésének meghatározásához a CrPHT4-3-at Vénusz fluoreszcens markerrel jelöltük meg a C-terminális végén, majd az így kapott konstrukciót (pLM005-CrPHT4-3; 28. A ábra) bejuttattuk a CC-4533 törzsbe (más néven cMJ030). A transzformált CC-4533-as törzsben kimutatható volt a Vénusz jelölt CrPHT4-3 fehérje fluoreszcens jele (28. B ábra). A Vénusz-jelöléssel ellátott CrPHT4-3 és a klorofill-a autofluoreszcenciájának egyesített képe (28. B ábra) alapján a CrPHT4-3 a kloroplasztisz burkolómembránjában helyezkedik el.

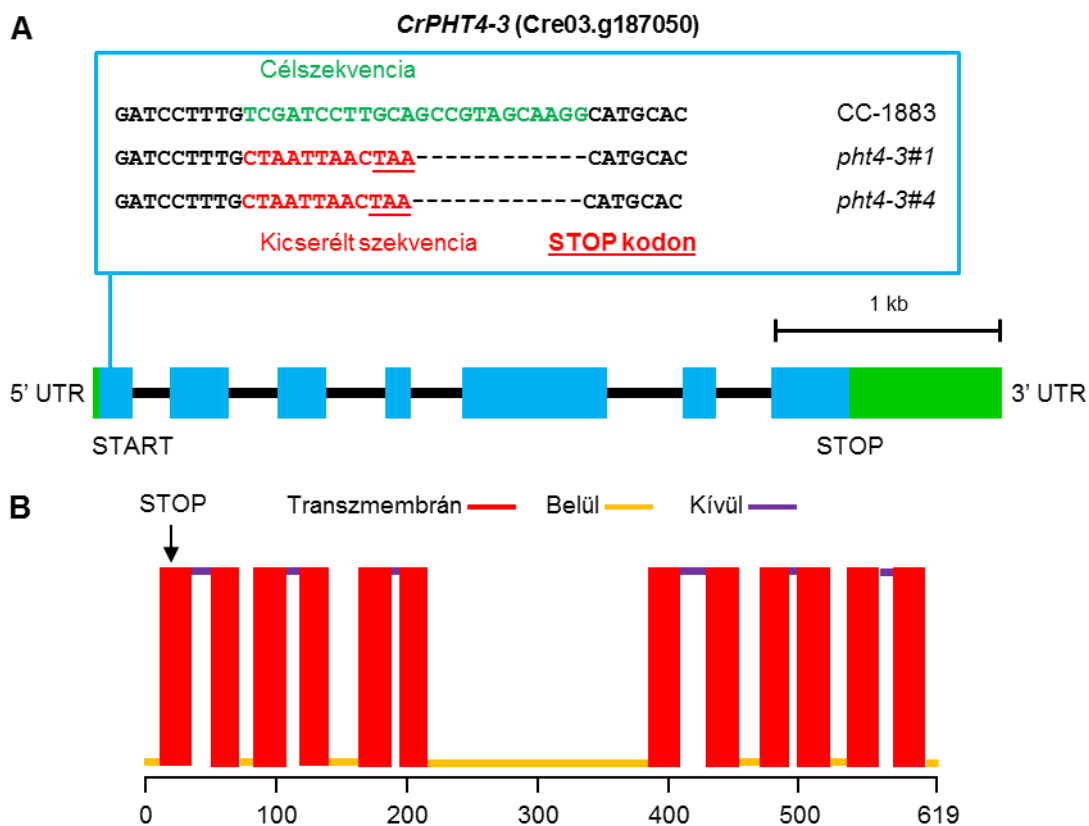


28. ábra A CrPHT4-3 a kloroplasztisz burkolómembránjában található. **A)** A pLM005-CrPHT4-3 plazmid térképe, amiről Vénusz fluoreszcens fehérjével jelölt CrPHT4-3 kifejeződik. **B)** Reprezentatív fluoreszcens mikroszkópos képek CC-4533-as (más néven cMJ030) törzsről (felső sor) és a pLM005-CrPHT4-3-at kifejező CC-4533-as törzsről (alsó sor). A Vénusz fluoreszcenciát 520 és 540 nm között, a klorofill autofluoreszcenciát pedig 650 és 750 nm között detektáltunk. Az összevont (Vénusz fluoreszcencia + klorofill autofluoreszcencia) képek a jobboldali oszlopban láthatók. A méretskála az összes képen 5 μm.

5.2.2. A CrPHT4-3 szükséges a növekedéshez, különösen erős fényel történő megvilágítás esetén

A CrPHT4-7 élettani szerepének megállapítása céljából *pht4-3* funkcióvesztéses mutánsokat vizsgáltunk, amelyeket CRISPR/Cas12a által közvetített genomszerkesztéssel kérésünkre az edinburgh-i egyetemen Dr. Molnár Attila és kutatócsoportja hozta létre, és bocsájtotta a rendelkezésünkre (Ferenczi és mtsai., 2017). A folyamat során a *CrPHT4-3* gén kódoló szekvenciájába juttatott korai stop kodon jelenlétét szekvenálással ellenőriztük

(29. A ábra). A *CrPHT4-3* első exonjában található stop kodon megakadályozza szinte a teljes fehérje transzlációját (29. B ábra). Következésképpen a *pht4-3* mutánsok minden valószínűség szerint a CrPHT4-3 fehérjét nem képesek kifejezni. A mutánsok genotipizálását követően a rendelkezésünkre álló három független mutáns közül kiválasztottunk kettőt, nevezetesen a *pht4-3#1* és *pht4-3#4* vonalakat és a részletes élettani méréseket ezekkel végeztük.

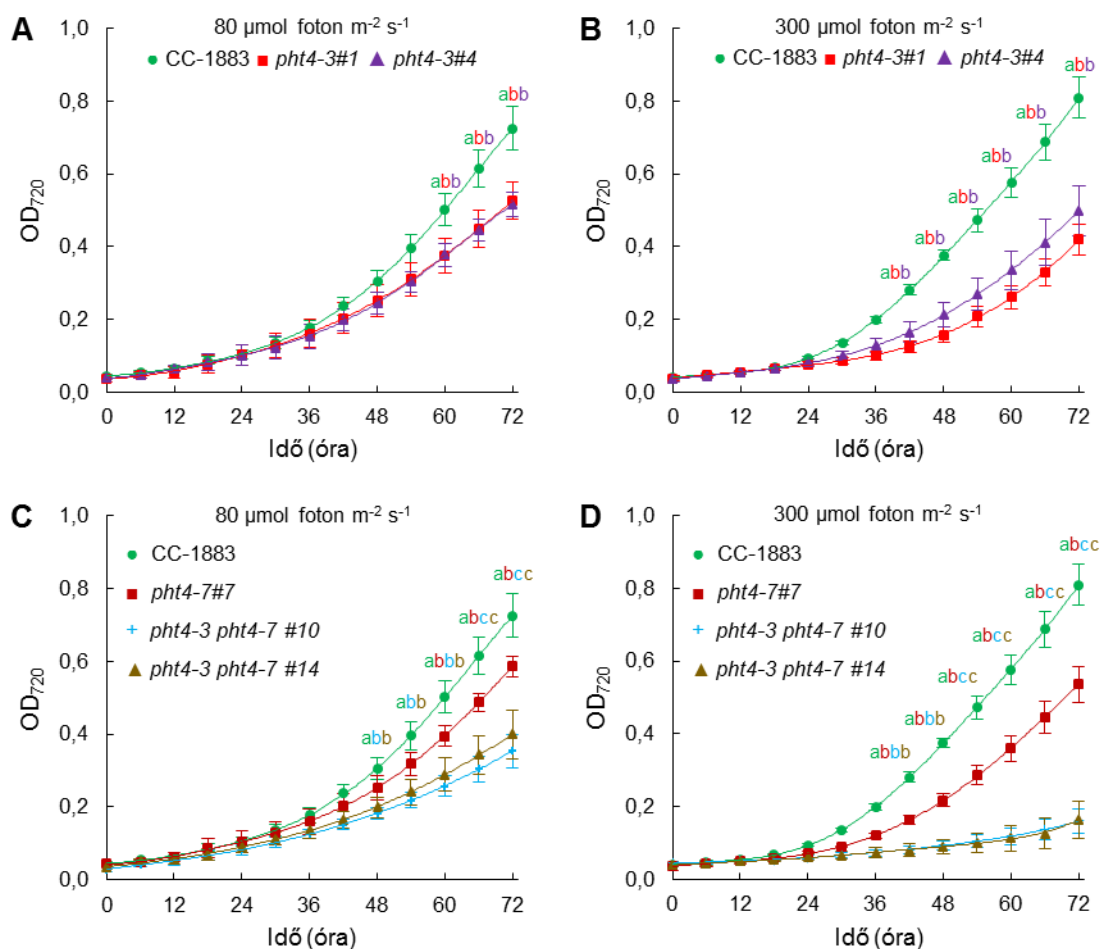


29. ábra A CRISPR/Cas12a technikával előállított *pht4-3* mutánsok genotípusa. **A)** A *CrPHT4-3* fizikai térképe (a Phytozome 13-as verziója alapján). A *pht4-3#1* és *pht4-3#4* mutánsok első exonjába egy korai stop kodon lett beépítve. Az exonokat kék négyzetek, az intronokat fekete vonalak, az 5' és 3' UTR régiókat pedig zöld négyzetek jelölik. **B)** A CrPHT4-3 transzmembrán héliceinek előrejelzése a Deep TMHMM online program 1.0.24-es verziójával történt. A predikció alapján a korai stop kodon beépítése megakadályozza a transzmembrán hélixek transzlációját.

A *pht4-3* mutánsok létrehozásával párhuzamosan *pht4-3 pht4-7* dupla mutánsokat is létrehoztak számunkra. Ezek tartalmazzák a *pht4-3#1* és a *pht4-7#7* mutánsokban található genetikai módosításokat, tehát igen nagy valószínűséggel sem a CrPHT4-3, sem pedig a CrPHT4-7 transzportert nem fejezik ki. A szekvenálással ellenőrzött dupla mutáns vonalak

közül is véletlenszerűen kiválasztottunk két független vonalat, nevezetesen a *pht4-3 pht4-7 #10* és a *pht4-3 pht4-7 #14* vonalakat és ezeken is részletes élettani méréseket végeztünk.

Jelentős különbséget figyeltünk meg a biomassza felhalmozódásban (az OD₇₂₀ alapján) a vad típus és a *pht4-3* mutáns vonalak között, amikor normál fényben (80 µmol foton m⁻² s⁻¹) neveltük a kultúrákat (30. A ábra). Ez a különbség még nagyobb lett erős fényben (300 µmol foton m⁻² s⁻¹; 30. B ábra). A duplamutánsok még lassabb növekedési fenotípust mutattak normál fényben (80 µmol foton m⁻² s⁻¹; 30. C ábra) és a sejtosztódásuk erős fényben (300 µmol foton m⁻² s⁻¹; 30. D ábra) drasztikusan lelassult.



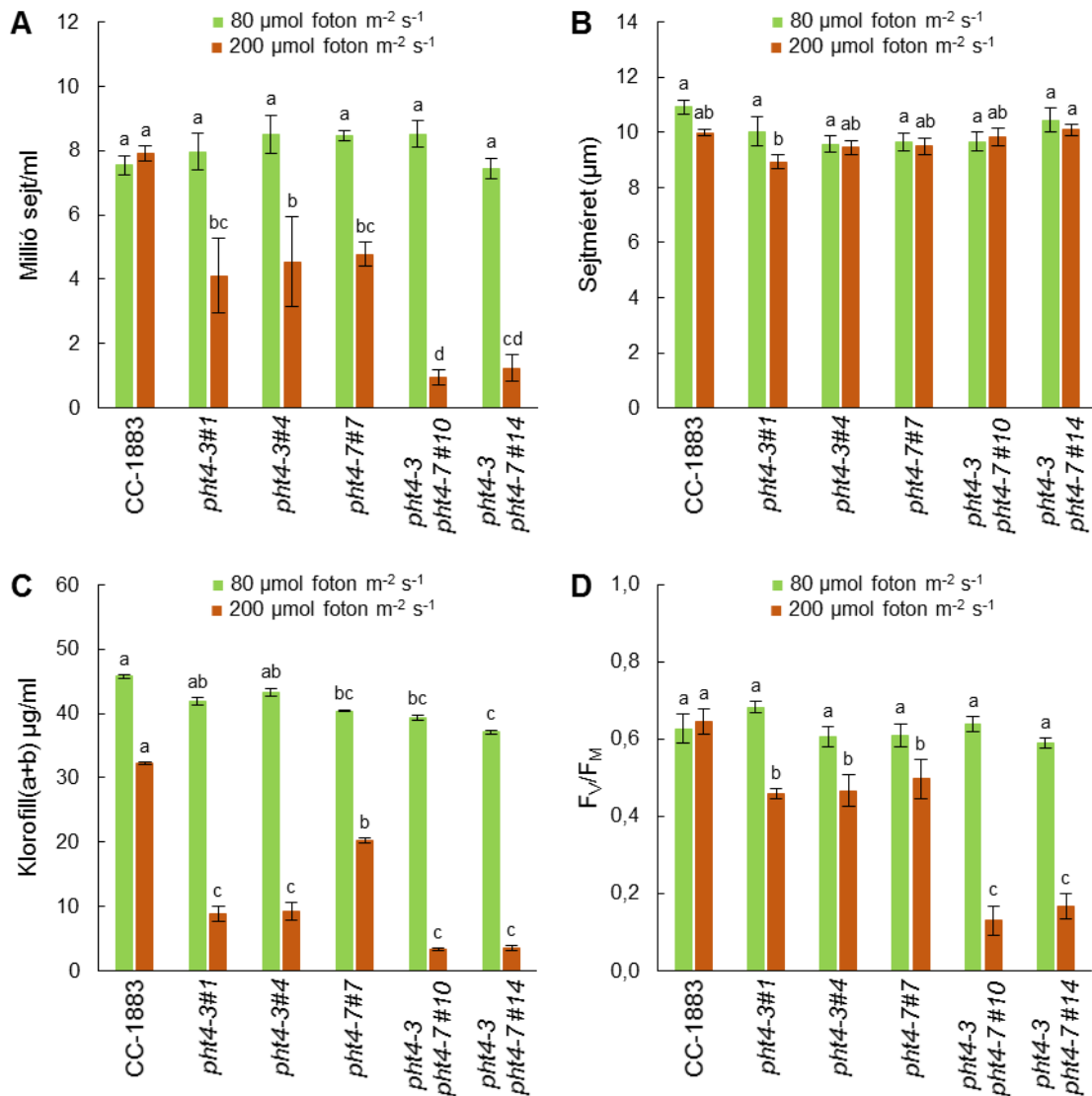
30. ábra A *pht4-3* mutánsok növekedési fenotípusa. **A)** A vad típus (CC-1883) és a *pht4-3* mutánsok növekedése 80 µmol foton m⁻² s⁻¹ erősségű folyamatos megvilágítás mellett. **B)** A vad típus (CC-1883) és a *pht4-3* mutánsok növekedése 300 µmol foton m⁻² s⁻¹ erősségű folyamatos megvilágítás mellett. **C)** A vad típus (CC-1883), a *pht4-7#7* mutáns és a dupla mutánsok növekedése 80 µmol foton m⁻² s⁻¹ erősségű folyamatos megvilágítás mellett. **D)** A vad típus (CC-1883), a *pht4-7#7* mutáns és a dupla mutánsok növekedése 300 µmol foton m⁻² s⁻¹ erősségű folyamatos megvilágítás mellett. Az algakultúrákat TAP tápoldatban, 23 °C-on neveltük, 72 órán keresztül, Multi-Cultivator

fotobioreaktorban, légköri levegővel buborékoltatva a tenyészeteket. A kultúrák kiindulási klorofilltartalmát minden esetben 0,5 µg klorofill(a+b)/ml-re állítottuk be. Az ábrán szereplő adatok 3-8 független biológiai ismétlés átlagát mutatják, szórásként a standard hibák (\pm SE) vannak feltüntetve. Az átlagok közötti különbségek szignifikanciáját ANOVA-val határoztuk meg, Tukey post-hoc teszttel. A különböző betűkkel jelölt átlagok szignifikánsan különböznek egymástól ($p < 0,1$).

Annak érdekében, hogy megfelelő mennyiségű biomassza álljon rendelkezésünkre a részletes élettani mérések levégzéséhez, a további kísérletekhez az alगतörzseket Erlenmeyer-lombikban neveltük, három napon át, 80 és 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fotonáram-sűrűségű folyamatos megvilágítás mellett. Ahogyan az a fotobioreaktorban végzett kísérletek eredményei alapján várható volt, a sejtszám és a klorofilltartalom szignifikánsan alacsonyabb volt a *pht4-3* szimpla és a *pht4-3 pht4-7* dupla mutánsokban a vad típusban mért értékekhez képest 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fotonáram-sűrűségű megvilágítás esetén (32. A és C ábrák). A mutánsok és a vad típus sejtméretei nagyon hasonlóak voltak normál és erős fényben nevelt sejt kultúrákban is (32. B ábra).



31. ábra A kísérletek során használt mutánsokról, valamint a vad típusról (CC-1883) készített fénykép. A kultúrákat Erlenmeyer-lombikokban, TAP tápoldatban neveltük, 72 órán keresztül, 200 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erősségű folyamatos megvilágítás mellett.



32. ábra Erlenmeyer-lombikban nevelt mutánsok élettani paramétereit 3 nap nevelés után. **A)** Sejtszám mérések eredményei. **B)** A vad típus (CC-1883), a *phl4-3* és *phl4-7* mutánsok, valamint a dupla mutánsok sejtméretei. **C)** Az algakultúrák klorofilltartalma. **D)** F_v/F_M értékek. A kultúrákat Erlenmeyer-lombikokban, TAP tápoldatban neveltük, 72 órán keresztül, 80 és 200 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erősségű folyamatos megvilágítás mellett. A kultúrák kiindulási klorofilltartalmát minden esetben 0,5 μg klorofill(a+b)/ml-re állítottuk be. Az ábrán szereplő adatok 3-5 független biológiai ismétlés átlagát mutatják, szórásként a standard hibák (\pm SE) vannak feltüntetve. Az átlagok közötti különbségek szignifikanciáját ANOVA-val határoztuk meg, Tukey post-hoc teszttel. A különböző betűkkel jelölt átlagok szignifikánsan különböznek egymástól ($p < 0,1$).

