

**A második fotokémiai rendszer alternatív elektrondonorának kémiai természete
és élettani szerepe cianobaktériumokban, algákban és növényekben;
potenciális biotechnológiai alkalmazások**

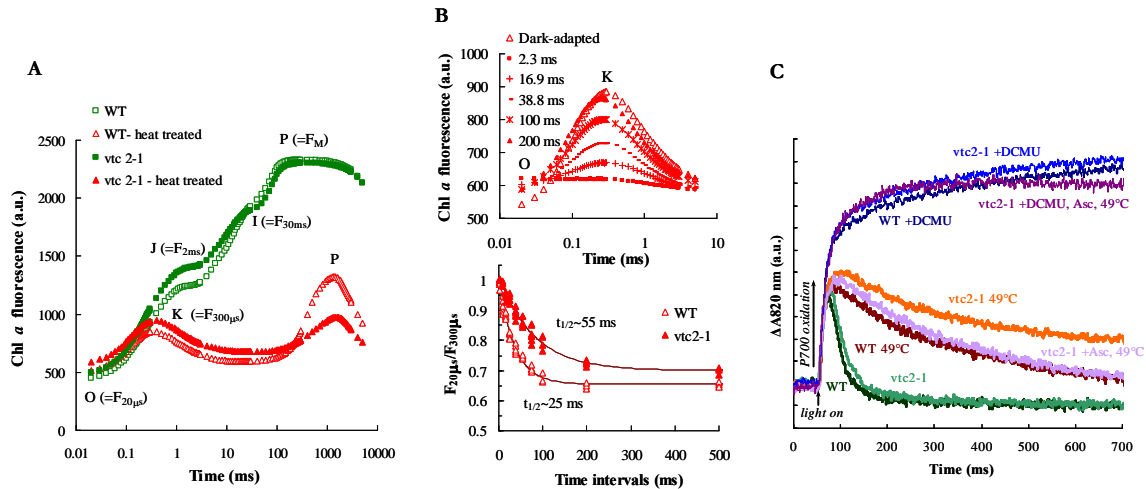
OTKA PD718

Záróbeszámoló

A fotoszintetikus elektrontranszport-lánc vízbontó komplexe rendkívül érzékeny a magas hőmérsékleti stresszre és károsodása következtében a második fotokémiai rendszer (PSII) reakciócentruma is inaktiválódhat. A projekt kezdete előtt publikált eredményeink azt mutatták (Tóth et al. 2007, Biochim Biophys Acta 1767: 295-305), hogy a vízbontó komplex károsodása esetén a vízmolekulák helyett más, alternatív elektrondonorok juttatnak elektronokat a fotoszintetikus elektrontranszport-láncba.

I. A pályázat első célkitűzése az alternatív elektrondonor azonosítása volt. Vad típusú és aszkorbát-deficiens (vtc2-1) Arabidopsis mutánsokon végzett gyors klorofill-a fluoreszcencia mérések alapján megállapítottuk, hogy az elektronátadás jóval lassabb az aszkorbát-deficiens növényekben ($t_{1/2}=55$ ms), mint a vad típusban ($t_{1/2}=25$ ms; 1A, 1B ábra). Intakt levelek aszkorbát-oldatban történő inkubálásával az elektronátadás jelentősen gyorsítható volt az aszkorbát-deficiens mutánsokban ($t_{1/2}=32$ ms), ami bizonyítja, hogy az aszkorbát juttat elektronokat a PSII-höz *in vivo* körülmények között.

A reakcióutakat termolumineszcenciás mérésekkel vizsgáltuk és megállapítottuk, hogy az aszkorbát-molekuláktól a Tyr_z⁺-n keresztül jutnak az elektronok a P680⁺-hoz, a primér töltésszétválasztás helyéhez. P700 abszorpciós mérések alapján kijelenthető volt, hogy az aszkorbáttól származó elektrontranszport az első fotokémiai rendszerben (PSI) is detektálható és DCMU-ra (PSII gátlószer) érzékeny, tehát a teljes fotoszintetikus elektrontranszport-láncban megjelennek PSII donor oldalán az aszkorbát oxidációjából származó elektronok (1.C ábra).



