

Zárójelentés „A szinglet oxigén szerepe cianobaktériumok és mikroalgák jelátviteli folyamataiban és környezetükkel való kölcsönhatásaikban” című K-116016 azonosítójú pályázatról

A projekt fő feladatai a következők voltak:

1, Szinglet oxigén ($^1\text{O}_2$) által indukálható gének azonosítása a *Synechocystis* 6803 cianobaktériumban.

Az előzetesen elvégzett teljes transzkriptom vizsgálat alapján 14 *Synechocystis* gén indukcióját jellemeztük részletesebben a $^1\text{O}_2$ képződését indukáló rose bengál (RB) vagy metilén kék (MB), illetve a szintén oxidatív stresszhatást okozó hidrogén peroxid (H_2O_2) jelenlétében kvantitatív PCR módszerrel.

Eredményeink szerint:

- Az sl10471 jelű gén indukciója a két oxidatív kezelés hatására hasonló mértékű volt.
- Az sl10815 slr0383 és sl10315 gének H_2O_2 hatására erősebben indukálódnak, mint $^1\text{O}_2$ hatására. Ezen gének vizsgálatát ezért nem folytatjuk.
- Négy gén (slr0841, slr1674, slr1737 és slr1915) expressziója RB kezelésre legalább kétszer erősebben növekszik, mint H_2O_2 kezelés hatására, azonban ezek indukciója nem túl erőteljes
- További gének: slr0644, ssr1425, ssr2595, ssr6086, slr0846 és slr1747 expressziója $^1\text{O}_2$ hatására specifikusnak tűnik az eddigi vizsgálatok alapján. Az utóbbi kettő mintegy hússzoros indukciót mutat.

A további vizsgálatok során az alábbi génekre koncentráltunk, amelyek irodalmi adatok és génfunkció azonosítási analízisek alapján a következő ismert vagy feltételezett funkcióval rendelkeznek:

- slr1737 tokoferol cikláz (E-vitamin szintézis)
- slr1747 nem bizonyított, de feltehetően pheophorbide(a) oxygenase (klorofill lebontási útvonalának enzime)
- slr1674 PSII termotoleranciáért felelősnek tartott gén
- slr1915 unknown
- slr0841 periplazmatikus fehérje, feltételezhetően a motilitásban játszik szerepet
- sl10846 ismeretlen funkció, több stressz hatásra is reagál (univerzális szenzor vagy regulátor?)
- ssr2595 HliB/SpcD magas fény indukált kis klorofill kötő proteint kódol (feltehetően szerepe van a klorofill szintézis és degradáció szabályozásában is)

2, $^1\text{O}_2$ -re reagáló géneket nem tartalmazó *Synechocystis* mutánsok létrehozása és jellemzése

A vizsgálatok következő szakaszában gén delécióval létrehoztunk olyan mutánsokat, amelyekben vagy az sl10846, vagy az ssr2595, vagy mindkét gén inaktíválva van (a gének

inaktiválására olyan DNS konstrukciókat készítettünk, amelyek homológ rekombinációval antibiotikum rezisztencia kazettára cserélik a gént). A mutánsok tulajdonságainak jellemzése a következő eredményre vezetett:

- A Δ sll0846 törzs növekedési ütemében nem tér el a vad típustól sem normál, sem magas fényerősség mellett, ill. külsőleg generált $^1\text{O}_2$ jelenlétében sem. Ebből arra következtetünk, hogy a gén funkcióját más gének átveszik a mutánsban. Ezzel összhangban van az az eredmény, hogy a RB által keltett $^1\text{O}_2$ hatására a ssr2595 és slr1747 gének expressziója jelentősen magasabb, mint a vad típusban.
- A Δ ssr2595 törzsben az sll0846, slr1747 és slr0841 géneknek $^1\text{O}_2$ hatására bekövetkező indukciója jelentősen elmarad a vad típusban tapasztalt mértéktől. A mutánsban a sejt denzitásra normált klorofill tartalom kisebb, mint a vad típusú sejt vonalban. A növekedési üteme alacsony fényen nem különbözik a vad típusától, ám magas fényen a MB által generált $^1\text{O}_2$ a sejtek növekedését leállítja.
- Egy külföldi együttműködés során meg tudtunk vizsgálni egy olyan *Synechocystis* mutánst is, amelyben mind az öt SCP/HLIP gén inaktiválva volt egy olyan törzsben, ami az I-es fotokémiai rendszer hiányában ezeket a géneket, ill. fehérje termékeiket folyamatosan kifejezi. Eredményeink szerint a Δ ScpABCDE mutánsban fokozott $^1\text{O}_2$ képződés figyelhető meg, ami arra utal, hogy az SCP/HLIP géncsalád, és benne az ssr2595 (ScpD) gén a $^1\text{O}_2$ eliminálásában vehet részt.