Az F_v/F_M érték, amely a PSII fotokémiai hatékonyságának indikátora (Schansker és mtsai., 2014; Sipka és mtsai., 2021), körülbelül 0,60-0,68 volt minden normál fényben nevelt vonalban (32. D ábra). Erős fényben a vad típusban mért F_v/F_M értéke körülbelül 0,65

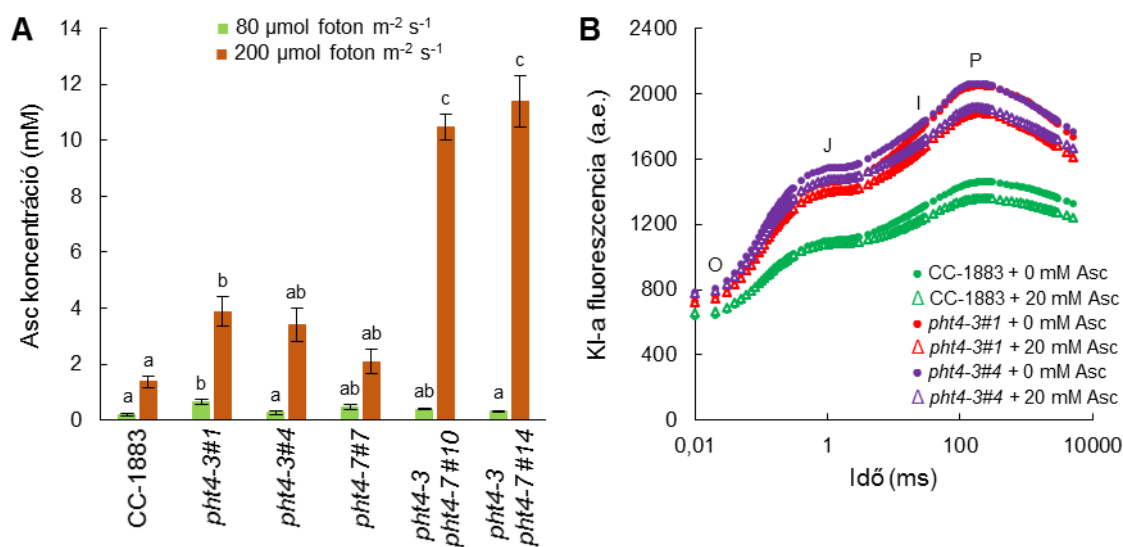
volt, ami arra utal, hogy fotoszintetikus elektrontranszport megfelelő hatékonysággal működik. A *pht4-3* mutánsokban a fotoszintézis hatékonysága szignifikánsan alacsonyabb volt (körülbelül 0,45), mint a vad típusú törzsben. A *pht4-3 pht4-7* dupla mutánsok F_v/F_m értékei 0,13-0,16 körül voltak, ami a fotoszintetikus elektrontranszport gátlására és fotoinhibícióra utal (32. D ábra). Ezekből az adatokból arra a következtetésre jutottunk, hogy a CrPHT4-3 szükséges a sejtek stressztűrő képességének fenntartásához, különösen erős fénytel történő megvilágítás esetén. A dupla mutánsokkal kapott eredmények arra engednek következtetni, hogy a CrPHT4-3 és a CrPHT4-7 fehérje hasonló szerepet tölt be, ugyanis mindkét fehérje funkcióvesztéses mutációja esetén a szimpla mutánsokon megfigyelt fenotípusok drámai módon felerősödnek.

5.2.3. A CrPHT4-3 szubsztrát-specifitása

Mivel a CrPHT4-3 aminosav szekvenciája szintén hasonlóságot mutat az AtPHT4;4 aszkorbát-transzporterével, ezért úgy döntöttünk, hogy az aszkorbát metabolizmussal és funkcióival kapcsolatos vizsgálatokat végzünk. Az aszkorbát koncentrációja körülbelül 0,2 mM volt a CC-1883-as törzsben, amikor $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fotonáram-sűrűségű megvilágítást használtunk (33. A ábra). A *pht4-3* mutánsokban az aszkorbát koncentrációja körülbelül 0,3-0,6 mM, a *pht4-3 pht4-7* dupla mutánsokban pedig körülbelül 0,3-0,4 mM volt (33. A ábra). $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fotonáram-sűrűségű megvilágítás esetén az aszkorbát tartalom hat- tizenkettőszeresére nőtt a *pht4-3* mutánsokban. Még ennél is nagyobb, körülbelül harmincszoros növekedést figyeltünk meg mindkét *pht4-3 pht4-7* dupla mutánsban, elérve a körülbelül 10 mM-os aszkorbát koncentrációt a sejtekben (33. A ábra).

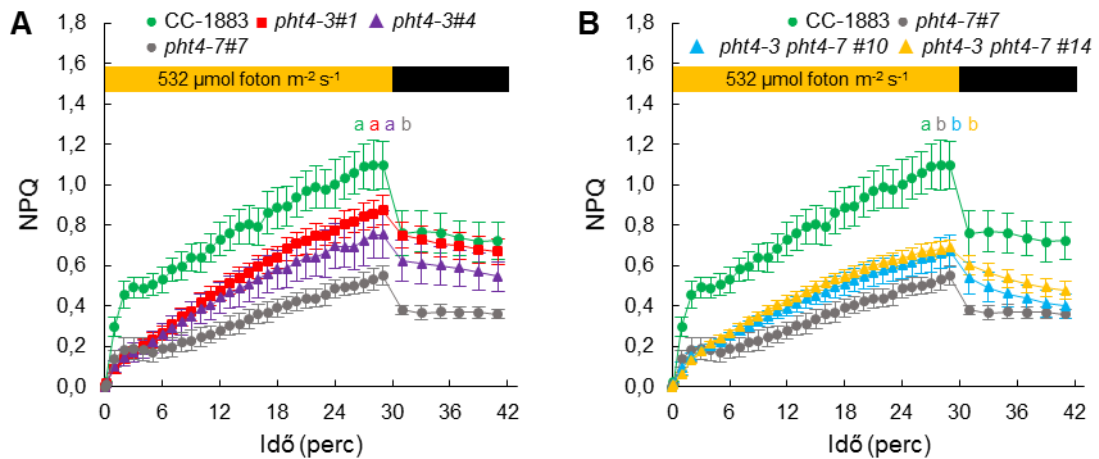
Ezt követően az aszkorbátkezelés hatását vizsgáltuk a gyors klorofill-a fluoreszcencia kinetikájára. Ahogyan korábban említésre került, magas koncentrációk esetén az aszkorbát inaktiválhatja a *C. reinhardtii* vízbontó komplexét, ami csökkenti a változó klorofill-a fluoreszcenciát (Nagy és mtsai., 2016; Nagy és mtsai., 2018). Feltételeztük, hogy ha a CrPHT4-3 aszkorbát-transzporterként működik a kloroplasztisz burkolómembránjában, akkor hiányában az aszkorbát bejutása a kloroplasztiszba kevésbé hatékony, következésképpen az aszkorbátkezelés során az OEC kevésbé károsodna. Ahogy az várható volt, a 20 mM-os aszkorbátkezelés a változó klorofill-a fluoreszcencia csökkenését eredményezte, normál fényben nevelt kultúrákban, de nem volt jelentős különbség a vad típus és a *pht4-3* mutánsok között (33. B ábra). Ez az eredmény azt jelzi, hogy a CrPHT4-

3 – hasonlóan a CrPHT4-7-hez – nem vesz részt az aszkorbát kloroplasztiszba történő szállításában.



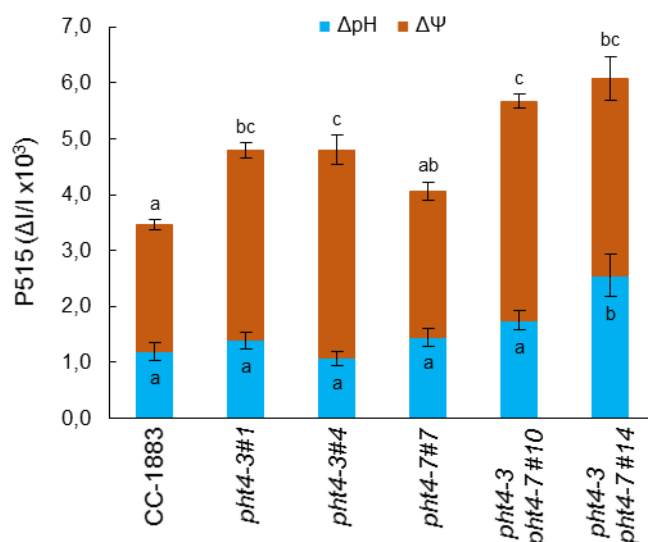
33. ábra A *pht4-3* mutánsokban nagymértékű aszkorbát felhalmozódás figyelhető meg erős fényben, ami nem befolyásolja a kloroplasztisz aszkorbátfelvételét. **A**) A vadtípus (CC-1883), a *pht4-3* mutánsok, a *pht4-7#7* mutáns és a dupla mutánsok aszkorbáttartalma 3 napos nevelést követően 80 és 200 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erősségű folyamatos megvilágítás mellett. **B**) Gyors klorofill-a fluoreszcencia (OJIP) tranziensek aszkorbátkezelte (20 mM) és kezeletlen vadtípusban (CC-1883) és a *pht4-3* mutánsokban. A görbék 5 független mérés átlagai. A kultúrákat Erlenmeyer-lombikokban, TAP tápoldatban neveltük. Az **A**) panelen szereplő adatok 4-5 független biológiai ismétlés átlagát mutatják, szórásként a standard hibák (\pm SE) vannak feltüntetve. Az átlagok közötti különbségek szignifikanciáját ANOVA-val határoztuk meg, Tukey post-hoc teszttel. A különböző betűkkel jelölt átlagok szignifikánsan különböznek egymástól ($p < 0,1$).

Erős fényben nevelt *pht4-3* mutánsokban az NPQ jelentősen csökkent a vadtípushoz képest (34. A ábra), *pht4-3 pht4-7* dupla mutánsokban a csökkenés mértéke pedig még nagyobb volt (34. B ábra). Mivel a kloroplasztiszban kialakuló aszkorbáthiány hatására az NPQ emelkedése figyelhető meg, a qI növekedése miatt (Vidal-Meireles és mtsai., 2020), ezért ez az eredmény arra utal, hogy az aszkorbát kloroplasztiszba történő szállítása a *pht4-3* mutánsokban és a dupla mutánsokban is változatlan a vadtípushoz képest.



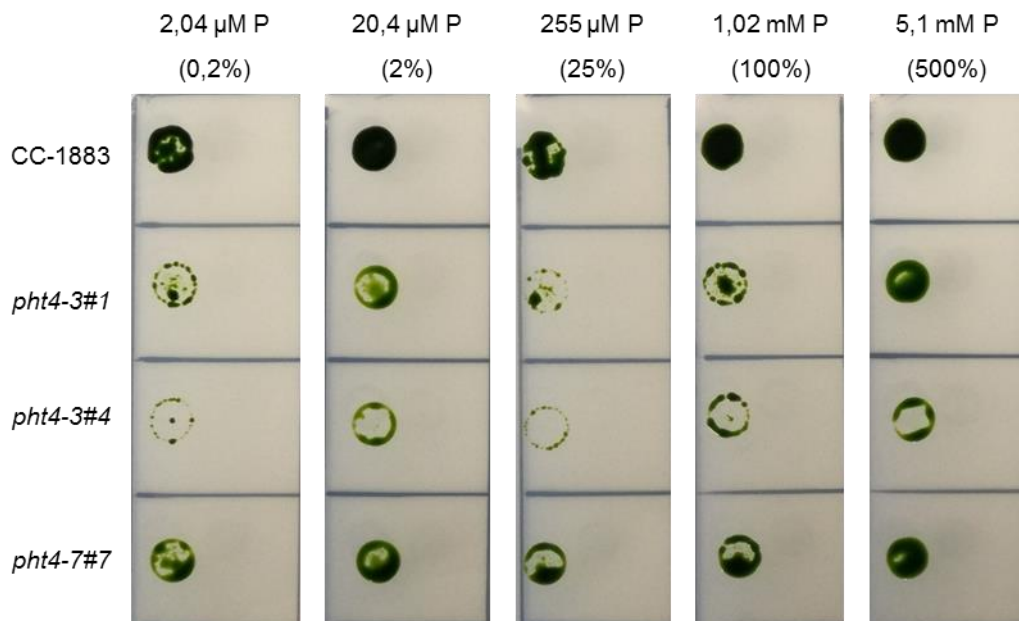
34. ábra A CrPHT4-3 hiánya megváltoztatja a nem-fotokémiai kioltást. **A)** 200 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erősségű folyamatos megvilágítás mellett nevelt *pht4-3* mutánsok NPQ értékei. **B)** 200 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erősségű folyamatos megvilágítás mellett nevelt dupla mutánsok NPQ értékei. Az NPQ indukciójához 30 perc hosszú, 532 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erősségű folyamatos megvilágítást használtunk, amit 12 perces sötétadaptáció követett, megszakítva 3000 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erősségű telítési fényimpulzusokkal. A kultúrákat Erlenmeyer-lombikokban, TAP tápoldatban neveltük, 72 órán keresztül. Az ábrán szereplő adatok 4-5 független biológiai ismétlés átlagát mutatják, szórásként a standard hibák (\pm SE) vannak feltüntetve. Az átlagok közötti különbségek szignifikanciáját a fényszakasz végén ANOVA-val határoztuk meg, Tukey post-hoc teszttel. A különböző betűkkel jelölt átlagok szignifikánsan különböznek egymástól ($p < 0,1$).

A kloroplasztisz ATP termelését a transz-tilakoid protonmozgató erő (pmf) hajtja, ami ΔpH -ként és membránpotenciálként ($\Delta\Psi$) tárolódik (Cruz és mtsai., 2005). A kloroplasztisz szervesetlen foszfát koncentrációjának csökkenése, ezáltal az ATP termelés csökkenése (Carstensen és mtsai., 2018) várhatóan megnövekedett pmf-hez vezet a tilakoid membránon keresztül (Cruz és mtsai., 2005). Amint a 35. ábrán látható, a teljes pmf mindkét *pht4-3* mutánsban fokozódott, amikor normál fényben neveltük őket, ami alátámasztja ezt a feltételezést. A növekedés mértéke a dupla mutánsok esetében még erőteljesebb volt. A teljes pmf növekedésének hátterében legfőképpen a membránpotenciál ($\Delta\Psi$) növekedése áll, ami szignifikánsan nagyobb a *pht4-3* szimpla és a dupla mutánsokban is.

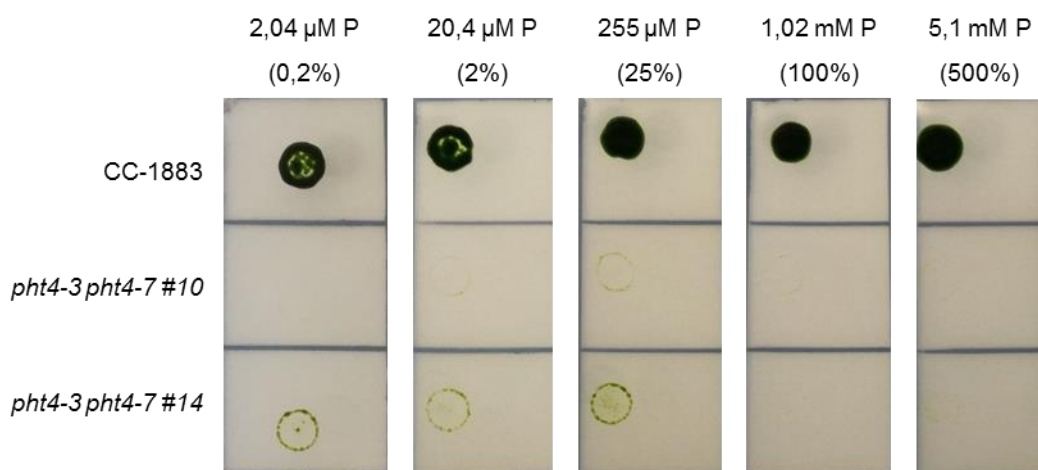


35. ábra A teljes protonmozgató erő változása a CrPHT4-3 hiányában. Az egyes komponenseket (ΔpH és $\Delta \Psi$) az 515 nm-en mért abszorbanca változása alapján az 535 nm-es referencia hullámhosszhoz képest, $\Delta I/I$ egységekben kifejezve ábrázoltuk. A kultúrákat Erlenmeyer-lombikokban, TAP tápoldatban neveltük, 72 órán keresztül, $80 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ erősségű folyamatos megvilágítás mellett. Az ábrán szereplő adatok 10-15 független biológiai ismétlés átlagát mutatják, szórásként a standard hibák (\pm SE) vannak feltüntetve. Az átlagok közötti különbségek szignifikanciáját ANOVA-val határoztuk meg, Tukey post-hoc teszttel. A különböző betűkkel jelölt átlagok szignifikánsan különböznek egymástól ($p < 0,1$).

Következő lépésként a mutánsok foszformegvonással szembeni érzékenységet vizsgáltuk. Csepptesztet végeztünk, szervesetlen foszfort különböző koncentrációkban ($2,04 \mu\text{M}$ - 0,2 %; $20,4 \mu\text{M}$ - 2 %; $255 \mu\text{M}$ - 25 %; $1,02 \text{ mM}$ - 100 % és $5,1 \text{ mM}$ - 500 %) tartalmazó TAP táplemezekben. Eredményeink azt mutatják, hogy a *pht4-3* mutáns vonalak növekedése jelentősen lelassult a vadtypushoz képest, függetlenül a tápközeg foszfortartalmától (36. ábra). A dupla mutánsok esetében még lassabb növekedést figyeltünk meg (37. ábra). A *pht4-3* mutánsok lassú növekedési fenotípusát kismértékben sikerült helyreállítanunk, amikor a tápközeg foszfortartalmát ötszörösére ($5,1 \text{ mM}$) növeltük. Megjegyzendő, hogy a TAP tápközeg foszfortartalma igen magas, ugyanis a vadtypus már $2,04 \mu\text{M}$ (0,2 %) foszfortartalmú táplemezen is képes a normál sebességű sejtosztódásra (36. és 37. ábrák).



36. ábra A *pht4-3* és *pht4-7* mutánsok, valamint a vad típus (CC-1883) növekedési tesztje különböző mennyiségű foszfort tartalmazó TAP agarlemezeken. A képek 5 nappal a ráoltás után készültek.

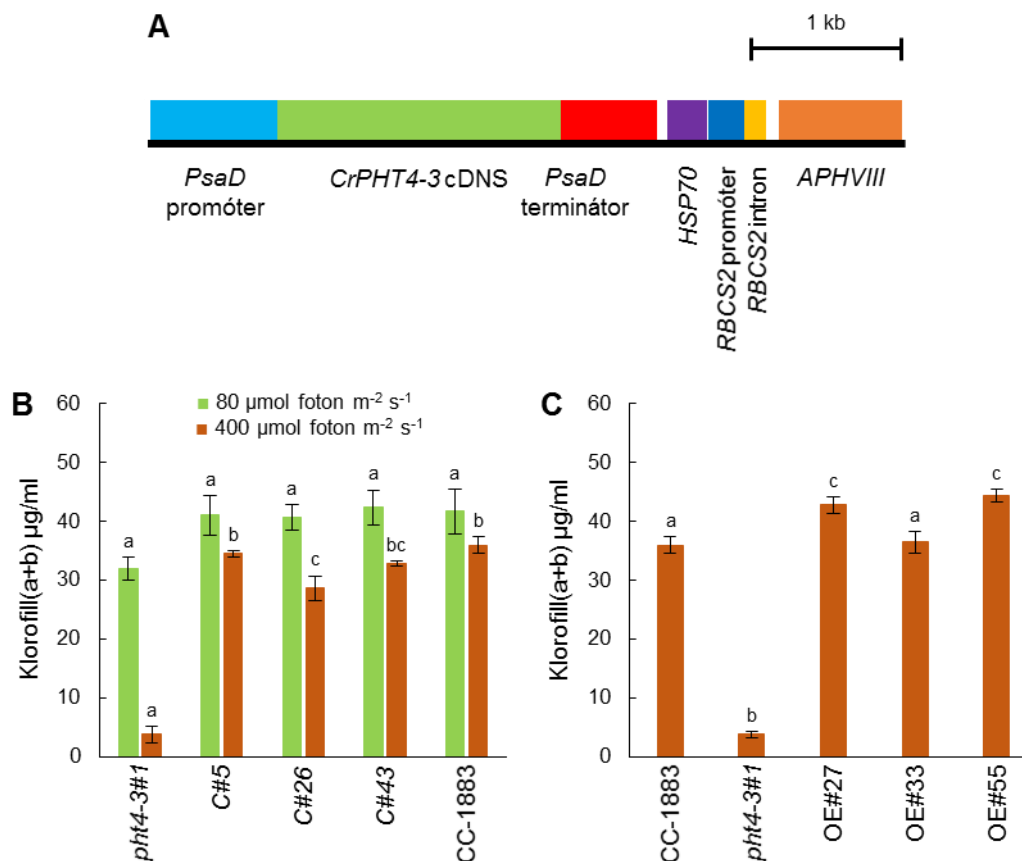


37. ábra A vad típus (CC-1883) és a *pht4-3 pht4-7* dupla mutánsok növekedési tesztje különböző mennyiségű foszfort tartalmazó TAP agarlemezeken. A képek 5 nappal a ráoltás után készültek.

