Ph.D. értekezés

NEHÉZFÉM ÉS SZINGLET OXIGÉN ÉRZÉKELÉS *SYNECHOCYSTIS* PCC 6803 CIANOBAKTÉRIUMBAN

PATYI GÁBOR

Témavezetők:

Dr. Kós Péter

Dr. Vass Imre

Biológia Doktori Iskola, SZTE-TTIK

ELKH Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Növénybiológiai Intézet

Szeged

2022

Tartalom

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE **4**

1. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS **6**

1.1. A *Synechocystis* PCC 6803 cianobaktérium és biotechnológiája **6**

1.2. A bioriporter tervezés **10**
1.2.1. Az érzékelés összekapcsolása a riporterfehérje-termeléssel 10
1.2.2. Toxicitási bioriporterek tervezése 12
1.2.3. Vegyület-specifikus bioriporterek tervezése 13
1.2.4. A nehézfémek kimutatására szolgáló bioriporterek 13

1.3. Nehézfém szennyezés és a cianobaktériumok **15**

1.4. A cianobaktériumok, mint nehézfém bioszenzorok **18**

1.5. A nikkel, kobalt és cink rezisztenciához kapcsolódó gén klaszter a *Synechocystis*-ben **20**
1.5.1. A nehézfém klaszter kobalt-szabályozásban részt vevő génjei 20
1.5.2. Az nehézfém klaszter nikkel-szabályozásban részt vevő génjei 21
1.5.3. A nehézfém klaszter cink-szabályozásban részt vevő génjei és kapcsolataik 22
1.5.4. A nehézfém klaszter felhasználása HM bioszenzor törzsek előállításához 22

1.6. Fénystressz **25**
1.6.1. A fotoszintetikus apparátus főbb elemei és azok működésének alapja 25
1.6.2. Fotoinhibíció 28

1.7. A szinglet oxigén **29**
1.7.1. Fotobleaching 32
1.7.2. PSII fotosérülése és D_1 protein regeneráció 33
1.7.3. $^1O_2$ által kiváltott génexpressziós változások 34

1.8. Fotoszenzitizátor festékek, $^1O_2$ generálás és detekció **36**
1.8.1. $^1O_2$ kioltás 38
1.8.2. $^1O_2$ detekciós módszerek 38

1.9. Magas fényhatásra adott válaszok cianobaktériumokban **39**
1.9.1 Magas fényhatás indukálta (*hli*) gének *Synechocystis*-ben 40

2. CÉLKITŰZÉS **44**

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK **45**

3.1. Az alkalmazott cianobaktériumtörzsek növekedési körülményeinek és nehézfémsó kezelések hatásainak vizsgálata 45
3.1.1. Nehézfém kezelések 45
3.1.2. Szinglet oxigén generálás fotoszenzitizátor festékekkel 46

3.2. Molekuláris biológiai módszerek 46
3.2.1. *Synechocystis* transzformáció és a mutánsok szelekciója 46
3.2.2. A NiCoZia (Δ*nrsRSBACD:*Δ*coaRT:*Δ*ziaAR) és a* Δ*hliB* törzs tervezése, valamint létrehozása 47
3.2.3. A *Synechocystis* PCC 6803 pILA*coaR*; pILA*nrsRS*; pILA*ziaR* bioriporter törzsek előállítása WT és NiCoZia törzsekből 48
3.2.4. A *Synechocystis* PCC 6803 pILA*hliB* bioriporter törzs előállítása WT-ból 51

3.3. Génexpressziós vizsgálatok 52
3.3.1. RNS izolálás és tisztítás 52
3.3.2. Teljes transzkriptom analízis 53
3.3.3. qPCR protokoll 53

3.4. Bioluminescencia mérés 53

3.5. Növekedésgörbék összehasonlítása 54

3.6. Az intracelluláris HM koncentráció meghatározása 55

3.7. Adatelemzés és ábrázolás 55

4. EREDMÉNYEK ÉS KIÉRTÉKELÉSÜK 56

4.1 Nehézfém bioriporterek érzékenységének növelése 56
4.1.1. Növekedési sebesség különbségek a NiCoZia (Δ*nrsRSBACD:*Δ*coaRT:*Δ*ziaAR)* törzs és WT törzs között 56
4.1.2. Intracelluláris nehézfém tartalom 58
4.1.2. WT-pILACoaR és NiCoZia-pILACoaR bioriporter törzsek Co^{2+} és Zn^{2+} nehézfémekre való érzékenységének összehasonlítása 59
4.1.3. WT-pILAnrsRS-1 és NiCoZia-pILAnrsRS-1 bioriporter törzsek Ni^{2+}-re való érzékenységének összehasonlítása és a pILAnrsRS-1 és pILAnrsRS-2 promóter irányultság indukciós különbsége 60
4.1.4. WT-pILAziaR és NiCoZia-pILAziaR bioriporter törzsek Zn^{2+} nehézfémre való érzékenységének összehasonlítása 61

4.2. Szinglet oxigén érzékeny gének azonosítása *Synechocystis*-ben 63
4.2.1. Génexpressziós változások exogén és endogén $^1O_2$ kezelések alatt 63
4.2.2. WT és Δ*hliB* növekedésbeli különbségei Mb és Rb jelenlétében 66
4.2.3. A *hli* gének génexpressziós változásai 68

4.2.4. A pILA*hliB* biolumineszcens riporter törzs 71
4.2.5. További $^1O_2$-érzékeny gének 75

5. ÖSSZEFOGLALÓ 83

5.1. Nehézfém bioriporterek detekciós érzékenységének növelése 83

5.2. Szinglet oxigén érzékeny gének a *Synechocystis*-ben 84

6. SUMMARY OF THE PH.D. THESIS 88

6.1 Increase the detection limit of heavy metal bioreporters 88

6.2 Singlet oxygen responsive genes in *Synechocystis* 89

7. IDÉZETT IRODALOM 92

8. PUBLIKÁCIÓS LISTA 113

8.1. A doktori eljárás alapját képező 2 db közlemény 113

8.2. Referált folyóiratban megjelent közlemények 113
8.2.1 A disszertáció témájához kapcsolódó közlemények 113
8.2.2. Egyéb közlemények 113
8.2.3. Folyamatban lévő közlemények 114

8.3. Egyéb szakmai anyagok 114

NYILATKOZAT 116

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 117

Rövidítések jegyzéke

AsA – aszkorbát

ATP – adenozin trifoszfát

BChl – bakterioklorofill

Carb – karbenicillin

CAT – kataláz

Chl – klorofill

Chl-a – klorofill-a

CPS – beütés per másodperc (counts per seconds)

DNS – dezoxiribonukleinsav

EPR – elektron paramágneses rezonancia

ETC – elektrontranszportlánc

Fd – ferredoxin

FLU – kék fény alatt fluoreszkál (fluorescent in blue light)

GPXH – glutation-peroxidáz

GST – glutation-S-transzferáz

HL – magas fényintenzitás

Hli – magas fény által indukált fehérjék

hli – magas fény által indukált gének

HM - nehézfém

ICmax – maximális gátló koncentráció

ICmin – minimális gátló koncentráció

ICP-MS - Induktív csatolású plazma atomemissziós spektrometria – tömegspektrometria

Km - kanamicin

LHC II – A II. fotokémiai rendszer fénygyűjtő komplexe

LL – alacsony fényintenzitás

LLD – legkisebb detekciós határ

OD – optikai denzitás

OEC – vízbontó komplex

ORF – nyílt leolvasási keret

PQ – plasztokinon

PSI – I. fotokémiai rendszer

PSII – II. fotokémiai rendszer

RC – reakció centrum

RNS – ribonukleinsav

ROS – reaktív oxigénformák

SCP – kis CAB-szerű fehérjék (small CAB like proteins)

SOD – szuperoxid-dizmutáz

SOSG – szinglet oxigén szenzor zöld fluoreszcens szenzor molekula

Sp-R – spektinomicin rezisztencia kazetta

sRNS – kis ribonukleinsav

TEMP –tetrametilpirimidin

TEMP-HCL – 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidon-hidroklorid

WT – vad típus

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

1.1. A *Synechocystis* PCC 6803 cianobaktérium és biotechnológiája

A jelen dolgozatom kísérleti modellszervezete a *Synechocystis* sp. PCC 6803 (*Synechocystis*) kék-zöld baktérium vagy más néven cianobaktérium. A *Synechocystis* egysejtű, édesvízi, oxigéntermelő fotoszintézist folytató, fotoautotróf Gram-negatív baktérium. Kisméretű genomja, valamint a molekuláris biológiai és fiziológiai mérések során tapasztalt könnyű kezelhetőségének köszönhetően rendkívül nagy figyelmet kap az alap- és alkalmazott kutatások során. A *Synechocystis* nemzetség tagjainak fontos sajátossága, hogy képesek mind fototróf növekedésre oxigéntermelő fotoszintézissel fényperiódusokban, mind pedig heterotróf növekedésre glikolízissel és oxidatív foszforilációval sötét időszakokban. Többségében a kettes fotokémiai rendszerre (PSII), hiányos mutánsok fényperiódusban is képesek a heterotróf növekedésre (Rengstl és mtsai., 2013; Vass és mtsai., 1992). A nemzetségbe tartozó cianobaktériumok mindegyike szintetizál klorofill-a (Chl-a) molekulát és a fotoszintézis során vizet hasznosítanak elektrondonorként, ami oxigén képződéséhez vezet. A legtöbbjük képes fikobilicianin pigment előállítására is, amely kékes színt kölcsönöz a sejteknek és ez a pigment felelős a közismert „kék-zöld alga” elnevezésükért. Egyes cianobaktériumok fikoeritrint is termelnek, mely egy vörös színű kiegészítő pigment. A *Synechocystis* cianobaktériumok génjeinek expressziója cirkadián ritmust mutat és a cirkadián óra szabályozása alatt áll, melynek köszönhetően a baktérium hatékonyan képes észlelni a világos és a sötét fázisok közötti átmenetet (Dong & Golden, 2008). Az oxigéntermelő fotoszintézist folytató cianobaktériumok körülbelül 2,7 milliárd éve léteznek a Földön. Földtörténeti szempontból ezek a fotoszintetizáló mikroorganizmusok óriási jelentőséggel bírnak, hiszen az oxigéntermelő fotoszintézisükhöz köthető a nagy oxigéngenerációs esemény (Schirrmeister és mtsai., 2015), mely elindította az átmenetet a Földön a magas szén-dioxid tartalmú és kevés oxigént tartalmazó légkörből a ma ismert légköri összetétel felé. A cianobaktériumok ezen újfajta fotoszintézise adta meg az esélyt akkoriban, hogy nagy mennyiségű oxigéngáz keletkezzen, mely a későbbiekben megalapozta a szárazföldi élet kialakulását. Rendkívüli alkalmazkodó képességüknek köszönhetően a cianobaktériumok ezt követően széles körben elterjedtek a Földön (Whitton, 2012), beleértve az édes és a sós vizek ökoszisztémáit, valamint a legtöbb szárazföldi környezetet. Filogenetikailag a *Synechocystis* később ágazik el, mint a *Synechococcus* sp. vagy *Oscillatoria* sp. a cianobaktériumok evolúciós fájában, távol az őstől (*Gloeobacter violaceus*), viszont szoros rokonságban áll egy másik modellszervezettel, a

Cyanothece ATCC 51442 nitrogénfixáló baktériummal. Mindezek alapján feltételezhető, hogy a *Synechocystis* eredetileg képes lehetett a nitrogén gáz megkötésére, azonban az idők során elveszítette a teljes nitrogénmegkötő (nif) génklaszterhez tartozó génjeit (Seán Turner, Tan-Chi Huang, 2001). Napjainkban a cianobaktériumokat széles körben alkalmazzák kísérleti modellszervezetekként, többek között a fotoszintézis, a szén- és nitrogén asszimiláció, a növényi plasztiszok evolúciójának és a környezeti stressz-akklimatizáció tanulmányozásához.

A *Synechocystis* az egyik legjobban vizsgált cianobaktérium törzs, mivel autotróf és heterotróf módon történő növekedésre is képes. A törzset 1968-ban egy édesvízű tóból izolálták (Yu és mtsai., 2013). A növekedéshez szükséges optimális hőmérséklet a 32–38 ºC közötti tartományba esik, mely könnyen biztosítható laboratóriumi körülmények között is (Červený és mtsai., 2015). A *Synechocystis* könnyedén képes az exogén DNS felvételére, mely jelenségre alapozva működik a természetes úton történő transzformálás molekuláris biológiai technikája (Pope & Kent, 1996). Ugyanakkor az exogén DNS természetes módon történő felvételén kívül a *Synechocystis* sejtek esetében gyakran alkalmazzák az elektroporációval, ultrahangos transzfekcióval és konjugációval történő exogén DNS beviteli módszereket is a transzformációs hatékonyság növelése érdekében. A fotoszintetikus apparátus vizsgálatánál számos hasonlóság figyelhető meg a cianobaktériumok és a szárazföldi növények fotoszintetikus rendszere között, mely az endoszimbionta elmélet kialakulásához vezetett. Eszerint a szárazföldi növények kloroplasztisza cianobakteriális eredetű, mely alapján eukarióta sejt, valamint az általa bekebelezett cianobaktérium sejt szimbiózisával alakultak ki a növények ősei (Sinetova & Los, 2016).

