

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**Aszkorbát-függő alternatív elektrontranszport növényekben
és az aszkorbát szerepe a *Chlamydomonas reinhardtii*
hidrogéntermelésének szabályozásában**

Nagy Valéria

Témavezetők:

Dr. Tóth Szilvia Zita – tudományos főmunkatárs

Dr. Garab Győző – tudományos tanácsadó

Biológia Doktori Iskola
Szegedi Tudományegyetem

Magyar Tudományos Akadémia, Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Növénybiológiai Intézet

Szeged
2015

Bevezetés

A növények és cianobaktériumok a fotoszintézis során a napfény energiáját felhasználva szerves anyagokat állítanak elő, amihez a vizet használják fel elektrondonorként és a víz oxidációja során O_2 szabadul fel. A fotoszintézis folyamatát nevezhetjük Földünk egyik legalapvetőbb folyamatának, ugyanis a fotoszintetizáló szervezetek O_2 termelése és CO_2 megkötése alapvető szerepet játszott a Föld légkörének kialakításában majd a légkör egyensúlyának fenntartásában, a szénhidrátok pedig nélkülözhetetlenek majdnem minden életforma számára. Mindemellett a fotoszintézishez kapcsolt H_2 -termelést tartják korunk egyik ígéretes megújuló energiaforrásának.

Az O_2 -termelő élőlények esetében a fotoszintézis folyamata a fényfüggő fotofizikai és fotokémiai folyamatokból valamint a Calvin-Benson ciklusból áll, amelyek – eukarióta szervezetekben – a kloroplasztisban mennek végbe. Minden fotoszintetizáló szervezetben megtalálhatók a tilakoidmembránba ágyazódott vagy ahhoz kapcsolódó, fény abszorpciójára képes klorofill-molekulák és különböző kísérőpigmentek (pl. a karotinoidek és fikobilinok). A fotoszintetikus elektrontranszportláncot a fő fehérje komplexek – az első és a második fotokémiai rendszer (PSI és PSII), a citokróm b_6f komplex, valamint az ATP-szintáz – és mobilis elemek (plasztokinon, plasztocianin, ferredoxin) alkotják.

A PSII donor oldalán helyezkedik el a vízbontó komplex (OEC, *oxygen evolving complex*), amely a fotoszintetikus elektrontranszportlánc egyik legsérülékenyebb komponense, a hő és az UV stressz elsődleges célpontja. Hőkezelés hatására az OEC külső fehérjéi (pl. a PsbO) és két Mn ion leválik a komplexről. Ez a leválás maga után vonja a Cl^- és Ca^{2+} ionok elvesztését, ami végül az OEC teljes inaktivációját eredményezi. Emellett hőstressz hatására a PSII D1 és D2 fehérjéi is károsodhatnak, ugyanis a donor oldal inaktivációja következtében a PSII reakciócentrumban a $P680^+$ élettartama megnő, amely oxidatív stresszhez, és végső soron a reakciócentrumok inaktivációjához vezet.

A PSI akceptor oldalán található a *Chlamydomonas reinhardtii* egysejtű zöldalgának a Fe-Fe típusú hidrogenáz enzime, melynek segítségével fotoszintézishez kapcsoltnan H₂-t képes termelni. Ez a hidrogenáz enzim nagyon érzékeny az O₂-re, jelenlétében a H₂-termelés gátolt. Ennek kiküszöbölésére kénmegvonás alkalmazható, ugyanis a kénhiány hatására az O₂-termelésért felelős PSII reakciócentrumok fokozatosan inaktiválódnak.

Az elektronok a hidrogenáz enzimhez három útvonalon keresztül juthatnak el:

- 1.) PSII-függő útvonal: a vízbontásból keletkező elektronok a lineáris elektrontranszporton keresztül jutnak el a hidrogenázhoz;
- 2.) PSII-független útvonal: a keményítő lebontásából származó elektronok a PQ-pool-on keresztül csatlakoznak a lineáris elektrontranszportoz;
- 3.) anaerob módon történő fermentációs útvonal: a piruvát acetil-koenzim-A-vá alakul, miközben a ferredoxin redukálódik, végül az elektronok a hidrogenáz enzimre kerülnek.