1. ábra. Aszkorbát-PSII alternatív elektrontranszport hőkezelt vad típusú és aszkorbát-deficiens (*vtc2-1*) leveleken. A. Kontroll és hőkezelt (49°C 40 s) leveleken mért klorofill-a fluoreszcencia tranziensek. B. Az aszkorbát-PSII elektrontranszport félidejének meghatározása. Felső panel: Hőkezelt leveleken mért, 5 ms-os fényimpulzusokkal indukált fluoreszcencia tranziensek. Alsó panel: A variábilis fluoreszcencia regenerációja az 5 ms-os fényimpulzusok közötti időintervallum függvényében. C. Vad típusú és *vtc2-1* Arabidopsis növényeken végzett fényindukált 820-nm abszorbanca tranziensek.

Számos fajt megvizsgálva (*Synechocystis*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Marchantia polymorpha*, *Nephrolepis exaltata*, *Pisum sativum*, *Hordeum vulgare*, *Soldanella alpina*), megállapítottuk, hogy ez a típusú alternatív elektrontranszport általánosan előfordul, azonban az elektronátadás félideje fajonként eltérő és nevelési körülményektől függően változik; kb. 15 és 40 ms közötti értékeket mértünk.

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

Ezeket az eredményeket az egyik legrangosabb folyóiratban publikáltuk a növénybiológia területén (Tóth et al. 2009 *Plant Physiol* 149: 1568-1578, IF 6.370), és a cikk szerkesztői ajánlással jelent meg (Minorski 2009, *On the Inside: Ascorbate: A donor of a photosynthetic electrons following heat stress*. *Plant Physiol* 149: 1205-1206).

II. A pályázat munkatervében szereplő második célkitűzések megfelelően megvizsgáltuk az aszkorbát a PSII alternatív elektrondonoraként betöltött élettani szerepét. Ismert,

hogy a vízbontó komplex inaktivációja esetén a PSII reakciócentrumok gyorsan inaktiválódnak kis intenzitású megvilágítás hatására is. Ezt a jelenséget donor oldal által indukált fotoinhibíciónak nevezzük. Feltételeztük, hogy az aszkorbát elektrondonorként véd a fotoinhibícióval szemben azáltal, hogy csökkenti a P680⁺ és a Tyr_Z⁺ káros felhalmozódását.

