

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

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

Széles Eszter

Témavezető:

Dr. Tóth Szilvia Zita - tudományos tanácsadó



Biológia Doktori Iskola
Szegedi Tudományegyetem

Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Növénybiológiai Intézet
Molekuláris Fotobioenergetikai Csoport

Szeged

2023

Bevezetés

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

A hagyományos lombikos nevelési és mérési módszerekkel szemben a mikrofluidikai eszközök kiváló lehetőséget jelentenek egyedi sejtek vagy kisszámú sejtpopulációk tanulmányozásához, precízen és dinamikusán szabályozható környezetben *in situ* és valós időben.

A mikrofluidika számos előnnyel bír a hagyományos nevelési rendszerekkel szemben, például a fejlődésbiológiai kutatások terén, hiszen így az egyes sejtek fenotípusait több órán keresztül vagy a sejtek egész élete során, azonos élettani körülmények között tanulmányozhatjuk. A mikrofluidikai eszközök alkalmasak a sejtosztódási sebesség és a biomassza-

növekedés mérésére, valamint különböző kezelések hatásának összehasonlítására.

A mikrofluidika által az is elérhetővé vált, hogy laboratóriumi méretű berendezéseket egy mikroszkóp tárgylemezére kicsinyíthessünk, ami lehetővé tette a kísérletek párhuzamosítását rendkívül kis mintatérfogat mellett, illetve az egysejt- szintű vizsgálatokat is.

Célkitűzések

A zöldalgák morfológiája és a fotoszintézise közötti kapcsolat tanulmányozásának megkönnyítése érdekében célul tűztük ki a mikrofluidika klorofill-a fluoreszcencia indukciós mérésekkel történő kombinációját. Olyan mikrofluidikai eszközöket terveztünk kifejleszteni, amelyek alkalmasak az egysejt-szintű morfológiai és fotoszintézis-vizsgálatokhoz.

A következő célokat tűztük ki:

- 1) Egyetlen sejt csapdázására alkalmas mikrofluidikai kamrák fejlesztése zöldalgák egysejt-analízisének megalapozásához.
- 2) Sejtosztódás megfigyelésére alkalmas csapdák fejlesztése, ahol egyetlen algasejtet képesek vagyunk becsapdázni, majd az utódsejteket a csapdában tartani.

- 3) A becsapdázott zöldalga-sejtek morfológiájának vizsgálata és klorofill-a fluoreszcencia egyidejű mérése Microscopy Imaging PAM készülék segítségével.
- 4) A módszer alkalmazhatóságának bemutatása: *Crvtc2-1* aszkorbát-hiányos mutánsokon végzett klorofill-a fluoreszcencia mérések, sejtosztódás megfigyelése, indukálható *PSBO* amiRNS vonalak vizsgálata, valamint a karotinoidok szerepének vizsgálata a PSII aktivitásának fenntartásában.

Alkalmazott módszerek

- Mikrofluidikai eszközök tervezése KLayout nyílt forráskódú szoftverrel.
- A mikrofluidikai eszközöket standard fotolitográfiával és lágy litográfiai technikákkal készítettük.
- A mikrofluidikai eszközökön belüli folyadékáramlás jellemzőit a Comsol Multiphysics 4.3a szoftverrel (COMSOL AB, Stockholm, Svédország) modelleztük. A sebesség-profilokat a „Lamináris áramlás” időfüggetlen modelljével vizsgáltuk.
- A szimulációk mellett fluoreszcens mikrogyöngyöket (Fluoresbrite YG karboxilát mikrogyöngyök, $d = 1\mu\text{m}$; Polysciences, Inc. Warrington, PA, USA)

használtunk nyomkövető részecskéként, az áramlási vonalak megjelenítéséhez.

