

**A C-VITAMIN BIOSZINTÉZISE ÉS
ÉLETTANI SZEREPEI A *CHLAMYDOMONAS*
REINHARDTII ZÖLDALGÁBAN**

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

André Manuel Vidal Meireles

Témavezető: Dr. Szilvia Zita Tóth

Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Magyar Tudományos
Akadémia
Növénybiológiai Intézet
Molekuláris Fotobioenergetikai Csoport

Szegedi Tudományegyetem
Biológia Doktori Iskola
Szeged, 2018

1.) Bevezetés

A *C. reinhardtii* nevű egysejtű zöldalga a heterotróf növekedésre való képességének köszönhetően kiváló modellorganizmus mind a fotoszintézis, mind a kloroplasztisz biogenezisének vizsgálatára. A heterotróf anyagcsere révén az egyébként letális fotoszintetikus mutánsok is életben tarthatók az acetát, mint kizárólagos szénforrás jelenlétében (Harris, 2001). A *Chlamydomonas*, mint modellrendszer másik nagy előnye, hogy jelenleg ez az egyetlen olyan fotoszintetikus szervezet, amelyben az összes, önálló genetikai állománnyal rendelkező sejtalkotó, a sejtmag, a kloroplasztisz és a mitokondrium genetikailag transzformálható (Nickelsen., 2005). Az újabb molekuláris biológiai technikák (amiRNS és CRISPR/Cpf1) szintén jól alkalmazhatók *Chlamydomonas* modellrendszerekben.

Az aszkorbát (Asc) létfontosságú szerepet játszik növényekben és állatokban egyaránt. Nélkülözhetetlen a reaktív oxigénformák (ROS), mint a szinglet oxigén és a szuperoxid anion semlegesítésében, továbbá kofaktora több, 2-oxosav függő dioxigenáz enzimnek, amelyek számos fontos élettani folyamatot katalizálnak. Magasabb rendű növényekben az antioxidáns hatása mellett az Asc szintén szerepet játszik a sejtosztódásban és a sejtfal kialakulásában, befolyásolja számos jelátvivő molekula (gibberellinek, etilén, szalicilsav, abszcizinsav) szintézisét, szabályozza a sztómák

nyitódását és az antocianin termelődését a növények magas fényintenzitáshoz való alkalmazkodása során. Ezek mellett képes befolyásolni egyes fotoszintetikus és fénystressz elleni védelemben szerepet játszó gének expresszióját. A violaxantin deepoxidáz enzim kofaktoraként részt vesz az ún. nem-fotokémiai kioltás (NPQ) folyamatában is.

Magasabb rendű növényekben az Asc elsősorban az L-galaktóz, vagy másnéven Smirnoff-Wheeler bioszintetikus úton termelődik. Ezen bioszintézis út kulcs enzimeiben hiányos mutánsok nem képesek kialakítani a vad típusra jellemző Asc szintet. Az Asc termelődés sebességét leginkább a GDP-L-galaktóz foszforilázt kódoló gén, a *VTC2* expressziós szintje határozza meg, amit a *vtc2-1* Arabidopsis mutánsok Asc szintjében megfigyelhető 80%-os csökkenés is alátámaszt (Conklin és mtsai., 2000; Müller-Moulé és mtsai., 2002, 2004).

A *C. reinhardtii* zöldalga genomja tartalmazza a Smirnoff-Wheeler Asc bioszintézis út összes enzimének génjét. Génexpressziós vizsgálatok alapján valószínűsíthető, hogy hasonlóan a magasabb rendű növényekhez, az algában található GDP-L-galaktóz foszforiláz expressziója is nagymértékben szabályozott (Urzica és mtsai., 2012). Az Asc bioszintézise és annak szabályozása még kevésbé tanulmányozott alacsonyabb rendű növényekben és zöldalgákban, melyekre általánosan jellemző, hogy kis mennyiségben tartalmaznak aszkorbátot.

