

Doktori (PhD) értekezés tézisei

PHT4 foszfát-transzporterek jellemzése zöldalgában

Tóth Dávid

Témavezető:

Dr. Tóth Szilvia Zita

**HUN
REN**



HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Növénybiológiai Intézet

Molekuláris Fotobioenergetikai Csoport

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Biológia Doktori Iskola

2024

Szeged

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 formákban 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 (Forte

és Lorenzo 2001; Jungk, 2001). A talajlakó gombákkal képzett mikorrhiza kapcsolatok száma szintén növekszik (Karandashov és Bucher, 2005). A növények protonokat, enzimeket és szerves savakat választanak ki a rizoszférába, hogy szerves foszfátot szabadítsanak fel a talaj szerves és szerves forrásaiból (Ammann és mtsai., 2005). A szerves 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 szerves foszfát felvétele koncentrációgrádiens 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 foszfátfelvétel 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. Lúdfüben (*Arabidopsis thaliana*) és 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 foszfátfelvételben és a növényen belüli

szállításban betöltött szerepük jól ismert. Érdekes módon az AtPHT4;4-ről kiderült, hogy az aszkorbát kloroplasztiszbba történő szállításában is szerepet játszik (Miyaji és mtsai., 2015).

A foszfát-transzport mechanizmusát kevésbé tanulmányozták zöldalgákban, és meglepő módon egyetlen szervesetlen foszfát-transzportert sem jellemeztek még részletesen. Wang és munkatársai (2020) 25 feltételezett foszfát-transzportert 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 (Wang és mtsai., 2020).

A szervesetlen foszfátfelvétel és a sejten belüli eloszlás mechanizmusainak megértése rendkívül fontos, mivel a mikroalgák nagy mennyiségű szervesetlen 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 szervesetlen foszfát visszanyerését a szennyvízkezelés során (Shilton és mtsai., 2012), hogy ezt követően foszforban gazdag biotrágyákat állítsanak elő (Slocombe és mtsai., 2020). Így a mikroalgák szervesetlen foszfátfelvételének és szállításának megértése rendkívül fontos a környezetvédelem és a vízgazdálkodás szempontjából.

2.) Célkitűzés

- CRISPR/Cas12a technika segítségével funkcióvesztéses *C. reinhardtii* mutánsok létrehozása. A kísérletek során használt mutánsokat kérésünkre Dr. Molnár Attila és kutatócsoportja (University of Edinburgh) 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 alapján és élesztősejtekben történő kifejeztetéssel.

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

4.) Az eredmények összefoglalása

A foszfát-transzport mechanizmusát kevésbé tanulmányozták zöldalgákban és meglepő módon egyetlen szervesetlen foszfát-transzportert sem jellemeztek még részletesen. Jelen dolgozatban a *Chlamydomonas reinhardtii* zöldalga két foszfát-transzporterét jellemeztük részletesen.

1. Eredményeink alapján kijelenthető, hogy a PHT4 transzporter család tagja, a CrPHT4-7 a kloroplasztisz burkolómembránjában helyezkedik el.
2. *C. reinhardtii*-ban és *S. cerevisiae*-ben végzett kísérletek eredményei alapján a CrPHT4-7 szervesetlen foszfát-transzporterként működik.
3. A részletes élettani jellemzés során kapott eredmények azt mutatják, hogy a CrPHT4-7 döntő szerepet játszik a kloroplasztisz megfelelő szervesetlen foszfátszintjének fenntartásában, ezáltal javítva a sejtek életképességét.
4. Bár a CrPHT4-7 viszonylag nagyfokú hasonlóságot mutat az AtPHT4;4-gyel, *C. reinhardtii*-ban nem mutatott jelentős aszkorbát-transzporter aktivitást. *S. cerevisiae*-ben kifejezette 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.

A fenti eredményekből a következő publikáció készült: Tóth és mtsai. (2024) CrPHT4-7 supports phosphate homeostasis and photosynthesis in *Chlamydomonas*. *Plant Physiology* 194: 1646-1661

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

Impakt faktor: 7,4

5. A PHT4 transzporter család egy másik tagja, a *C. reinhardtii*-ban azonosított CrPHT4-3 szintén a kloroplasztisz burkolómembránjában helyezkedik el.
6. *C. reinhardtii*-ban és *S. cerevisiae*-ben végzett kísérletek eredményei alapján a CrPHT4-3 is szervesetlen foszfát-transzporterként működik.
7. A részletes élettani mérések eredményei azt mutatják, hogy a CrPHT4-3 a CrPHT4-7 mellett szintén fontos szerepet játszik a kloroplasztisz megfelelő szervesetlen foszfátszintjének kialakításában, ezáltal hozzájárulva a foszfor-homeosztázis és végső soron a sejtek életképességének fenntartásához.
8. Bár a CrPHT4-3 szintén viszonylag nagyfokú hasonlóságot mutat az AtPHT4;4-gyel, nem mutatott számottevő aszkorbát-transzporter 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.
9. 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.

Ezen eredmények egy szerkesztés alatt álló kézirat alapját képezik.

5.) Summary

Phosphorus is essential for living organisms. It is found in all parts of the plant cell, is a structural component of nucleic acids and phospholipids, and is essential in signaling and energy transfer reactions, as well as in photosynthesis. Members of the PHT family are the best studied phosphate transporters in vascular plants. They are well known for their role in inorganic phosphate uptake from the soil and transport within the plant. Phosphate transport has been less studied in green algae, and surprisingly, no inorganic phosphate transporters have yet been characterized. In this thesis, we performed a detailed physiological characterization of two phosphate transporters found in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*.