5.2.4. Genetikai komplementáció és a CrPHT4-3 túltermeltetése

A megfigyelt fenotípusok és a CrPHT4-3-at érintő mutáció közötti kapcsolat megerősítése céljából genetikai komplementációs kísérleteket végeztünk. A CrPHT4-3 teljes hosszúságú cDNS-ét a *PSAD* gén promotor és terminátor szekvenciája közé klónoztuk, majd a *pht4-3#1* mutánszt ezzel a konstrukcióval transzformáltuk (38. A ábra). A komplementációval képesek voltunk helyreállítani a *pht4-3#1* mutánsra jellemző lassú

növekedési fenotípust. Erős fényben ($400 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$) nevelt kultúrák esetében a helyreállított növekedési fenotípus a kultúrák szignifikánsan magasabb klorofilltartalmával hozható összefüggésbe (38. B ábra).



38. ábra Genetikai komplementáció és a CrPHT4-3 túltermeltetése. **A)** pJR103 plazmid térképe, ami *PSDA* promóter és terminátor szekvencia között tartalmazza a CrPHT4-3 cDNS szekvenciáját. **B)** A vad típus (CC-1883), a *pht4-3#1* mutáns és a véletlenszerűen kiválasztott komplementált vonalak klorofilltartalma. **C)** A vad típus (CC-1883), a *pht4-3#1* mutáns és a véletlenszerűen kiválasztott CrPHT4-3-at túltermelő vonalak klorofilltartalma. A kultúrákat Erlenmeyer-lombikokban, TAP tápoldatban neveltük, 72 órán keresztül, 80 vagy 400 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erősségű folyamatos megvilágítás mellett. Az ábrán szereplő adatok 3 független biológiai ismétlés átlagát mutatják, szórásként a standard hibák (\pm SE) vannak feltüntetve. Az átlagok közötti különbségek szignifikanciáját ANOVA-val határoztuk meg, Tukey post-hoc teszttel. A különböző betűkkel jelölt átlagok szignifikánsan különböznek egymástól ($p < 0,1$).

A CC-1883-as törzset (vad típus) is transzformáltuk a korábban említett konstrukcióval, hogy CrPHT4-3-at túltermelő vonalakat hozzunk létre. A véletlenszerűen kiválasztott és tesztelt vonalak közül kettő gyorsabb növekedést mutatott a vad típushoz

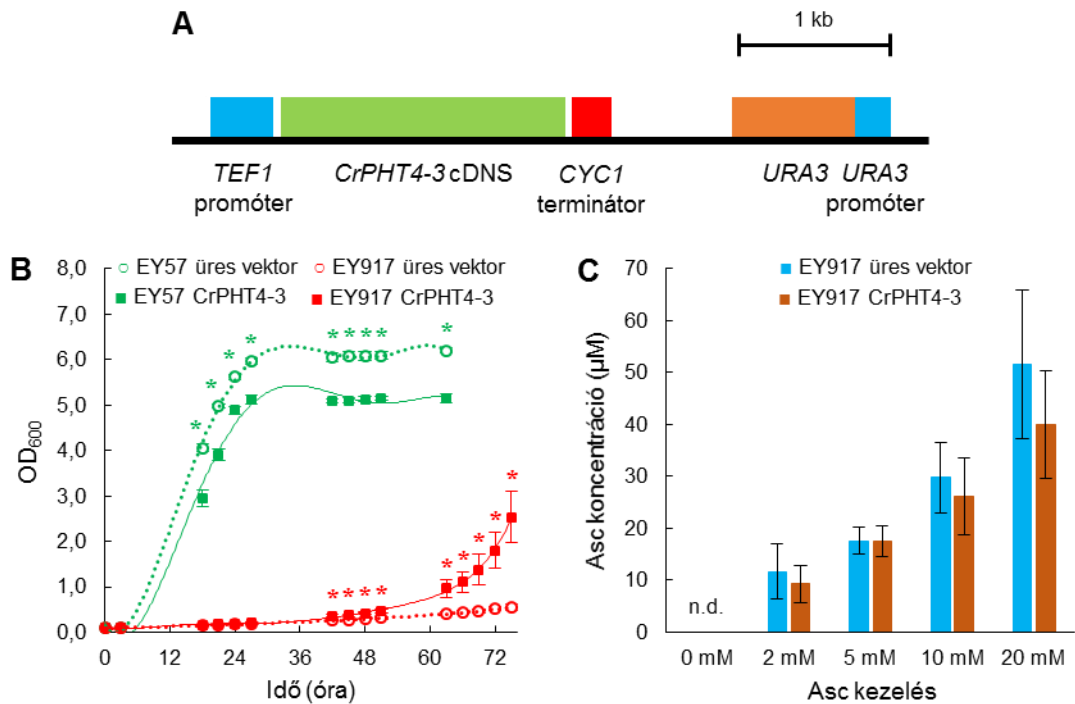
képest, amikor erős fényben ($400 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) neveltük a kultúrákat, amit a szignifikánsan magasabb klorofilltartalom bizonyít (38. C ábra).

5.2.5. A CrPHT4-3 kifejeztetése foszfát-transzportereket nem tartalmazó élesztőtörzsben

A CrPHT4-3 szubsztrát-specifitásának vizsgálatához az EY917-es élesztőtörzset használtuk, amelyben öt nagy affinitású szervesetlen foszfát-transzporter (PHO84, PHO87, PHO89, PHO90, PHO91) inaktiválva van és a PHO84 expresszióját a GAL1 promóter szabályozza, lehetővé téve a növekedést galaktóztartalmú tápközegben (Wykoff és O'Shea 2001).

Az EY57-es (vadtípus) és EY917-es törzseket a CrPHT4-3 gént tartalmazó p426-TEF plazmiddal transzformáltuk (39. A ábra). Kontrollként az üres vektorral transzformált EY57-es és EY917-es élesztőtörzseket használtuk. A CrPHT4-3 kifejeztetésének az élesztőkultúrák növekedésére gyakorolt hatását ezután glükóztartalmú tápoldatban vizsgáltuk. Azt az eredményt kaptuk, hogy a CrPHT4-3-at kifejező élesztőtörzs növekedése jelentősen javult az üres vektorral transzformált EY917-es törzséhez képest (39. B ábra). A CrPHT4-3 kifejeztetése az EY57-es törzsben szignifikánsan lassabb növekedést eredményezett az üres vektorral transzformált EY57-es törzshöz képest (39. B ábra). Ezek az adatok azt mutatják, hogy a CrPHT4-3 szervesetlen foszfát-transzporterként működik.

A CrPHT4-3 egy lehetséges aszkorbát-transzporter is, mivel a fehérje nagy hasonlóságot (41,3 %) mutat az AtPHT4;4 aszkorbát-transzporterrel. A fehérje aszkorbát-transzporter aktivitását élesztősejtekben vizsgáltuk. A CrPHT4-3-at és az üres vektort kifejező élesztőtörzseket 2, 5, 10 és 20 mM aszkorbát jelenlétében 15 percig inkubáltuk. A kontroll tenyészetek nem tartalmaztak aszkorbátot. Egyik aszkorbát koncentráció estén sem volt szignifikáns különbség a kontroll (üres vektorral transzformált EY917-es törzs) és a CrPHT4-3-at kifejező élesztőtörzsek között (39. C ábra). Ezek az adatok összhangban vannak a *Chlamydomonas* sejtekkel kapott eredményeinkkel (33. B ábra) és azt jelzik, hogy a CrPHT4-3 minden valószínűség szerint nem működik aszkorbát-transzporterként.



39. ábra A CrPHT4-3 transzporter kifejeztetése élesztőtörzsekben. **A)** A p426-TEF-CrPHT4-3 plazmid térképe. **B)** Üres vektorral vagy a *CrPHT4-3* cDNS szekvenciáját tartalmazó vektorral transzformált EY57-es és EY917-es (foszfát-transzporter hiányos) *S. cerevisiae* törzsek növekedési fenotípusa. **C)** Üres vektorral transzformált és CrPHT4-3-at kifejező EY917-es törzsek aszkorbátfelvétele. Az élesztő kultúrákat 2, 5, 10 és 20 mM aszkorbáttal inkubáltuk 15 percig. Az ábrán szereplő adatok 3-5 független biológiai ismétlés átlagát mutatják, szórásként a standard hibák (\pm SE) vannak feltüntetve. Az átlagok közötti különbségek szignifikanciáját Welch-féle párosítatlan t-próba segítségével határoztuk meg. A csillagokkal jelölt átlagok szignifikánsan különböznek a kontrollként használt, üres vektorral transzformált törzs átlagától ($p < 0,1$).

6. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

6.1. A CrPHT4-7 transzporter élettani jelentősége

A transzporterek alapvető szerepet játszanak a szerves foszfor felvételében és sejten belüli eloszlásában. *C. reinhardtii* sejt citoplazma membránjában elhelyezkedő szerves foszfát-transzporterek affinitásuk alapján két kategóriába sorolhatóak: vannak kis sebességű, nagy affinitású és nagy sebességű, alacsony affinitású transzporterek. Ezek közül a nagy affinitású transzporterek aktivitása fokozódik foszforhiány során (Plaxton és Lambers, 2015). Ebbe a csoportba tartoznak a H^+/PO_4^{3-} PTA és Na^+/PO_4^{3-} PTB szimporterek (Moseley és mtsai., 2006; Wang és mtsai., 2020; Grossman és Wollman, 2023). A PTA és PTB transzporterek mellett genetikai elemzéssel PHT3 és PHT4 transzportereket is azonosítottak *C. reinhardtii* genomjában (Wang és mtsai., 2020), de ismereteink szerint egyiket sem jellemezték részletesen.

Azt találtuk, hogy a PHT4 transzporter család tagja, a *C. reinhardtii*-ban azonosított CrPHT4-7 a kloroplasztisz burkolómembránjában elhelyezkedő szerves foszfát-transzporter (9. B és 10. ábrák). A *pht4-7* mutánsok lassú növekedést mutattak mixotróf nevelési körülmények között, különösen amikor erős fényben neveltük őket (11. és 13. ábrák). Azonban a lassabb növekedést lehetővé tevő fotoautotróf körülmények között nem tapasztaltunk észrevehető különbséget a vad típus és a *pht4-7* mutánsok között a növekedési sebesség, az NPQ és az F_v/F_m tekintetében (15. ábra). Ezenkívül azt találtuk, hogy a sejtek teljes foszfortartalmát nem befolyásolta a CrPHT4-7 hiánya (19. B ábra) és a tenyészetek extra szerves foszforral való ellátása nem képes helyreállítani a *pht4-7* mutánsok lassú növekedési fenotípusát (20. A ábra). Érdekes módon a foszformegvonás nem okozott erőteljesebb fenotípust a *pht4-7* mutánsokban, mint az erős fénykezelés (16. és 20. ábrák). Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a CrPHT4-7 hiánya csak a kloroplasztisz szerves foszforfelvételét befolyásolta, a teljes sejt szerves foszforfelvételét nem. Gyors növekedést lehetővé tevő körülmények között (mixotróf nevelés TAP tápoldatban) a CrPHT4-7 hiánya szerves foszforhiányt, valamint az ATP koncentráció csökkenését okozza (19. B és C ábrák), korlátozva a Calvin-Benson-Bassham ciklus aktivitását, ezáltal az algakultúrák lassabb növekedését eredményezve, különösen magas fényintenzitáson. Ezzel párhuzamosan a fotoszintetikus elektrontranszport lánc túlzottan redukálttá válik, amint azt a megnövekedett pmf jelzi erős fényben nevelt kultúrák esetében (19. D ábra). Az F_v/F_m érték csökkenése erős fényviszonyok mellett (14. D ábra) arra utal, hogy a túlredukált

elektrontranszport lánc mellett a PSII aktivitása is gátolt. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a CrPHT4-7 döntő szerepet játszik a kloroplasztisz megfelelő szeretlen foszforszintjének fenntartásában, ezáltal javítva a sejtek életképességét.

A CrPHT4-7 hiányának a fotoszintézisre gyakorolt hatásaihoz hasonló eredményekről számoltak be a szeretlen foszforhiány során zöldalgákban és edényes növényekben (Wykoff és mtsai., 1998; Petrou és mtsai., 2008; Carstensen és mtsai., 2018), valamint a búza (*Triticum aestivum*) *pht2;1*-es mutánsában (Guo és mtsai., 2013). Riboszóma degradációt és a fotoszintetikus elektrontranszportlánc aktivitásának csökkenését, beleértve a PSII alegységének, a PsbA mennyiségének a csökkenését szintén megfigyelték foszforhiány esetén (Wykoff és mtsai., 1998). A fotoszintetikus elektrontranszport leszabályozása a fotoinhibíció mérséklését szolgálja, mivel a Calvin-Benson-Bassham ciklus aktivitásának csökkenése azt jelenti, hogy a begyűjtött fényenergia nagy része nem használható fel a sejtanyagcsere támogatására. Foszforéhezés során számos fényvédő mechanizmus, valamint foszforfelvételi és tárolási mechanizmus aktiválódik (Grossman és Wollman, 2023).

Az edényes növények foszfát-transzporter mutánsai fokozott NPQ-t mutatnak az ATP-termelés mérséklődése által kiváltott magasabb ΔpH miatt (Guo és mtsai., 2013; Karlsson és mtsai., 2015). Ezzel szemben a *pht4-7* mutánsainkban az NPQ csökkent, amikor erős fényben neveltük őket (18. B ábra). A zöldalgák NPQ mechanizmusai sok tekintetben különböznek az edényes növényekétől (Erickson és mtsai., 2015; Vecchi és mtsai., 2020). A qE, amely egy gyors, ΔpH -függő komponens, többnyire fotoautotróf növekedési körülmények között jelenik meg (Erickson és mtsai., 2015), és a mi mixotróf nevelési körülményeink között nem indukálódott (18. ábra). Ehelyett az NPQ több perces időskálán alakult ki, amely magában foglalhatja az NPQ zeaxantin függő (qZ), állapotátmenettel kapcsolatos (qT) és fotoinhibíciós (qI) komponenseit is (Erickson és mtsai., 2015; Vidal-Meireles és mtsai., 2020). Megfigyeltük, hogy a pmf mindkét *pht4-7* mutánsban megemelkedett (19. D ábra), ami arra utal, hogy a csökkent NPQ nem a membránenergia hiánya miatt következett be. Másrészt az ATP termelés és az állapotátmenet (amely a qT komponensért felelős) csökkent a *pht4-7* mutánsokban (19. A és C ábrák), valószínűleg a csökkent szeretlen foszfátellátás miatt (hasonlóan, amint azt korábban *Dunaliella* foszforéheztetése során megfigyelték; Petrou és mtsai., 2008). A zöldalgák fő fényvédő mechanizmusaként működő, csökkent állapotátmenet (Goldschmidt-Clermont és Bassi, 2015) szintén magyarázatot adhat az erős fényben nevelt *pht4-7* mutánsok F_v/F_M értékeinek csökkenésére (14. D ábra).

A kloroplasztisz szervesetlen foszfátellátottságának csökkenése a sejt aszkorbát tartalmának drámai növekedéséhez vezetett, amikor a tenyészeteket erős fényben neveltük (17. A ábra). Az aszkorbát nagymértékű felhalmozódása a *pht4-7* mutánsokban a reaktív oxigénfajták sejtkárosító hatásainak mérséklése érdekében fordulhat elő. A reaktív oxigénfajták keletkezésének fő kiváltó oka esetünkben a csökkent mértékű állapotátmenet és ATP szintézis, ami a CO₂ fixáció mérséklődéséhez vezet. Az aszkorbát magas koncentrációban történő felhalmozódása az OEC inaktiválódásához vezet, ami által az elektrontranszportlánc túlredukáltsága enyhül (Nagy és mtsai., 2018). Tehát a kloroplasztiszban fellépő szervesetlen foszfáthiány nagymértékű aszkorbát felhalmozódást vált ki a *C. reinhardtii*-ban, hasonlóan a kénmegvonás esetén megfigyelhető aszkorbát felhalmozódáshoz (Nagy és mtsai., 2016). Ezzel ellentétben a CrPHT4-7 túltermeltetése *C. reinhardtii*-ban fokozott fénystresszel szembeni ellenállóképességet eredményezett (26. ábra), ami azt mutatja, hogy a foszfát-transzport korlátozhatja a fotoszintézist intenzív megvilágítás során.

Bár a CrPHT4-7 viszonylag nagyfokú hasonlóságot mutat az AtPHT4;4-gyel, nem mutatott jelentős aszkorbát-transzport aktivitást. A kloroplasztiszok aszkorbát felvételének méréséhez az algatenyészeteket aszkorbát jelenlétében inkubáltuk, majd az aszkorbát felvétel mértékéről a klorofill-a fluoreszcencia tranziensek mérésével szereztünk információt. Eredményeink azt mutatták, hogy a kloroplasztiszok aszkorbát felvétele nem különbözött a vad típusban és a *pht4-7* mutánsokban (17. B ábra). *S. cerevisiae*-ben kifejezve a CrPHT4-7 nem fokozta a sejtek aszkorbát felvételét az élettanilag releváns koncentrációtartományban (27. C ábra). Magas koncentráció esetén a CrPHT4-7 transzportert kifejező élesztő törzs aszkorbát felvétele enyhén fokozódott, fiziológiás körülmények között azonban a CrPHT4-7 valószínűleg csekély szerepet játszik az aszkorbát szállításában.