Laboratóriumi körülmények között a *Synechocystis* tenyészetek agarlemezeken és folyadék kultúrákban egyaránt fenntarthatóak. A sejtek tenyésztésére leggyakrabban a BG-11 nevű tápoldatot alkalmazzák (Rippka és mtsai., 1979). Optimális növekedésükhöz a pH 7 és 8,5 közötti kémhatás, valamint az 50 μmol $m^{-2}s^{-1}$ foton fényintenzitás az ideális. A sejtek osztódási sebessége szén-dioxiddal dúsított levegővel (1–2% CO_2) történő buborékoltatással növelhető, azonban ekkor további pufferelést igényelhet a pH fenntartása. Molekuláris biológiai kísérletekben alkalmazott klónozási folyamatok során a sejtek szelekcióját általában antibiotikum-rezisztencia gének alkalmazásával végzik. Heidorn és munkatársai 2011-ben kísérletesen meghatározták a *Synechocystis* kanamicin, spektinomicin, sztreptomicin, klóramfenikol, eritromicin és a gentamicin ideális alkalmazási koncentrációját (Heidorn és mtsai., 2011). A tenyészetek körülbelül 2 hétig tarthatók agarlemezeken, és rendszeres átoltás

alkalmazásával korlátlan ideig fenntarthatóak. A folyékony sejtkultúrák hosszú távú tárolása 15%-os glicerin oldat hozzáadását követően -80 ºC-on lehetséges.

A *Synechocystis* sejtek viszonlyag kis (3,57 Mbp) genommal, valamint három kis plazmiddal rendelkeznek, melyek általában 12 kópiában találhatóak meg: pCC5.2 (5,2 kb) pCA2,4 (2,4 kb) és pCB2,4 (2,4 kb). Ezen kívül még négy nagy plazmidot is tartalmaznak: pSYSM (120 kb), pSYSX (106 kb), pSYSA (103 kb) és pSYSG (44 kb). Habár a *Synechocystis* gyakran alkalmazott modellszervezetnek számít, kevés olyan szintetikus *in silico* genetikai eleme és konstrukciója létezik, amely felhasználható a géntechnológiához. Mivel a cianobaktériumok általában lassan osztódnak (~24 óra), célszerű a klónozott DNS felszaporítására és izolálására egy gyorsan növő, könnyen kezelhető gazdaszervezet alkalmazása, mint az *Escherichia coli*, mely alkalmas a konstrukciók konjugációval történő átvitelére is a *Synechocystis* sejtekbe.

A plazmidok stabil, replikálódó cirkuláris DNS darabok. Olyan plazmidok létrehozásához, amelyek több fajban is sikeresen működnek, úgynevezett *broad-host-range shuttle* (széles gazda-tartományú) transzfervektorra van szükség. Emellett fontos az is, hogy a génexpressziót szabályozó promóterek kiszámíthatóan működjenek több gazdaszervezetben is. Jelenleg csak egy *broad-host-range shuttle* vektor, az RSF1010 többszöröződik sikeresen a *Synechocystis*-ben (Mermet-Bouvier és mtsai., 1993). Az RSF1010 egy mobilizációs plazmid, amely megkönnyíti a sejtek közötti konjugációt, lehetővé téve a DNS horizontális géntranszferjét. Ezenkívül az RSF1010 kódolja saját replikációs gépezetét is, így nem szükséges, hogy a gazdasejt rendelkezzen a szükséges fehérjékkel és a transzkripciós faktorokkal. Csoportunk az előbb említett vektort felhasználva elsőként fejlesztett ki egy egyszerű módszert a CRISPR interferencia alkalmazására a natív *S. pyogenes* CRISPR összeállítást tartalmazó pCRISPathBrick plazmid módosításával a *Synechocystis* számára, melyet pCRPB1010-nek neveztünk el (Kirtania és mtsai., 2019).

A promóterek a DNS transzkripciójának szabályozásáért felelős génszekvenciák. Az I. típusú promóterek a gén kódoló szekvenciája előtt megtalálható konszenzus -35 és -10 régióból (Pribnow box) (Imamura & Asayama, 2009) állnak. Heidorn és munkatársai 2011-ben összeállítottak egy listát azokról a promóterekről, melyek a natív *Synechocystis* szintetikus konstrukcióihoz használhatók, azonban ezek alkalmazása keresztreakciókhoz és nem ortogonális vagy nem specifikus génexpresszióhoz is vezethet (Heidorn és mtsai., 2011). Hasznos gyűjtemény az úgynevezett Anderson-promóterek, mely egy konstitutív promótereket

magába foglaló gyűjtemény, amelyet egy kombinatorikus könyvtárból gyűjtöttek össze a -35 (5'TTGACA-3') és -10 (5'-TATAAT-3') konszenzus szekvenciájuk alapján (http://parts.igem.org/Promóters/Catalog/Anderson). Legjobban a BBa_J23101 funkcionál, melyről kimutatták, hogy a *Synechocystis*-ben is működik (Camsund & Lindblad, 2014). Az iGem Registry a BioBrick kezdeményezés részeként biztosítja ezeket a promóter szekvenciákat cserélhető genetikai részek létrehozására.

A szintetikus biológia egyik létfontosságú alapja olyan indukálható promóterek és gének alkalmazása, melyek működése igény szerint ki- és bekapcsolható a sejtekben. Az *E.coli*-ban számos, népszerű indukálható promóter létezik, mint a pBad, pTet és pLac promóterek, amelyek egy, a gén operátor régiójához kötődő, a transzkripciós apparátus progresszióját blokkoló represszor molekula által szabályozhatók. Ezen promóterek lehetővé teszik bioszenzor sejtvonalak előállítását, melyek segítségével különböző anyagok, mint például nehézfémek (HM) jelenléte is kimutatható. Ugyanakkor a *Synechocystis* esetében a rendelkezésre álló promóterek és a velük felmerülő problémák megnehezítik a pBad, pTet és pLac típusú bioszenzorok létrehozását. Mivel a transzkripciós apparátusban lévő béta alegységet kötő fehérjék magasabb kezdeti kötődési affinitással rendelkeznek a *Synechocystis*-ben, mint más eubakteriális modellben, a kis kötő-molekulákra válaszul be- / kikapcsoló promóterek kevésbé hatékonyak a *Synechocystis*-ben, hiszen az RNS polimeráz II le tudja szorítani őket a DNS szálról. Camsund, Heidorn és Lindblad kísérletük során több operonos promóter alkalmazásával próbálták fokozni a pLac repressziót a *Synechocystis*-ben, megkönnyítve ezáltal a DNS hurkolódását. Eredményeik azt mutatták, hogy ezzel a módszerrel olyan erős represszió érhető el, amely lehetetlenné teszi a transzkripció aktivációját (Camsund és mtsai., 2014). Huang és Lindblad létrehozott egy módosított pTet promótereket tartalmazó könyvtárat, változó mértékű represszióval egy dinamikus tartományban a glükóz toleráns *Synechocystis* sp. ATCC 27184-ban (Huang & Lindblad, 2013). Számos más promótert, például a PrnpB-t és a PrbcL variánsait, valamint a Ptrc promóter két operátorral rendelkező változatát is kifejlesztették és jellemezték pPMQAK1-GFP széles gazda specifitású shuttle vektorba való beépítéssel *Synechocystis*-ben (Huang és mtsai., 2010).

Az indukálható promóterek gyakran alkalmazott csoportját a HM-ek által indukálható promóterek adják, melyek esetében a transzkripció indukciója például a cink, kadmium, kobalt, arzén, nikkel és a króm jelenlétében aktiválódik (Peca és mtsai., 2007). Számos ilyen HM érzékeny promótert találtak és vizsgáltak a *Synechocystis*-ben is (Blasi és mtsai., 2012).

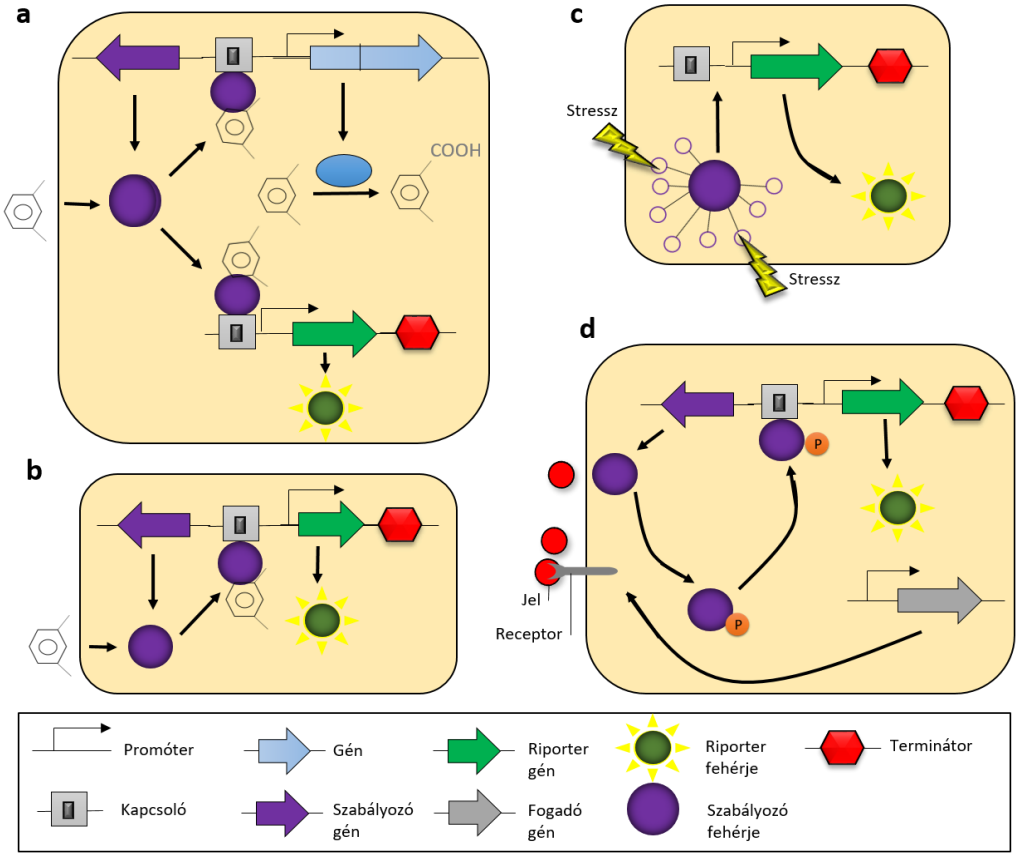
Azonban ezen promóterek alkalmazását nagyban megnehezíti, hogy a fémionok metabolizmusának útvonalai és a HM-ek koncentrációjának megváltozása nem kívánatos mellékhatásokkal járhat együtt (Hynninen & Virta, 2010). Mindezek ellenére a HM specifikus promóterek alkalmazása cianobakteriális bioszenzor törzsekben óriási lehetőséget rejt a bioremediáció területén (Peca és mtsai., 2017). Ugyanakkor ezek hatékonysága és specifitása a mai napig alacsonyabb a kémiai alapú HM kimutatási technikákhoz képest, így fejlesztésük nélkülözhetetlen a versenyben maradásuk érdekében (Peca és mtsai., 2008).

1.2. A bioriporter tervezés

1.2.1. Az érzékelés összekapcsolása a riporterfehérje-termeléssel

A „bakteriális bioriporter" kifejezés fokozatosan egyenértékűvé vált a genetikailag módosított baktériumokkal, amelyekben egy vagy több szabályozó hálózatot hoznak létre felismerhető és számszerűsíthető eredmények előállítására. A bakteriális bioriporter technológia ereje abban rejlik, hogy a meglévő jelátviteli útvonalat nem a natív válasza, hanem egy mesterséges kimenet figyeli. Ennek elérése érdekében a kívánt kimenetet kódoló gén (vagy géncsoport) expresszióját, az úgynevezett „riporter fehérjét", mesterségesen egy, a szükséges specifitással rendelkező, szenzoros-szabályozó rendszer vagy hálózat irányítása alá vonják (1. ábra). A termelt riporterfehérje mennyiségét vagy aktivitását tekintjük a targetre adott sejtes válasznak. Az ideális riporterfehérjék könnyen kimutathatók és mennyiségileg meghatározhatók (lehetőleg nem invazív módon), nagyon érzékenyek, és ideális esetben nincsenek jelen a natív szervezetben (Daunert és mtsai., 2000). Az érzékszervi-szabályozó rendszer és a riportergén kiválasztásánál eddig is fontos tényező volt a kémiai vegyületek vagy az általános mintatoxicitás kimutatásának motivációja, de a közelmúltban a példák mást is

mutattak. Újabb lehetőségek bakteriális bioriporterek számára, például az oszcillátorok (Elowitz, 2000), vagy a különböző hálózati kaszkádszámlálók (Friedland és mtsai., 2009).