Elvégeztünk egy komplex kísérlet sorozatot, amelynek során a vad típusú ill. az egyszeres (Δ sll0846, Δ ssr2595) és kétszeres (Δ sll0846 Δ ssr2595) mutáns sejteket MB alkalmazásával történő $^1\text{O}_2$ kezelésnek vetettük alá. A sejtekből teljes transzkripciós mintázat meghatározásra alkalmas RNS mintákat készítettünk és megtörtént a minták új generációs szekvenálása annak érdekében, hogy a mutáns és vad típusú sejtekben egymástól különböző mértékben indukálódó gének azonosításával tárjuk fel az inaktivált gének szerepét. A kapott eredmények azonban nem voltak egyértelműen értelmezhetők, aminek valószínű oka a $^1\text{O}_2$ produkció körülményeiben keresendő. Ezért ez a kísérlet sorozat megismétlésre vár, amit a projekt végére terveztünk, de a COVID helyzet miatti leállások miatt nem sikerült megvalósítani. A vizsgálatokat elvégzését továbbra is tervezzük és OTKÁ-n kívüli forrásokból fogjuk elvégezni.

A munka ezen szakaszainak (1. és 2. pont) eredményeiről két nemzetközi konferencián számoltunk be [1, 2] és egy nemzetközi folyóirat cikket [3] közzeltünk.

3, $^1\text{O}_2$ -re reagáló gének promótereit tartalmazó szenzor mutánsok létrehozása *Synechocystis*-ben $^1\text{O}_2$ képződés *in vivo* jellemzésére

A munkaterv eredeti elképzelése az volt, hogy a $^1\text{O}_2$ -re reagáló gének azonosítása után azok promótereivel olyan GFP riporter konstrukciókat hozunk létre, amelyek $^1\text{O}_2$ jelenlétére GFP termelésével reagálnak. Ezeket a mutánsokat elő is állítottuk. A fent felsorolt gének promótereit PCR segítségével kiamplifikáltuk a genomból, és az ampikon végeket megfelelő restriktions endonukleáz hasítóhelyekkel láttuk el. Ezeket az inszerteket GFP fluoreszcens riporter gén elé illesztettük pIGA promóterpróba ingavektorba. Az így keletkezett plazmidokat *E. coli* baktériumban történő felsokszorozást követően transzformáltuk *Synechocystis* sejtekbe, és a sikeres transzformánsokat antibiotikumon szelektáltuk, valamint PCR technikával ellenőriztük.

A mutánsok az elképzeléseknek megfelelően reagáltak a GFP transzkript szinten a $^1\text{O}_2$ jelenlétére, de GFP fluoreszcencia növekedést nem tapasztaltunk. Kiderült, hogy a szinglet oxigén közvetlen kölcsönhatásba lép a GFP molekulákkal és kioltja azok fluoreszcenciáját. Ennek következtében a szinglet oxigén által indukálható promóterek által szabályozott GFP termelés nem alkalmazható az eredetileg tervezett célra, azaz cianobakteriális szinglet oxigén riporter törzsek előállítására.

A GFP fluoreszcencia $^1\text{O}_2$ által történő kioltása azonban alkalmas lehet a $^1\text{O}_2$ in vivo keletkezésének kimutatására, ha a GFP-t állandó szinten konstitutívan termelő törzseket használunk. A módszert GFP-t kifejező *E. coli* és *Synechocystis* törzseken is teszteltük és az eredmények azt mutatják, hogy a $^1\text{O}_2$ valóban képes a GFP fluoreszcencia specifikus kioltására in vivo körülmények között. Azt is kimutattuk, hogy a GFP kioltása specifikus $^1\text{O}_2$ -re és más reaktív oxigén formák (szuperoxid, H_2O_2) hatására fiziológias koncentrációk mellett nem következik be.