Eredményeinket összefoglalva, kimutattuk, hogy a CrPHT4-7 hozzájárul a szervesetlen foszfor-homeosztázis és ezáltal a fotoszintézis fenntartásához a kloroplasztiszban. A CrPHT4-7 túltermeltetése megnöveli az algasejtek fénytűrését. Másrészt a CrPHT4-7 funkciójának elvesztése nem eredményezett letális fenotípust, bár a szervesetlen foszfor elengedhetetlen a kloroplasztisz funkciójának fenntartásához. Éppen ezért valószínűnek tűnik, hogy további PHT transzporterek találhatóak a kloroplasztisz burkolómembránjában. A PHT2 transzporterek nem találhatóak meg zöldalgákban (Bonnot és mtsai., 2017), ezért valószínűleg a PHT4 család többi tagja látja el szervesetlen foszforral a kloroplasztiszt. Ezek közül a CrPHT4-3-at részletesen jellemeztük a 5.2. fejezetben.

6.2. A CrPHT4-3 transzporter élettani jelentősége

Eredményeink alapján kijelenthető, hogy a PHT4 transzporter család tagja, a *C. reinhardtii*-ban azonosított CrPHT4-3 a kloroplasztisz burkolómembránjában elhelyezkedő szervesetlen foszfát-transzporter (28. B ábra). A *pht4-7* mutánsokhoz hasonlóan *pht4-3* mutánsok is lassú növekedést mutattak mixotróf nevelési körülmények között, különösen, amikor erős fényben neveltük őket (30. A, B és 31. ábrák). A *pht4-3 pht4-7* dupla mutánsok sejtosztódása extrém módon lelassult erős fényben, ami arra enged következtetni, hogy a CrPHT4-3 és a CrPHT4-7 fehérje hasonló szerepet tölt be, ugyanis mindkét fehérje funkcióvesztéses mutációja esetén a szimpla mutánsokon megfigyelt fenotípusok felerősödnek (30. C, D; 32. és 33. A ábrák). Ezenkívül azt találtuk, hogy a tenyészetek extra szervesetlen foszforral (5,1 mM - 500 %) való ellátása csak kismértékben képes helyreállítani a *pht4-3* mutánsok lassú növekedési fenotípusát és nincsen hatással a dupla mutánsok sejtosztódására (36. és 37. ábrák). Érdekes módon a foszformegvonás nem okozott erőteljesebb fenotípust a *pht4-3* mutánsokban, mint az erős fénykezelés. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a CrPHT4-3 hiánya csak a kloroplasztisz szervesetlen foszforfelvételét befolyásolta, a teljes sejt szervesetlen foszforfelvételét nem, hasonlóan, mint a *pht4-7* mutánsok esetében. Továbbá azt találtuk, hogy a fotoszintetikus elektrontranszport lánc túlzottan redukálttá válik, amint azt a megnövekedett pmf jelzi normál fényben nevelt kultúrák esetében (35. ábra). Az F_v/F_m érték csökkenése erős fényviszonyok mellett (32. D ábra) arra utal, hogy a túlredukált elektrontranszport lánc mellett a PSII aktivitása is gátolt. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a CrPHT4-3 a CrPHT4-7 mellett szintén fontos szerepet játszik a kloroplasztisz megfelelő szervesetlen foszfor szintjének fenntartásában, ezáltal hozzájárulva a foszfor-homeosztázis fenntartásához és végső soron a sejtek életképességének fenntartásához.

A *pht4-3* mutánsainkban az NPQ szintje csökkent, amikor erős fényben neveltük őket, habár a csökkenés mértéke kisebb volt, mint amit a *pht4-7#7* mutáns esetében mértünk (34. A ábra). A *pht4-3 pht4-7* dupla mutánsok NPQ kinetikája hasonlított a *pht4-7#7* mutánsban megfigyelthez (34. B ábra). A zöldalgák NPQ mechanizmusai sok tekintetben különböznek az edényes növényekétől (Erickson és mtsai., 2015; Vecchi és mtsai., 2020). A qE, amely egy gyors, ΔpH -függő komponens, többnyire fotoautotróf növekedési körülmények között jelenik meg (Erickson és mtsai., 2015) és az általunk használt mixotróf nevelési körülmények között nem indukálódott (34. ábra). Ehelyett az NPQ több perces időskálán alakult ki, amely magában foglalhatja az NPQ zeaxantin függő (qZ),

állapotátmenettel kapcsolatos (qT) és fotoinhibíció (qI) komponenseit is (Erickson és mtsai., 2015; Vidal-Meireles és mtsai., 2020). Feltételezzük, hogy a *pht4-3* mutánsok esetében szintén a qT komponens kialakulása gátolt a kloroplasztiszban fellépő foszforhiány következtében, csakúgy, mint a *pht4-7* mutánsok esetében.

Megfigyeltük, hogy a pmf mindkét *pht4-3* mutánsban megemelkedett és a növekedés mértéke nagyobb volt, mint amit a *pht4-7#7* mutáns esetében mértünk. Ugyancsak pmf emelkedést figyeltünk meg a dupla mutánsok esetében is. Ez arra utal, hogy a csökkent NPQ nem a membrán energizáltságának hiánya miatt következett be (35. ábra).

A kloroplasztisz szeretlen foszfátellátottságának csökkenése a sejt aszkorbát tartalmának drámai növekedéséhez vezetett, amikor a tenyészeteket erős fényben neveltük (33. A ábra). Az aszkorbát nagymértékű felhalmozódása a *pht4-3* szimpla és a *pht4-3 pht4-7* dupla mutánsokban a reaktív oxigénfajták sejtkárosító hatásainak mérséklése érdekében fordulhat elő. Másrészt az aszkorbát magas (mM-os) koncentrációban történő felhalmozódása az OEC inaktiválódásához vezethet, ami által az elektrontranszportlánc túlredukáltsága enyhül (Nagy és mtsai., 2018). Az OJIP kinetikák alapján kijelenthető, hogy a *pht4-3* és *pht4-7* mutánsokban nem történt csökkent mértékű OEC inaktiváció a kontroll törzshöz képest (17. B és 33. B ábrák).

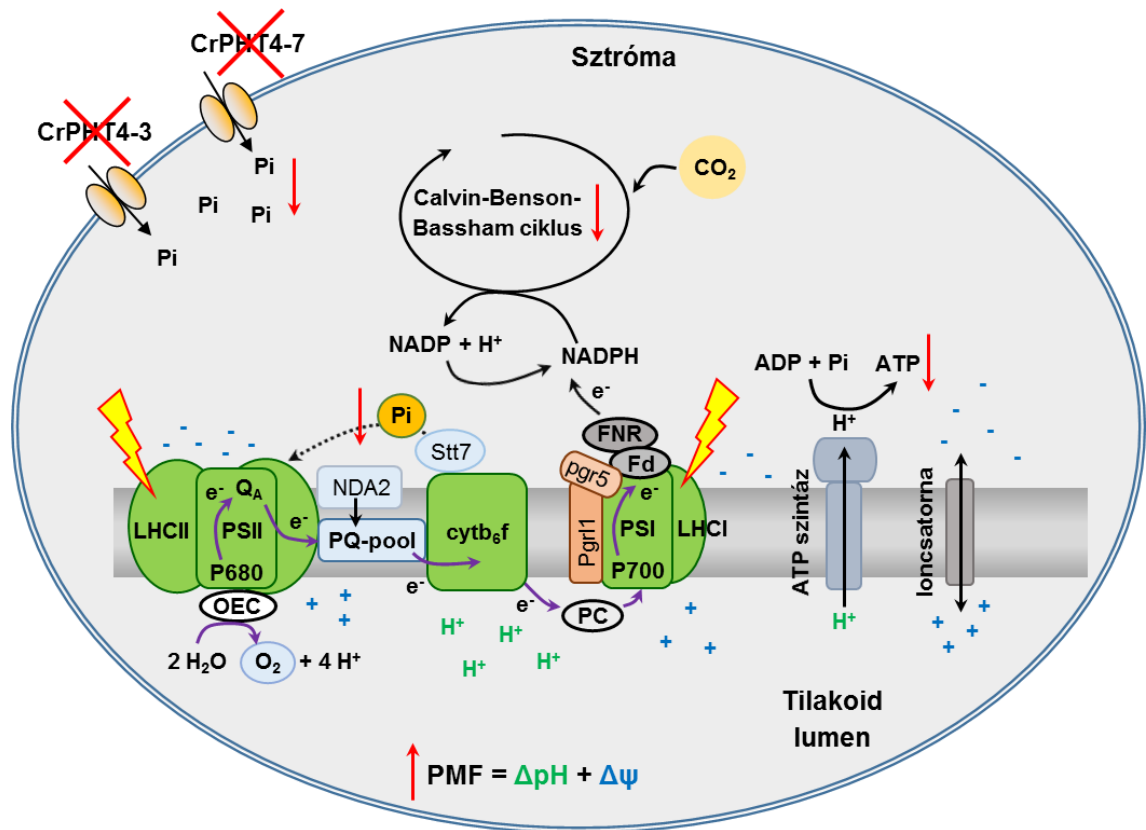
Megfigyeltük, hogy a CrPHT4-3 túltermeltetése *C. reinhardtii*-ban kismértékben fokozta a fénystresszel szembeni ellenállóképességet (38. C ábra), ami azt mutatja, hogy a szeretlen foszfát-transzport korlátozhatja a fotoszintézist intenzív megvilágítás során.

Bár a CrPHT4-3 szintén viszonylag nagyfokú hasonlóságot mutat az AtPHT4;4-gyel, nem mutatott számottevő aszkorbát-transzport aktivitást. A kloroplasztiszok aszkorbát felvételének méréséhez az algatenyészeteket aszkorbát jelenlétében inkubáltuk, majd az aszkorbát felvétel mértékéről a klorofill-a fluoreszcencia tranziensek mérésével szereztünk információt. Eredményeink azt mutatták, hogy a kloroplasztiszok aszkorbát felvétele nem különbözött a vad típusban és a *pht4-3* mutánsokban (33. B ábra). *S. cerevisiae*-ben kifejezve a CrPHT4-3 nem fokozta a sejtek aszkorbát felvételét (39. C ábra). Eredményeink alapján tehát kijelenthető, hogy a CrPHT4-3 nem vesz számottevően részt az aszkorbát szállításában.

6.3. CrPHT4-7 és CrPHT4-3 transzporter részletes jellemzése során kapott eredmények összefoglalása

Kimutattuk, hogy mindkét általunk megvizsgált transzporter a kloroplasztisz burkolómembránjában található. A *pht4-3* funkcióvesztéses mutánsok a *pht4-7* mutánsokhoz képest a fénystresszel szemben kevésbé bizonyultak ellenállóknak. A transzporterek kifejeztetése foszfát-transzporter hiányos élesztőtörzsben gyorsabb sejtosztódást eredményezett, ami igazolja, hogy a CrPHT4-7 és a CrPHT4-3 egyaránt szervesetlen foszfát-transzporterként működik. *S. cerevisiae*-ben kifejeztetve egyik fehérje sem volt képes fokozni a sejtek aszkorbátfelvételét az élettanilag releváns koncentrációtartományban (2-5 mM), ezért valószínűnek tűnik, hogy fiziológias körülmények között csekély szerepet játszanak az aszkorbát szállításában. Kimutattuk, hogy a CrPHT4-7 és a CrPHT4-3 egyaránt hozzájárul a szervesetlen foszfor homeosztázis és ezáltal a fotoszintetikus folyamatok fenntartásához a kloroplasztiszban. A CrPHT4-3 túltermeltetése kismértékben, míg a CrPHT4-7 túltermeltetése nagyobb mértékben megnöveli az algasejtek fényvel szembeni ellenállóképességét. Hasonlóan ahhoz, mint amit a CrPHT4-7 fehérje esetében tapasztaltunk, a CrPHT4-3 funkciójának elvesztése sem eredményezett letális fenotípust. Ugyanakkor a *pht4-3 pht4-7* dupla mutánsok stressztűrő képessége drasztikusan lecsökkent, ezért valószínűnek tűnik, hogy az általunk megvizsgált CrPHT4-7 és CrPHT4-3 transzporterek együtt kulcsszerepet játszanak foszfát kloroplasztiszba történő szállításában. CrPHT4-3 és CrPHT4-7 szervesetlen foszfát-transzporterek hiányában *C. reinhardtii* kloroplasztiszában az alábbi változások figyelhetők meg, különösen magas fényintenzitáción (40. ábra):

- A CrPHT4-3 és CrPHT4-7 transzporterek hiányában a kloroplasztiszba történő szervesetlen foszfát-szállítás csökken.
- A kloroplasztisz ATP-termelése csökken.
- A Calvin-Benson-Bassham ciklus aktivitása valószínűleg mérséklődik.
- A teljes transztilakoid protonmozgató erő (pmf) megnő.
- Csökkent mértékű állapotátmenet figyelhető meg, feltehetően az LHCII elégtelen mértékű foszforilációja következtében.



40. ábra A CrPHT4-3 és CrPHT4-7 szeretlen foszfát-transzporterek hiányában a *C. reinhartii* kloroplasztiszában bekövetkező élettani változások sematikus ábrázolása.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Először is köszönetet szeretnék mondani lelkiismeretes, precíz, segítőkész témavezetőmnek Dr. Tóth Szilvia Zitának, aki tanácsaival és útmutatásával segítette a munkámat.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Molnár Attilának és Dr. Ferenczi Áronnak, akik a munkám során használt *C. reinhardtii* mutánsokat a rendelkezésünkre bocsátották.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Dennis Wykoffnak, aki a munkám során használt *S. cerevisiae* törzseket bocsátotta a rendelkezésünkre.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Ralph Bocknak és Juliane Neupertnek, amiért néhány hetet a potsdami Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology-ban tölthettem. Az ott eltöltött idő alatt megszerzett tudás és tapasztalat nagyban hozzájárult a későbbi eredményes munkámhoz.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Soujanya Kuntamnak, Prof. Dr. Martin C. Jonikasnak, Lianyong Wangnak és Dr. Migh Edének az általam vizsgált fehérjék intracelluláris lokalizációjának meghatározásában nyújtott segítségükért.

Köszönet illeti Dr. Kovács Lászlót a mérési eredmények statisztikai elemzése során nyújtott segítségéért.

Köszönettel tartozom Dr. Szentmihályi Klárának az algasejtek foszfortartalmának meghatározásában nyújtott segítségéért.

Köszönet illeti Dr. Tengölics Rolandot az ATP mérések során nyújtott segítségéért.

Köszönöm Dr. Sarkadi Zsuzsának az élesztőtörzsek transzformálása során nyújtott segítségét.

Köszönöm a Molekuláris Fotobioenergetikai Csoport összes volt és jelenlegi tagjának, hogy kérdéseimmel, problémáimmal mindig bizalommal fordulhatta hozzájuk.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm szüleimnek, családomnak és barátaimnak, hogy mindvégig mellettem álltak, tartották bennem a lelket és végig hittek bennem.

8. IRODALOMJEGYZÉK

- Abdelrahman M, El-Sayed MA, Hashem A, Abd_Allah EF, Alqarawi AA, Burritt DJ, Tran LSP (2018) Metabolomics and transcriptomics in legumes under phosphate deficiency in relation to nitrogen fixation by root nodules. *Front Plant Sci* 9: 922
- Amitai G, Sorek R (2016) CRISPR-Cas adaptation: insights into the mechanism of action. *Nat Rev Microbiol* 14: 67-76
- Amtmann A, Hammon JP, Armengaud P, White PJ (2005) Nutrient sensing and signalling in plants: potassium and phosphorus. *Botanical Res* 43: 209-257
- Anders C, Niewoehner O, Duerst A, Jinek M (2014) Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature* 513: 569-573
- Austin JR, Staehelin LA (2011) Three-dimensional architecture of grana and stroma thylakoids of higher plants as determined by electron tomography. *Plant Physiol* 155: 1601-1611
- Ayadi A, David P, Arrighi JF, Chiarenza S, Thibaud MC, Nussaume L, Marin E (2015) Reducing the genetic redundancy of *Arabidopsis* PHOSPHATE TRANSPORTER1 transporters to study phosphate uptake and signaling. *Plant Physiol* 167: 511-526
- Begemann MB, Gray BN, January E, Gordon GC, He Y, Liu H, Wu X, Brutnell TB, Mockler TC, Oufattole M (2017) Precise insertion and guided editing of higher plant genomes using Cpf1 CRISPR nucleases. *Sci Rep* 7: 11606
- Bellinger EG, Sigeo DC (2010) Freshwater algae. Identification and use as bioindicators. First edition, Chapter 1: Introduction to freshwater algae, 1-13. John Wiley & Sons Ltd
- Bennett WF (1993) Nutrient deficiencies & toxicities in crop plants. Chapter 1: Plant nutrient utilization and diagnostic plant symptoms, 1-11. The APS Press
- Berg AS, Joern BC (2006) Sorption dynamics of organic and inorganic phosphorus compounds in soil. *J Environ Qual* 35:1855-1862
- Berndt T, Kumar R (2009) Novel mechanisms in the regulation of phosphorus homeostasis. *Physiol* 24: 17-25
- Bibikova M, Golic M, Golic K, Carroll GD (2002) Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics* 161: 1169-75
- Blaby IK, Blaby-Haas CE, Tourasse N, Hom EFY, Lopez D, Aksoy M, Grossman A, Umen J, Dutcher S, Porter M, King S, Witman GB, Stanke M, Harris EH, Goodstein D, Grimwood J, Schmutz J, Vallon O, Merchant SS, Prochnik S (2014) The *Chlamydomonas* genome project: a decade on. *Trends Plant Sci* 19: 672-680
- Blankenship RE (1992) Origin and early evolution of photosynthesis. *Photosynth Res* 33: 91-111
- Blankenship RE (2001) Molecular evidence for the evolution of photosynthesis. *Trends Plant Sci* 6: 4-6

- Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD (2005) Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* 151: 2551-2561
- Bonente G, Pippa S, Castellano S, Bassi R, Ballottari M (2012) Acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* to different growth irradiances. *J Biol Chem* 287: 5833-5847
- Bonnot C, Proust H, Pinson B, Colbalchini FPL, Lesly-Veillard A, Breuninger H, Champion C, Hetherington AJ, Kelly S, Dolan L (2017) Functional PTB phosphate transporters are present in streptophyte algae and early diverging land plants. *New Phytol* 214: 1158-1171
- Broadley MR, Bowen HC, Cotterill HL, Hammond JP, Meacham MC, Mead A, White PJ (2004) Phylogenetic variation in the shoot mineral concentration of angiosperms. *J of Experimental Botany* 55: 321-336
- Brodie J, Lewis J (2007) Unravelling the algae: the past, present, and future of algal systematics. First edition, Chapter 7: Systematics of the green algae: conflict of classic and modern approaches, 123-153. CRC Press
- Busch W, Saier MH Jr (2002) The transporter classification (TC) system. *Critical Rev in Biochem and Mol Biol* 37: 287-337
- Capecchi MR (1989) Altering the genome by homologous recombination. *Science* 244: 1288-1292
- Carstensen A, Herdean A, Schmidt SB, Sharma A, Spetea C, Pribil M, Husted S (2018) The impacts of phosphorus deficiency on the photosynthetic electron transport chain. *Plant Physiol* 177: 271-284
- Chang MX, Gu M, Xia YW, Dai XL, Dai CR, Zhang J, Wang SC, Qu HY, Yamaji N, Ma JF, Xu GH (2019) OsPHT1;3 mediates uptake, translocation, and remobilization of phosphate under extremely low phosphate regimes. *Plant Physiol* 179: 656-670
- Corpet F (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl Acids Res* 16: 10881-10890
- Craigie RA, Cavalier-Smith T (1982) Cell volume and the control of the *Chlamydomonas* cell cycle. *J Cell Set* 54: 173-191
- Crombez H, Motte H, Beeckman T (2019) Tackling plant phosphate starvation by the roots. *Dev Cell* 48: 599-615
- Cruz JA, Kanazawa A, Treff N, Kramer DM (2005) Storage of light-driven transthylakoid proton motive force as an electric field ($\Delta\Psi$) under steady-state conditions in intact cells of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynth Res* 85: 221-233
- Cruz JA, Sacksteder CA, Kanazawa A, Kramer DM (2001) Contribution of electric field ($\Delta\psi$) to steady-state transthylakoid proton motive force (pmf) *in vitro* and *in vivo*. Control of pmf parsing into $\Delta\psi$ and ΔpH by ionic strength. *Biochemistry* 40: 1226-1237