Az aszkorbát (C-vitamin) a növényi sejtekben mindenütt előforduló multifunkcionális szereppel rendelkező metabolit. Fontos feladata a reaktív oxigén gyökök semlegesítése, de szerepet játszik a redox jelátvitelben, a sejtosztódásban, a sejtfal bioszintézisében, a génexpresszióban, egyes enzimek aktivitásának szabályozásában, valamint a violaxantin-deepoxidáz kofatora. A PhD munkám során az aszkorbátnak egy újabb, fontos szerepét vizsgáltuk *Arabidopsis thaliana* növényekben és *Chlamydomonas reinhardtii* egysejtű zöldalgákban.

Célkitűzések

PhD tanulmányaim kezdetekor (2009) ismert volt, hogy ha a PSII vízbontó komplexe hőstressz által sérül, a vízmolekulák helyett nagy mennyiségben jelenlévő, alternatív elektrondonorok juttatnak elektronokat a

második fotokémiai rendszerhez *in vivo*. Korábbi *in vitro* kísérleti adatok alapján feltételeztük, hogy ez a donor az aszkorbát. Ezek alapján célul tűztük ki:

- Az alternatív elektrondonor azonosítását
- Ezen alternatív elektrontranszport-folyamat lehetséges élettani szerepének vizsgálatát.

Ismeretes volt, hogy *Chlamydomonas reinhardtii* sejtekben kénmegvonás hatására jelentősen csökken a PSII oxigéntermelése és az így létrejött anaerob körülmények között a fennmaradó PSII aktivitásból és a keményítőbontásból származó elektronok részben hidrogéntermelésre fordítódnak. Elképzelhetőnek tartottuk, hogy a hidrogéntermelés serkenthető az alternatív elektrondonorok által, ennek igazolására célul tűztük ki:

- Az aszkorbát elektrontranszportra és hidrogéntermelésre gyakorolt hatásának vizsgálatát *C. reinhardtii* sejtekben.

Anyagok és alkalmazott módszerek

A növények nevelése

A munkánk során 8-10 hetes vad típusú (Columbia-0), aszkorbát-hiányos (*vtc2-1* és *vtc2-3*) és aszkorbát-túltermelő (*miox4*) *Arabidopsis thaliana* növényeket vizsgáltunk, melyeket növénynevelő kamrában, 8/16 óra fény/sötét ciklus mellett neveltünk. A fényperiódus alatt a fotonáram-sűrűség $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a hőmérséklet $24 \text{ }^\circ\text{C}$, míg a sötétperiódus alatt $18 \text{ }^\circ\text{C}$ volt.

A *vtc2* gén – amely a GDP-l-galaktóz foszforiláz enzimet kódolja – különböző pontmutációinak következtében az aszkorbáttartalom nagymértékben lecsökken *A. thaliana* növényekben. A *vtc2-1* mutánsban 85%-os, míg a *vtc2-3* esetében kb. 50-70%-os a csökkenés a vad típushoz képest. A *miox4* transzgénikus *A. thaliana* növényben (*miox4* gén a mioinozitol-oxigenáz enzimet kódolja) a levelek aszkorbáttartalma 2-3-szor nagyobb a vad típushoz képest.

Chlamydomonas törzsek nevelése

Az aszkorbát hidrogéntermelésre gyakorolt hatását a CC-124 és S-01 *C. reinhardtii* törzseken vizsgáltuk. A sejteket Tris-acetát-foszfát (TAP) szilárd táptalajon tartottuk fenn, $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fotonáram-sűrűségeen, $24 \text{ }^\circ\text{C}$ -on, alganevelő kamrában. A kísérletekhez a sejteket TAP tápoldatban, $80\text{-}100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fotonáram-sűrűségeen, $24 \text{ }^\circ\text{C}$ -on, 100 rpm -en rázatva neveltük. A hidrogéntermelés vizsgálatához a három napos TAP tápoldatban nevelt sejteket többszöri centrifugálással kénmentes TAP tápoldatba helyeztük át. A hidrogéntermeléshez 100 ml -es szérumüveget használtunk, amelyben 30 ml $8 \mu\text{g/ml}$ klorofillt tartalmazó folyadékkultúrát helyeztünk, az üveg légtérét pedig nitrogén gázra cseréltük. A kultúrát továbbra is rázatva tartottuk, ugyanolyan paraméterek mellett, mint amikor kén tartalmazó tápoldatban voltak.