Mivel a GFP fluoreszcencia $^1\text{O}_2$ által történő kioltása miatt a GFP riporter konstrukciók nem bizonyultak alkalmasnak a $^1\text{O}_2$ in vivo kimutatására egy másik megközelítést alkalmaztunk luciferáz riporter gén felhasználásával. A riporter törzs létrehozásához a pILA promóter próba vektort használtuk, mely a luciferáz riporter fehérjét kódoló génszekvenciákat hordozza. KpnI restrikciós enzim segítségével a prom2595 szekvenciát a *LuxA* és *LuxB* gének elé inszertáltuk és létrehoztuk a pILAprom2595-ös konstrukciót, majd *Synechocystis*-be történő transzformációt követően indukciós kísérleteket hajtottunk rajta végre. Az eredmények azt mutatták, hogy a fényintenzitás növelésével, a 40-200 μE tartományban, a luciferáz fluoreszcencia intenzitás fokozatos növekedést mutatott. Alacsony koncentrációjú (0.5 μM) RB jelenlétében a fluoreszcencia indukció mértéke megnövekedett 70 és 120 μE intenzitású megvilágítás esetén, ami azt mutatja, a luciferáz riporter gén konstrukció valóban reagál a $^1\text{O}_2$ jelenlétére.

A projekt kezdete óta jelentős előrehaladás történt a géninaktivációs módszerekben a CRISPR típusú eljárások kifejlesztésével, amelyekkel viszonylag egyszerűen megoldható több célgén egyidejű inaktiválása. Mivel az a módszer cianobaktériumok esetén csak korlátozottan volt alkalmazható kidolgoztunk egy single-plastid alapú CRISPR géninaktiválási módszert *Synechocystis* 6803-ra, amit II-es fotokémiai rendszer psbO és psbA2, psbA3 génjeinek inaktiválására használtunk. A módszer a későbbiekben jól alkalmazható lesz a $^1\text{O}_2$ által közvetített jelátviteli hálózat komponenseinek célzott kiiktatására.

Az eredményeket egy nemzetközi konferencia előadásban (riporter mutánsok [4]) és egy folyóirat közleményben (CRISPR alapú gén inaktiválás [5]) mutattuk be.

4. Intra- és extracelluláris $^1\text{O}_2$ képződés a mikroalgákban

A tervezett munka egyik fontos eleme volt az előzetes vizsgálatok során felismert extracelluláris $^1\text{O}_2$ képződés vizsgálata *Synechocystis*-ben és a korall szimbiózis fotoszintetikus partnereként működő *Symbiodinium* ostoros algában, továbbá az intracelluláris $^1\text{O}_2$ képződés jellemzése a *Symbiodinium* sejteken belül. Megerősítettük, hogy a *Synechocystis* sejtek kiválasztanak a sejtfalon kívülre egy erős $^1\text{O}_2$ képződési potenciállal rendelkező metabolitot, továbbá azt, hogy ez a metabolit a sejteken belül nem indukál $^1\text{O}_2$ képződést. A kiválasztott metabolit nem jut vissza intakt sejtekbe, illetve ha visszajut akkor elveszti $^1\text{O}_2$ képzési potenciálját. Ezért a *Synechocystis* sejtekből kiválasztott metabolit a sejtek környezetében

található más organizmusokra gyakorolhat hatást. Az ezzel kapcsolatos eredményeket egy nemzetközi konferencián mutattuk be [6].

Kimutattuk, hogy az intra- és extracelluláris $^1\text{O}_2$ képződés jelen van a *Symbiodinium* ostoros algában. Továbbá azt is, hogy az extracelluláris $^1\text{O}_2$ képződés szerepet játszhat a korall szimbiózis környezeti stresszhatások által indukált felbomlásában. Az eredményeket két konferencia előadásban [7,8] és a nagy presztízsű *New Phytologist* folyóiratban közzétettük [9], ami jelentős sajtóvisszhangot kapott.