- Cutolo EA, Caferri R, Guardini Z, Osto LD, Bassi R (2023) Analysis of state 1-state 2 transitions by genome editing and complementation reveals a quenching component independent from the formation of PSI-LHCI-LHCII supercomplex in *Arabidopsis thaliana*. *Biology Direct* 18: 49
- Daram P, Brunner S, Rausch C, Steiner C, Amrhein N, Bucher M (1999) *Pht2;1* encodes a low-affinity phosphate transporter from *Arabidopsis*. *Plant Cell* 11: 2153-2166
- Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada ZA, Eckert MR, Vogel J, Charpentier E (2011) CRISPR RNA maturation by transencoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* 471: 602-607
- Dong D, Ren K, Qiu X, Zheng J, Guo M, Guan X, Liu H, Li N, Zhang B, Yang D, Ma C, Wang S, Wu D, Ma Y, Fan S, Wang J, Gao N, Huang Z (2016) The crystal structure of Cpf1 in complex with CRISPR RNA. *Nature* 532: 522-526
- Doudna JA, Charpentier E (2014) The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346: 1258096
- Emanuelsson O, Nielsen H, von Heijne G (1999) Chlorop, a neural networkbased method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci* 8: 978-984
- Endo A, Masafumi M, Kaya H, Toki S (2016) Efficient targeted mutagenesis of rice and tobacco genomes using Cpf1 from *Francisella novicida*. *Sci Rep* 6: 38169
- Engel BD, Schaffer M, Cuellar LK, Villa E, Plitzko JM, Baumeister W (2015) Native architecture of the *Chlamydomonas* chloroplast revealed by in situ cryo-electron tomography. *eLife* 4: e04889
- Erickson E, Wakao S, Niyogi KK (2015) Light stress and photoprotection in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* 82: 449-465
- Fabiańska I, Bucher M, Hausler RE (2019) Intracellular phosphate homeostasis - a short way from metabolism to signalling. *Plant Sci* 286: 57-67
- Fan J, Andre C, Xu C (2011) A chloroplast pathway for the de novo biosynthesis of triacylglycerol in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Letters* 585: 1985-1991
- Fausser F, Vilarrasa-Blasi J, Onishi M, Ramundo S, Patena W, Millican M, Osaki J, Philp C, Nemeth M, Salomé PA, Li X, Wakao S, Kim RG, Kaye Y, Grossman AR, Niyogi KK, Merchant SS, Cutler SR, Walter P, Dinneny JR, Jonikas MC, Jinkerson RE (2022) Systematic characterization of gene function in the photosynthetic alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nat Genet* 54: 705-714
- Ferenczi A, Pyott DE, 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
- Fernie AR and Tóth SZ (2015) Identification of the elusive chloroplast ascorbate transporter extends the substrate specificity of the PHT family. *Molecular Plant* 8: 674-676

- Fleischmann MM, Ravanel S, Delosme R, Olive J, Zito F, Wollman FA, Rochaix JD (1999) Isolation and characterization of photoautotrophic mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* deficient in state transition. *J Biol Chem* 274: 30987-30994
- Fonfara I, Richter H, Bratovič M, Le Rhun A, Charpentier E (2016) The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA. *Nature* 532: 517-521
- Forde B, Lorenzo H (2001) The nutritional control of root development. *Plant and Soil* 232: 51-68
- Furihata T, Suzuki M, Sakurai H (1992) Kinetic characterization of two phosphate uptake systems with different affinities in suspension-cultured *Catharanthus roseus* protoplasts. *Plant Cell Physiol* 33: 1151-1157
- Gietz RD, Schiestl RH (2007) High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat Protoc* 2: 31-34
- Goldberg T, Hecht M, Hamp T, Karl T, Yachdav G, Ahmed N, Altermann U, Angerer P, Ansoerge S, Balasz K, Bernhofer M, Betz A, Cizmadija L, Do KT, Gerke J, Greil R, Joerdens V, Hastreiter M, Hembach K, Herzog M, Kalemanov M, Kluge M, Meier A, Nasir H, Neumaier U, Prade V, Reeb J, Sorokoumov A, Troshani I, Vorberg S, Waldraff S, Zierer J, Nielsen H, Rost B (2014) Loctree3 prediction of localization. *Nucleic Acids Res* 42: W350-W355
- Goldschmidt-Clermont M, Bassi R (2015) Sharing light between two photosystems: mechanism of state transitions. *Curr Opin Plant Biol* 25: 71-78
- Goodenough U, Lin H, Lee JH (2007) Sex determination in *Chlamydomonas*. *Seminars in Cell and Developmental Biol* 18: 350-361
- Gorman DS, Levine RP (1965) Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA* 54: 1665-1669
- Greiner A, Kelterborn S, Evers H, Kreimer G, Sizova I, Hegemann P (2017) Targeting of photoreceptor genes in *Chlamydomonas reinhardtii* via zinc-finger nucleases and CRISPR/Cas9. *Plant Cell* 29: 2498-2518
- Grossman AR, Wollman FA (2023) The *Chlamydomonas* sourcebook. Third edition, Volume 2, Chapter 4: Phosphorus and sulfur uptake, assimilation, and deprivation responses, 129-151. Academic Press
- Guo B, Jin Y, Wussler C, Blancaflor EB, Motes CM, Versaw WK (2008) Functional analysis of the *Arabidopsis* PHT4 family of intracellular phosphate transporters. *New Phytol* 177: 889-898
- Guo C, Zhao X, Liu X, Zhang L, Gu J, Li X, Lu W, Xiao K (2013) Function of wheat phosphate transporter gene *TaPHT2;1* in Pi translocation and plant growth regulation under replete and limited Pi supply conditions. *Planta* 237: 1163-1178
- Gutiérrez-Alanís D, Ojeda-Rivera JO, Yong-Villalobos L, Cárdenas-Torres L, Herrera-Estrella L (2018) Adaptation to phosphate scarcity: tips from *Arabidopsis* roots. *Trends Plant Sci* 23: 721-730

- Haft DH, Selengut J, Mongodin EF, Nelson KE (2005) A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput Biol* 1: e60
- Hallgren J, Tsirigos KD, Pedersen MD, Armenteros JJA, Marcatili P, Nielsen H, Krogh A, Winther O (2022) DeepTMHMM predicts alpha and beta transmembrane proteins using deep neural networks. *bioRxiv* <https://doi.org/10.1101/2022.04.08.487609>
- Hallin EI, Guo K, Åkerlund HE (2016) Functional and structural characterization of domain truncated violaxanthin de-epoxidase. *Physiol Plantarum* 157: 414-421
- Hamel P, Saint-Georges Y, de Pinto B, Lachacinski N, Altamura N, Dujardin G (2004) Redundancy in the function of mitochondrial phosphate transport in *Saccharomyces cerevisiae* and *Arabidopsis thaliana*. *Mol Microbiol* 51: 307-317
- Hammond JP, Broadley MR, White PJ (2004a) Genetic responses to phosphorus deficiency. *Annals of Botany* 94: 323-332
- Hammond JP, White PJ, Broadley MR (2004b) Diagnosing phosphorus deficiency in plants. *Aspects of Applied Biology* 72: 89-98
- Harris EH (2001) *Chlamydomonas* as a model organism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 363-406
- Harris EH (2009) The *Chlamydomonas* sourcebook. Second edition, Volume 1, Chapter 1: The genus *Chlamydomonas*, 1-18. Academic Press
- Hasan M, Hasan M, da Silva JAT, Li X (2016) Regulation of phosphorus uptake and utilization: transitioning from current knowledge to practical strategies. *Cell Mol Biol Lett* 21: 7
- Hefferin ML, Tomkinson AE (2005) Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA Repair* 4: 639-648
- Herrera-Estrella L, López-Arredondo D (2016) Phosphorus: the underrated element for feeding the world. *Trends Plant Sci* 21: 461-463
- Hu X, Wang C, Liu Q, Fu Y, Wang K (2017) Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cpf1 system. *J Genet Genomics* 44: 71-73
- Hutner SH, Provasoli L, Schatz A, Haskins CP (1950) Some approaches to the study of the role of metal in the metabolism of microorganisms. *Proc Am Philos Soc* 94: 152-170
- Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A (1987) Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol* 169: 5429-5433
- Jansen R, Embden JD, Gaastra W, Schouls LM (2002) Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol* 43: 1565-1575
- Jiang F, Taylor DW, Chen JS, Kornfeldt JE, Zhou K, Thompson AJ, Nogales E, Doudna JA (2016) Structures of a CRISPR-Cas9 R-loop complex primed for DNA cleavage. *Science* 351: 867-871

- Jiang F, Zhou K, Ma L, Gressel S, Doudna JA (2015) A Cas9-guide RNA complex preorganized for target DNA recognition. *Science* 348: 1477-1481
- Jiang WZ, Brueggeman AJ, Horken KM, Plucinak TM, Weeks DP (2014) Successful transient expression of Cas9 and single guide RNA genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell* 13: 1465-1469
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Chapentier E (2012) A programmable dual RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337: 816-821
- Johnson MP (2016) Photosynthesis. *Essays in Biochemistry* 60: 255-273
- Jungk A (2001) Root hairs and the acquisition of plant nutrients from soil. *J of Plant Nutrition and Soil Sci* 164: 121-129
- Karandashov V, Bucher M (2005). Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas. *Trends in Plant Sci* 10: 22-29
- Karlsson PM, Herdean A, Adolfsson L, Beebo A, Nziengui H, Irigoyen S, Ünneper R, Zsiros O, Nagy G, Garab G, Versaw WK, Spetea C (2015) The *Arabidopsis* thylakoid transporter PHT4;1 influences phosphate availability for ATP synthesis and plant growth. *Plant J* 84: 99-110
- Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJ (2015) The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc* 10: 845-58
- Kim H, Kim ST, Ryu J, Kang BC, Kim JS, Kim SG (2017) CRISPR/Cpf1-mediated DNA-free plant genome editing. *Nature Comm* 8: 14406
- Kouřil R, Oostergetel GT, Boekema EJ (2011) Fine structure of granal thylakoid membrane organization using cryo electron tomography. *Biochim Biophys Acta* 1807: 368-374
- Kovács L, Vidal-Meireles A, Nagy V, Tóth SZ (2016) Quantitative determination of ascorbate from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* by HPLC. *Bio-Protoc* 6: e2067
- Kramer DM, Sacksteder CA (1998) A diffused-optics flash kinetic spectrophotometer (DOFS) for measurements of absorbance changes in intact plants in the steady-state. *Photosynth Res* 56: 103-112
- Krammer EM, Vu GT, Homble F, Prevost M (2015) Dual mechanism of ion permeation through VDAC revealed with inorganic phosphate ions and phosphate metabolites. *PLoS One* 10: 0121746
- Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer ELL (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 305: 567-580
- Kroth P, Strotmann H (1999) Diatom plastids: secondary endocytobiosis, plastid genome and protein import. *Physiol Plant* 107: 136-141
- Lambrev PH, Nilkens M, Miloslavina Y, Jahns P, Holzwarth AR (2010) Kinetic and spectral resolution of multiple nonphotochemical quenching components in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol* 152: 1611-1624

- Lapis-Gaza HR, Jost R, Finnegan PM (2014) *Arabidopsis* PHOSPHATE TRANSPORTER1 genes *PHT1;8* and *PHT1;9* are involved in root to shoot translocation of orthophosphate. *BMC Plant Biol* 14: 334
- Lemieux MJ (2008) A perspective on the structural studies of inner membrane electrochemical potential-driven transporters. *Biochim Biophys Acta* 1778: 1805-1813
- Li R, Wang J, Xu L, Sun M, Yi K, Zhao H (2020) Functional analysis of phosphate transporter OsPHT4 family members in rice. *Rice Sci* 27: 493-503
- Li Z, Peers G, Dent RM, Bai Y, Yang SY, Apel W, Leonelli L, Niyogi KK (2016) Evolution of an atypical de-epoxidase for photoprotection in the green lineage. *Nat Plants* 2: 16140
- Lino CA, Harper JC, Carney JP, Timlin JA (2018) Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug Deliv* 25: 1234-1257
- Liu F, Chang XJ, Ye Y, Xie WB, Wu P, Lian XM (2011) Comprehensive sequence and whole-life-cycle expression profile analysis of the phosphate transporter gene family in rice. *Mol Plant* 4: 1105-1122
- Liu J, Yan L, Luan M, Wang Y, Zhang C, Zhang B, Shi J, Zhao FG, Lan W, Luan S (2015) A vacuolar phosphate transporter essential for phosphate homeostasis in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 112: 6571-6578
- Liu TY, Huang TK, Yang SY, Hong YT, Huang SM, Wang FN, Chiang SF, Tsai SY, Lu WC, Chiou TJ (2016) Identification of plant vacuolar transporters mediating phosphate storage. *Nat Comm* 31: 11095
- Lynch JP (2011) Root phenes for enhanced soil exploration and phosphorus acquisition: tools for future crops. *Plant Physiol* 156: 1041-1049
- McFadden GI, van Dooren GG (2004) Evolution: red algal genome affirms a dispatch common origin of all plastids. *Current Biology* 14: 514-516
- Mirkovic T, Ostroumov EE, Anna JM, van Grondelle R, Govindjee, Scholes GD (2017). Light absorption and energy transfer in the antenna complexes of photosynthetic organisms. *Chem Rev* 117: 249-293
- Miyaji T, Kuromori T, Takeuchi Y, Yamaji N, Yokosho K, Shimazawa A, Sugimoto E, Omote H, Ma JF, Shinozaki K, Moriyama Y (2015) AtPHT4;4 is a chloroplast-localized ascorbate transporter in *Arabidopsis*. *Nat Comm* 6: 5928
- Mojica FJ, Diez-Villasenor C, Soria E, Juez G (2000) Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of archaea, bacteria and mitochondria. *Mol Microbiol* 36: 244-246
- Moseley JL, Chang CW, Grossman AR (2006) Genome-based approaches to understanding phosphorus deprivation responses and PSR1 control in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell* 5: 26-44

- Mudge SR, Rae AL, Diatloff E, Smith FW (2002) Expression analysis suggests novel roles for members of the Pht1 family of phosphate transporters in *Arabidopsis*. *Plant J* 31: 341-353
- Mullen MD (2005) Phosphorus in soils: biological interactions. *Encyclopedia of Soils in the Environment* 3: 210-216
- 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: quasihelical 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
- Nagai T, Ibata K, Park ES, Kubota M, Mikoshiba K, Miyawaki A (2002) A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol* 20: 87-90
- Nagarajan VK, Jain A, Poling MD, Lewis AJ, Ragothama KG, Smith AP (2011) *Arabidopsis* Pht1;5 mobilizes phosphate between source and sink organs, and influences the interaction between phosphate homeostasis and ethylene signaling. *Plant Physiol* 156: 1149-1163
- Nagy V, Vidal-Meireles A, Podmaniczki A, Szentmihályi K, Rákhely G, Zsigmond L, Kovács L, Tóth SZ (2018) The mechanism of photosystem-II inactivation during sulphur deprivation-induced H₂ production in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* 94: 548-561
- Nagy V, Vidal-Meireles A, Tengölics R, Rákhely G, Garab G, Kovács L, Tóth SZ (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
- Nelson N, Yocum CF (2006) Structure and function of photosystems I and II. *Annu Rev Plant Biol* 57: 521-565
- Neupert J, Gallaher SD, Lu Y, Strenkert D, Segal N, Barahimipour R, Fitz-Gibbon ST, Schroda M, Merchant SS, Bock R (2020) An epigenetic gene silencing pathway selectively acting on transgenic DNA in the green alga *Chlamydomonas*. *Nat Commun* 11: 1-17
- Neupert J, Karcher D, Bock R (2009) Generation of *Chlamydomonas* strains that efficiently express nuclear transgenes. *Plant J* 57: 1140-1150
- Neupert J, Shao N, Lu Y, Bock R (2012) Genetic transformation of the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Methods Mol Biol* 847: 35-47
- Nickelsen J (2005) Cell biology: the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* - a genetic model organism. *Botany* 66: 66-89

- Nikkanen L, Solymosi D, Jokel M, Allahverdiyeva Y (2021) Regulatory electron transport pathways of photosynthesis in cyanobacteria and microalgae: recent advances and biotechnological prospects. *Physiol Plantarum* 173: 514-525
- Nishimasu H, Nureki O (2017) Structures and mechanisms of CRISPR RNA-guided effector nucleases. *Curr Opin Struct Biol* 43: 68-78
- Norton TA, Melkonian M, Andersen RA (1996) Algal biodiversity. *Phycologia* 35: 308-326
- Ouedraogo JP, Tsang A (2020) CRISPR-Cas systems for fungal research. *Fungal Biol Rec* 34: 189-201
- Paul B, Montoya G (2020) CRISPR-Cas12a: functional overview and applications. *Biomedical J* 43: 8-17
- Petrou K, Doblin MA, Smith RA, Ralph PJ, Shelly K, Beardall J (2008) State transitions and nonphotochemical quenching during a nutrient-induced fluorescence transient in phosphorus-starved *Dunaliella tertiolecta*. *J Phycol* 44: 1204-1211
- Plaxton W, Lambers H (2015) Phosphorus metabolism in plants. Volume 48, Chapter 12: Algae in a phosphorus-limited landscape, 337-374. Wiley-Blackwell
- Porra RJ (2002) The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls *a* and *b*. *Photosynth Res* 73: 149-156
- Porra RJ, Thompson WA, Kriedeman PE (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 975: 384-394
- Pribil M, Labs M, Leister D (2014) Structure and dynamics of thylakoids in land plants. *J Exp Bot* 65: 1955-1972
- Raines CA (2022) Improving plant productivity by re-tuning the regeneration of RuBP in the Calvin–Benson–Bassham cycle. *New Phytologist* 236: 350-356
- Rausch C, Bucher M (2002) Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta* 216: 23-37
- Reimer RJ, Edwards RH (2003) Organic anion transport is the primary function of the SLC17/type I phosphate transporter family. *Eur J Physiol* 447: 629-635
- Reuter DJ, Robinson JB (1997) Plant analysis: an interpretation manual. Second edition, Chapter 2: Nutrient deficiency and toxicity symptoms, 35-47. CSIRO Pub
- Riegman R, Stolte W, Noordeloos AAM, Slezak D (2000) Nutrient uptake and alkaline phosphatase (EC 3:1:3:1) activity of *Emiliania huxleyi* (*Prymnesiophyceae*) during growth under N and P limitation in continuous cultures. *J Phycol* 36: 87-96
- Rocha GV, Maharajana T, Ceasara SA, Ignacimuthua S (2019) The role of PHT1 family transporters in the acquisition and redistribution of phosphorus in plants. *Critical Rev in Plant Sci* 3: 171-198