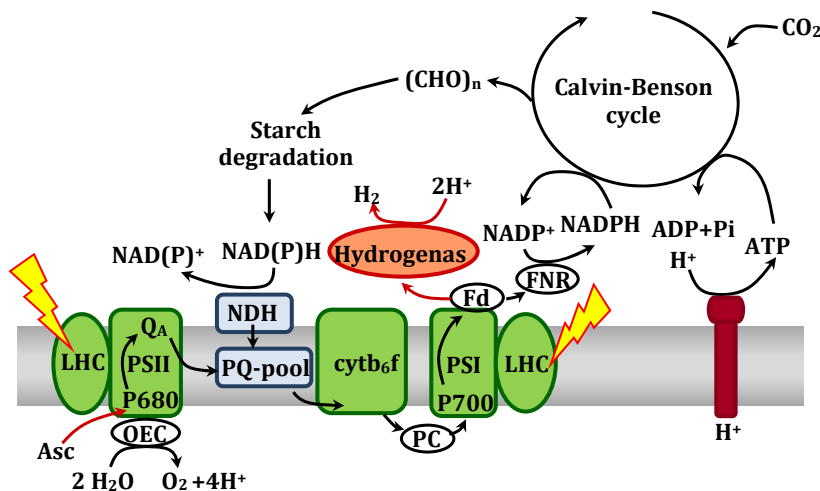
Vadtípusú, aszkorbát-deficiens (vtc2-3) és aszkorbát-túltermelő (miox-4, Prof C.L. Nessler, Arkansas State University, USA) Arabidopsis növények oxigénfejlődésének teljes inaktivációját követően (40°C, 15 min) a növényeket megvilágításnak tettük ki, hogy megvizsgáljuk, hogy a reakciócentrumok inaktivációjának sebessége függ-e az aszkorbát tartalomtól. Gyors klorofill-a fluoreszcencia tranziensek alapján megállapítottuk, hogy sorozatos single turnover flashek hatására a reakciócentrumok csak akkor inaktiválódnak, ha a közöttük lévő intervallum nem elegendő az Tyr_Z⁺ aszkorbát általi redukációjához. Folyamatos, közepes intenzitású (kb. 300 μmol foton m⁻²s⁻¹) fényben néhány perc alatt lelassul a Tyr_Z-P680⁺ elektrontranszport, majd ezt a PSII reakciócentrumok teljes inaktivációja követi, ami 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 PsbO proteinje is degradálódik ez idő alatt. A különböző aszkorbát-tartalmú Arabidopsis növényeket összehasonlítva megállapítottuk, hogy az inaktiváció sebessége nagymértékben függ az aszkorbát-tartalomtól. Annak bizonyítására, hogy az aszkorbát védő szerepe nemcsak a szabadgyök-kioltó tulajdonságának köszönhető, hanem alternatív donorként is védi a reakciócentrumokat, difenil-karbazid kezelést végeztünk. A difenil-karbazid a PSII mesterséges donora és intakt levelek megfelelő koncentrációjú oldatban való inkubálásával elérhető volt, hogy az aszkorbát-deficiens növények reakciócentrumába ugyanolyan sebességgel érkezenek az elektronok, mint a vadtípusban. Megállapítottuk, hogy a difenil-karbazid jelenlétében is lassabb az inaktiváció, mint az aszkorbát-deficiens levelekben. Tehát az aszkorbát PSII donorként véd, illetve lassítja a PSII inaktivációját. Ezt a hatást enyhe hőkezelésben részesített növényeken is sikerült kimutatnunk. Vizsgáltuk a hő- és fénykezelést követő helyreállást is, és megállapítottuk, hogy a helyreállítás mértéke és sebessége jóval nagyobb a vadtípusú és az aszkorbát-túltermelő növényben, mint az

aszorbát-deficiensben. Ezekből az eredményekből cikk született szintén a Plant Physiology c. folyóiratban (Tóth et al. 2011 Plant Physiol 157: 1628-1641, IF 6.451).

Az aszorbát védő szerepét UV-stressz esetében is vizsgáljuk. Az aszorbát-deficiens és vad típusú Arabidopsis minták gyors klorofill-a fluoreszcencia görbéi alapján megállapítottuk, hogy az aszorbát védő szereppel bír UV-stressz esetén is, azt azonban nem sikerült egyértelműen bizonyítanunk, hogy ez az alternatív donor szerepének tulajdonítható.

Az eddigi eredmények azt valószínűsítették, hogy az aszorbát csak inaktív vízbontás mellett képes elektronokat szolgáltatni a PSII-höz. Azonban a $\Delta\PsbO$ mutánsban (C. Spetea, University of Gothenburg), amelyben a vízbontó komplex aktív, de nem tartalmazza a PsbO proteint, elektronátadást figyeltünk meg az aszorbáttól a PSII felé. Tervezzük ezen vizsgálatok folytatását, majd későbbi publikálását.

III. A pályázat harmadik célkitűzésünk megfelelően vizsgáltuk az aszorbát-PSII alternatív elektrontranszport biotechnológiai hasznosíthatóságát. A cianobaktériumokkal történő kísérleteket elvetettük, mivel az irodalmi adatok és a téma szakértőivel történő diskussziók alapján valószínűsíthető volt, hogy cianobaktériumokban nincs vagy nagyon csekély mértékű az aszorbát-bioszintézis, valamint a hidrogéntermelés mértéke is jelentősen elmarad a *Chlamydomonas reinhardtii* zöldalgában mérhetőtől.



2. ábra. Hidrogéntermelés *Chlamydomonas reinhardtii* zöldalgában.