1. ábra: **bakteriális bioriporter tervek**. Az összes bakteriális bioriporter létjogosultsága az, hogy előre meghatározott feltételeknek való kitettség következtében aktív riporterfehérjét termeljen. Ahhoz, hogy ez megtörténjen, a riporterfehérje feltételes szintézisét sejtszabályozó körhöz kell kapcsolni. Ez a kör lehet nagyon összetett, és sokféle kimenetet tartalmazhat, mint például az sOs hálózat, vagy lehet akár nagyon egyszerű is, egyetlen operonnal, például a HM-rezisztencia hálózatok. Egy bioriportert úgy terveznek meg, hogy a rendelkezésre álló molekuláris „építőelemek" egy részét (de nem feltétlenül az összeset) a gazdasejt funkcionális szabályozó körében állítják össze. **a: Egy metabolizálható szerves vegyületre reagáló bakteriális riporter terv**. Egy központi szabályozó fehérje érzékeli a vegyület jelenlétét és aktiválja a génexpressziót a bakteriális kromoszóma egy promóter melletti dedikált aktivátor helyéről (vagy kapcsolójáról). A kapcsolót és promótert tartalmazó DNS-szegmens megkettőzésével és egy promóter nélküli riportergénnel való fúzionálásával a riporter expressziója a szabályozó fehérje irányítása alá kerül. A riporter szintézis tehát akkor indul be, amikor a sejt találkozik a szabályozó fehérje által felismert effektor vegyülettel. **b: Ugyanaz a vegyület által aktivált szabályozókör, mint az a) részben, de egy heterológ gazdaszervezetben nem képes metabolizálni a kimutatott vegyületet**. A riporter szabályozási kör ezért le van kapcsolva minden olyan korlátozástól vagy további vezérlőmechanizmustól, amelyet a natív gazda gyakorolhat a kapcsolóra és a promóterre. **c: A toxicitásra vagy stresszre reagáló riporterek tervezési elve**. Egy stresszválasz-hálózatból kiválasztott, megkettőzött génpromóter, amelyről ismert, hogy a kívánt stresszviszonyok aktiválják, fúzionálódik a riportergénhez, és beágyazódik a sejt meglévő hálózatába. **d: Példa egy bonyolultabb tervezésre**, amelyben a célvegyületet (jelet)

egy receptor (vagy „vevő”) fehérje segítségével detektálják a periplazmában. A receptorhoz való kötődés intracelluláris foszforilációt vált ki, amely a kapcsolóhoz és a promóterhez jut, ami a riportergén expressziójához vezet. Ez a kialakítás szükségessé teheti a megfelelő vevő génmodulok tervezését a riporter körben. Az egyértelműség kedvéért nem minden kapcsoló, promóter és terminátor lett feltüntetve a tervezési vázlatokon (készült Van Der Meer & Belkin, 2010 alapján).

1.2.2. Toxicitási bioriporterek tervezése

A bakteriális bioriporterek különböző tervezési típusait írták le, többnyire a riporter sejt kívánt funkciója és célpontja alapján (1. ábra). A toxicitás monitorozása céljából egy bakteriális stresszválasz hálózatból kiválasztott promótert *in vitro* fúzionálnak egy promóter nélküli riportergénhez, és visszaültetik a gazdasejtbe. A további promóter-riporter fúzió ezért ideális esetben a megfelelő sejttoxicitási válaszhálózat szerves részeként fog viselkedni, és a riporter indukció a megcélzott válasz, ami reprezentatívnak tekinthető (1. c ábra). Az egyik széles körben használt stresszhálózat a rekombinációs és javító protein A (recA) – LexA által szabályozott sOs válasz, amely a kémiailag kiváltott DNS-károsodást reprezentálja (Fry és mtsai., 2005). Az *E. coli* és *S. enterica* subsp. *enterica serovar Typhimurium* str. L2 ismert sOs válaszhálózatai több tucat génfunkciót foglalnak magukban, amelyek közül néhánynak (például az *umuC*, *recN*, *sfiA*, *recA* és a colicin D gén (*cda*) expressziója sikeresen befolyásolta a toxicitást (Van Der Meer & Belkin, 2010). Más stresszhálózatokat is hasonló módon hasznosítottak, mint például a hősokk-válasz fehérjék szabályozási rendszerét (Choi & Gu, 2002; Van Dyk és mtsai., 1994) és antioxidáns hatású védelmi szabályozókat is használtak (például *oxyR* és *soxRS* promótereinek felhasználásával) az oxidatív stresszválaszt kiváltó vegyületek kimutatására (Belkin és mtsai., 1996). A toxicitási bioriporterek hasznos promóter-repertoárjának bővítésére genomszintű stratégiákat alkalmaztak. Új toxicitás indukálta promótereket izoláltak a *Photorhabdus luminescens luxCDABE* luciferáz riporterrel fúzionált véletlenszerű 1,8 kb méretű fragmensekből álló *E. coli* shotgun kromoszómakönyvtár szűrésével standard stresszorokra adott válasz esetében, amelyek mindegyike egy külön stresszhálózatot példáz (Belkin és mtsai., 1996).

1.2.3. Vegyület-specifikus bioriporterek tervezése

A második típusú bioriporterek többé-kevésbé az eredeti *P. fluorescens* naftalin bioriporter működési elvének (1. a és b ábra) kiterjesztésén alapulnak, amelyek egyes vegyületeket vagy vegyületosztályokat céloznak meg (Trögl és mtsai., 2012). Az ilyen bioriporterek komponenseit olyan baktériumokból izolálják, amelyek rezisztencia mechanizmussal rendelkeznek bizonyos vegyületekkel (például HM-ekkel vagy antibiotikumokkal) szemben, vagy olyan törzsekből, amelyek képesek metabolizálni a toxikus vegyületeket (például naftalin, toluol, fenol vagy a 2-hidroxi-bifenil biocid). Mind a rezisztencia-mechanizmusokban, mind a toxikus vegyület metabolizmusában a szabályozást gyakran egyetlen szenzor-szabályozó fehérje éri el, amely felelős a célvegyület intracelluláris észleléséért és az azt követő génexpresszió egy vagy néhány kulcspromóterről indított indukciójáért. A riporter hálózat ezért összeállítható a kulcspromóter DNS-szegmenseiből és a szenzor-szabályozó fehérje aktiválási helyéből, amely egy riportergénhez van fúzionálva, magát a szabályozó fehérjét kódoló gén egy extra másolatával vagy anélkül (1. b ábra).

1.2.4. A nehézfémek kimutatására szolgáló bioriporterek

A higany- és arzénérzékelő bioriporter törzsek voltak az elsők a HM-re reagáló rendszerek között, amelyeket kifejlesztettek (Selifonova és mtsai., 1993; Virta és mtsai., 1995). A higany bioriporter komponenseit az *E. coli* Tn21 transzpozonjának klasszikus *mer* operonjából (*merTPCADE*) nyerték ki, és a Merr szabályozó fehérje génjéből, valamint a *merRp*-t és a Hg^{2+}-indukált *merTp30*-at tartalmazó *merR-merT* intergenikus DNS-ből áll. Az endogén Merr–merTp rendszer rendkívüli érzékenységget mutat a Hg^{2+}-ra, és az egyik tanulmány már 1 fM-os kimutatási határt említ (Virta és mtsai., 1995).

Az arzén jelenlétének kimutatására szolgáló bioriporter törzsek a természetes bakteriális védekező rendszert használják ki az arzenit és arzenát ionok ellen (AsIII és AsV). A háttérben még tovább csökkentett és skálázható riportergén-expressziót sikerült elérni a lacZ-riporter előtti riboszómakötő hely módosításainak sorozatával. Ez több izogén *E. coli* riporter törzs kifejlesztéséhez vezetett, amelyek mindegyike különböző arzénkoncentráció-tartományban biztosít alkalmazható riportereket (Van Der Meer & Belkin, 2010).

A Ni-lel és Co-tal szembeni rezisztenciát akár egy és ugyanaz a génklaszter is kódolhatja, erre példa a *C. metallidurans cnrCBA* (Belkin és mtsai., 1996) és az *E. coli rcnA* (Koch és mtsai., 2007), amik Ni-re és Co-ra egyaránt indukálhatóak. Hasonló operon (*ncc*) található az *Alcaligenes xylosoxidans* 31A-ban, ahol az előbbi HM-ek mellett a klaszter a Cd-rezisztenciát is kódolja (Schmidt & Schlegel, 1994). E rendszerek expresszióját minden esetben a Ni és a Co szabályozza. Ezek a fémek azonban külön-külön is detoxifikálhatók. A Co-rezisztenciát a *czcCBA*-klaszter révén érik el, amely felelős a *C. metallidurans* CH34-ben a Zn-, Cd- és Co-kiáramlásért (Schmidt & Schlegel, 1994). A *Synechococcus* egy specifikus Co-transzportert is kódol, amelynek expresszióját a Co és a Zn indukálja. A *Synechococcus nrs* operonjának expresszióját viszont Ni és Co egyaránt indukálja, de ez csak a Ni-lel szembeni rezisztenciát biztosít (Huertas és mtsai., 2014). Az *Achromobacter xylosoxidans* 31A-ból származó *NreB* egy specifikus Ni-exporter, amelyet szintén kifejezetten a Ni indukál (G. Grass és mtsai., 2001). Az eddigi bioriporterek, amelyeket a Ni kimutatására készítettek, főként a *C. metallidurans cnr* (Tibazarwa és mtsai., 2001), valamint a *Synechococcus* és a *Synechocystis nrs* operonján (későbbiekben részletezve az 1.5. fejezetben) alapulnak (Peca és mtsai., 2008), vagy egyéb mikroorganizmusokat használtak Ni bioszenzorként (Cayron és mtsai., 2017; Mohseni és mtsai., 2018).

A Zn egy eszenciális fém, amelyet a sejtek aktívan importálnak a celluláris Zn-szükségleteik kielégítésére. Csak az *Escherichia coli* négy különböző mechanizmussal rendelkezik a Zn felvételére (Allen Easton és mtsai., 2006). A cink több mint 300 enzim kofaktoraként szolgál és szükséges a makromolekulák szerkezeti stabilitásának fenntartásához; túl magas koncentrációban való jelenléte azonban gátolja az aerob légzési láncot, és jelentős toxicitást okozhat.

A celluláris kizárási (extrudálási) mechanizmusok nem tesznek lényeges különbséget a Zn, a Cd és az ólom között. Sok esetben a Zn-rezisztenciát meghatározó tényezők genetikailag nem különböztethetők meg a Cd-mal és Pb-mal szembeni rezisztenciát okozó tényezőktől. Például a kétértékű fémkiáramlás P-típusú ATP-ázai, a ZntA (*E.coli*), a CadA (*Staphylococcus aureus* és *Pseudomonas putida*), egyaránt képesek a Pb, Cd és Zn exportjára (Patterson és mtsai., 2013). Talán nem meglepő, hogy az ezen fémion transzportereket kódoló gének kifejeződését számos fém hasonló módon szabályozza. A ZntR transzkripciós faktort, amely a *zntA* promóterre hat, a Hg, Cd, Pb és Zn is aktiválja; a *cadA P. putida* promóterből származó expressziót Zn, Cd, Pb, Co és Hg indukálja, a *cadA P. aeruginosa* promótert pedig Zn, Cd, Hg,