A közelmúltban kimutattuk, hogy az aszkorbátnak fontos szerepe van a *C. reinhardtii* fotobiológiai hidrogéntermelésében (Nagy és mtsai., 2016). Megvilágítás hatására a második fotokémiai rendszer (PSII) vízbontó komplexe (OEC) katalizálja a víz oxidációját, amely elektronokat szolgáltat a fotoszintetikus széndioxid redukció számára. Kimutattuk, hogy kénmegvonás hatására az Asc nagy mennyiségben felhalmozódik az algasejtben, és redukáló erejének köszönhetően inaktíválja az OEC-t. Az Asc, mint alternatív elektron donor képes ugyan elektronokat adni a PSII-nek, de ennek sebessége nem elegendő a donor-oldali fotoinhibíció elkerülésére, aminek eredményeképpen a PSII reakciócentrumok inaktíválódnak. A vízbontó képesség megszűnése anaerob körülmények kialakulásához vezet, ami a hidrogéntermelés megindulásának feltétele (Nagy és mtsai., 2016). A kénmegvonás során az Asc a PSII inaktíválásában betöltött szerepének feltárása még további kísérleteket igényelt.

A fotoszintetizáló szervezetek növekedéséhez a fény elengedhetetlen, azonban a felesleges mennyiségű fényenergia ártalmas is lehet. Nem-fotokémiai kioltásnak (NPQ) nevezzük azokat a fotoprotektív folyamatokat, melyek a feleslegben elnyelt fényenergiát hő formájában disszipálják. Az NPQ a fényintenzitás gyors fluktuációjára adott válaszoktól a hosszútávú fénystresszhez való alkalmazkodásig terjed. Az NPQ egyik fő komponense magában foglalja a violaxantinból

a zeaxantinba történő átalakulást, amelyet a violaxatin deepoxidáz (VDE) enzim katalizál. A *C. reinhardtii* VDE enzime (CrVDE) különbözik a más algákban, ill. magasabb rendű növényekben található VDE enzimektől (Li és mtsai., 2016b), és nem ismeretes, hogy az Asc szükséges-e kofaktorként a CrVDE működéséhez, mint ahogy azt a növényi VDE esetén korábban megfigyelték.

2.) Célkitűzés

- Az Asc bioszintézis szabályozásának és élettani szerepének vizsgálata *C. reinhardtii* algában
- Az Asc PSII inaktiválásában betöltött szerepének meghatározása a kénmegvonással indukált hidrogéntermelés során
- Annak meghatározása, hogy az Asc szükséges-e kofaktorként a CrVDE enzim aktivitásához, ill. az Asc NPQ mechanizmusban játszott szerepének vizsgálata.

3.) Alkalmazott módszerek

- amiRNS;
- *C. reinhardtii* nukleáris transzformációja;
- DNS izolálás;
- PCR;
- Fehérjeizolálás;
- Western blott;
- RNS izolálás;
- cDNA szintézis;
- qRT-PCR;
- Chl *a* fluoreszcencia;
- Northern blott;
- HPLC;
- GC-MS;
- ICP-OES;
- Enzimaktivitás mérés;
- Termolumineszcencia;
- Tilakoid izolálás.

4.) Az eredmények összefoglalása

Az Asc bioszintézise és annak szabályozása kevésbé tanulmányozott az alacsonyabb rendű növények esetében. Annak ellenére, hogy a *C. reinhardtii* zöldalga genomjában megtalálható az aszkorbát bioszintézis Smirnof-Wheeler útjának minden enzime, élettani jelentősége még nem volt bizonyított. Jelen dolgozatban azt is kimutattuk, hogy az aszkorbát bioszintézise zöldalgákban a növényekétől eltérő mechanizmussal szabályozódik:

- Chlamydomonasban a *VTC2* gén expresszióját nem befolyásolja közvetlen módon a fotoszintetikus elektrontranszport lánc;

- A magasabb rendű növényekkel ellentétben Chlamydomonasban a *VTC2* transzkript szintje nincs cirkadián kontroll alatt;

- oxidatív stressz hatására a *VTC2* expressziója fokozódik, ami nagyon gyors Asc akkumulációt eredményez;

- Fiziológiás Asc koncentráció-tartományban az Asc bioszintézise negatív visszacsatolás által nem szabályozott.