A kísérletek során használt kezelések

- Hő- és fénykezelések
- Kémiai kezelések

Mérési módszerek

- A klorofilltartalom meghatározása spektrofotométerrel
- Az aszkorbát tartalom meghatározása spektrofotométer és HPLC segítségével
- A keményítőtartalom meghatározása spektrofotométerrel
- Gyors klorofill-a fluoreszcencia tranziensek (OJIP) mérése
- Az ETR, NPQ és qE paraméterek meghatározása
- P_{700} oxidációs-redukációs abszorpciós mérések
- Termolumineszcencia mérések
- 515 nm -es elektrokróm abszorpciótranziens mérések
- Hidrogén- és oxigéngáz meghatározása gázkromatográfiával
- *In vitro* hidrogenáz aktivitás mérések
- Western blot analízis

Az eredmények összefoglalása

Vadtípusú és aszkorbát-hiányos (*vtc2-1*) *A. thaliana* növényeken végzett gyors klorofill-a fluoreszcencia mérések alapján megállapítottuk, hogy ha az OEC inaktív, az aszkorbát a PSII alternatív elektrondonoraként funkcionál, *in vivo*. Az elektronátadás félideje függ a levelek aszkorbáttartalmától, vad típusú növényekben 25 ms, míg aszkorbát-hiányos mutánsokban (*vtc2-1*) ez 55 ms volt, ami aszkorbátoldatban történő inkubálás után 32 ms-ra gyorsítható volt. Termolumineszcencia méréseinkből kiderült, hogy az aszkorbát közvetve vagy közvetlenül a Tyr_Z⁺-hez juttatja az elektronokat. P₇₀₀ oxidációs-redukációs kinetikai méréseink pedig azt is megmutatták, hogy az aszkorbát-függő elektrontranszport a PSI aktivitását mérve is detektálható, és 3-(3,4-diklorofenil)-1,1-dimetilureával (DCMU) gátolható. Ezen eredményeink bizonyítják, hogy az aszkorbát elektronokat juttat a PSII-höz, *in vivo* körülmények között, egy mérsékelt sebességű elektrontranszportot fenntartva.

A vizsgálatok során az oxigénfejlődést általában rövid idejű hőimpulzussal (48-50 °C, 40 s) teljesen inaktiváltuk, de enyhébb, élettanilag releváns hőkezelés (39-40 °C, 15 perc) után is sikerült az aszkorbát-függő alternatív elektrontranszportot detektálnunk.

Megvizsgáltuk, hogy az aszkorbátnak milyen élettani szerepe lehet egyes stresszhatások, mint pl. a donor oldali fénygátlás kivédésében. Méréseinkhez vad típusú, aszkorbát-hiányos (*vtc2-3*) és aszkorbát-túltermelő (*miox4*) *A. thaliana* növényeket hasonlítottunk össze és megvizsgáltuk a PSII reakciócentrumok hő- és fénykezelés hatására (40°C, 15 perces hőkezelés után 300 μmol m⁻² s⁻¹ fotonáram-sűrűségű megvilágítás) bekövetkező inaktiválódásának folyamatát. Megállapítottuk, hogy e kezelés hatására néhány perc alatt lelassul a Tyr_Z-P680⁺ elektronátadás, majd ezt a PSII reakciócentrumok teljes inaktivációja követi, ami egy jóval lassabb folyamat, kb. 1 óra alatt játszódik le. Western blot analízis alapján megállapítottuk, hogy nem csak a D1 protein, hanem a CP43 belső antenna komplex és a vízbontó komplex 33 kDa-os proteinje is degradálódik

ugyanezen idő alatt. Ha aszkorbát-deficiens leveleket 1 mM difenilkarbaziddal (DPC, a PSII mesterséges elektrondonora) inkubáljuk, lelassul a PSII reakciócentrum inaktiválódása – megerősítve azt a következtetésünket, hogy az alternatív elektrondonorok jelentős fotoprotektív szerepet töltenek be.

Az aszkorbát H₂-termelésre gyakorolt hatását *Chlamydomonas reinhardtii* sejteken vizsgáltuk. Kimutattuk, hogy inaktív OEC mellett a magasabb rendű növényekhez hasonlóan a *C. reinhardtii* sejtekben az aszkorbát lineáris elektrontranszportot tart fenn. A lehetséges biotechnológiai alkalmazhatóságot abban láttuk, hogy az aszkorbát elektronokat szolgáltat a PSII-n keresztül a hidrogenáz felé, de – a vízbontással ellentétben – O₂ nem képződik.