Az intracelluláris $^1\text{O}_2$ képződés részletes vizsgálatát *Symbiodiniumban* nagyon megnehezíti, hogy a $^1\text{O}_2$ közvetlen detektálására alkalmas ESR és fluoreszcens szenzorok nem tudnak átjutni a sejtfalon. Ezen probléma leküzdésére kifejlesztettünk egy olyan protoplasztálási módszert, ami lehetővé teszi a *Symbiodinium* sejtek falának célzott eltávolítását, anélkül, hogy a sejtek fiziológiai állapota (fotoszintetikus aktivitás és osztódási képesség) károsodna. Mivel a protoplasztálás egy mikrofluidikai rendszerben csapdázódott sejteken történik lehetőség van az egyedi sejtek tulajdonságainak nyomon követésére. Kimutattuk, hogy a $^1\text{O}_2$ vizsgálatokban gyakran használt fluoreszcens szenzor, a Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG), a protoplasztálás után bejut a *Symbiodinium* sejtekbe, és segítségével kimutatható a kloroplasztiszokban lokalizált $^1\text{O}_2$ képződés. Az eredmények alapján készült kézirat beküldés előtt áll a *Lab on a Chip* folyóiratba [10].

A projekt részleges támogatásával készült továbbá egy összefoglaló könyvfejezet a reaktív oxigén formák szerepéről a korallpusztulásban [11].

5. A $^1\text{O}_2$ szerepe a fotoszintetikus apparátus károsításában és a $^1\text{O}_2$ ellen védő mechanizmusok

A reaktív oxigén formák (ROS) fotoszintetikus rendszerekre gyakorolt hatásaival kapcsolatos vizsgálatok alapvető kérdése az, hogy a $^1\text{O}_2$, illetve más ROS formák (pl. superoxid) milyen módon vesz(nek) részt a fotoszintetikus apparátus károsításában. Ezzel kapcsolatos vizsgálataink egyik fontos eredménye annak kimutatása, hogy a növények és mikroalgák fénykárosítási vizsgálataiban gyakran használt protein szintézis gátlószer a kloramfenikol kölcsönhatásba lép a fotoszintetikus elektrontranszporttal és ennek eredményeként szuperoxid képződik az I-es és a II-es fotokémiai rendszerben is. Ennek következtében, kloramfenikol jelenlétében felerősödik a II-es fotokémiai rendszer fényindukált károsítása, ezért a kloramfenikol alkalmazását kerülni kell a fénygátlási vizsgálatokban. Ezzel kapcsolatos eredményeinket egy nemzetközi folyóirat cikkben közzétettük [12].

A $^1\text{O}_2$ fotoszintézist károsító hatásaival kapcsolatban az irodalomban vitatott kérdés volt, hogy a $^1\text{O}_2$ képes-e a II-es fotokémiai rendszer aktivitását közvetlenül károsítani, vagy csak a károsítást helyreállító repair folyamat gátlása révén fejti ki hatását. A terület áttekintését egy összefoglaló könyvfejezetben közzétettük [13]. Munkánk során megmutattuk, hogy a sejtekhez adott RB által indukált $^1\text{O}_2$ közvetlenül károsítja a II-es fotokémiai rendszer aktivitását izolált tilakoid membránokban és intakt mikroalga sejtekben egyaránt. Ezzel kapcsolatos eredményeinket egy nemzetközi folyóirat cikkben közzétettük [14].

A $^1\text{O}_2$ hatásaival kapcsolatban szintén vitatott kérdés volt a prolin szerepe a $^1\text{O}_2$ kioltásában. Munkánk során sikerült tisztáznunk, hogy a prolin valóban $^1\text{O}_2$ kioltó hatású és azt is megmutattuk, hogy a kioltás az ún. fizikai mechanizmus útján történik, nem pedig kémiai

oxidáció útján. Azt is megmutattuk, hogy a prolin szuperoxid detoxifikáló hatással is rendelkezik. Az eredmények alapján egy nemzetközi folyóirat cikk jelent meg [15].