- Rochaix JD (1995) *Chlamydomonas reinhardtii* as the photosynthetic yeast. *Annu Rev Genet* 29: 209-30
- Ruban AV, Johnson MP (2009) Dynamics of higher plant photosystem crosssection associated with state transitions. *Photosynth Res* 99: 173-183
- Ruiz-Pavón L, Karlsson PM, Carlsson J, Samyn D, Persson B, Persson BL, Spetea C (2010) Functionally important amino acids in the *Arabidopsis* thylakoid phosphate transporter: homology modeling and site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 49: 6430-6439
- Saga G, Giorgetti A, Fufezan C, Giacometti GM, Bassi R, Morosinotto T (2010) Mutation analysis of violaxanthin de-epoxidase identifies substrate-binding sites and residues involved in catalysis. *J Biol Chem* 285: 23763-23770
- Saier MHJ (2000) A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol and Mol Biol Rev* 63: 354-411
- Saier MHJ, Reddy BL (2015) Holins in bacteria, eukaryotes, and archaea: multifunctional xenologues with potential biotechnological and biomedical applications. *J Bacteriol* 197: 7-17
- Salomé PA, Merchant SS (2019) A series of fortunate events: introducing *Chlamydomonas* as a reference organism. *Plant Cell* 31: 1682-1707
- Santabarbara S, Villafiorita Monteleone F, Remelli W, Rizzo F, Menin B, Casazza AP (2019) Comparative excitation-emission dependence of the F_V/F_M ratio in model green algae and cyanobacterial strains. *Physiol Plantarum* 166: 351-364
- Sanz-Luque E, Bhaya D, Grossman AR (2020) Polyphosphate: a multifunctional metabolite in cyanobacteria and algae. *Front Plant Sci* 11: 938
- Schachtman DP, Reid RJ, Ayling SM (1998) Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiol* 116: 447-453
- Schansker G, Tóth SZ, Holzwarth AR, Garab G (2014) Chlorophyll *a* fluorescence: beyond the limits of the Q_A model. *Photosynth Res* 120: 43-58
- Schreiber U, Klughammer C (2008) New accessory for the DUAL-PAM-100: the P515/535 module and examples of its application. *PAM Appl Notes* 1: 1-10
- Shen J, Yuan L, Zhang J, Li H, Bai Z, Chen X, Zhang W, Zhang F (2011) Phosphorus dynamics: from soil to plant. *Plant Physiol* 156: 997-1005
- Shen J, Zeng Y, Zhuang X, Sun L, Yao X, Pimpl P, Jiang L (2013) Organelle pH in the *Arabidopsis* endomembrane system. *Mol Plant* 6: 1419-1437
- Silton AN, Powell N, Guieysse B (2012) Plant based phosphorus recovery from wastewater via algae and macrophytes. *Curr Opin Biotechnol* 23: 884-889
- 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

- Shmakov S, Smargon A, Scott D, Cox D, Pyzocha N, Yan W, Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Makarova KS, Wolf YI, Severinov K, Zhang F, Koonin EV (2017) Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* 15: 169-182
- Sipka G, Magyar M, Mezzetti A, Akhtar P, Zhu Q, Xiao Y, Han G, Santabarbara S, Shen J-R, Lambrev PH, Garab G (2021) Light-adapted charge-separated state of photosystem II: structural and functional dynamics of the closed reaction center. *Plant Cell* 33: 1286-1302
- Slocombe SP, Zúñiga-Burgos T, Chu L, Wood NJ, Camargo-Valero MA, Baker A (2020) Fixing the broken phosphorus cycle: wastewater remediation by microalgal polyphosphates. *Front Plant Sci* 11: 1-17
- Spickett CM, Smirnoff N, Pitt AR (2000) The biosynthesis of erythroascorbate in *Saccharomyces cerevisiae* and its role as an antioxidant. *Free Radic Biol Med* 28: 183-192
- Srivastava S, Upadhyay MK, Srivastava AK, Abdelrahman M, Suprasanna P, Phan Tran LS (2018) Cellular and subcellular phosphate transport machinery in plants. *Int J Mol Sci* 19: 1914
- Staelin LA (2003) Chloroplast structure: from chlorophyll granules to supra-molecular architecture of thylakoid membranes. *Photosynth Res* 76: 185-196
- Stella S, Alcon P, Montoya G (2017a) Class 2 CRISPR-Cas RNA-guided endonucleases: Swiss Army knives of genome editing. *Nat Struct Mol Biol* 24: 882-892
- Stella S, Alcon P, Montoya G (2017b) Structure of the Cpf1 endonuclease R-loop complex after target DNA cleavage. *Nature* 546: 559-563
- Sternberg SH, Redding S, Jinek M, Greene EC, Doudna JA (2014) DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature* 507: 62-67
- Sueoka N (1960) Mitotic replication of deoxyribonucleic acid in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA* 46: 83-91
- Sun T, Li M, Shao Y, Yu L, Ma F (2017) Comprehensive genomic identification and expression analysis of the phosphate transporter (PHT) gene family in apple. *Front Plant Sci* 8: 426
- Swarts DC, Jinek M (2018) Cas9 versus Cas12a/Cpf1: Structure-function comparisons and implications for genome editing. *WIREs RNA* 9: e1481
- Swarts DC, van der Oost J, Jinek M (2017) Structural basis for guide RNA processing and seed-dependent DNA targeting by CRISPR-Cas12a. *Mol Cell* 66: 221-233
- Szentmihályi K, Blázovics A, Maya Z, Mohai M, Süle K, Albert M, Szénási G, Sebestény A, Máthé C (2020) Metal element alteration in the lung by cisplatin and CV247 administration. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 128: 110307
- Takabatake R, Hata S, Taniguchi M, Kouchi H, Sugiyama T, Izui K (1999) Isolation and characterization of cDNAs encoding mitochondrial phosphate transporters in soybean, maize, rice, and *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 40: 479-486
- Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, Morrison C, Hashimoto M, Utsumi H, Yamaguchi-Iwai Y, Shinohara A, Takeda S (1998) Homologous recombination and non-homologous end-joining

- pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J* 17: 5497-5508
- Tang X, Lowder LG, Zhang T, Malzahn AA, Zheng X, Voytas DF, Zhong Z, Chen Y, Ren Q, Li Q, Kirkland ER, Zhang Y, Qi Y (2017) A CRISPR-Cpf1 system for efficient genome editing and transcriptional repression in plants. *Nature Plants* 3: 17018
- Tardif M, Atteia A, Specht M, Cogne G, Rolland N, Brugiére S, Hippler M, Ferro M, Bruley C, Peltier G, Vallon O, Cournac L (2012) Predalgo: a new subcellular localization prediction tool dedicated to green algae. *Mol Biol Evol* 29: 3625-3639
- Tateda C, Watanabe K, Kusano T, Takahashi Y (2011) Molecular and genetic characterization of the gene family encoding the voltage-dependent anion channel in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 62: 4773-4785
- Thoré ESJ, Schoeters F, Spit J, Van Miert S (2021) Real-time monitoring of microalgal biomass in pilot-scale photobioreactors using nephelometry. *Processes* 9: 1530
- Thumuluri V, Armenteros JJA, Rosenberg Johansen A, Nielsen H, Winther O (2022) Deeploc 2.0: multi-label subcellular localization prediction using protein language models. *Nucleic Acids Res* 50: 228-234
- Ullrich-Eberius CI, Novacky A, van Bel AJ (1984) Phosphate uptake in *Lemna gibba* G1: energetics and kinetics. *Planta* 161: 46-52
- Ungerer, J, Pakrasi HB (2016) Cpf1 is a versatile tool for CRISPR genome editing across diverse species of cyanobacteria. *Sci Rep* 6: 39681
- Urzica EI, Adler LN, Page MD, Linster CL, Arbing MA, Casero D, Pellegrini M, Merchant SS, Clarke SG (2012) Impact of oxidative stress on ascorbate biosynthesis in *Chlamydomonas* via regulation of the *VTC2* gene encoding a GDP-L-galactose phosphorylase. *J Biol Chem* 287: 14234-14245
- van der Oost J, Westra ER, Jackson RN, Wiedenheft B (2014) Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* 12: 479-492
- Vecchi V, Barera S, Bassi R, Dall'Osto L (2020) Potential and challenges of improving photosynthesis in algae. *Plants* 9: 67
- Versaw WK, Garcia LR (2017) Intracellular transport and compartmentation of phosphate in plants. *Curr Opin Plant Biol* 39: 25-30
- Versaw WK, Harrison MJ (2002) A chloroplast phosphate transporter, PHT2;1 influences allocation of phosphate within the plant and phosphate-starvation responses. *Plant Cell* 14: 1751-1766
- Vidal-Meireles A, Neupert J, Zsigmond L, Rosado-Souza L, Kovács L, Nagy V, Galambos A, Fernie AR, Bock R, Tóth SZ (2017) Regulation of ascorbate biosynthesis in green algae has evolved to enable rapid stress-induced response via the *VTC2* gene encoding GDP-L-galactose phosphorylase. *New Phytol* 214: 668-681

- Vidal-Meireles A, Tóth D, Kovács L, Neupert J, Tóth SZ (2020) Ascorbate deficiency does not limit nonphotochemical quenching in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 182: 597-611
- Wang C, Huang W, Ying Y, Li S, Secco D, Tyerman S, Whelan J, Shou H (2012) Functional characterization of the rice SPX-MFS family reveals a key role of OsSPX-MFS1 in controlling phosphate homeostasis in leaves. *New Phytol* 196: 139-148
- Wang C, Yue W, Ying Y, Wang S, Secco D, Liu Y, Whelan J, Tyerman SD, Shou H (2015) Rice SPX-major facility superfamily3, a vacuolar phosphate efflux transporter, is involved in maintaining phosphate homeostasis in rice. *Plant Physiol* 169: 2822-2831
- Wang H, Xu Q, Kong YH, Chen Y, Duan JY, Wu WH, Chen YF (2014) Arabidopsis WRKY45 transcription factor activates PHOSPHATE TRANSPORTER1;1 expression in response to phosphate starvation. *Plant Physiol* 164: 2020-2029
- Wang L, Patena W, Van Baalen KA, Xie Y, Singer ER, Gavrilenko S, Warren-Williams M, Han L, Harrigan HR, Hartz LD, Chen V, Ton VTNP, Kyin S, Shwe HH, Cahn MH, Wilson AT, Onishi M, Hu J, Schnell DJ, McWhite CD, Jonikas MC (2023) A chloroplast protein atlas reveals punctate structures and spatial organization of biosynthetic pathways. *Cell* 186: 3499-3518.e14.
- Wang L, Xiao L, Yang H, Chen G, Zeng H, Zhao H, Zhu Y (2020) Genome-wide identification, expression profiling, and evolution of phosphate transporter gene family in green algae. *Front Genet* 11: 590947
- Wang Y, Wang F, Lu H, Liu Y, Mao C (2021) Phosphate uptake and transport in plants: an elaborate regulatory system. *Plant Cell Physiol* 62: 564-572
- Wang Z, Guo Q, Tian L (2022) Tracing phosphorus cycle in global watershed using phosphate oxygen isotopes. *Sci Total Environ* 829: 154611
- Wright AV, Nunez JK, Doudna JA (2016) Biology and applications of CRISPR systems: harnessing nature's toolbox for genome engineering. *Cell* 164: 29-44
- Wykoff DD, Davies JP, Melis A, Grossman AR (1998) The regulation of photosynthetic electron transport during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 117: 129-139
- Wykoff DD, O'Shea EK (2001) Phosphate transport and sensing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 159: 1491-1499
- Xu R, Qin R, Li H, Li D, Li L, Wei P, Yang J (2017) Generation of targeted mutant rice using a CRISPR-Cpf1 system. *Plant Biotechnol J* 15: 713-717
- Xue H, Tokutsu R, Bergner SV, Scholz M, Minagawa J, Hippler M (2015) Photosystem II subunit R is required for efficient binding of lightharvesting complex stress-related protein 3 to photosystem II-light-harvesting supercomplexes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 167: 1566-1578
- Yamano T, Nishimasu H, Zetsche B, Hirano H, Slaymaker IM, Li Y, Fedorova I, Nakane T, Makarova KS, Koonin EV, Ishitani R, Zhang F, Nureki O (2016) Crystal structure of Cpf1 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell* 165: 949-962

- Yan M, Yan HQ, Ren GX, Zhao JP, Guo XP, Sun YC (2017). CRISPR-Cas12a-assisted recombineering in bacteria. *App Environ Microbiol* 83: e00947-17
- Yang SY, Huang TK, Kuo HF, Chiou T (2017) Role of vacuoles in phosphorus storage and remobilization. *J Exp Bot* 68: 3045-3055
- Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P, Volz SE, Joung J, van der Oost J, Regev A, Koonin EV, Zhang F (2015) Cpf1 is a single RNAguided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell* 163: 759-771
- Zhang P, Liu S, Cong B, Wu G, Liu C, Lin X, Shen J, Huang X (2011) A novel omega-3 fatty acid desaturase involved in acclimation processes of polar condition from Antarctic ice algae *Chlamydomonas* sp. ICE-L. *Mar Biotechnol* 13: 393-401
- Zhu W, Miao Q, Sun D, Yang G, Wu C, Huang J, Zheng C (2012) The mitochondrial phosphate transporters modulate plant response to salt stress via affecting ATP and gibberellin metabolism in *Arabidopsis thaliana* PLoS One 7: e43530

9. ÖSSZEFOGLALÁS

9.1. Bevezetés

A foszfor az élő szervezetek számára nélkülözhetetlen makroelem. Létfontosságú biomolekulák szerkezeti alkotóeleme, mint például az ATP, nukleinsavak, foszfolipidek, cukor-foszfátok és különböző koenzimek (Rocha és mtsai., 2019). Szerepet játszik az energiaháztartás és az anyagcsere szabályozásában, különböző jelátviteli folyamatokban és a fotoszintézisben (Berndt és Kumar, 2009). Az egyik legfontosabb növényi tápanyag, a növényi sejtek száraz tömegének 0,1-1,4 %-át teszi ki (Broadley és mtsai., 2004; Amtmann és mtsai., 2005). Napjainkban a foszforhiány a megművelt földterületek 70 %-át érinti és jelentős mértékben csökkenti a terméshozamot, ezért a foszfortartalmú műtrágyák a modern mezőgazdaság nélkülözhetetlen kiegészítőivé váltak (Lynch, 2011; Herrera-Estrella és López-Arredondo 2016).

A talajban a foszfor különféle vegyületek formájában fordul elő. A talaj szerves anyagainak bomlása, valamint a foszfortartalmú kőzetek mállása következtében szerves és szervetlen formában is előfordul (Shen és mtsai., 2011). A talaj foszfortartalmának 29-65 % szerves, 35-71 % pedig szervetlen formában van jelen. Számos a talajban előforduló foszfortartalmú vegyület közül a szervetlen foszfát (PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} és a H_2PO_4^-) a növények számára a legkönnyebben hozzáférhető.

A növények számos stratégiát fejlesztettek ki annak érdekében, hogy növeljék hozzáférésüket a talajoldatban található szervetlen foszfáthoz és képesek legyenek átvészelni a foszforhiányos időszakokat (Hammond és mtsai., 2004a; 2004b). Foszforhiány esetén a növények megnövelik gyökérrendszerük felületét oly módon, hogy növelik a szénhidrátok mennyiségét a gyökerekben, ami felgyorsítja az oldalgökörek keletkezését és növekedését, valamint növelik a gyökérszőrök számát és hosszát is (Forde és Lorenzo 2001; Jungk, 2001). A talajlakó gombákkal képzett mikorrhiza kapcsolatok száma szintén növekszik (Karandashov és Bucher, 2005). A növények továbbá protonokat, enzimeket és szerves savakat választanak ki a rizoszférába, hogy szervetlen foszfátot szabadítsanak fel a talaj szerves és szervetlen forrásaiból (Amtmann és mtsai., 2005). A szervetlen foszfát meglehetősen alacsony, általában 1-10 μM -os koncentrációban van jelen a talajban (Yang és mtsai., 2017). Ezzel szemben a növényi sejtekben a koncentrációja már a mM-os tartományba esik (jellemzően 5-20 mM) (Hasan és mtsai., 2016). Ebből kifolyólag a szervetlen foszfátfelvétel koncentráció grádiens ellenében történik a sejtfalon és a

plazmamembránon keresztül, ami igen energiaigényes folyamat. Ezen túlmenően a szerves foszfát anionoknak le kell győzniük a negatív membránpotenciált is, ahhoz hogy bejussanak a növényi sejtekbe (Schachtman és mtsai., 1998; Rausch és Bucher 2002). A foszfátfelvétele kotranszporterek közreműködése révén valósul meg. Annak érdekében, hogy a növény elkerülje a membrán hiperpolarizációját, a H_2PO_4^- belépése a sejtekbe más kationokkal (például H^+ vagy Na^+) együtt történik (Schachtman és mtsai., 1998; Rausch és Bucher 2002).

A szerves foszfát sejtmembránokon keresztül történő szállítása a felhasználás szabályozásának kritikus szakasza. Az elmúlt néhány évben számos olyan transzportert azonosítottak, amelyek a szerves foszfát szállításában játszanak szerepet. Lúdfűben (*Arabidopsis thaliana*) és a rizsben (*Oryza sativa*) öt nagy affinitású szerves foszfát-transzporter (PHT) családot azonosítottak (PHT1, PHT2, PHT3, PHT4 és PHT5), amelyek fehérjeszekvenciáik, sejten belüli elhelyezkedésük és funkcióik alapján különíthetők el egymástól (Sun és mtsai., 2017). A PHT családok tagjai a legjobban tanulmányozott foszfát-transzporterek az edényes növényekben. A talajból történő szerves foszfát felvételében és a növényen belüli szállításban betöltött szerepük jól ismert. Érdekes módon az AtPHT4;4-ről kiderült, hogy az aszkorbát kloroplasztiszba történő szállításában is szerepet játszik (Miyaji és mtsai., 2015).

A foszfát-transzport mechanizmusát kevésbé tanulmányozták zöldalgákban, és meglepő módon egyetlen szerves foszfát-transzportert sem jellemeztek még részletesen. Wang és munkatársai (2020) 25 feltételezett foszfát-transzportert kódoló gént azonosítottak a *Chlamydomonas reinhardtii* nevű zöldalga genomjában. Ezeket négy alcsaládba sorolták: a PTA alcsalád négy, a PTB tizenegy, PHT3 egy, a PHT4 alcsalád pedig kilenc gént tartalmaz (Wang és mtsai., 2020). A szerves foszfátfelvétel és a sejten belüli eloszlás mechanizmusainak megértése rendkívül fontos, mivel a mikroalgák, így többek között a *C. reinhardtii* is nagy mennyiségű szerves foszfátot képesek felhalmozni és tárolni polifoszfát szemcsék formájában, specifikus vakuólumokban, úgynevezett acidokalciszómákban (Sanz-Luque és mtsai., 2020). Ez az úgynevezett „luxusfelvétel” (Riegman és mtsai., 2000) elősegítheti a szerves foszfát visszanyerését a szennyvízkezelés során (Shilton és mtsai., 2012), hogy ezt követően foszforban gazdag biotrágyákat állítsanak elő (Slocombe és mtsai., 2020). Így a mikroalgák szerves foszfátfelvételének és szállításának megértése fontos lehet a környezetvédelem és a vízgazdálkodás szempontjából.