We have established that CrPHT4-7 and CrPHT4-3, members of the PHT4 family in *C. reinhardtii*, are inorganic phosphate transporters localized to the chloroplast envelope membrane. Based on a detailed physiological characterization, we concluded that CrPHT4-7 and CrPHT4-3 play a crucial role in maintaining an adequate level of inorganic phosphate in the chloroplast, thereby enhancing cellular fitness. Although CrPHT4-7 and CrPHT4-3 exhibit a relatively high degree of similarity with AtPHT4;4, they did not show substantial ascorbate transport activity in the physiologically relevant concentration range. We have shown that overexpressing CrPHT4-7 or CrPHT4-3 enhanced high light tolerance. On the other hand, the loss of CrPHT4-7 and CrPHT4-3 functions was not lethal. 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 play a key role in transporting phosphate into the chloroplast.

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, thus improving the viability of the cells.

6.) Saját közlemények

MTMT azonosító: 10055189

Összesített impakt faktor: 42,004

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, Molnar A, Tóth SZ (2024) The chloroplastic phosphate transporter CrPHT4-7 supports phosphate homeostasis and photosynthesis in *Chlamydomonas*. *Plant Physiology* 194: 1646-1661
<https://doi.org/10.1093/plphys/kiad607>
Impakt faktor: 7,4

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

Átdolgozás alatt lévő kézirat

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

Konferencia előadások

Tóth D, Ferenczi Á, Vidal-Meireles A, Neupert J, Bock R, Kovács L, Molnár A, Tóth SZ (2018) A PHT7, egy feltételezett aszkorbát-transzporter vizsgálata *Chlamydomonas reinhardtii*-ban. Hazai Fotoszintézis-kutatók Találkozója, Mátrafüred, Magyarország, 2018. november 7-9.

Konferencia poszterek

Veszélka S, Kiss L, Bozsó Z, Fülöp L, **Tóth D**, Szalontai B, Kóta Z, Sipos P, Szabó-Révész P, Deli MA (2015) Nanoparticles for drug delivery across the blood-brain barrier: a cell culture study. 11th International Conference on Cerebral Vascular Biology, Párizs, Franciaország, 2015. július 6-9.

Galambos A, **Tóth D**, Vidal-Meireles A, Kovács L, Nagy V, Podmaniczki A, Rigó G, Fernie AR, Zsigmond L, Tóth SZ (2016) The chloroplastic bile acid transporter 3 is required the operation of the photosynthetic electron transport chain in *Arabidopsis thaliana*. Straub-Napok, Szeged, Magyarország, 2016. május 25-26.

Tóth D, Galambos A, Vidal-Meireles A, Kovács L, Nagy V, Podmaniczki A, Rigó G, Fernie AR, Zsigmond L, Tóth SZ (2017) Aszkorbát transzporterek azonosítása kloroplasztiszban. 47. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg 2017. május 16-19.

Tóth D, Galambos A, Nagy V, Vidal-Meireles A, Podmaniczki A, Kovács L, Ferenczi Á, Molnár A, Tóth SZ (2018) Identification of ascorbate transporters in green algae. First European Conference for Photosynthesis Research, Uppsala, Svédország, 2018. június 25-28.

Tóth D, Ferenczi Á, Vidal-Meireles A, Neupert J, Bock R, Kuntam S, Kovács L, Molnár A, Tóth SZ (2019) A PHT7, egy feltételezett aszkorbát-transzporter vizsgálata *Chlamydomonas reinhardtii*-ban. 49. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, Magyarország, 2019. május 14-17.

Tóth D, Ferenczi Á, Vidal Meireles A, Neupert J, Bock R, Kuntam S, Kovács L, Molnár A, Tóth SZ (2019) Investigation of PHT7, a putative ascorbate transporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. 10th International Conference Photosynthesis and Hydrogen Energy Research for Sustainability, Szentpétervár, Oroszország, 2019. június 23-28.

Tóth D, Tengölics R, Vidal-Meireles A, Kovács L, Papp B, Tóth SZ (2021) Metabolomics suggests that chloroplastic ascorbate acts as a metabolite signal in *Arabidopsis thaliana*. XIII. Magyar Növénybiológiai Kongresszus, Szeged, Magyarország, 2021. augusztus 24-27.

Tóth D, Kuntam S, Ferenczi Á, Vidal-Meireles A, Kovács L, Wang L, Sarkadi Z, Migh E, Neupert J, Bock R, Jonikas MC, Molnár A, Tóth SZ (2022) The chloroplastic phosphate transporter CrPHT4-7 supports phosphate homeostasis and photosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. Straub-Napok, Szeged, Magyarország, 2022. május 25-27.

Tóth D, Kuntam S, Ferenczi Á, Herman É, Kovács L, Jonikas MC, Molnár M, Tóth SZ (2023) PHT4-3, a novel chloroplastic phosphate transporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. Straub-Napok, Szeged, Magyarország, 2023. május 25-26.

Tóth D, Kuntam S, Ferenczi Á, Herman É, Kovács L, Jonikas MC, Attila Molnár A, Tóth SZ (2023) PHT4-3, a novel chloroplastic phosphate transporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. The 16th Nordic Photosynthesis Congress & The 5th Nordic Algae Symposium, Umea, Svédország, 2023. június 19-21.