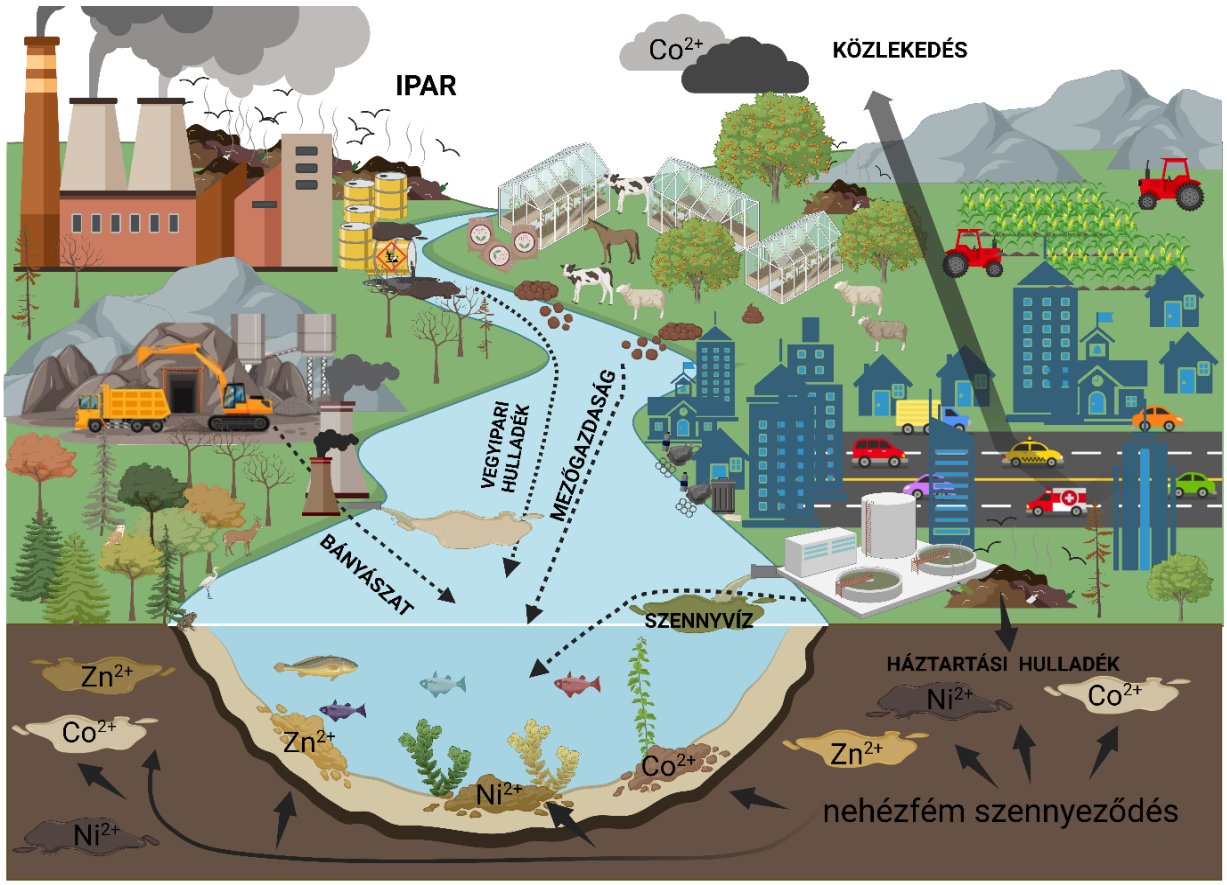
Ni, Co és Cu aktiválja (Brocklehurst, 2002; Lee és mtsai., 2001; Leedjärv és mtsai., 2008; Marie R.B. Binet, 2000). Az összes fent említett transzkripciós faktor a MerR családhoz tartozik. Hasonló a helyzet más típusú transzkripciós faktorok esetében is. A CadC, az ArsR család tagja, amely az *S. aureus* törzsben a CadA szintézisét szabályozza, derepresszálja a Cd, a bizmut (Bi), a Pb, a Co és a Zn hatására (Yoon & Silver, 1991). Így az aktivátorok köre valójában sokkal szélesebb, mint a transzporter által felismert hordozók köre. Az indukálhatóság e tulajdonsága korlátokat szab a bioriporter tervezésében; ennek megfelelően nehezen fejleszthetőek ki olyan bioriporterek, amelyek egyedileg specifikusak a Zn, Cd vagy Pb kimutatására. A ZntR és a *zntA* gén promóterének felhasználásával készült bioriporterek a legérzékenyebbek a Cd és a Pb jelenlétére, de a Zn és a Hg magasabb koncentrációja is indukálja őket (Ivask és mtsai., 2002).

A *Synechocystis* Zn szabályozásában fontos szerepet játszó *zia* géncsoportról, mely Zn kezelés hatására megnövekedett expressziót mutat (Blasi és mtsai., 2012; Peca és mtsai., 2007) a későbbiekben részletesen esik majd szó (lásd 1.5.3. alfejezet).

1.3. Nehézfém szennyezés és a cianobaktériumok

A nehézfémek (HM) a természetben előforduló, 20-nál nagyobb rendszámú fémelemek, melyeket nagy atomsűrűség (4 g/cm^3 – 5 g/cm^3) jellemez. Ezek akár nagyon alacsony koncentrációban is toxikusak lehetnek (Nagajyoti és mtsai., 2010). A talajban való felhalmozódásukat a pedoszféra degradációjának egyik fő okozójaként tartják számon. A természetben a HM-ek mélyen a földben vannak elrejtve, mint a földkéreg nem lebontható összetevői. Azonban a természeti erőforrások túlzott kiaknázása egyszerű utat adott ezeknek a HM-eknek, hogy feljussanak a Föld felszínére (2. ábra). Ezek vagy természetes módon jelen vannak a talajban (vulkáni tevékenységek, kőzetek mállása), vagy különféle antropogén tevékenységek, például bányászat, fémolvasztás, műtrágyák és ipari hulladékok túlzott használata stb. járulnak hozzá a szennyeződéshez (Shahzad és mtsai., 2018). Továbbá azt találták, hogy az antropogén eredetű HM–ek jelenléte a légkörben csaknem háromszor nagyobb, mint a természetes tényezőkből származók HM-eké (Sposito & Page, 1984). A HM-ek oldatban vagy szilárd formában kerülnek a talajba és a vízcseppekbe. Felhalmozódnak a tengerfenéken, vagy adszorbeálódnak a szilárd tárgyakon. A HM-ek a talajban is felhalmozódnak, mivel nem szerves szennyeződések, illetve nem oxidálják őket a mikroorganizmusok (Wuana & Okieimen, 2011).

A HM-ek ezenfelül a szerves szennyeződések lebomlását is akadályozzák a mikrobiális aktivitás gátlása révén (Maslin & Maier, 2000). A talajfauna HM-eknek való kitettsége megzavarja és ezáltal csökkenti a talaj termékenységét. A HM-ekről ismert, hogy csökkentik a szulfátredukáló baktériumok szaporodását azáltal, hogy denaturálják a fehérjéket és inaktiválják az enzimeket (Guo és mtsai., 2017). Az ilyen szennyezett helyeken növekvő növények a HM-eket felveszik az érintett talajvízből, és folyamatosan felhalmozzák őket. Ez a felhalmozott HM-tömeg a növényekben a tápláléklánc lineáris hálózata mentén megnövekszik, ami hatással lehet az emberi egészségre (Kobielska és mtsai., 2018). Biológiailag nem lebontható természetünknek és hosszabb biológiai felezési idejüknek köszönhetően a HM-ek toxikusabbak, mint a legtöbb más xenobiotikum (Ramachandra és mtsai., 2018). A tápláléklánccon keresztül növekvő HM-koncentrációk csökkentéséhez szükséges a talaj vizsgálata, a szennyeződés azonosítása és mértékének meghatározása, majd annak eltávolítása. Ebben fontos szerepet tölthetnek be a bakteriális HM bioszenzorok.



2. ábra: A Ni^{2+}, Co^{2+} és Zn^{2+} szennyezéshez hozzájáruló folyamatok és hatásaik egyszerű szemléltetése Az ábra saját koncepció, valamint A. Selvi és munkatársai alapján készült (Selvi és mtsai., 2019).

Az elmúlt évtizedekben fokozódott a HM-ek által okozott környezetszennyezés és az ennek következtében kialakuló egészségügyi veszély (Gummin és mtsai., 2020). A

feldolgozóipar által termelt szennyvizek különféle HM-eket tartalmaznak, például Ni^{2+} -t, Co^{2+}-ot, Zn^{2+}-et, Cu^{2+}-et és Cd^{2+}-ot. Ezek a vegyületek jelentősen hozzájárulnak a környezet mérgező HM-szennyezésének növekedéséhez. Az elmúlt években az ipari szennyezés mellett a közlekedésből származó utcai por is egyre nagyobb jelentőséggel bír, ami rendkívül magas egészségügyi kockázatot jelenthet a nagyvárosokban (Dytłow & Górka-Kostrubiec, 2021). Emellett összefüggést találtak a belélegzett Co^{2+} és a légúti tünetek, valamint a tüdő diszfunkciói között a svéd nehézfémiparban (Andersson és mtsai., 2020). Az átlagos, nagyobb egészségügyi kockázat nélkül belélegezhető Co^{2+} koncentráció 0,0017 mg/m^3 (körülbelül 0,013 nM) volt. Ennek ellenére egy tanulmányban kimutatták, hogy az autópálya menti levegőben a Co^{2+}-szintje 1,9-3,5 mg/kg (2,5-15 µM) között mozgott, mely jóval meghaladja a határértéket (Khan és mtsai., 2019). Folyókban és tavakban főként a Zn^{2+} és Ni^{2+} szennyeződés előfordulása jellemző. A korábbi években Európában a jelentett Ni^{2+} koncentráció az ivóvízben általában 10 µg L^{-1} (0,17 µM) alatt volt. A Zn^{2+} szintje a felszíni és a talajvízben általában nem haladta meg a 0,01 és 0,05 mg/L^{-1} értéket (0,05-0,25 µM) (WHO, 2017). Egy 2020-as indiai tanulmány szerint a Co^{2+} koncentrációja körülbelül 0,003 µM, a Ni^{2+} 0,22 µM a Zn^{2+} pedig 0,82 µM volt a vizsgált folyóterületen (Rampley és mtsai., 2020).

Az északi sarktól a déliig a cianobaktériumok egyaránt jelen vannak a vízi és a szárazföldi ökoszisztémákban. Különösen az oligotróf és édesvízi rendszerek fő alkotói lehetnek. A napenergia, a víz, a CO_2 és az ásványi sók felhasználásával az élelmiszerlánc számára nagy mennyiségű biomassza előállításához a cianobaktériumok jelentik az első biológiai határt a mérgező vegyületek táplálékhálóba való bejutása ellen. Mivel a cianobaktériumok különféle fémkationokat igényelnek sejtanyagcseréjük és növekedésük fenntartásához, képesek ezeket a HM-eket felvenni és hasznosítani egy bizonyos koncentráció alatt (Baptista & Vasconcelos, 2006; Cavet, Jennifer S.; Borrelly, 2003; Dietrich H. Nies, 2003).

Amellett, hogy nagy mennyiségű különféle fémre van szükségük az élethez, a cianobaktériumokat gyakran befolyásolják a fémkoncentrációk drasztikus változásai. Sokszor ki vannak téve HM-toxicitásnak, amelyek sajnos manapság gyakori környezeti jelenségek a vízi és szárazföldi ökoszisztémákban az előbb említett emberi tevékenységek okán. A HM ellen való védekezés érdekében az élőlényeknek érzékeny szabályozási rendszerre van szüksége, mely egyúttal biztosítja a sejtek számára szükséges mennyiségben történő fémion felvételt, ugyanakkor segíti a fémek okozta toxicitás elkerülését. A sejtek felhalmozással, allokációs

tárolással (exklúzió), vagy méregtelenítéssel szabályozhatják a számukra toxikus fémek felvételét, hogy fenntartsák homeosztázisukat.

A cianobaktériumok olyan bonyolult fémrezisztencia-mechanizmusokkal rendelkeznek, mint az enzimatikus és az ATPázok vagy kemiozmotikus efflux rendszerek általi aktív-transzport révén történő kizárás. Ezek a P-típusú ATPázok fémionokat szállítanak a citoszolból a periplazmába (Patterson, C. J., Pernil, R., Foster, A. W., & Robinson, 2016). A cianobaktériumok HM-szabályozó rendszereivel kapcsolatos ismereteink folyamatosan bővülnek, illetve új anyagcsereutakat fedeznek fel (Cassier-Chauvat & Chauvat, 2015). Ezen információk rendszerezése és összegyűjtése azonban nem könnyű, mivel a fémtűrés és annak következménye szinte minden fajban eltérő. A sejteknek minden sejtfunkcióhoz meg kell találniuk a megfelelő elemet, sőt akár különböző fémionok versenyezhetnek ugyanazon kötési helyért is (Pennella és mtsai., 2003).

1.4. A cianobaktériumok, mint nehézfém bioszenzorok

Körülbelül 30 év telt el az első, teljes sejtes élő bioszenzor sejtvonal elkészítése óta és az egyre gyorsabb ütemben haladó, új géntechnológiai eljárásokkal módosított mikroorganizmusok előállítása és környezeti tesztelése valósult meg az elmúlt évek során. Ahhoz, hogy egy ötlet vagy új technológia a teoretikus felvetéstől elérjen egészen a gyakorlati vagy ipari szintű alkalmazásig több évtized is szükséges a jelenlegi állapotok mellett. Úgy tűnik azonban, hogy az egész sejtes bioszenzorokat célzó kutatások megvalósulása és azok eredményei még többnyire az elvi bizonyítási vagy demonstrációs fázisában vannak és közel sem kiterjedtek az ipari, természetvédelmi használatra, vagy legalábbis az akadémiai kutatáson kívüli kereskedelmi felhasználásra. Ennek a jelenségnek az oka számos forrásból származik, mint például a reális célok kitűzésének hiánya, érzékenységbeli lemaradások a jelenleg alkalmazott kémiai módszerekhez képest, valamint a jogi szabályozások.

A mérgező vegyi anyagokat észlelő bioriporter baktériumok megalkotása a szintetikus biológia egyik legkorábbi sikerének tekinthető. Az ilyen baktériumokban a genetikai szabályozási kör racionális tervezése olyan celluláris szenzoros és szabályozó komponensekből készül, amelyek képesek a sejt kémiai kimutatását számszerűsíthető riporterfehérje jellé alakítani.

A bakteriális bioérzékelés és a riporter géntechnológia számos egyedi vonatkozását intenzíven áttekintették a múltban, kiemelve a bakteriális riportervizsgálatok számos sikeres elvi bizonyítékát, bizonyítva a terület egészének érettségét. A laboratóriumi eredmények azonban nem párosultak a bioriporterek kereskedelmi felhasználásának azonos mértékű növekedésével. Például, mind a laboratóriumi, mind a terepi vizsgálatok kimutatták, hogy a bakteriális bioriporter tesztekben az arzén kimutatási határértéke közel 5 nM (0,4 μg L^{-1}) (Baumann & van der Meer, 2007), ami jóval alacsonyabb, mint a 10 μg/L^{-1} ivóvízben meghatározott standard, így ezek a riporterek alkalmasak akár a határérték alatti elemzésre is. Mindeközben, több fejlődő ország ivóvízforrásai arzén szennyezésnek vannak kitéve (Trang és mtsai., 2005). Azonban nincs nagyszabású kereskedelmi tevékenység arzén bioriporter tesztek forgalmazására, ugyanis a HM tesztek piacát e helyett továbbra is a kémiai tesztkészletek uralják.