9.2. Célkitűzések

- CRISPR/Cas12a technika segítségével funkcióvesztéses *C. reinhardtii* mutánsok létrehozása. A kísérletek során használt mutánsokat kérésünkre az edinburgh-i egyetemen Dr. Molnár Attila és kutatócsoportja hozta létre, és bocsájtotta a rendelkezésünkre.
- A CrPHT4-3 és a CrPHT4-7 transzporterek sejten belüli elhelyezkedésének meghatározása. Ehhez olyan alga törzsek létrehozása, amelyek Vénusz fluoreszcens fehérjével jelölt transzportereket fejeznek ki.
- *pht4-3*, *pht4-7*, valamint *pht4-3 pht4-7* dupla mutánsok segítségével a fehérjék élettani szerepének a tisztázása, különös tekintettel a fotoszintetikus aktivitásra.
- Az általunk vizsgált CrPHT4-3 és CrPHT4-7 transzporterek szubsztrát-specifitásának meghatározása *C. reinhardtii*-ban végzett élettani mérések alapjá és élesztősejtekben történő kifejeztetéssel.

9.3. Alkalmazott módszerek

- CRISPR/Cas12a technika segítségével létrehozott *C. reinhardtii* mutánsok genetikai jellemzése
- *C. reinhardtii* és *S. cerevisiae* genetikai transzformációja
- DNS és RNS izolálás
- PCR és RT-qPCR
- Fluoreszcens mikroszkópia
- Fotoszintetikus paraméterek mérése (OJIP, NPQ, qT)
- HPLC
- *C. reinhardtii* sejtek ATP koncentrációjának meghatározása
- Sejtszám és sejtméret meghatározás

9.4. Eredmények

9.4.1. CrPHT4-7 fehérjével kapcsolatos eredmények

Fluoreszcens mikroszkópiával kapott eredményeink alapján kijelenthető, hogy a PHT4 transzporter család tagja, a *C. reinhardtii*-ban azonosított CrPHT4-7 a kloroplasztisz burkolómembránjában elhelyezkedő szerves foszfát-transzporter. A részletes élettani jellemzés során kapott eredmények azt mutatják, hogy a CrPHT4-7 döntő szerepet játszik a kloroplasztisz megfelelő szerves foszfátszintjének fenntartásában, ezáltal javítva a sejtek életképességét. Megfigyeltük, hogy a kloroplasztiszban fellépő szerves foszfáthiány nagymértékű aszkorbát-felhalmozódást vált ki a *C. reinhardtii*-ban, hasonlóan a kénmegvonás esetén megfigyelhető felhalmozódáshoz (Nagy és mtsai., 2016). Az aszkorbát nagymértékű fokozott termelődése a *pht4-7* mutánsokban a reaktív oxigénformák sejtkárosító hatásainak mérséklése érdekében történhet. A reaktív oxigénformák keletkezésének kiváltó oka feltehetően a csökkent mértékű állapotátmenet és ATP szintézis, ami a CO₂ fixáció hatékonyságának csökkenéséhez vezet.

Bár a CrPHT4-7 viszonylag nagyfokú hasonlóságot mutat az AtPHT4;4-gyel, *C. reinhardtii*-ban nem mutatott jelentős aszkorbát-transzport aktivitást. *S. cerevisiae*-ben kifejezve a CrPHT4-7 nem fokozta a sejtek aszkorbátfelvételét az élettanilag releváns koncentrációtartományban, ezért kijelenthető, hogy fiziológiás körülmények között a CrPHT4-7 valószínűleg nem játszik szerepet az aszkorbát szállításában.

Megfigyeltük továbbá, hogy a CrPHT4-7 túltermeltetése megnöveli az algasejtek fénystressztűrő képességét. Másrészt a CrPHT4-7 funkciójának elvesztése nem eredményezett letális fenotípust, annak ellenére, hogy a szerves foszfor elengedhetetlen a kloroplasztisz funkciójának fenntartásához. Éppen ezért valószínűnek tűnt, hogy további PHT transzporterek találhatóak a kloroplasztisz burkolómembránjában.

9.4.2. CrPHT4-3 fehérjével kapcsolatos eredmények

Eredményeink alapján kijelenthető, hogy a PHT4 transzporter család egy másik tagja, a *C. reinhardtii*-ban azonosított CrPHT4-3 a kloroplasztisz burkolómembránjában elhelyezkedő szerves foszfát-transzporter. A részletes élettani mérések eredményei azt mutatják, hogy a CrPHT4-3 a CrPHT4-7 mellett szintén fontos szerepet játszik a kloroplasztisz megfelelő szerves foszfátszintjének kialakításában, ezáltal hozzájárulva a foszfor-homeosztázis és végső soron a sejtek életképességének fenntartásához. A *Crpht4-3*

és a *Crpht4-3 Crpht4-7* dupla mutánsok szintén a sejt aszkorbát tartalmának drámai növekedésével válaszoltak a fénystresszre, valószínűleg a reaktív oxigénformák sejtkárosító hatásainak mérséklése érdekében.

A CrPHT4-3 túltermeltetése kismértékben megnövelte az algasejtek fényvel szembeni ellenállóképességét. Hasonlóan ahhoz, mint amit a CrPHT4-7 fehérje esetében tapasztaltunk, a CrPHT4-3 funkciójának elvesztése sem eredményezett letális fenotípust. Ugyanakkor a *pht4-3 pht4-7* dupla mutánsok stressztűrő képessége drámai módon lecsökkent, ezért valószínűnek tűnik, hogy az általunk megvizsgált CrPHT4-3 és CrPHT4-7 transzporterek együtt kulcsszerepet játszanak foszfát kloroplasztiszba történő szállításában.

Bár a CrPHT4-3 szintén viszonylag nagyfokú hasonlóságot mutat az AtPHT4;4-gyel, nem mutatott számottevő aszkorbát-transzport aktivitást sem *C. reinhardtii*-ban, sem pedig *S. cerevisiae*-ben kifejezve. Eredményeink alapján tehát kijelenthető, hogy a CrPHT4-3 sem vesz számottevően részt az aszkorbát szállításában.

Eredményeinket összefoglalva kijelenthetjük, hogy *C. reinhardtii* nevű zöldalgában sikerült kettő foszfát-transzportert azonosítanunk és jellemeznünk. A részletes élettani jellemzések során kapott eredmények azt mutatják, hogy ezek a transzporterek fontos szerepet játszanak a kloroplasztisz megfelelő szerves foszfátszintjének fenntartásában, ezáltal javítva a sejtek életképességét.

10. SUMMARY

10.1. Introduction

Phosphorus is an essential macroelement for living organisms. It is a structural component of vital biomolecules such as ATP, nucleic acids, phospholipids, sugar phosphates and various coenzymes (Rocha et al., 2019). It plays a role in the regulation of energy balance and metabolism, in various signaling processes and in photosynthesis (Berndt and Kumar, 2009). Perhaps the most important plant nutrient after nitrogen, accounting for 0.1-1.4 % of the dry weight of plant cells (Broadley et al., 2004; Amtmann et al., 2005). Today, phosphorus deficiency affects 70% of cultivated land and significantly reduces crop yields, which is why phosphorus-containing fertilizers have become essential supplements for modern agriculture (Lynch, 2011; Herrera-Estrella and López-Arredondo 2016).

In the soil, phosphorus occurs in the form of various compounds. It occurs in both organic and inorganic forms as a result of the decomposition of soil organic matter and the weathering of phosphorus-containing rocks (Shen et al., 2011). 29-65 % of the phosphorus content of the soil is present in organic and 35-71 % in inorganic form. Among the many phosphorus-containing compounds found in the soil, inorganic phosphate (PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} and H_2PO_4^-) is the most accessible to plants.

Plants have developed several strategies to increase their access to inorganic phosphate in the soil solution and to survive periods of phosphorus deficiency (Hammond et al., 2004a; 2004b). In case of phosphorus deficiency, plants increase the surface area of their root system by increasing the amount of carbohydrates in the roots, which accelerates the formation and growth of lateral roots, and also increases the number and length of root hairs (Forde and Lorenzo 2001; Jungk, 2001). The number of mycorrhizal connections with soil-dwelling fungi also increases (Karandashov and Bucher, 2005). Plants secrete protons, enzymes, and organic acids into the rhizosphere to release inorganic phosphate from soil organic and inorganic sources (Amtmann et al., 2005). Inorganic phosphate is present in soil at fairly low concentrations, usually 1-10 μM (Yang et al., 2017). In contrast, its concentration in plant cells is in the mM range (typically 5-20 mM) (Hasan et al., 2016). Thus, the absorption of inorganic phosphate takes place against the concentration gradient through the cell wall and the plasma membrane, which is a highly energy-demanding process. In addition, the inorganic phosphate anions must also overcome the negative

membrane potential to enter plant cells (Schachtman et al., 1998; Rausch and Bucher 2002). The uptake of phosphate is realized through the cooperation of cotransporters. In order to avoid membrane hyperpolarization, H_2PO_4^- enters cells together with other cations, such as H^+ and Na^+ (Schachtman et al., 1998; Rausch and Bucher 2002).

The transport of inorganic phosphate across cell membranes is a critical step in the regulation of utilization. In the past few years, several transporters have been identified that play a role in the transport of inorganic phosphate. Five high-affinity inorganic phosphate transporter (PHT) families (PHT1, PHT2, PHT3, PHT4 and PHT5) have been identified in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*, which can be distinguished from each other based on their protein sequences, intracellular location and functions (Sun et al., 2017). Members of the PHT families are the best studied phosphate transporters in vascular plants. Their role in the uptake of inorganic phosphate from the soil and transport within the plant is well known. Interestingly, AtPHT4;4 was also found to be involved in the transport of ascorbate into the chloroplast (Miyaji et al., 2015).

The mechanism of phosphate transport has been poorly studied in green algae, and surprisingly, no inorganic phosphate transporters have been characterized in detail. Wang et al. (2020) identified 25 genes encoding putative phosphate transporters in the genome of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. These were classified into four subfamilies: the PTA subfamily contains four, the PTB eleven, the PHT3 one, and the PHT4 subfamily nine genes (Wang et al., 2020). The understanding of the mechanisms of inorganic phosphate uptake and cellular distribution is of high importance, because microalgae can accumulate and store polyphosphate particles in specific vacuoles, acidocalcosomes, which are very important in storing inorganic phosphate (Sanz-Luque et al., 2020). This so-called “luxury uptake” (Regman et al., 2000) can facilitate the recovery of inorganic phosphate during wastewater treatment (Shilton et al., 2012) to subsequently produce phosphorus-rich fertilizers (Slocombe et al., 2020). Thus, understanding the uptake and transport of inorganic phosphate by microalgae is extremely important for the protection of environment and water management.

10.2. Aims

- Generation of *C. reinhardtii* CrPHT4-3 and CrPHT4-7 mutants with loss of function, using the CRISPR/Cas12a technique. The mutants used in the experiments were created, and made available to us by Dr. Attila Molnár and his research group at the University of Edinburgh upon our request.
- Determination of the intracellular localisation of CrPHT4-3 and CrPHT4-7 proteins. This is achieved by creating algal strains expressing the transporters tagged with Venus fluorescent protein.
- Elucidation of the physiological roles of proteins using *pht4-3*, *pht4-7* and *pht4-3 pht4-7* double mutants, with particular attention paid to photosynthetic activity.
- Determination of the substrate-specificity of the CrPHT4-3 and CrPHT4-7 transporters based on physiological measurements in *C. reinhardtii* and their expression in yeast cells.

10.3. Applied methods and techniques

- Genetic characterization of *C. reinhardtii* mutants generated by CRISPR/Cas12a technique
- Genetic transformation of *C. reinhardtii* and *S. cerevisiae*
- DNA and RNA isolation
- PCR and RT-qPCR
- Fluorescence microscopy
- Measurement of photosynthetic parameters (OJIP, NPQ, qT)
- HPLC
- Determination of ATP content in *C. reinhardtii*
- Determination of cell number and cell size

10.4. Results

10.4.1. Molecular characterization and physiological roles of the CrPHT4-7 transporter

Based on our results obtained by fluorescence microscopy on algal strains expressing the transporter tagged with Venus fluorescent protein, it can be stated that CrPHT4-7 is located in the chloroplast envelope membrane. The results obtained during the detailed physiological characterization show that CrPHT4-7 plays a crucial role in maintaining the appropriate inorganic phosphate level of the chloroplast, thereby improving cell viability. We observed that the inorganic phosphate deficiency occurring in the chloroplast causes a strong ascorbate accumulation in *C. reinhardtii*, similar to the accumulation observed in the case of sulfur deprivation (Nagy et al., 2016). The increased production of ascorbate in *pht4-7* mutants may occur in order to mitigate the cell damaging effects of reactive oxygen species. The root cause of the formation of reactive oxygen species is presumably the reduced state transition and ATP synthesis, which leads to a decrease in the efficiency of CO₂ fixation.

Although CrPHT4-7 shows a relatively high degree of similarity with AtPHT4;4, it did not show significant ascorbate transport activity in *C. reinhardtii*. CrPHT4-7 expressed in *S. cerevisiae* did not increase ascorbate uptake by cells in the physiologically relevant concentration range either, therefore it can be stated that CrPHT4-7 probably does not play a role in ascorbate transport under physiological conditions.

We also observed that the overproduction of CrPHT4-7 increases the light stress tolerance of algal cells. On the other hand, loss of function of CrPHT4-7 did not result in a lethal phenotype, despite the fact that inorganic phosphorus is essential to maintain chloroplast function. Therefore, it seemed likely that additional PHT transporters are located in the envelope membrane of the chloroplast.

10.4.2. Molecular characterization and physiological roles of the CrPHT4-3 transporter

Based on our results, it can be stated that CrPHT4-3, another member of the PHT4 transporter family in *C. reinhardtii*, is located in the chloroplast envelope membrane. Detailed physiological measurements revealed that CrPHT4-3, alongside CrPHT4-7, plays a crucial role in establishing the appropriate inorganic phosphate level within the chloroplast.

This, in turn, contributes to maintaining phosphorus homeostasis and ultimately ensures cell viability. *pht4-3* and *pht4-3 pht4-7* double mutants also responded to light stress with a dramatic increase in cellular ascorbate content, probably to mitigate the cell-damaging effects of reactive oxygen species.

Overproduction of CrPHT4-3 slightly increased the resistance of algal cells to strong light. Similar to what was observed in the case of the CrPHT4-7 protein, the loss of function of CrPHT4-3 did not result in a lethal phenotype. At the same time, the stress tolerance of *pht4-3 pht4-7* double mutants was dramatically reduced, so it seems likely that the CrPHT4-7 and CrPHT4-3 transporters together play a key role in transporting phosphate into the chloroplast.

Although CrPHT4-3 also shows a relatively high degree of similarity with AtPHT4;4, it did not show significant ascorbate transport activity either in *C. reinhardtii* or in *S. cerevisiae*. Based on our results, it can therefore be stated that CrPHT4-3 is not significantly involved in the transport of ascorbate.

Summarizing our results, we can state that we succeeded in identifying and characterizing two phosphate transporters in the green alga *C. reinhardtii*. The results obtained during the detailed physiological characterization show that these transporters play an important role in maintaining the appropriate inorganic phosphate level of the chloroplast.

11. PUBLIKÁCIÓS LISTA

11.1. A dolgozat alapját képező közlemény

Tóth D, Kuntam S, Ferenczi Á, Vidal-Meireles A, Kovács L, Wang L, Sarkadi Z, Migh E, Szentmihályi K, Tengölics R, Neupert J, Bock R, Jonikas MC, Molnár A, Tóth SZ (2023) The chloroplastic phosphate transporter CrPHT4-7 supports phosphate homeostasis and photosynthesis in *Chlamydomonas*. *Plant Physiology* 00: 1-16

<https://doi.org/10.1093/plphys/kiad607>

Impakt faktor: 7,4

11.2. Egyéb közlemények

Simon LM, Laczkó I, Demcsák A, **Tóth D**, Kotormán M, Fülöp L (2012) The formation of amyloid-like fibrils of α -chymotrypsin in different aqueous organic solvents. *Protein & Peptide Letters* 19: 544-550

Impakt faktor: 1,994

Vidal-Meireles A, **Tóth D**, Kovács L, Neupert J, Tóth SZ (2020) Ascorbate deficiency does not limit nonphotochemical quenching in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* 182: 597-611

Impakt faktor: 8,34

Podmaniczki A, Nagy V, Vidal-Meireles A, **Tóth D**, Patai R, Kovács K, Tóth SZ (2021) Ascorbate inactivates the oxygen-evolving complex in prolonged darkness. *Physiologia Plantarum* 171: 232-245

Impakt faktor: 5,081

Nagy V, Podmaniczki A, Vidal-Meireles A, Kuntam S, Herman É, Kovács L, **Tóth D**, Scoma A, Tóth SZ (2021) Thin cell layer cultures of *Chlamydomonas reinhardtii* L159I-N230Y, *pgr11* and *pgr5* mutants perform enhanced hydrogen production at sunlight intensity. *Bioresource Technology* 333: 125217

Impakt faktor: 11,889

Vidal-Meireles A, Kuntam S, Széles E, **Tóth D**, Neupert J, Bock R, Tóth SZ (2022) The lifetime of the oxygen-evolving complex subunit PSBO depends on light intensity and carbon availability in *Chlamydomonas*. *Plant Cell and Environment* 46: 422-439
Impakt faktor: 7,3

Tóth D, Tengölics R, Aarabi F, Karlsson A, Vidal-Meireles A, Kovács L, Kuntam S, Körmöczi T, Fernie A, Hudson E, Papp B, Tóth SZ Chloroplastic ascorbate acts as a regulatory hub in plant metabolism regardless of oxidative stress. *Plant Physiology* - átdolgozás alatt