Normál körülmények között a *C. reinhardtii* aszkorbát-tartalma igen kicsi: az alga sejtek kb. 100-szor kevesebb aszkorbátot tartalmaznak, mint a növényi sejtek, azonban oxidatív stressz hatására az aszkorbát mennyisége megnövekedhet. Megfigyeltük, hogy az általunk vizsgált két *C. reinhardtii* (S-01 és CC-124) törzsben a kénmegvonás hatására a sejten belüli aszkorbát-koncentráció jelentősen, kb. 50-100-szorosára emelkedett, illetve a 10 mM külsőleg hozzáadott aszkorbát jelentősen meggyorsította a maximális aszkorbát-koncentráció kialakulását, amely nagyon hasonló volt a kezeletlen kultúrákban mért maximális értékhez. Ebből következik, hogy az általunk külsőleg hozzáadott 10 mM aszkorbát élettanilag releváns, mivel hasonló aszkorbátszint alakul ki a kénmegvonás hatására is. Termolumineszcencia méréseink azt mutatják, hogy az aszkorbát elősegíti a kultúra anaerobbá válását valószínűleg az által, hogy az aszkorbát redukálja az OEC Mn-centrumát; emellett az aszkorbát átmenetileg a PSII alternatív elektrondonoraként is viselkedik.

Megfigyeltük, hogy az S-01 és CC-124 törzsek eltérően viselkednek a fotobiológiai H₂-termelés szempontjából. A különbség az eltérő hatékonyságú respirációnak és hidrogenáz aktivitásnak tudható be. Gázkromatográfias mérések mutatják, hogy aszkorbát hozzáadása nélkül az S-01-es kultúra a kénmegvonás negyedik napján, míg a CC-124-es kultúra már a kénmegvonás második napján

anaerobbá válik és egy erőteljesebb H₂-termelés következik be. Az S-01 törzsben az aszkorbát azáltal, hogy csökkenti az OEC aktivitást, tehát feloldja az O₂ gátlást, továbbá a PSII alternatív elektrondonor hatása miatt stimulálja a H₂-termelést. Ezzel szemben a CC-124 kultúrában az aszkorbátkezelés csökkenti a termelődött H₂ mennyiségét, mivel ebben a törzsben a respiráció igen hatékony, így fel tudja használni a keletkezett O₂-t és az aszkorbát erőteljes OEC-t gátló hatása végső soron a H₂-termelés csökkenéséhez vezet.

Eredményeink azt mutatják, hogy az aszkorbátnak fontos szabályozó szerepe lehet a fotobiológiai H₂-termelésben – ami megnyitja annak a lehetőségét, hogy az aszkorbát bioszintézis szabályozása által az OEC és a PSII aktivitása szabályozható, ill. ennek révén a *C. reinhardtii* H₂-termelésének hatékonysága növelhető.

Következtetések

Az alternatív elektrondonor azonosítása érdekében végzett kísérleteink alapján megállapítottuk, hogy:

- Ha az OEC inaktív, az aszkorbát a PSII elektrondonoraként viselkedik magasabb rendű növényekben és *C. reinhardtii* zöldalgákban is, *in vivo* körülmények között.
- Az aszkorbáttól az elektronok a PSII-höz a Tyr_Z⁺ közvetítésével jutnak el.
- Az aszkorbát mérsékelt sebességű lineáris elektrontranszportot tart fenn.

A PSII alternatív elektrondonoraként működő aszkorbát élettani jelentőségét tisztázandó kísérleteink arra az eredményre vezettek, hogy:

- Az aszkorbát PSII donorként mérsékeltén véd a donor-oldal által indukált fotoinhibícióval szemben.

Megállapítottuk, hogy az aszkorbát központi szerepet tölthet be a *C. reinhardtii* H₂-termelésének a szabályozásában, mivel:

- *C. reinhardtii* sejtekben a kénmegvonás hatásra jelentősen megnövekszik a sejtek aszkorbát tartalma, valamint 10 mM aszkorbát hozzáadása a kontroll kultúrához hasonló sejten belüli koncentráció kialakulásához vezet.
- Az aszkorbát elősegíti a kultúra anaerobbá válását azáltal, hogy redukálja az OEC Mn-centrumát; emellett az aszkorbát a PSII alternatív elektrondonoraként is viselkedik.
- A két, a fotobiológiai H₂-termelés szempontjából eltérően viselkedő törzs közötti különbség az eltérő hatékonyságú respirációnak és hidrogenáz aktivitásnak tudható be.

Tudományos közlemények

A dolgozat alapját képező közlemények:

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

IF: 6,235

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

IF: 6,535

Nagy V, Tengölics R, Schansker G, Rákhely G, Kovács L K, Garab G, Tóth SZ (2012) Stimulatory effect of ascorbate, the alternative electron donor of photosystem II, on the hydrogen production of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Int. J. Hydrogen Energy* 37: 8864–8871.