Különböző fémérzékelő bakteriális rendszereket teljes sejtes bioriporterek előállítására már többször felhasználtak (Hynninen & Virta, 2010). Az egész sejtes bioriporterek kiegészítik a HM-ek kimutatásának hagyományos módszereit, amelyek rendkívül érzékeny és specifikus fizikai és kémiai technikákon alapulnak, mint például az atomabszorpciós spektroszkópia vagy a tömegspektrometria; az ilyen módszerek azonban nem képesek különbséget tenni a környezeti mintában jelen lévő HM mennyiségnek a biológiai rendszerekre potenciálisan veszélyes, hozzáférhető, valamint az ezek számára nem hozzáférhető része között. A kémiai módszerekkel ellentétben a teljes sejtes bioriporterek a biológiailag hozzáférhető fémeket mutatják ki, amelyek képesek átjutni a sejtmembránon, kölcsönhatásba lépni a sejtalkotókkal. Mindemellett képesek integrálni a biológiai hozzáférhetőséghez hozzájáruló környezeti tényezők (pH, redoxpotenciál, kationok közötti kicserélődés, biológiai aktivitás stb.) komplexitását is (Köhler és mtsai., 2000).

Az első lumineszcens cianobakteriális bioriporter a *Synechococcus sp*. PCC 7942 törzsben készült el (Erbe és mtsai., 1996). Ez a bioriporter azonban korlátozott mennyiségű endogén aldehidet (a bioluminescencia-reakció luciferáz-szubsztrátját) mutatott ki, és n-dekanál exogén hozzáadására volt szüksége; valamint csak három fémmel, Zn-kel, Cu-zel és Cd-mal tesztelték, és kimutatták, hogy ezekre változó érzékenységgel reagált. Azóta több tanulmány is foglalkozott a cianobaktériumok különböző HM bioriporterekként való alkalmazásával, de a szenzitivitás növelésében számottevő előrelépést nem tudtak elérni (S.-Y. Kim és mtsai., 2008; Martín-Betancor és mtsai., 2015; Peca és mtsai., 2008). Csoportunkhoz

köthető több teljes sejtes lumineszcens HM riporter törzs létrehozása a *Synechocystis* PCC 6803 cianobaktériumban, melyek Ni^{2+}, Zn^{2+} és Co^{2+} érzékenységgel bírtak, emellett képesek voltunk érzékenységükön javítani egy egyszerű molekuláris biológiai módszer alkalmazásával (Peca és mtsai., 2008, illetve jelen tanulmány).

1.5. A nikkel, kobalt és cink rezisztenciához kapcsolódó gén klaszter a *Synechocystis*-ben

A *Synechocystis* cianobaktérium genomban egy darab fémek által szabályozott géncsoport található meg, amely részt vesz a cink, kobalt és nikkel fémekkel szembeni rezisztenciájának kialakításában (García-Domínguez és mtsai., 2000). Ez a klaszter egy 12 kb hosszú régió, és 11 nyílt leolvasási keretet (ORF) tartalmaz, amelyek 6 feltételezett transzkripciós egységből állnak. A *coaT* és a *coaR* a Co^{2+} toleranciához köthető. Az *nrsBACD* operon részt vesz a Ni^{2+} és Co^{2+} homeosztázisban, és az *nrsRS* operon régiója szabályozza. A *ziaA* és a *ziaR* pedig a Zn^{2+} toleranciában vesz részt (Peca és mtsai., 2007).

1.5.1. A nehézfém klaszter kobalt-szabályozásban részt vevő génjei

A *coaT* egy feltehetőleg Co^{2+} -ot exportáló P-típusú ATPázt kódol, amelyet a *coaR* termék szabályoz. A Co^{2+} által indukált CoaR aktivátor szabályozza a *coaT*-t, amely kódolja a P-típusú ATPáz homológ kation szállító CoaT fehérjeterméket (Patterson, C. J., Pernil, R., Foster, A. W., & Robinson, 2016). A CoaR fehérje strukturális modellezése feltárta, hogy a rekombináns CoaR hidrofób karboxil terminális régiói membrán kötöttek. A már ismert kobalt érzékeléséhez szükséges MerR-szerű DNS-kötő doménje mellett a CoaR-nek van egy második doménje is, amely homológ egy olyan izomerázzal, amely részt vesz a kobalamin szintézisében (Rutherford és mtsai., 1999a).

A kobalamin-bioszintézis egy membránhoz kapcsolódó, számos organizmusban, köztük a *Synechocystis*-ben is megtalálható útvonal. Ugyanakkor, még mindig nem ismert, hogy a membrán lokalizált CoaR ennek a szintézis-útnak a szereplője-e vagy sem (Patterson, C. J., Pernil, R., Foster, A. W., & Robinson, 2016).

A coaT és a coaR együttesen egy feltételezett kobalt-efflux rendszert hoz létre, ez a két egység eltérő módon szabályozódik. A rendszer specifikus Co^{2+} és Zn^{2+} indukciót mutatott,

lényegesen magasabb Co^{2+} válasz mellett. A ^{57}Co citoplazmában való felhalmozódása során a hibás CoaT-vel rendelkező *Synechocystis* mutáns csökkent Co^{2+} -tal szembeni ellenállást mutatott, ugyanakkora cinkkel szemben mutatott ellenálló képessége nem változott (García-Domínguez és mtsai., 2000; Rutherford és mtsai., 1999b). Illetve a *Synechocystis* ΔziaΔcoa kettős mutánsok hasonló érzékenységet mutattak a Zn^{2+} iránt, mint a Δzia mutánsok, ami arra utal, hogy a CoaT egyáltalán nem járul hozzá a Zn^{2+}-transzporthoz (Borrelly és mtsai., 2004).

1.5.2. Az nehézfém klaszter nikkel-szabályozásban részt vevő génjei

Ni^{2+} jelenlétében a *Synechocystis*-ben lévő *nrs* gének magas génexpressziós szinten megnyilvánuló indukciót mutatnak (López-Maury és mtsai., 2002). Funkciójuk nem teljesen tisztázott, egyébként az *nrsA* és az *nrsB* feltételezhetően egy Ni^{2+} efflux rendszert alkot, a *czcABC* géntermékekkel való homológiájuk alapján. A *czcA* és a *czcB* egy kation-efflux rendszert kódol, amely rezisztenciát biztosít a Co^{2+}, Zn^{2+} és Cd^{2+} ellen *Ralstonia eutropha*ban (D. H. Nies és mtsai., 1989). Deléciós *nrsA* és *nrsD* mutánsokban megfelelően csökkent Ni^{2+} toleranciát figyeltek meg. Későbbi tanulmányok szerint az *NrsA* és az *NrsB* egy membránhoz kötött fehérje-komplexumot képezhet, amely proton / kation antiport révén katalizálja a Ni^{2+} kiáramlást a sejtből (Maitra, 2016).

Az *NrsC* nem homológ a *czc* által kódolt fehérjékkel és szerepe ismeretlen a Ni^{2+} transzportban (Maitra, 2016). Az nrs nikkel-efflux operon utolsó génje az *NrsD*, mely egy membránfehérjét kódol, és a Ni^{2+}-exportban részt vevő permeázok fő szupercsaládjának tagja. Az NrsD magas homológiát mutat az *Achromobacter xylosoxidans* NreB-jével (Gregor Grass és mtsai., 2001).

Az *nrsD* gén olyan fehérjét kódol, amely egy két komponenses rendszerszabályozás alapján a nikkel kiáramlását segíti elő. Az NrsD szabályozza azt, hogy a plazmamembránon keresztül egyirányú kiáramlás folyjon, a független citoszolos nikkel-érzékelő szabályozási rendszerrel párhuzamosan. Ezenkívül az *InrS* gén elnyomja az *nrsD*-t. InrS hiányos mutánsok konstitutív nrsD expressziót mutatnak, ami a sejtenkénti összes nikkel atom számának csökkenését és a pigmenttartalom enyhe változását eredményezi. (Patterson, C. J., Pernil, R., Foster, A. W., & Robinson, 2016).

Az *nrsR* és *nrsS* ORF-jei alkotják a korábban említett kétkomponensű rendszert, amely szabályozza az *nrsBACD* operon nikkel függő expresszióját. Az *nrsRS* génszakasz elrontása csökkent Ni^{2+} toleranciát okozott és megszűnt az *nrsBACD* operon Ni^{2+} függő indukciója (Giner-Lamia és mtsai., 2014; López-Maury és mtsai., 2002).

1.5.3. A nehézfém klaszter cink-szabályozásban részt vevő génjei és kapcsolataik

A Zn^{2+} toleranciában kiemelten fontos a zia gén csoport két ORF-et tartalmaz, a *ziaA*-t, amely a ZiaA Zn^{2+} transzportert kódolja, és a ziaR-t, amely egy ZiaA-t szabályozó fehérjét kódol. Ez a két gén eltérően íródik át a központi promóterről (Nucifora és mtsai., 1989).

Ezen túlmenően a *Synechocystis*-ben a *ziaA* génről kiderült, hogy a Zn kezelés hatására aktiválódik, és a P1 típusú ATPázok fémtranszportáló fehérjéihez hasonlóan működik. Az SmtA és ZiaA szabályozói (SmtB és ZiaR) aminosav szekvenciájukban nagyon hasonlóak. A ZiaA egy fémiont transzportáló P1 típusú ATPáz, ami fehérje-szekvencia hasonlóságot mutat a korábban említett *Staphylococcus aureus* CadA fehérjéjével is, mely a cink toleranciáért és a cink felhalmozódásának csökkentéséért felelős (Nucifora és mtsai., 1989), és rendelkezik egy oldékony HM-kötő doménnel ($ZiaA_N$) az amino terminálison (HMBD) (Patterson, C. J., Pernil, R., Foster, A. W., & Robinson, 2016). Általában a ZiaA a *Synechocystis* sejtekben szabályozza a cink transzportját a sejtekben és közvetíti a citoszolos Zn^{2+} kiáramlást a periplazmatikus térbe.

A ZiaR egy transzkripciós represszor (Thelwell és mtsai., 1998) és az ArsR-SmtB fémfüggő represszorokhoz tartozik, melyről már korábban szó esett (Shi és mtsai., 1994). Az Atx1 egy réz chaperon a *Synechocystis*-ben, és nem képez két hibrid kölcsönhatást a ZiaA amino terminálisával, bár két hibrid interakciót alakít ki más P1 típusú réztranszportáló ATPázokkal, mint például a PacS és a CtaA (Thelwell és mtsai., 1998).

1.5.4. A nehézfém klaszter felhasználása HM bioszenzor törzsek előállításához

Mióta a *Synechocystis* HM által szabályozott klaszterét azonosították a 11 ORF és 6 feltételezett transzkripciós egységgel, már voltak akik ezeket a speciális HM-ekre reagáló géneket riportergénként használták az egész sejtes HM bioriporterek előállítása során. Csoportunkban már több, teljes sejtes bioszenzort készítettünk a *Synechocystis*-ben úgy, hogy

a *coaT* és *nrsBACD* promótereket inszertáltuk a luxAB riporter gének elé. Ezek az nrsLux és a coaLux bioszenzorok reagáltak a megfelelő fémionokra. 3 órás inkubálás után a coaLux riporter esetében a kimutatási tartomány 0,3-6 μM Co^{2+} és 1-3 μM Zn^{2+} volt, az nrsLux törzs pedig 0,2-6 μM Ni^{2+}-koncentráció tartományban volt specifikus (Peca és mtsai., 2008). Ezek genetikailag módosított élő baktériumok, amelyek a fémionok által működtetett szabályozó körök molekuláris fúzióit fejezik ki könnyen detektálható fehérjéket kódoló riporter génekkel. Így képesek lehetnek kimutatni a környezetben lévő fémionokat, ami alternatívát jelent a hagyományos analitikai kémiai módszerekkel szemben.

Legnagyobb előnyük az a képesség, hogy kimutatják az adott HM biológiailag elérhető frakcióit (nem pedig a teljes koncentrációt), lehetővé téve a szennyezett helyek pontosabb értékelését. A méregtelenítésben szerepet játszó anyagcsere útvonalak kialakítása és több gén HM-től függő indukciójának vizsgálata (Blasi és mtsai., 2012) potenciális alkalmazási lehetőséget kínál a HM-ekkel szennyezett környezeti talaj vagy vízminták vizsgálatára és kimutatására, amelynek fontosságát korábban már részleteztem.