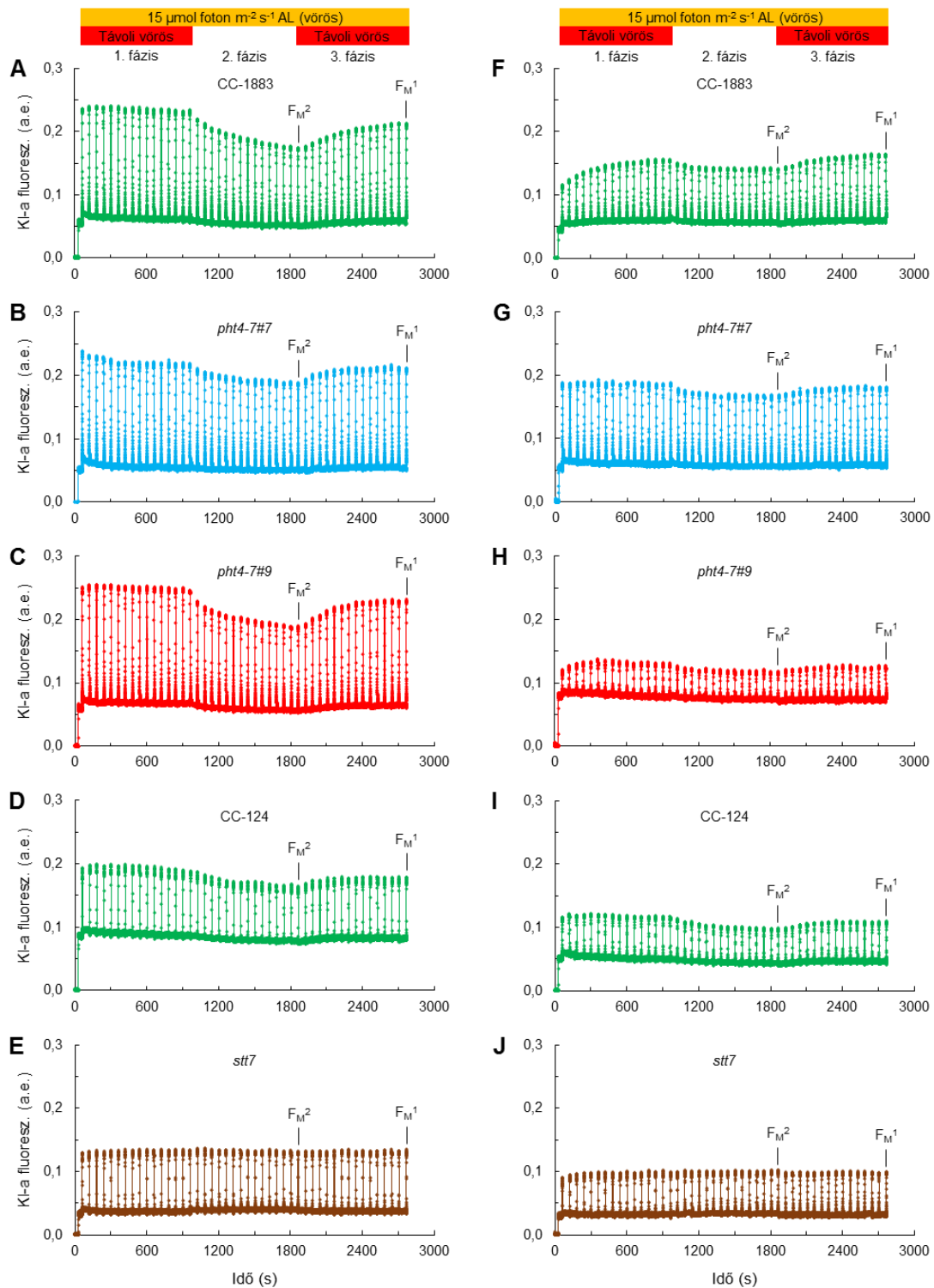
Összesített impakt faktor: 42,004

12. MELLÉKLETEK

CrPHT4-3	-----	-----	-----MLHQ	PLRSQCTRRV	PADPLSILAA	VARHAPIGY-	33
CrPHT4-7	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AtPHT4;1	-----	-----	-----MNARA	LLCSSNIHSL	YTSNRPEKT	SSSRSLRNLK	35
AtPHT4;2	-----	-----MATV	GSLKPLHSS	CSSSFPRNPI	V--NRKALLG	FVF----DSA	38
AtPHT4;3	-----	---MCYSLSI	QSSIDFHNRN	ALKIHGDRAI	LTSNLPPLRR	IPFLPERDRR	47
AtPHT4;4	MALGGLISNR	NFGSFIGSGN	GCQRLGKSGA	EVSKLFPNAL	LCRNHQPLQA	SLHHESGHMR	60
AtPHT4;5	-----	-----	---MARLTLR	PHNHFFSSPI	YAHKQPFSLV	YTFPHHHQ-	36
AtPHT4;6	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
CrPHT4-3	-----V	AHGARAPGYA	SAGVGRAPQL	LARGRLPAGP	NGASRRSLVA	AGAAAADAAA	84
CrPHT4-7	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AtPHT4;1	PSPKSL---R	VWYIPRNRSS	VFRVLVRSSD	KSESSNSYV	EGDKVSGNND	-VVSDSPSSI	91
AtPHT4;2	RK-----N	QIRCENLRYS	SESDGKRR-N	AAAKKRQSP	ERCAAEGVLT	GGGGSEAIAE	90
AtPHT4;3	VRT-----L	VLCTGRVNS	LKFTGNTSVD	LCGIPRHRLR	VSCSDARRTP	EETAABELTAQ	100
AtPHT4;4	RSFGCFLQPR	MDSVIRFRNS	IKINRSRAY	KSEESDITEG	VVPSADGSAE	AILVEGNLQN	120
AtPHT4;5	-----N	PLIKSRVKCS	ASGTERVRES	KKLPPKDPTE	DPKQLPIPE	VLSTETGFEQ	87
AtPHT4;6	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
CrPHT4-3	PAPAPARVSP	FINVLLPTAL	ALLLNCMDRI	CLSVAIMPMA	AEFGWPASLQ	GVIQSAFLWG	144
CrPHT4-7	----MNTRPH	RWNVVVMIAV	AFVLCNMDKV	NMSVAVIPMA	AELGWSATER	GLVSSSFFWG	56
AtPHT4;1	VLPWWEFFPK	RWVIVLLCFS	AFLLCNMDRV	NMSIAILPMS	AEYGNPATV	GLIQSSFFWG	151
AtPHT4;2	VRT---MMPE	RIKVVILTAC	MMCLCNADRV	VMSVAVVPLA	DKLGWSSSFL	GVVQSSFLWG	147
AtPHT4;3	PNFSEFITSE	RVKVVAMLAL	ALALCNADRV	VMSVAIVPLS	LSRGWSKSF	GIVQSSFLWG	160
AtPHT4;4	ASPWWQFP	RWVIVLLCFS	SFLLCNMDRV	NMSIAILPMS	QEYNWSSATV	GLIQSSFFWG	180
AtPHT4;5	NWPPWKNIPQ	RYKLIGATSL	AFVICNMDKV	NLSIAIIPMS	HQFGWSSSVA	GLVQSSFFWG	147
AtPHT4;6	--MKLSNIPQ	RYVIVFLTFI	STCVCIERY	GFSIAYTVAA	DAAGINQSSK	GTILSTFFVG	58
CrPHT4-3	YMATQLVGGG	LADRYGGKRV	LAAGIAWFSV	ASLLLPLLLQ	PATVAAGLTV	PAVLLSRFLT	204
CrPHT4-7	YSATQLPAGY	ISTKIGGAKV	LAAGVALWSF	GTLIAPP---	----AAQTSL	LALCATRVLV	109
AtPHT4;1	YLLTQIAGGI	WADTVGGKRV	LGFGVIWWSI	ATILTPV---	----AAKGLG	PYLLVVRAFM	204
AtPHT4;2	YIFSSVIGGA	LVDRYGGKRV	LAWGVALWSL	ATLLTPW---	----AAHST	LALLCVRAFF	200
AtPHT4;3	YLISPIAGGT	LVDRYGGKVV	MAWGVALWSL	ATFLTPW---	----AADSSL	WALLAARAFM	213
AtPHT4;4	YLLTQILGGI	WADKFGGKVV	LGFGVWWSF	ATIMTPI---	----AARLGL	PYLLVVRAFM	233
AtPHT4;5	YALSQIPGGW	LKIFGGKRV	LEIGVFTWSF	ATALVPL---	----LAGF-M	PGLIFRILIV	199
AtPHT4;6	YACSQVPGGW	AAQKIGGRKV	LLLSFVLWSS	TCFLVPL---	----DPNRV	GLLVVARLLV	110
CrPHT4-3	GLGEGVALPS	MSNLVASHIQ	PAAKARALGL	CFSGFHSGNL	VGLVLSPLL	MTYGWRLGL	264
CrPHT4-7	GLGEGFAPSA	ATAVLAKLVP	STERSRAVA	VWGLDVGSA	VGLLLCGPLI	RMFGWPSVFF	169
AtPHT4;1	GVGEGVAMPA	MNNILSKWVP	VQERSRSLAL	VYSGMYLGSV	TGLAFSPFLI	HQFGWPSVFF	264
AtPHT4;2	GLAEGVAMPS	MTTLLSRWF	MDERASAVGI	SMAGFHMGNV	VGLLLTPLML	SSIGISGPF	260
AtPHT4;3	GVAEGVALPC	MNNMVARWF	PTERSRAVGI	AMAGFQLGNV	VGLMLSPLML	SQGGIYGFVF	273
AtPHT4;4	GIGEGVAMPA	MNNMLSKWVP	VESRSRSLAL	VYSGMYLGSV	TGLAFSPMLI	TKFGWPSVFF	293
AtPHT4;5	GIGEGVSPSA	ATDLIARTIP	VKERSRAVGF	VFGGLSLGSV	MGLLLAPPII	ETFNWESVFF	259
AtPHT4;6	GVAQGFIFPS	IHTVLAQWVP	PHERSRLVSI	TTSGMYLGAA	LGMWLLPALV	ELRGPESVFL	170
CrPHT4-3	VFGVLGAPLL	LFWLKAVPDA	PAAAAAAPAA	PAPAAPAVAA	PAPAPEAAKP	TAPAAAAAAA	324
CrPHT4-7	LFVAVLGLVWV	AAWPLVQPK	MDPDMIAE---	-----	-----NKKKE	QERATRLALA	212
AtPHT4;1	SFGSLGTVWL	TLWLTKAESS	PLE-----	-----	-----DP	TLLPEERKLI	299
AtPHT4;2	LFASLGLLWV	STWSSGVTNN	PQD-----	-----	-----SP	FITRSELRLI	295
AtPHT4;3	IFGLSGFLWL	LVWLSATSSA	PDR-----	-----	-----HP	QITKSELEYI	308
AtPHT4;4	SFGSLGSIWF	LLWLKFAYSS	PKD-----	-----	-----DP	DLSEEKVI	328
AtPHT4;5	LFGLLGVGW	VGFQFLNEEE	VSY-----	-----	-----KG	NEISTSHKSE	294
AtPHT4;6	AEALAGVIWS	LLWIRYATDP	PRSE-----	-----	-----HP	KAAAAGFGGA	206
CrPHT4-3	APNSPPGTSM	SSISVNINYA	STSVPVTAQA	ATDLAASNAA	SAAAAAAYA	AAAAPAAAAA	384
CrPHT4-7	QANEVAASAL	ESVDET---	-----	-----	-----	-----	228
AtPHT4;1	ADNC-----	-A-----	-----	-----	-----	-----	304
AtPHT4;2	QAGKPV---Q	PS-----	-----	-----	-----	-----	304
AtPHT4;3	KQKQISTME	NK-----	-----	-----	-----	-----	320
AtPHT4;4	LGGS-----	-K-----	-----	-----	-----	-----	333
AtPHT4;5	NATKE-----	-E-----	-----	-----	-----	-----	300
AtPHT4;6	LLPTNV----	-----	-----	-----	-----	-----	212
CrPHT4-3	PSTAAEAAGP	GPGSAVAAA	AAAPAVATKS	DVTVAKLLTS	SATWAIIVN	IVNHFGYFIY	444
CrPHT4-7	-----	---PVSATYA	KLEKSLPDG	KVPWGEFFRS	PVWAVTVAH	FCFNWGYTTL	275
AtPHT4;1	-----	-----	---SKEPVK	SIPWRLILSK	PVWALISCH	FCHNWGTFIL	340
AtPHT4;2	-----	-----	---TISPKP	NPSLRLLLSK	LPTWAIIFAN	VTNWGYFVL	340
AtPHT4;3	-----	-----	---RISTSG	IPPFGRLLSK	MPTWAVIVAN	SMHSWGFVVI	356
AtPHT4;4	-----	-----	---PREPVT	VIPWKLILSK	PVWALIIISH	FCHNWGTFIL	369
AtPHT4;5	-----	-----	---LGSSLK	EIPWKSFFQS	PAVWAMIYTH	FCGSWGHYTC	336
AtPHT4;6	-----	-----	---NHHKVT	HIPWKKIMLS	LPVWAIIVNN	FTFHYALYVL	248

CrPHT4-3	LNWME	TYFSK	ALGFDL	RS	SS	FTAFLP	PWLVM	AVGSSA	AGLL	ADSLV	ARGM-	AVTT	VRKSLQ	503													
CrPHT4-7	LAWL	PSYFEL	ALGLN	VER	SS	FLTLIP	YIAM	TAMMPL	VGPV	ADGW	VKNGV-	PLTR	VRKICQ	334													
AtPHT4;1	LTWM	PTYHQ	VLKFN	LMESG	LLSV	FPWMTM	AISAN	AGGWI	ADTL	VSRGF-	SVTN	VRKIMQ	399														
AtPHT4;2	LSWM	PVYFQT	VFNVN	LKQAA	WFSA	LPWATM	AISGY	YAGAA	SDFL	LIRGH-	SVTS	VRKIMQ	399														
AtPHT4;3	LSWM	PIYFNS	VYHVN	LKQAA	WFS	AVPWSM	AFTGY	IAGFW	SDLL	IRRG	T-	SITL	TRKIMQ	415													
AtPHT4;4	LTWM	PTYYNQ	VLKFN	LTE	SG	LLCVLP	PWLTM	AVFAN	IGGWI	ADTL	VSRGL-	SITN	VRKIMQ	428													
AtPHT4;5	LSWL	PTYFSE	ALSLN	LTE	AA	WVSIL	PPLAS	IVVTS	LAGQF	ADYL	LITNGV-	DTT	VRKICQ	395													
AtPHT4;6	MNWL	PTYFEL	GLQIS	LQGM	SSKM	MVPLYLN	FVFS	I	VGGFI	ADYL	LITKRIL	SVTR	TRKFLN	308													
CrPHT4-3	TVAF	LV	PAAA	-LMVLC	QPGI	SAATA	-----	-----	---	VTAM	TVA	LGTT	SLQAG	544													
CrPHT4-7	GIAF	VGPAVC	MIACA	ILTPA	AAAT	AKAATT	GVS	AAGP	VLT	AVLV	GLMSVA	FALGA	WSRAG	394													
AtPHT4;1	TIGF	LGP	PAF-	-FLTQL	KHID	SPTMA	-----	-----	---	VLC	MACS	QGTDA	FSSQSG	439													
AtPHT4;2	SIGF	MG	PGL-	-SLLCL	NFAK	SPSCA	-----	-----	---	AVFM	TIA	LSLSS	FSSQAG	439													
AtPHT4;3	SIGF	IG	PGI-	-ALIGL	T	TAK	QPLVA	-----	---	SAWL	SLA	VGLKS	F	SHLG	455												
AtPHT4;4	SIGF	LGP	PAF-	-FLSQL	SHVK	TPAMA	-----	-----	---	VLC	MACS	QGS	DAFSSQSG	468													
AtPHT4;5	TIAF	V	PAIC	MTLSS	V	DIGL	PPWE	I	-----	---	VGIL	TAG	LALSS	FALSG	437												
AtPHT4;6	TVGF	L	IASAA	LMVL	PM	F	RTE	NGV	-----	---	ILCS	SVA	LGFL	LALGRAG	348												
CrPHT4-3	EVAN	MSD	VAP	RHAG	KMF	GLC	NTFG	CLSG	IV	GVTAV	G	IVE	ATKS	SFT-PV-	-----	FQ	594										
CrPHT4-7	LYCN	HQ	DLS	KYAS	ALL	GIT	NTAG	AIP	GV	GVTM	AGYL	LD	TTAS	SWAN	AL	-----	FI	445									
AtPHT4;1	LYSN	HQ	DIAP	RYSG	VLL	GLS	NTAG	VLAG	VL	GTAAT	G	ILQ	H-G	SWD-DV-	-----	FT	488										
AtPHT4;2	FLLN	MQ	DIAP	QYAG	F	LHG	IS	NCAG	T	LAA	IV	STIG	T	GYFVQ	WLG	S	FQ-AF-	-----	LT	489							
AtPHT4;3	FLIN	LQ	EIAP	EYSG	V	LHG	MC	LTAG	T	LAA	IV	GTVG	A	G	F	F	VE	LLGS	FQ-GF-	-----	IL	505					
AtPHT4;4	LYSN	HQ	DIGP	RYAG	VLL	GLS	NTAG	VLAG	VF	GTAAT	G	ILQ	R-G	SWD-DV-	-----	FK	517										
AtPHT4;5	LYCH	Q	DISP	EYAS	ILL	GIT	NTVG	AVP	GV	IV	G	VALT	G	FLLD	STH	SWT	MSL-	-----	FV	488							
AtPHT4;6	FAVN	H	DIAP	RYAG	I	VMG	V	NTAG	T	L	AGI	I	GVDL	T	G	LLE	ASKL	V	YSDLS	HPES	WRV	V	FF	408			
CrPHT4-3	MTAAL	Y	V	V	V	G	AVVL	V	W	C	R	G	E	K	V	F	D	618									
CrPHT4-7	PTAIC	Q	L	F	G	A	AVYT	W	L	A	S	S	E	R	Q	S	W	S	470								
AtPHT4;1	ISVGL	Y	L	V	G	T	VIWN	L	F	S	T	G	E	K	I	I	D	512									
AtPHT4;2	VTAF	L	Y	F	A	T	VF	W	L	L	F	A	T	G	E	R	V	F	512								
AtPHT4;3	LTAIL	Y	L	L	S	A	LFY	N	I	Y	A	T	G	E	R	V	D	F	D	T	T	A	A	534			
AtPHT4;4	VAVAL	Y	L	I	G	T	LV	W	N	L	F	A	T	G	E	K	I	L	D	541							
AtPHT4;5	PSI	F	F	Y	L	T	G	T	V	W	L	A	F	A	S	S	E	P	Q	T	F	R	K	E	D	S	517
AtPHT4;6	IPGL	L	C	I	F	S	V	V	F	L	L	F	S	T	G	E	R	I	F	D	432						

Mellékletek 1. ábra PHT4 fehérjék aminosav szekvenciáinak összehasonlítása. A PHT4 fehérjecsalád *Arabidopsis thaliana*-ban található tagjainak, valamint *Chlamydomonas reinhardtii*-ben található CrPHT4-3 és CrPHT4-7 fehérjék aminosav szekvenciáinak összehasonlítása. A konzervált aminosavakat pirossal, a prediktált transzmembrán régiókat pedig sárgával jelöltük. Az aminosav szekvencia illesztésekhez és a transzmembrán régiók előrejelzéséhez MultAlin és Phyre2 (verzió 2.0) online szoftvereket használtunk.



Mellékletek 2. ábra A *pht4-7* és *stt7* mutánsok tipikus állapotátmeneti kinetikája. **A-E)** 80 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erősségű folyamatos megvilágítás mellett nevelt algakultúrák állapotátmeneti kinetikája. **F-J)** 500 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erősségű folyamatos megvilágítás mellett nevelt algakultúrák állapotátmeneti kinetikája. A kultúrákat Erlenmeyer-lombikokban, TAP tápoldatban neveltük, 72 órán keresztül. Az F_M^2 és F_M^1 értékeket használtuk a qT kiszámolásához (a számoláshoz használt képletet lásd az Anyagok és módszerek című részben).