IF: 3,548

Nagy V, Vidal-Meireles A, Tengölics R, Rákhely G, Garab G, Kovács L, Tóth SZ. Ascorbate accumulation during sulphur deprivation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and its effects on photosystem II activity and H₂ photoproduction (előkészületben).

Konferencia előadások:

- Nagy V: Improvement of biohydrogen production in *Chlamydomonas reinhardtii* by ascorbate as an alternative electron donor of PSII. Environmental Effect on Photosynthesis, International Workshop, Nyíregyháza, 2010
- Nagy V: A második fotokémiai rendszer alternatív elektrondonora és lehetséges alkalmazása zöldalgák hidrogéntermelésének serkentésére. Szegedi Tudományegyetem Sófi József a Szegedi Tehetségekért Alapítvány Ösztöndíj Konferencia, Szeged, 2011
- Nagy V: Aszkorbát-függő alternatív elektrontranszport biotechnológiai alkalmazása a hidrogéntermelésben. Szegedi Tudományegyetem Sófi József a Szegedi Tehetségekért Alapítvány Ösztöndíj Konferencia, Szeged, 2012
- Nagy V: Aszkorbát- függő alternatív elektrontranszport és biotechnológiai alkalmazása a hidrogéntermelésben. Szegedi Biológus Doktorandusz Konferencia, Szeged, 2012

Konferencia poszterek:

- Tóth SZ, Nagy V, Puthur JT, Kovács L, Garab G: The physiological role of ascorbate as photosystem II electron donor: protection against photoinactivation in heat-stressed leaves. 4th International Symposium of the SFB 429, Potsdam, 2010
- Nagy V, Puthur JT, Kovács L, Garab G, Tóth SZ: Az aszkorbát élettani szerepe a második fotokémiai rendszer alternatív elektrondonoraként. 40. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2010
- Nagy V, Tóth SZ, Latinovics D, Kovács L K, Garab G: A második fotokémiai rendszer alternatív elektrondonorainak hatása a hidrogéntermelésre *Chlamydomonas reinhardtii* sejtekben. A Magyar Növénybiológiai Társaság X. Kongresszusa, Szeged, 2011
- Nagy V, Tengölics R, Schansker G, Rákhely G, Kovács LK, Garab G, Tóth SZ: Az aszkorbát a második fotokémiai rendszer alternatív elektrondonora és lehetséges alkalmazása zöldalgák hidrogéntermelésének serkentésére. 42. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2012

Tóth SZ, Nagy V, Tengölics R, Schansker G, Rákhely G, Kovács LK, Garab G:
Novel role of ascorbate in the photosynthetic electrontransport.
Physiological significance and potential biotechnological application.
75th Anniversary of Albert Szent-Györgyi's Nobel Prize Award, Szeged,
2012

Nagy V, Tóth SZ, Tengölics R, Schansker G, Rákhely G, Kovács LK, Garab G:
Ascorbate, as alternative electron donor to photosystem II, protects
plants against photoinhibition and stimulates the photoproduction of
hydrogen in green algae. „Our future”, Keszthely, 2013

Nagy V, Tengölics R, Schansker G, Rákhely G, Kovács LK, Garab G, Tóth SZ:
Ascorbate, as alternative electron donor to photosystem II, protects
plants against photoinhibition and stimulates the photoproduction of
hydrogen in green algae. 10th International Hyrdrogenase Conference,
Szeged, 2013

Nyilatkozat

Mint az alábbi közlemények felelős szerzője igazolom, hogy a Ph.D. jelölt Nagy Valéria jelentős mértékben hozzájárult az alábbi cikk létrehozásához és téziseiben felhasznált eredményeket más Ph.D. értekezésben nem használjuk fel.

Tóth SZ, Puthur JT, Nagy V, Garab G (2009) Experimental evidence for ascorbate-dependent elektron transport in leaves with inactive oxygen-evolving complexes. *Plant Physiol.* 149: 1568–1578.

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

Szeged, 2015. március 2.

.....

Dr. Tóth Szilvia Zita
tudományos főmunkatárs
MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Növénybiológiai Intézet

Nagy V, Tengölics R, Schansker G, Rákhely G, Kovács L K, Garab G, Tóth SZ (2012) Stimulatory effect of ascorbate, the alternative electron donor of photosystem II, on the hydrogen production of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Int. J. Hydrogen Energy* 37: 8864–8871.

Szeged, 2015. március 2.

.....

Dr. Garab Győző
tudományos tanácsadó
MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Növénybiológiai Intézet