Az elmúlt pár évtizedben számos más kutatás is megcélozta a HM-ek bioszenzorokkal történő kimutatását (1. táblázat). Ugyanakkor ez az ígéretes téma számos kihívást rejt magában. Rendkívül nehéz olyan géneket találni, melyek specifikusan és rendkívül jó érzékenységgel képesek kimutatni az adott HM szennyeződést. Ezért is nagyon fontos a már felfedezett és jól ismert szereppel bíró géneken alapuló bioszenzorok érzékenységének javítása, annak érdekében, hogy az alacsony, ám az egészségre mégis káros HM koncentrációk környezetbarát módon és olcsón kimutathatóak legyenek. Összehasonlításként összegyűjtöttük az 1. táblázatban az elmúlt évek során kifejlesztett egész sejtes bioszenzor törzseket, melyek a Ni^{2+}, Co^{2+} és Zn^{2+} kimutatására alkalmasak voltak valamilyen módon. Az úgynevezett legkisebb detekciós limitjük alapján (LLD) jól látható, hogy egyes kivételekkel a szenzorok érzékenysége még fejlesztésre szorul annak érdekében, hogy képesek legyenek kimutatni a globálisan megfigyelhető átlagszennyeződési mértéket az említett HM-ek esetében. Egyes tanulmányok szerint a következő átlagos koncentrációkban figyelhetőek meg az említett nehézfémek globálisan: Ni^{2+}:10 $\mu g/L^{-1}$ (0,17 μM), Co^{2+}:1,9-3,5 mg/L^{-1} (2,5-15 μM) és Zn^{2}: 0,01 - 0,05 mg/L^{-1} (0,05-0,25 μM) (Kumar és mtsai., 2019; WHO, 2017).

1. táblázat: Genetikailag módosított Ni^{2+}, Co^{2+} és Zn^{2+} bioszenzor törzsek az elmúlt évtizedekből és a legkisebb detekciós határuk (lowest limit of detection - LLD). Illetve a jelen PhD értekezés tárgyát képző riporter törzsek értékei.

Mikroorganizmus	HM	LLD	Műszer	Hivatkozás
Ralstonia eutropha	Ni^{2+} Co^{2+}	0.1 µM 9 µM	Luminométer	(Tibazarwa és mtsai., 2001)
B. sphaericus	Ni^{2+}	0.002 ppb (0.03 nM)	Potentiométer	(Verma & Singh, 2006)
E. coli	Ni^{2+}	4.7 µg L^{-1} (80 nM)	Luminométer	(Cayron és mtsai., 2017)
Microbacterium sp. MRS-1	Co^{2+}	200 mg L^{-1} (1.5 mM)	Microplate reader	(Sundararaju és mtsai., 2020)
P. putida	Zn^{2+}	5 µM	Fluoriméter	(Liu és mtsai., 2012)
E. coli	Zn^{2+}	0.2 mM	Fluoriméter	(Ravikumar és mtsai., 2012)
Vibrio sp. MM1	Ni^{2+} Co^{2+} Zn^{2+}	6.16 mg L^{-1} (47.44 µM) 3 mg L^{-1} (27.93 µM) 0.97 mg L^{-1} (6 µM)	Luminométer	(Mohseni és mtsai., 2018)
Chlorella vulgaris	Ni^{2+} Co^{2+} Zn^{2+}	1 ppb (7.7 nM) 1 ppb (7.7 nM) 10 ppb (0.61 µM)	Konduktométer	(Berezhetskyy és mtsai., 2007)
***Synechocystis* PCC6803**	Ni^{2+} Co^{2+} Zn^{2+}	0.2 µM 0.3 µM 1 µM	Luminométer	(Peca és mtsai., 2008)

Jelen tanulmányban tárgyalt nehézfém bioriporter konstrukció

Mikroorganizmus	HM	LLD	Műszer	Hivatkozás
***Synechocystis* PCC6803**	Ni^{2+} Co^{2+} Zn^{2+}	0.05 µM 0.2 µM 0.03 µM	Luminométer	(Patyi és mtsai., 2021)

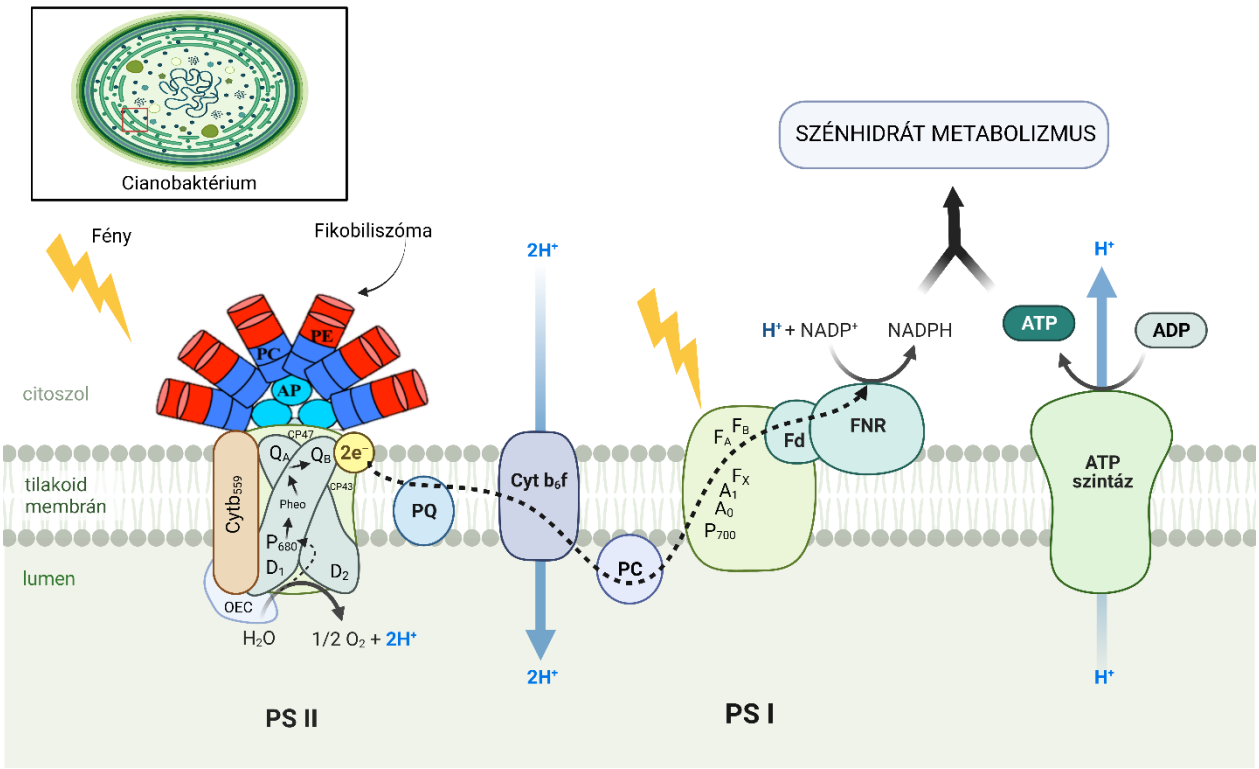
1.6. Fénystressz

1.6.1. A fotoszintetikus apparátus főbb elemei és azok működésének alapja

A fotoszintézis első szakaszában az antenna komplexek által elnyelt fotonok energiája által a $NADP^+$ két elektront és egy H^+-t vesz fel, ennek eredményként egy a $NADP^+$-hoz képest egyszeresen redukált és protonált NADPH keletkezik. Emellett ATP keletkezik az ADP-ből, miközben a vízbontásból származó O_2 melléktermékként felszabadul. Ez a fő folyamat jellemzi a fotoszintézis első (fényfüggő) szakaszát, mely során a fotoszintézis sötét (fénytől független) szakaszához szükséges energia (ATP) és a redukált koenzimek (NADPH) létrejönnek, melyek végül a CO_2 megkötéséhez, majd glükóz szintéziséhez használódnak fel.

Az oxigéntermelő fotoszintézis fényfüggő szakaszát négy nagy enzimkomplex katalizálja a fotoszintetizáló sejtek tilakoid membránjában (TM). A TM speciális zsírsavakat tartalmazó foszfolipid kettős rétegből épül fel, melyet transzmembrán vagy membrán-asszociált speciális fehérjék és pigment-protein komplexek alkotnak. A növényi kloroplasztiszban található TM egyedülálló struktúrával bír, úgynevezett grána és sztróma szerkezeti régiókból tevődik össze, míg az őseiknek tekinthető cianobaktériumokban egy hasonlóan rétegelt, zárt membránrendszer található.

A tilakoid membránban található négy nagy enzimkomplex a következő: a kettes fotokémiai rendszer (PS II, víz:plasztokinon-oxidoreduktáz); citokróm$_{b6f}$ (plasztokinol:plasztocianin-oxidoreduktáz, ferredoxin:plasztocianin-oxidoreduktáz) az egyes fotokémiai rendszer (PSI; plasztocianin:ferredoxin-oxidoreduktáz) és az ATP szintáz (3. ábra). Szerepük a fotoszintetikus folyamat alap mechanizmusát alkotó elektrontranszportlánc (ETC) lépéseinek katalizálása.



3. ábra: A fotoszintetikus apparátus fő elemei és működésük alapelvei (Campbell és mtsai., 1998 alapján).

A fotoszintézis első lépése a fény begyűjtése. A foton begyűjtéséhez a fotoszintetizáló élőlények különböző antennarendszereket fejlesztettek ki evolúciójuk során, melyet erősen befolyásolt az élőhelyükön rendelkezésre álló fény hullámhossza. Így alakulhatott ki az az állapot, hogy rendkívül sokféle struktúra jött létre a fajok fénygyűjtő komplexeinek fejlődése során. A cianobaktériumokban a fénybegyűjtést a fikobiliszóma pigment-protein komplexek látják el, melyek pigmentösszetételben és struktúrában is jelentősen eltérnek a magasabb rendű növények és moszatok antenna komplexeitől (LHCI és LHCII) (Green, 2019). A fikobiliszómák nagy hatékonysággal képesek a fénybegyűjtésre, illetve mindkét reakciócentrumot (RC) képesek kiszolgálni. Ezek a nagy pigment protein komplexek az LHCII-től eltérően nem a klorofill-a-t és klorofill-b-t használják fénybegyűjtő pigmentnek, hanem fikobiliproteinekből állnak, melyek olyan kovalensen kötött fikobilin pigmenteket, mint a fikoeritrin (PE), fikocianin (PC) és allofikocianin (AP) tartalmaznak (Alam, 2019) (3. ábra).

A foton az antennarendszereken át történő begyűjtését és továbbítását követően, mint gerjesztési energia adódik tovább a PSII-nek. Itt az energiát a RC D_1 fehérje alaegységeihez kötött speciális klorofill (Chl) molekula dimer, a P_{680} nyeli el. A PSII RC-jában megtörténik az

elsődleges töltésszétválasztás, vagyis az elnyelt foton energiája által gerjesztett P_{680} átad egy elektront a feofitin molekulának (Phe). Ezt követően az elektron átkerül a stabil, elsődleges kinon elektron akceptorra (Q_A) , majd pedig a kötőhelyéről leválni képes másodlagos kinon elektron akceptorra (Q_B). Az elsődleges töltésszétválasztásnak köszönhetően az oxidált P_{680}^+, egy erős oxidáló hatással rendelkezik, ami által képes lesz a vízmolekula bontására és elektront elvonni tőle. A víz bontása a PSII lumen felőli részénél elhelyezkedő vízbontó komplexben (OEC-ben) zajlik, illetve a PSII D_1 fehérjéjének TyrZ redox aktív aminosava közvetíti. Az OEC fény által szabályozott oxidációs állapotokon esik át, melynek során elektronok és protonok szabadulnak fel a vízből (Eberhard és mtsai., 2008; Nelson, 2011; Vass, 2011).

A töltésszétválasztást a Phe-ről a Q_A-ra továbbkerülő elektron, illetve a P_{680}^+ OEC felőli redukciója stabilizálja. A Q_B redukált állapotba való kerüléséhez két töltésszétválasztási lépés szükséges, ezt követően a kétszeresen redukált Q_B^{2-} protonokat kezd el felvenni a sztróma felől, létrehozva egy protonált kinont. Ezt követően a kétszeresen protonált Q_B leválik kötőhelyéről és helyét egy szabadon mozgó plasztokinonnak (PQ) adja át. A membránban szabadon mozgó redukált PQH_2 a citokróm$_{b6f}$ fehérje komplexnek adja át az elektronjait, amin keresztül az elektronok eljutnak a TM lumen felőli részéhez kapcsolódó mobilis plasztocianinhoz (PC) (Höhner és mtsai., 2020).

A PSII töltésszétválasztásával párhuzamosan megtörténik a PSI Chl molekula dimerjének a P_{700} –nak a foton általi gerjesztése is, majd a P_{700}^+ az elvesztett elektronját a PC-ról pótolja. A PSII-höz hasonlóan a PSI-ben is csak akkor lesz stabil a töltésszétválasztás, ha a P_{700}^+ által leadott elektron gyorsan továbblép a PSI reakcióközpontjában az elektron akceptor láncon. Az elsődleges elektron akceptor egy Chl-a monomer (A_0), majd az elektron az A_1-es fillokinon molekulára kerül át. Az A_1 fillokinon molekulától az elektront az FeS_X elsődleges ferredoxin-akceptor veszi át, majd innen az FeS_A és FeS_B központokon halad át, mígnem a ferredoxinra kerül (Fd), mely hidrofil molekulaként szállíthatja az elektront a sztrómában. A Fd végül a ferredoxin:$NADP^+$-oxidoreduktáznak (FNR) adja az elektront, mely segítségével az elektron a fényfüggő szakasz végső akceptorára kerül a $NADP^+$-ra és redukálja, így NADPH-vá alakul (Teodor & Bruce, 2020).