- A mikrofluidikai eszközök geometriai jellemzőit pásztázó elektronmikroszkóppal (SEM) ellenőriztük.
- *C. reinhardtii* törzsek: CC-124 (vad típus), CC-4533 (vad típus), *Crvtc2-1*, *EV31*, *PSBO-A58* és *PSBO-B22* amiRNS vonalak. Nevelésük különböző fényintenzitásokon (90, 151, 180, 200, 383 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$), minimál és acetát-tartalmú tápoldatban történt.
- A kultúrák betöltése, kezelése és tenyésztése a mikrofluidikai eszközökben, fecskendőpumpa (Model No. 4000, New Era Pump Systems Inc., Farmingdale, NY, USA) segítségével, meghatározott áramlási viszonyok mellett történt.
- Mikroszkópos megfigyelések módosított AxioScope A1 epifluoreszcens mikroszkóppal.
- A fénymikroszkópos felvételek a mikroszkóphoz egy 60N-C 2/3" 0,63x videoadapterrel kapcsolt Axiocam 503 color CCD kamerával (Zeiss GmbH, Jena, Germany) készültek.
- A különböző fotoszintetikus paraméterek mérésére (F_V/F_M , NPQ) egy szintén a mikroszkóphoz kapcsolt

Microscopy Imaging PAM klorofill-a fluorométer mikroszkópos változatát (Walz GmbH, Effeltrich, Germany) használtunk.

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

Eredmények

A következő főbb eredményeket értük el kutatásaim során:

- Kétféle mikrofluidikai eszközt terveztünk kifejezetten a *C. reinhardtii* számára: „Tulipán” és „Csésze” alakúakat. A mikrofluidikai eszközökön belüli folyadékáramlás jellemzőit számítógépes szimulációval modelleztük és az áramlási vonalak megjelenítéséhez fluoreszcens mikrogöngyöket használtunk nyomkövető részecskékként.
- A „Tulipán” eszköz csapdái nagyon hatékonyan bizonyultak egyedi algasejtek befogására és szilárd

felülethez rögzítés nélküli egy helyben tartására. A „Csésze” alakú kamrák szintén alkalmasak egyedi sejtek befogására, valamint az utódsejtek felnevelésére. A morfológiai megfigyelések mellett az általunk készített mikrofluidikai kamrák klorofill-a mérések végzésére is alkalmasak, a Microscopy Imaging PAM készülék segítségével.

- A „Tulipán” alakú csapdáinkban nemfotokémiai kioltás (NPQ) méréseket végeztünk a *Crvtc2-1* aszskorbát-hiányos mutánsokon egysejt-szinten. Megfigyeltük, hogy az aszskorbát-hiányos mutánsok NPQ értéke magasabb volt, mint a CC-4533 vad típusú törzse, fotoautotróf és mixotróf körülmények között is. Eredményeink összhangban vannak Vidal-Meireles és mtsai. (2020) korábbi megfigyeléseivel, amelyeket lombikban nevelt kultúrákon kaptak. Tehát a „Tulipán” mikrofluidikai platform lehetővé tette az NPQ megbízható és egyetlen sejten történő mérését anélkül, hogy a sejteket szilárd hordozóhoz kellene kötnünk, amely általában szükséges az egysejt-szinten történő klorofill-a fluoreszcencia méréséhez, azzal a kockázattal, hogy károsíthatja vagy zavarja a sejtek élettani folyamatait.

- A „Tulipán” mikrofluidikai eszközeink alkalmasak voltak nitrát-indukálható *PSBO*-amiRNS transzformánsok megfigyelésére. Az ammónia tartalmú tápoldat nitrát-tartalmúra történő lecserélése a vízbontó komplex *PSBO* alegységének csendesítésével jár, ennek következtében a *PSBO*-amiRNS vonalak F_v/F_M értékei rövid idő alatt erőteljesen lecsökkentek. Tehát a „Tulipán” mikrofluidikai eszköz alkalmas volt a tápoldat gyors cseréjére és a fotoszintetikus aktivitásban fellépő változások nagy időbeli felbontással történő követésére.
- A „Csésze” mikrofluidikai eszköz segítségével egysejt-szinten kimutattuk, hogy a fotoszintetikus hatékonyság változik a sejtciklus során, ami összhangban van a korábbi, sejt kultúra szintű fotoszintetikus-aktivitás mérésekkel és transzkriptomikai eredményekkel. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy a fotoszintetikus apparátus szerkezeti és funkcionális átalakuláson megy keresztül a sejt és a kloroplasztisz osztódása közben.
- A „Tulipán” csapdákat tartalmazó mikrofluidikai eszköz alkalmasnak bizonyult a PSII felépülésének és lebomlásának követésére is egysejt-szinten. A