Publikációk:

- 1, Ivy Mallick, István-Zoltán Vass, Péter Kós, Imre Vass (2018). Singlet oxygen responsive genes in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. First European Congress on Photosynthesis, Uppsala, 2018, June 25-28
- 2, Barbara Hodi, Istvan Zoltan Vass, Ivy Mallick, Gabor Patyi, Peter B. Kos, Imre Vass (2019) Effect of singlet oxygen on gene expression profile in *Synechocystis* PCC6803. 9th Symposium on Microalgae and Seaweed Products in Plant/Soil-Systems Mosonmagyaróvár, Hungary, June 25-26, 2019
- 3, Tibiletti, T., Rehman, A.U., Vass, I., Funk, C. (2018). The stress-induced SCP/HLIP family of small lightharvesting-like proteins (ScpABCDE) protects Photosystem II from photoinhibitory damages in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photosynth. Res.* (2018) 135:103–114
- 4, Gábor Patyi, Barbara Hódi, István Zoltán Vass, Imre Vass and Peter Kós (2019). Assessment of intracellular singlet oxygen by GFP fluorescence in *Synechocystis* PCC6803 9th Symposium on Microalgae and Seaweed Products in Plant/Soil-Systems Mosonmagyaróvár, Hungary, June 25-26, 2019.
- 5, Kirtania, P., Hódi, B., Mallick, I., Vass, I.-Z., Fehér, T., Vass, I. and Kós, P.B. (2019) A single plasmid based CRISPR interference in *Synechocystis* 6803 – A proof of concept. *PLoS One*, 14(11):e0225375. doi: 10.1371/journal.pone.0225375.
- 6, István Zoltán Vass, Péter B. Kós, Ateeq ur Rehman, Imre Vass (2017) Characterization of an intriguing substance from the growth medium of *Synechocystis* PCC 6803. 10th European Workshop on the Molecular Biology of Cyanobacteria. Cluj, Aug. 20-24. Book of Abstracts
- 7, Ateeq ur Rehman, Milan Szabó, Zsuzsanna Deák, Anthony Larkum, Peter J. Ralph and Imre Vass (2017) Singlet oxygen production in intact microalgae: mechanism and detection methods. International Conference on “Plants: Their Chemical and Biological Applications for Today and Tomorrow” April 12-14, 2017 Department of Botany University of Gujrat, Pakistan
- 8, Imre Vass, László Sass, Anthony Larkum, Peter Ralph and Ateeq ur Rehman (2017). A fluorescence wave phenomenon reflects the interaction of photosynthetic and respiratory electron transport in *Symbiodinium*. Aquafluo II Conference, Sydney, UTS, 2017, December 4-8
- 9, Rehman, A.U., Szabó, M., Deák, Z., Sass, L., Larkum, A., Ralph, P. and Vass, I. (2016) *Symbiodinium* sp. cells produce light induced intra- and extra-cellular singlet oxygen, which mediates photodamage of the photosynthetic apparatus and has the potential to interact with the animal host in coral symbiosis, *New Phytologist*, 212: 472-484.
- 10, Faiza Bashir, Milán Szabó, Sándor Kovács, Ágnes Ábrahám, Krisztina Nagy, Ferhan Ayaydin, Ildikó Valkony-Kelemen, Péter Galajda, Szilvia Zita Tóth, László Sass, Péter Kós, Imre Vass (2021). Microfluidic analysis of viable protoplast formation in the coral endosymbiont alga *Symbiodinium* sp. manuscript intended for submission to Lab on a Chip
- 11, Szabó, M., Larkum, A.W.D., Vass, I. (2020). *A Review: The Role of Reactive Oxygen Species in Mass Coral Bleaching*. In: Raven, John A.; Grossman, Arthur R.; Larkum, Anthony W.D. (szerk.) . Springer International Publishing, pp. 459-488.

- 12, Kodru, S., Rehman, A.U., Vass, I. (2021). Chloramphenicol enhances Photosystem II photodamage in intact cells of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Photosynthesis Research* (2020) 145:227–235.
- 13, Imre Vass (2019). The role of Singlet Oxygen in Photoinhibition of Photosystem II. in *Oxygen Production and Reduction in Artificial and Natural Systems*, J. Barber, P. Nixon and A.V. Ruban eds., World Scientific Publishers. pp. 91-118
- 14, Bashir, F., Rehman, A.U, Szabó, M., Vass, I. (2021). Singlet oxygen damages the function of Photosystem II in isolated thylakoids and in the green alga *Chlorella sorokiniana*. *Photosynth. Res.* in press, <https://doi.org/10.1007/s11120-021-00841-3>
- 15, Rehman, A.U., Bashir, F., Ayaydin, F., Kóta, Z., Páli, T., Vass, I. (2021) Proline is a quencher of singlet oxygen and superoxide both in in vitro systems and isolated thylakoids. *Phys. Plant.* in press, DOI: 10.1111/ppl.13265