Ugyanakkor az ETC reakcióval párhuzamosan a lumenben protonok (H^+) halmozódnak fel, a vízbontás és a protonált PQ sztrómából történő H^+ transzportjának okán. A felhalmozódott magas H^+ koncentráció miatt a lumen és a sztróma között egy pH grádiens jön létre, ez a

kemiozmotikus erő hajtja az ATP szintáz fehérje komplexet, mely az ADP ATP-vé történő foszforilációját katalizálja (Rich, 2008) (3. ábra).

1.6.2. Fotoinhibíció

A fotoszintézisre közvetve vagy közvetlenül minden stresszor hatással van. Ezek egyaránt lehetnek hosszú vagy rövidtávú változásokat kiváltó stresszfaktorok. Ugyanakkor a legjelentősebb stresszfaktor, mely a fotoszintézis folyamatait számottevően befolyásolja az maga a fény (Barber & Andersson, 1992). A napfény a legmeghatározóbb energiaforrás a Földön. Mivel a beérkező fényenergiának csak kis része hasznosul fotoszintézis során, az esetlegesen megnövekedett fénymennyiség stresszorként hat a fotoszintetizáló élőlényekre.

Az élőlények az evolúció során képesek voltak akklimatizációval és adaptációval alkalmazkodni a fény különböző spektrális változásaihoz, azonban még ennek ellenére is előfordul, hogy a fotoszintézis során több foton abszorbeálódik, mint amennyinek kellene, mely a fénystressz jelenségét váltja ki. A magas fényintenzitásnak (HL) kitett élőlények többféle mechanizmust fejlesztettek ki, hogy elvezessék a feleslegesen elnyelt fotonokat. Ilyen reakciók például a fotorespiráció, nitrit és szulfát asszimiláció, oxigén redukciós utak (Mehler-reakció; klororespiráció) vagy a ciklikus elektron transzport utak és természetesen a nem-fotoszintetikus kioltás (NPQ) folyamata (Demmig-Adams & Adams, 1992). Ha ezek az útvonalak sem érik el a kívánt hatást, akkor beszélhetünk fénygátlásról vagy fotoinhibícióról.

Az oxigén alapú fotoszintézis fotoinhibíciója általános jelenség, amely a fény nagy energiájú szubsztrátként való felhasználásának elkerülhetetlen következményeként jelentkezik, és a fény, mint stresszfaktor káros következménye. A fotoinhibíció során, a többlet fényenergia toxikus anyagok, többek között a reaktív oxigén formák (ROS), képződésére fordítódik, ami károsítja a fotokémiai rendszereket. Az ekkor keletkező különböző káros ROS kivédésére számos védelmi vonal épült ki. Ilyen ROS kioltó mechanizmus például az antioxidáns rendszert alkotó enzimek és molekulák (SOD, APX, GSH) aktivációja, a Mehler-reakció, Halliwell-Asada ciklus és a D_1 RC fehérje *de novo* szintézise. Kis fényintenzitáson ezek a folyamatok még képesek lépést tartani a ROS produkcióval, ugyanakkor a stressz előrehaladtával elkerülhetetlen a fénystressz megvalósulása és a fotodinámiás reakciók lezajlása.

A fotodinámiás reakciók során a molekuláris oxigénből keletkeznek reaktív oxigén formák. Fotodinámiás reakcióból I.-es és II.-es típusú reakciót különítünk el.

Az I.-es típusú fotodinámiás reakció során közvetlen elektron átadás történik az O_2-re és $O_2^{\bullet-}$ keletkezik. Ez a jelenség a magasabb rendű növények kloroplasztiszában és a mitokondriumában is lejátszódó folyamat. A folyamat során a kloroplasztisz víz-víz ciklusa során a vízbontásból származó elektron visszajut a víz molekulára. A képződő $O_2^{\cdot-}$a SOD - APX útvonalon redukálódik vissza vízzé (B Halliwell & Gutteridge, 1999).

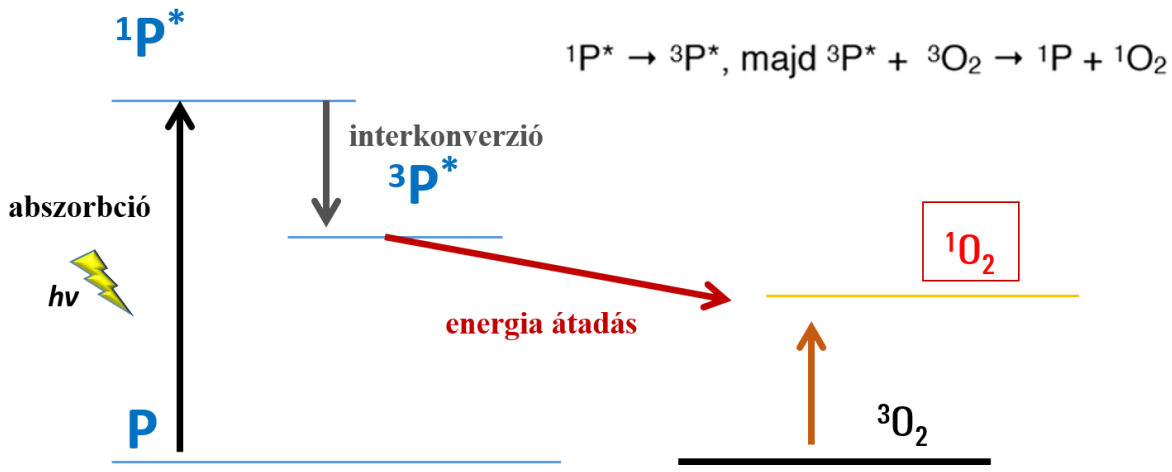
A II. típusú fotodinámiás reakció eredményeként $^1O_2$ jön létre, mely egy igen erős ROS.

1.7. A szinglet oxigén

A $^1O_2$, a molekuláris oxigén legalacsonyabb gerjesztésű elektronállapota, már körülbelül 80 éve ismert a tudományos közösség előtt. Jellegzetes kémiája megkülönbözteti a molekuláris oxigén triplett alapállapotától és fontos kutatási téma a légköri kémiától és anyagtudománytól a biológiáig és az orvostudományig. Egy ilyen „érett állampolgára" a tudománynak, mint a $^1O_2$ mindazonáltal a modern tudomány élvonalában maradt.

A $^1O_2$ egy rendkívül fontos, nagy oxidatív kapacitással rendelkező, így igen nagy károsító hatással bíró ROS. Könnyen oxidálja a különböző molekulákat, ezért citotoxikus. Képződése elkerülhetetlen a fotoszintetikus folyamatok során. Keletkezése az úgynevezett II-es típusú fényfüggő fotodinámiás reakcióhoz köthető. Ennek a folyamatnak a részeként az abszorbeálódott foton képes gerjeszteni egy olyan szinglet állapotú pigmentet, mint például a Chl, és egy interkonverziót követően triplett állapotú Chl-á alakítja. A Chl, mint fő fényelnyelő pigment a fénygyűjtő komplexben, a belső antennákban és a RC-okban is nagyon hatékonyan nyeli el a fényt, és további előnye, hogy a gerjesztett állapotok elég hosszú élettartamúak (akár néhány nanoszekundum), melynek célja, hogy lehetővé tegye a gerjesztési energia elektrokémiai potenciállá történő átalakítását töltésleválasztással. Ha a pigmentek nem képesek az energia hatékony felhasználására, a gerjesztett állapotban lévő elektronok spinjei áttolódhatnak és alacsonyabb energiájú gerjesztett állapotot eredményezhetnek, így előidézve a Chl triplett állapotot. A Chl triplett állapota még hosszabb élettartamú, néhány mikroszekundum O_2-nel telített körülmények között. Ez a Chl triplett a szintén triplett alapállapotú molekuláris oxigénnel kölcsönhatva energiatranszfer során szinglet állapotba kerül és $^1O_2$-t generál, ha nincsenek jelen kioltók (Foote & Clennan, 1995) (4. ábra).

Ez a folyamat tekinthető a leggyakoribb szinglet oxigénforrásnak a biológiai rendszerekben (Davies, 2004), különösen a fotoszintetikus szervezetekben (Krieger-Liszkay, 2005; Krieger-Liszkay és mtsai., 2008; Pospisil, 2009; Vass és Cser, 2009; Ziegelhoffer és Donohue, 2009). A fotoszintetikusan aktív mikroorganizmusok Chl-okat, illetve bakterioklorofillokat (BChl) tartalmaznak a fotoszintetikus apparátusukban, melyek nagyon erős fotoszenzitizátorok (Borland és mtsai, 1987; Cogdell és mtsai, 2000; Okazaki és mtsai, 2010;).



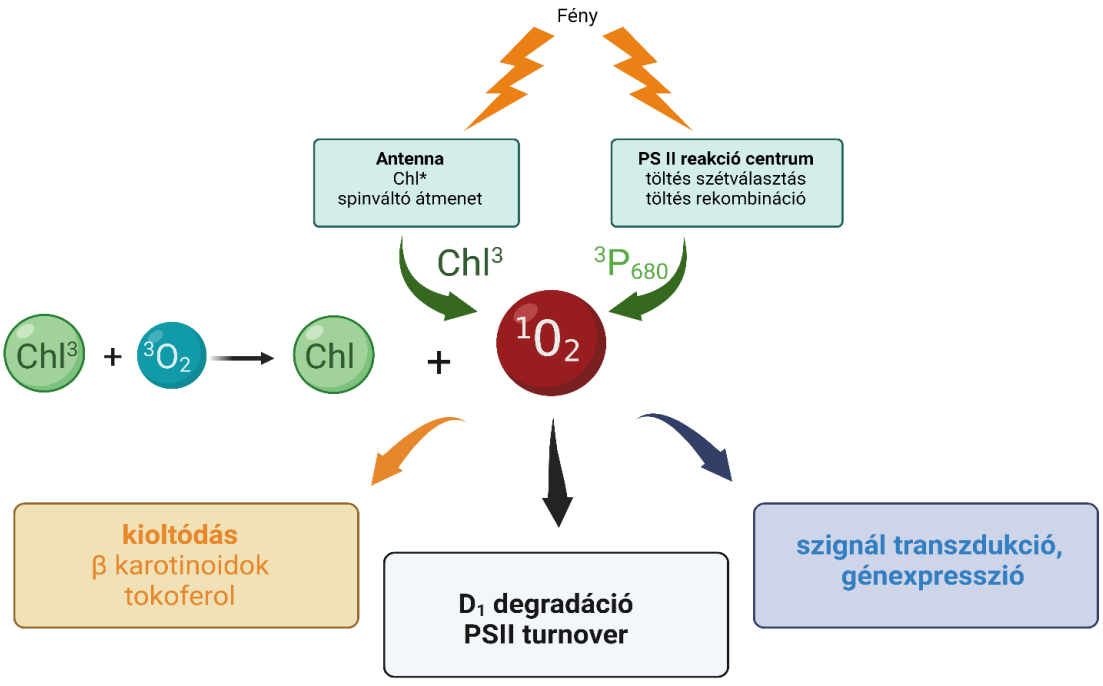
4. ábra: A kettes típusú fotodinámiás reakciót bemutató sematikus rajz, mely során a pigment (P) által elnyelt fotonnak köszönhetően, a gerjeszett pigment elreagál a molekuláris oxigénnel ($^3O_2$), melynek végén szinglet oxigén ($^1O_2$) keletkezik.

A cianobaktériumokban (oxigéntermelő fototrófokban) a fénygerjesztett Chl-a molekulák generálják a $^1O_2$ keletkezését a PSII RC-jában és a fénygyűjtő fikobiliszómákban (Krieger-Liszkay, 2005). A $^1O_2$ a PSII által generált fő ROS, amely szabadon diffundál a biológiai membránokon keresztül. Ezenkívül a PSII-höz kapcsolódó ETC és az OEC $O_2^{\bullet-}$-ot és H_2O_2 -ot képez (Pospíšil, 2009), különösen erős napsugárzás idején (Krieger-Liszkay és mtsai., 2008).

A $^1O_2$ könnyebben képződik bizonyos élettani körülmények között, például a nagy fényintenzitás vagy szárazság esetén, ami a sztómák bezárásához, valamint a kloroplasztiszok alacsony CO_2-koncentrációjához vezet. Ilyen körülmények között a plasztokinon (PQ) készlet nagyon redukált állapotban lehet, az előrefelé irányuló elektrontranszport nagyon korlátozott, és a PSII-ben rekombinációs reakciók léphetnek fel. A magas napsugárzás a gerjesztett Chl-ok egyensúlyának felbomlását és a terminális elektron akceptorok elérhetőségét okozza, ami a fent említett ROS képződéséhez vezet. (Barry Halliwell & Gutteridge, 2015).

A $^1O_2$ képződését követően számos sejten belüli folyamatban vehet részt (5. ábra). Egyrészt kioltódhat fizikai úton (energiaátadás), mint pl. karotinoidokkal való reakciója közben, vagy kioltódhat kémiai úton is (oxidációs reakció), mint az AsA-tal történő reakciója során. A $^1O_2$ számos makromolekulát képes károsítani létrejöttét követően, valamint ROS-ként oxidálja az útjába kerülő fehérjéket, zsírsavakat, sőt a különböző nukleotidokat is (Krieger-Liszkay, 2005). Legjelentősebb fiziológiai hatása a PSII D_1 fehérjéjének károsító mechanizmusa, melynek degradációs mechanizmusának jellemzésével számos kutatás foglalkozik (lásd 1.7.2. fejezet).