kloroplasztiszban kódolt fehérjék szintézisét linkomicinnel gátoltuk, majd az F_v/F_M és a Φ_{PSII} érték segítségével követtük PSII inaktiválódását. A karotinoid-bioszintézist norfluorazonnal gátolva a PSII szintén inaktiválódott, amely a β -karotin a PSII felépülésében játszott szerepének tulajdonítható. A PSII helyreállítását a gátlószerek eltávolítása után az F_v/F_M és a Φ_{PSII} érték segítségével követtük nyomon. A PSII inaktiválódását és helyreállítását sötétben és alacsony fényintenzitáson is tanulmányoztuk. Egysejtszinten kimutattuk, hogy a PSII regenerációját és *de novo* szintézisét az elérhető β -karotin mennyisége korlátozhatja és a PSII aktivitás csökkenése a β -karotin készlet fokozatos kimerülését jelzi.

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

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

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

Summary

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

The following results were achieved during my research:

- We designed two types of microfluidic devices specifically for *C. reinhardtii* that are called "Tulip" and "Pot" according to the shape of their traps.

- Non-photochemical quenching (NPQ) measurements were performed on *Crvtc2-1* ascorbate-deficient mutants at the single-cell level in our "Tulip"-shaped traps. The "Tulip" microfluidic platform enabled reliable and single-cell measurement of NPQ without the need to attach the cells to a solid support, which is usually required to measure chlorophyll-*a* fluorescence at the single-cell level, with the risk of damaging or interfering with the physiological processes of cells.
- Our "Tulip" microfluidic devices were suitable for observing nitrate-inducible *PSBO*-amiRNA transformants. The "Tulip" microfluidic device was suitable for rapid replacement of the nutrient solution and for monitoring changes in photosynthetic activity with a high temporal resolution.
- "Pot"-shaped chambers are also suitable for capturing individual cells and rearing progeny cells. Using the "Pot" microfluidic device, we demonstrated that photosynthetic efficiency changes during the cell cycle.

- The microfluidic device containing "Tulip" traps proved to be suitable for monitoring the degradation and recovery of PSII at the single-cell level, using the F_V/F_M and Φ_{PSII} parameters. We were able to demonstrate at the single-cell level that the regeneration and *de novo* synthesis of PSII is limited by the amount of available β -carotene and that the decrease in PSII activity indicates the gradual depletion of the β -carotene pool.

Publikációk listája

MTMT azonosító: 10082197

Összesített impakt faktor: 15,613

A dolgozat alapjául szolgáló közlemény:

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

Egyéb közlemények:

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

Nyilatkozat

Mint az alábbi közlemény felelős szerzője igazolom, hogy Széles Eszter Ph.D. jelölt jelentős mértékben hozzájárult az alábbi tudományos publikáció létrehozásához, és a tézisében közölt eredményeit más Ph.D. értekezésben nem használjuk fel.

Vidal-Meireles A., Kuntam S., **Széles E.**, Tóth D., Neupert J., Bock R., Tóth S.Z. (2023) The lifetime of the oxygen-evolving complex subunit PSBO depends on light intensity and carbon availability in *Chlamydomonas*. *Plant Cell Environ.* 46: 422-439.



André Vidal-Meireles
Posztdoktor kutató

Photosynthesis and Environment Team of BiAM DRR, CEA
Cadarache (Franciaország)



Dr. Tóth Szilvia Zita
Tudományos tanácsadó
Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Növénybiológiai Intézet