A *Chlamydomonas reinhardtii* hidrogenáz enzime a fotoszintetikus elektrontranszportlánc első fotokémiai rendszerének akceptor oldalán helyezkedik el és a ferredoxintól kapja az elektronokat. A hidrogéntermelés mértéke természetes körülmények között igen csekély, aminek egyik oka, hogy a fotoszintézis során keletkező oxigén gátolja a hidrogenáz enzim működését. Ennek elkerülésére kénmentes tápoldatba, anaerob körülmények közé helyezve a sejteket az oxigéntermelésért felelős PSII reakciócentrumai részben inaktiválódnak, így jelentősen csökken az oxigéntermelés és ezzel párhuzamosan hidrogenáz szintetizálódik és beindul a hidrogéntermelés. A hidrogéntermelés mértékét alapvetően meghatározza a maradék lineáris elektrontranszport aktivitása de emellett a keményítőtöbontás is jelentősen hozzájárul a hidrogéntermeléshez.

Megállapítottuk, hogy a külsőleg adott aszkorbát hőkezelt *Chlamydomonas reinhardtii* sejtekben gyorsítja az elektrontranszportot: normál körülmények között az aszkorbát-PSII elektrontranszport félideje 33 ms, azonban 10 mM aszkorbát hozzáadásával 13 ms-ra csökken. P700 abszorpciós mérések bizonyították, hogy hőkezelés hatására lelassul a PSII felől érkező elektrontranszport, amit 10 mM külsőleg adott aszkorbát jelentősen felgyorsít. Azonos eredményeket kaptunk a kénmentes tápoldaton nevelt sejteken is. Mivel ez a folyamat DCMU-ra érzékeny, bizonyítottnak tekinthető, hogy kénmegvonás hatására az aszkorbát - ugyanúgy, mint hőkezeléssel inaktivált vízbontás esetében - alternatív PSII elektrondonorként viselkedik. Ezen okból kifolyólag nem volt szükség a kénmentes tápoldatban nevelt sejtek hőkezelésére.

A hidrogéntermelés detektálása gázkromatográfiás mérésekkel, Prof. Dr. Kovács Kornél csoportjával (Szegedi Tudományegyetem Biotechnológiai Tanszék) együttműködésben történt. A kénmegvonás kezdetekor adott 10 mM aszkorbát jelentős, kb. háromszoros emelkedést eredményezett a hidrogéntermelésben. Hasonló eredményeket értünk el a mesterséges PSII donor, a difenil-karbazid hozzáadásával is. A DCMU jelentősen csökkentette a hidrogéntermelés mértékét, ami bizonyítja, hogy az aszkorbát serkentő hatása az alternatív elektrondonor szerepének köszönhető, tehát a sejtekhez adott, vagy esetleg az ott túltermeltetett aszkorbát alkalmas a hidrogéntermelés fokozására.

Ezen eredményeinket az International Journal of Hydrogen Energy c. folyóiratban publikáltuk, a projektben résztvevő PhD hallgató, Nagy Valéria első szerzőségével (Nagy et al., 2012 Int J Hydrogen Energy 37: 8864-8871, IF: 4.057). Ezen munkát folytatni kívánjuk: tovább szeretnénk vizsgálni az aszkorbát elektrontranszportra gyakorolt hatását, valamint antiszensz oligonukleotidok segítségével vizsgáljuk a hidrogéntermeléssel kompetitív folyamatokat is.

IV. A projekt fő célkitűzéseinek teljesítése mellett több munkában is részt vettem, amelyek eredményei hozzájárulnak az aszkorbát szerepének jobb megismeréséhez és biotechnológiai hasznosításához.

IV/a. Az aszkorbát szerepének vizsgálatához az általunk leggyakrabban használt módszer a gyors klorofill-a fluoreszcencia mérése, amellyel kapcsolatban azonban még számos kérdés megválaszolatlan. A csoportunkban végzett kísérletek azt mutatják, hogy a PSII-ben konformációváltozások zajlanak le, amelyek nagymértékben befolyásolhatják a klorofill-a fluoreszcencia intenzitását és annak kinetikáját (Schansker et al., 2011 Biochim Biophys Acta 1807: 1032-1043, IF: 5.132)