A fenti eredményekből a következő publikáció készült: Vidal-Meireles és mtsai. (2017) *New Phytologist* 214: 668-681, doi: 10.1111/nph.14425.

C. reinhardtii algában kénmegvonás okozta stressz hatására az Asc koncentrációja olyan mértékben

megnövekedhet, ami már képes inaktiválni a vízbontó komplexet, ami végső soron hipoxia kialakulását, majd a hidrogéntermelés megindulását eredményezi. E korábbi eredményeinkből kiindulva (Nagy és mtsai., 2016), célul tűztük ki az Asc e folyamatokban játszott szerepének pontosabb tisztázását és a következőket állapítottuk meg:

- Az általánosan elfogadott hipotézissel szemben a PsbA mennyiségének nagymértékű csökkenését a kénmegvonás során nem közvetlenül a sejtek kén tartalmának csökkenése okozza;
- A PsbA fehérje újraképződése (turnover) jelentős a kénmegvonás alatt;
- A kénmegvonás alatt a *VTC2* gén transzkript mennyiségének növekedése az Asc koncentrációjának mM-os tartományba való felhalmozódásához vezet;
- A PSII aktivitás csökkenését a megnövekedett Asc koncentráció által elősegített donor oldali fotoinhibíció okozhatja.

A fenti eredményekből a következő publikáció készült: Nagy és mtsai. (2018) *The Plant Journal* 94: 548-561; doi: 10.1111/tpj.13878.

Az Asc fontos szerepet játszik a magasabb rendű növények fotoszintézisében, ill. a VDE enzim kofaktoraként funkcionál (Müller-Moulé és mtsai., 2002). A VDE a tilakoid lumenének savasodására aktiválódik és a violaxantin

zeaxantinná alakulását katalizálja, ami fontos mozzanat az NPQ qE komponensének kialakulásában (Müller-Moulé és mtsai., 2002).

A *C. reinhardtii* VDE enzime a növények VDE ezimétől jelentősen eltér: A CrVDE a fotoszintetikus baktériumok likopén cikláz enzimével mutat rokonságot, és a tilakoid membrán sztróma felőli oldalán helyezkedik el (Li és mtsai., 2016b). Emellett nem ismert, hogy az Asc az algák VDE enzimének kofaktora-e, és általában véve, az Asc szerepe az algák NPQ folyamataiban még alig ismert. Ezzel kapcsolatban a következőket állapítottuk meg:

- A magasabb rendű növényekkel ellentétben az Asc nem szükséges a VDE működéséhez *C. reinhardtii* algában;
- Fotomixotróf körülmények között, normál fényintenzitáson, a H₂O₂ növeli az NPQ lassú komponensét;
- Az algakultúrát fotoautotróf körülmények között és nagy fényintenzitáson az Asc hiánya fotoinhibícióhoz vezet, ami a H₂O₂ túlzott felhalmozódásával magyarázható.

Ezen eredmények egy szerkesztés alatt álló kézirat alapját képezik.

5.) Saját közlemények

MTMT azonosító szám: 10052738

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(7): 1460-1472. doi: 10.1111/pce.12701

IF: 6,173

Kovács L, **Vidal-Meireles A**, Nagy V, Tóth SZ (2016) Quantitative determination of ascorbate from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* by HPLC. *Bio-protocol* 6(24): BioProtoc. 2067. doi: 10.21769/BioProtoc.2067

IF: N.A.

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 Phytologist* 214(2): 668-681. doi: 10.1111/nph.14425.

IF: 7,330

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*. The Plant Journal 94(3): 548-561. doi: 10.1111/tpj.13878.

IF: 5,901

Nagy V, Podmaniczki A, **Vidal-Meireles A**, Tengölics R, Kovács L, Rákhely G, Scoma A, Tóth SZ (2018) Water-splitting-based, sustainable and efficient H₂ production in green algae as achieved by substrate limitation of the Calvin-Benson-Bassham cycle. Biotechnology for Biofuels 11:69. doi: 10.1186/s13068-018-1069-0.

IF: 5,203

Vidal-Meireles A, Lambrev P, Galambos A, Kovács L, Tóth SZ (előkészületben) Ascorbate is not required for zeaxanthin-dependent quenching in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*.

6.) Kommunikáció nemzetközi konferenciákon

1. **Vidal-Meireles A**, Nagy V, Neupert J, Tengölics R, Rákhely G, Bock R, Garab G, Kovács L, Tóth SZ. The effects of ascorbate on the O₂ evolution and H₂ production of sulphur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cultures. 1st International Solar Fuels Conference, Április 26 – Május 1, 2015, Uppsala (Svédország) [Poszter bemutatás and Rövid előadás]

2. Paneerselvam N, **Vidal-Meireles A**, Nagy V, Kovács L, **Tóth SZ**. The PSBO1 protein of photosystem II protects the oxygen-evolving complex from the reducing power of luminal ascorbate. ICAR 2015, Július 5-9, 2015, Paris (Franciaország) [Poszter bemutatás]

3. **Vidal-Meireles A**, Neupert J, Nagy V, Kovács L, Zsigmond L, Rosado-Souza L, Fernie AR, Bock R, **Tóth SZ**. Regulation of ascorbate biosynthesis in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. ENCAPP 2016, Április 26 – 29, 2016, Saint Paul's Bay (Málta) [Poszter bemutatás]

4. **Nagy V**, **Vidal-Meireles A**, Tengölics R, Rákhely G, Garab G, Kovács L, Tóth SZ. Ascorbate accumulation during sulphur deprivation and its effects on photosystem II activity and H₂ production of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. ENCAPP 2016. Április 26 – 29, 2016, Saint Paul's Bay (Málta) [Poszter bemutatás]

5. **Tóth SZ**. Regulation of ascorbate biosynthesis in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Photosynthetic

electron and proton transport in plants and algae (17-ik “International Congress on Photosynthesis Research” szatelita rendezvénye). Augusztus 4 – 7, 2016, Arnhem (Hollandia) [Előadás]

6. **Vidal-Meireles A**, Neupert J, Zsigmond L, Kovács L, Nagy V, Rosado-Souza L, Fernie AR, Bock R, Tóth SZ. Ascorbate biosynthesis and its regulation by *VTC2* in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. SEB Gothenburg 2017, Július 3 – 6, 2017, Gothenburg (Svédország) [Poszter bemutatás]

7. **Tóth D**, Galambos A, Nagy V, **Vidal-Meireles A**, Podmaniczki A, Kovács L, Molnár A, Tóth SZ. Identification of ascorbate transporters in green algae. First European Congress on Photosynthesis Research, Június 25-28, 2018, Uppsala (Svédország) [Poszter bemutatás]

8. **Vidal-Meireles A**, Galambos A, Kovács L, Tóth SZ. In the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* ascorbate is not required for the induction of non-photochemical quenching. Plant Biology 2018, Július 14 – 18, 2018, Montreal (Kanada) [Poszter bemutatás]

9. **Vidal-Meireles A**, Galambos A, Kovács L, Tóth SZ. In the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* ascorbate is not required for the induction of non-photochemical quenching. ISPR meeting *From Light to Life*, Július 17 – 20, 2018, Montreal (Kanada) [Poszter bemutatás és előadás]

7.) Elyert díjak

1. MTA Biológiai Kutatóközpont, *PhD ösztöndíj* (2013)
2. Campus Hungary, *Konferencia részvételt támogó díj* (2015)
3. MTA, *Fiatal kutatói ösztöndíj* (2016)
4. Szegedi Biológiai Doktori iskola, *PhD hallgatói konferencia legjobb előadója díj* (2016)
5. “Company of Biologists”, *utazási támogatás* (2018)
6. Az Egyesült Államok Energiaügyi Minisztériuma, *utazási támogatás* (2018)
7. “ISPR” / “Plant Cell & Environment”
“Photosynthesis: from life to life” szakmai találkozó legjobb doktandoandusz poszter díj (2018)