IV/b. A zöldalgák hidrogéntermelése egy rendkívül összetett folyamat. A hidrogenáz enzim expresszióját és működését számos kompetitív folyamat gátolhatja, mint pl. a PSI ciklikus elektrontranszport, az oxigéntermelés és a CO₂ fixálás. A Szegedi Biológiai Kutatóközpont Növényi Sejtszétválasztási és Stressz Adaptációs Csoportjával együttműködésben kimutattuk, hogy szintetikus antiszensz oligonukleotidokkal a génexpresszió átmenetileg és specifikusan gátolható növényi levelekben (Dinç et al., 2011 Plant Physiol 157:1628-1641, IF: 6.451, Dinç et al. 2012 Biochim Biophys Acta 1817: 770-779, IF: 5.132). Az antiszensz oligonukleotidokat az aszkorbát alternatív elektrondonor szerepének további vizsgálatához szeretnénk felhasználni növényi levelekben. Emellett kísérleteket végzünk annak vizsgálatára, hogy *Chlamydomonas* sejtekben is felhasználható-e ez a módszer, amellyel a hidrogéntermeléssel kompetitív folyamatokban részt vevő fehérjék szintézise gátolható, és ezáltal a hidrogéntermelés serkenthető lenne.

IV/c. Alternatív elektrontranszport folyamatok a PSI reakciócentrum körül is lejátszódnak, amelyek pl. hőstressz és szárazságstressz hatására aktivizálódnak. Ezen

folyamatokat termolumineszcencia és P700 mérésekkel vizsgáltam Prof. Dr. Gabriel Cornic csoportjával együttműködésben (Peeva et al., 2012 *Physiol Plantarum* 144: 83–97, IF 3.067).

Hallgatói részvétel:

A projektben a terveknek megfelelően több hallgató is részt vett:

Nagy Valéria az International Training Course (ITC) keretében csatlakozott a csoporthoz 2008-ban, majd 2009-től PhD hallgatóként folytatta a munkát. A projektben való részvétel során teljesítette a PhD megszerzéséhez szükséges publikációs követelményeket, a védésre pedig 2013 elején kerül sor.

Andrei Herdean szintén ITC-hallgatóként vett részt a projektben 2010-2011-ben. Az aszkorbát védőhatását vizsgálta UV-B és UV-C stressznek kitett növényeken, valamint vizsgálatokat végzett a Δ PsbO mutánsban is. Ő jelenleg Cornelia Spetea csoportjában, Svédországban PhD hallgató.

A munkában továbbá részt vett Dr. Jiří Frolec, aki doktorandusz hallgatóként három hónapot töltött a csoportunkban és részt vett az aszkorbát elektrontranszportra gyakorolt hatásainak vizsgálatában *Chlamydomonas reinhardtii* sejtekben.

Beruházások:

Vizsgálatainkat nagyban elősegítették a pályázati forrásból megvásárolt Dual-PAM készülékkel végzett klorofill-a fluoreszcencia és P700 abszorbancia mérések.

A *Chlamydomonas* alga nevelését a projektben tervezettnél jóval alacsonyabb költséggel sikerült megoldanunk, a fennmaradó összeget pedig LED-es megvilágítópanel vásárlására fordítottuk, amit fotoinhibíciós kísérletekhez tudunk használni.

Publikációs tevékenység:

Eredményeinket számos hazai és külföldi konferencián bemutattuk poszter és előadás formájában. A legjelentősebbek a 2008. június 22-27 között South Hadley-ben (USA) megrendezett Gordon Research Conference– Photosynthesis konferencia és a 2010-ben Pekingben megrendezett 15th International Congress on Photosynthesis konferencia,

ahol proceedings formájában is publikáltuk az eredményeinket (Tóth et al., 2011 Proceedings of the 15th International Congress on Photosynthesis, Beijing, China).

A projekt fő célkitűzéseinek teljesítése alapján három, rangos folyóiratban publikált cikk született és emellett folyamatban van egy review cikk írása, amelynek témája a kloroplaszt lumenjében található aszkorbát szerepe a fotoprotektív folyamatokban (Tóth SZ, Schansker G, Garab G, Roles of chloroplast luminal ascorbate in photoprotection). A projekt témájához kapcsolódóan további négy, társszerzős cikk jelent meg. Eddig ezekre a cikkekre összesen 27 hivatkozás történt.