Az utóbbi évtizedben igen jelentős hangsúlyt kapott az a felismerés, hogy a $^1O_2$ képes lehet jelátviteli útvonalakban részt venni és hatással lehet a génexpresszióra is. Magasabb rendű növényekben a $^1O_2$ jelátvivő molekulaként is működik, amely információt továbbít a kloroplasztiszoktól a sejtmaghoz, szabályozva a nukleáris gének expresszióját (Dmitrieva és mtsai., 2020; L. Wang és mtsai., 2016). Rendkívül rövid élettartama ellenére a $^1O_2$ a kloroplasztiszokból a citoplazmába és az apoplasztba diffundálhat. Amint azt a legújabb tanulmányok kimutatták, az $^1O_2$ által aktivált jelátviteli útvonalak nemcsak a kloroplasztiszok $^1O_2$-termelésének szintjétől, hanem helyétől is függenek, és kétféle választ aktiválhatnak, akár a HL-hoz való akklimatizációt, akár a programozott sejthalált (C. Kim és mtsai., 2012).



5. ábra: A szinglet oxigén képződésének helyei és a potenciális sejten belüli útvonalai (Krieger-Liszkay, 2005 alapján).

Az $^1O_2$ élőlényekre gyakorolt hatásával kapcsolatos tanulmányokat bonyolítja az a tény, hogy fényben többféle ROS termelődik egyidejűleg. Még a magasabb rendű növényeknél is nehézkes a $^1O_2$ hatások vizsgálata, ahol már több kapcsolat is felfedezésre került a jelátvitelben (Dmitrieva és mtsai., 2020). Ezeknek a vizsgálatoknak nagyon értékes eszközei azok a mutánsok, amelyek kifejezetten nagy mennyiségű $^1O_2$-t termelnek. Ezek közül az egyik az *Arabidopsis thaliana* flu (kék fényben fluoreszkáló) mutánsa (Meskauskiene és mtsai., 2001). A sejtmag által kódolt kloroplaszt fehérje, a FLU szabályozza a Chl bioszintézist azáltal, hogy megakadályozza a tetrapirrol szintézis Mg-protoporfirin ágán az intermedierek túlzott felhalmozódását. A FLU komplexet képez a Chl szintézis utolsó lépéseit katalizáló fehérjékkel, a Mg^{2+}-protoporfirin IX monometil-észter-ciklázzal és a NADPH:protoklorofillid oxidoreduktázzal (Kauss és mtsai., 2012). Ez a komplex a gránum peremén lokalizálódik (L. Wang és mtsai., 2016). A szabad protoklorofill megkötésekor a komplex gátolja a glutamil-tRNS-szintetázt azáltal, hogy blokkolja a protoklorofill szintézist. A FLU hiánya megakadályozza a glutamil-tRNS-gátló komplex képződését, ami a szabad protoklorofill felhalmozódását okozza a sötétben (Kauss és mtsai., 2012). A flu mutáns életképes marad, ha folyamatos fényben nevelik és a vad típushoz hasonló növekedési mintát és magtermelést mutat (Op Den Camp és mtsai., 2003). Sötétben azonban a növények szabad protoklorofillt halmoznak fel. Miután a flu növények a sötétből a fénybe kerülnek, a protoklorofill erős fotoszenzitizátorként működik, ami $^1O_2$-képződéshez vezet.

A $^1O_2$ védőszer is lehet, oxidálhat molekulákat és elpusztíthat olyan szervezeteket, amelyeket egyébként károsnak tartanánk. Az egyik megfelelő példa erre az a szerep, amelyet a $^1O_2$ antibakteriális vagy antimikrobiális szerként játszhat, növényekben és állatokban egyaránt (Maisch és mtsai., 2007; Mosinger és mtsai., 2007).

1.7.1. Fotobleaching

A növényeknek meg kell birkózniuk a változó fényviszonyokkal a hatékony fénybegyűjtés fenntartása és a fénykárosodás elkerülése mellett (Li és mtsai., 2018). A túlzott, hosszan tartó fénynek való expozíció fotoinhibíciót, azaz a fotoszintetikus aktivitás csökkenését okozza, amit klorózis, vagyis a Chl molekulák fotobleachingje (kifehéredése) és végül a sejthalál követ. A $^1O_2$ -nek nagy szerepe van a fotobleaching folyamatában, mely során a

zsírsavak kettős kötéseit vagy egyes fehérjék aromás gyűrűit támadja meg és egy hidroperoxi csoportot alakít ki a molekulán.

A fotobleaching során a fotoszintetikus apparátus elsősorban a reaktív oxigénformák révén károsodik. A $^1O_2$ a már részletesen bemutatott reakcióval a triplett állapotú Chl és az oxigén kölcsönhatása révén jöhet létre, különösen a PSII RC-ban (4. ábra), melynek D_1 fehérjéjét károsítja (Trebst és mtsai., 2002). Ez a mechanizmus fontos, de nem kizárólagos útja a PS II fénykárosodásának, és a OEC Mn-klaszterének látható fény által kiváltott inaktiválása a $^1O_2$ függő úttal párhuzamosan is történhet (Vass, 2011). A PSI komplexet is károsíthatja a fény, különösen olyan rossz körülmények között, amikor az ETC a PSII-ből korlátozottá válik (Scheller & Haldrup, 2005).

Ugyanakkor kevésbé világos, hogy a fénygyűjtő antennakomplexekben a Chl-ek közvetlen szerepet játszanak-e az oxidatív fotokárosodásban. Egy, a kettes fénygyűjtő komplexre (LHCII) irányuló kutatásban, a Chl fény által indukált fotobleaching hatását vizsgálták különböző molekuláris környezetben, mint a fehérje aggregátumokban, detergens micellákban vagy proteoliposzómákban. Az eredményeik további bizonyítékokat mutattak ki arra vonatkozóan, hogy az LHCII molekuláris környezete jelentős hatással van annak funkcionális jellemzőire, beleértve többek között a fénykárosodásra való hajlamot (Lingvay és mtsai., 2020).

1.7.2. PSII fotosérülése és D_1 protein regeneráció

Az *Arabidopsis thaliana* leveleiben *in vivo* kimutatták a $^1O_2$ képződést fluoreszcens festék alkalmazásával (Hideg és mtsai., 2001; Op Den Camp és mtsai., 2003). Trebst és munkatársai (Trebst és mtsai., 2002) bizonyítékot szolgáltattak arra vonatkozóan, hogy a $^1O_2$ fontos károsítója a *Chlamydomonas reinhardtii* sejtek fotoinhibíciója (azaz a PSII aktivitás és a D1 fehérje fény által kiváltott elvesztése) során.

A sérülés javító mechanizmusa az úgynevezett D_1 *de novo* szintézis, mely során a D_1 fehérje újraszintetizálódik és a RC újra összeszerelődik. Ennek a folyamatnak a során a RC fehérjéi reverzibilisen foszforilálódnak és a RC alegységei szétválnak, a dimereken kívül a sapka proteinek is leválnak, így a fehérje komplex kikerül a grána tilakoidból, ezáltal a károsodott D_1 fehérjéhez a proteáz enzimek hozzáférhetnek és lebontják. Közben a D_1 fehérjét

kódoló *psbA* gén kifejeződése megerősödik és új fehérje szintézisébe kezd, majd a különböző pigmentek ligációjával és transzlációs módosításokkal párhuzamosan megtörténik a fehérje érése, transzlokálódik és újra összeszerelődik a RC, majd visszakerül a TM-ba (Cheregi és mtsai., 2007).

1.7.3. $^1O_2$ által kiváltott génexpressziós változások

Az elmúlt két évtizedben az irodalomban egyre többen arról számoltak be, hogy a $^1O_2$ jelenlétére adott válaszként olyan gének specifikus aktivációja figyelhető meg, amelyek részt vesznek az organizmus fotooxidatív stresszel szembeni molekuláris védekező válaszában (J. Glaeser és mtsai., 2011; Leisinger és mtsai., 2001a; Op Den Camp és mtsai., 2003). Leisinger és munkatársai kimutatták, hogy olyan fotoszenzitizátor szerek jelenlétében, mint a rosebengal, a *Chlamydomonas*-ból származó glutation-peroxidáz (GPXH) homológ gént az $^1O_2$ transzkripciósan aktiválja, míg a *gpxh* mRNS-szintje csak gyengén fejeződik ki $O_2^{\bullet-}$-dal vagy peroxiddal szemben (Leisinger és mtsai., 2001a). Op den Camp és munkatársai az *Arabidopsis* flu mutánsát használták fel annak kimutatására, hogy a protoklorofill felhalmozódása következtében képződő $^1O_2$ számos (70 darab) gént gyorsan aktivált (Op Den Camp és mtsai., 2003). Ezzel szemben más reaktív oxigénformák, mint például a $O_2^{\bullet-}$, nem szabályozták a korai stresszválasz alatt e gének expresszióját. A flu mutánsban a $^1O_2$ perifériásan termelődik a membrán felszínén és ezért reakcióba léphet a sztróma vegyületeivel. Természetes körülmények között a $^1O_2$ a PSII RC-ában termelődik és más célmolekulákkal reagál, mint ebben a mutánsban. Leisinger és Fischer azonban a fotoszintetikus ETC gátlóit alkalmazva a PSII $^1O_2$ képződését vizsgálta és csak a *Chlamydomonas* GPXH homológ génjének szignifikáns indukcióját találta (Leisinger és mtsai., 2001b).

Azok a mikroorganizmusok, amelyek rendszeresen szembesülnek fotooxidatív stresszel, specifikus rendszereket fejlesztettek ki, amelyek érzékelik a $^1O_2$ jelenlétét és szorosan szabályozzák a $^1O_2$ reakciótermékeinek eltávolítását. A fotooxidatív stresszre adott válaszokat számos fotoszintetikus és nem fotoszintetikus mikroorganizmusban vizsgálták. Ennek a válasznak a szabályozásáról azonban csak a fototróf alfa-proteobaktérium *Cereibacter sphaeroides* (régi nevén: *Rhodobacter sphaeroides*) esetében szereztek részletes ismereteket. Ebben a szervezetben és a rokon proteobaktériumokban az extracitoplazmatikus funkció (ECF) szigma faktor, az RpoE szabadul fel a rokon ChrR antiszigma faktorból $^1O_2$ jelenlétében, mely

aktiválja a fotooxidatív stressz ellen védelmet nyújtó gének expresszióját. A legújabb kísérletek azt mutatják, hogy a $^1O_2$ jelként működik, amelyet a még ismeretlen komponensek érzékelnek és a ChrR proteolíziséhez vezet. Az RpoE egy második alternatív szigmafaktort, az RpoHII expresszióját indukálja, amely több gént szabályoz, mely részben átfedésben van az RpoHI által szabályozott hősokk-reakcióval (J. Glaeser és mtsai., 2011).

A génszabályozás alternatív szigmafaktorok általi transzkripciós szabályozása mellett úgy tűnik, hogy a nem kódoló kis RNS-ek (sRNS-ek) számos olyan fehérje szintézisét befolyásolják, amelyek részt vesznek a fotooxidatív stresszre adott válaszban. Az mRNS-célpontok kölcsönhatását ezekkel az sRNS-ekkel általában a Hfq RNS-chaperon közvetíti. A Hfq-t kódoló gén deléciója $^1O_2$ érzékeny fenotípushoz vezet, amely gátolja a génszabályozás poszt-transzkripciós szintű sRNS-ek általi szabályozását *C. sphaeroides*-ben. Ezért a különböző szabályozó komponensek komplex hálózata szabályozza a fotooxidatív stressz elleni védelmet az oxigént nem termelő fotoszintetikus baktériumokban (J. Glaeser és mtsai., 2011).

A cianobaktérium sejtekhez képest, ahol a baktérium sejt nagy részét a tilakoid membrán teszi ki, így könnyen elérhető akár a rövid életidejű ROS-ok számára is, felmerül a kérdés, hogy egy olyan rendkívül rövid életű molekula, mint a $^1O_2$, hogyan képes az eukarióta sejtmagba továbbítható jelet adni, mely ezután a génexpresszió szabályozására fejti ki hatását. Néhány más reaktív oxigénfajtáról, például a $O_2^{\bullet-}$-ról vagy a peroxidról kimutatták, hogy közvetlenül másodlagos hírvivőként működnek az oxidatív stresszválasz gének, például a GPXH, a GST-k és az APX expressziójának szabályozásában (Vranova és mtsai., 2002). Az $^1O_2$ rövid élettartama miatt kérdéses, hogy a jelátviteli lánc egy komponensét közvetlenül oxidálja az eukarióta sejtekben. Ehelyett feltételezhetően a D_1 fehérje lebomlásából vagy a Chl bomlási termékeiből származó reakciótermékek szolgálhatnak szignálmolekulákként. Kimutatták, hogy a Chl prekurzorok, mint például a Mg-protoporfirin IX, jelzőmolekulaként működhetnek a kloroplasztiszok és a sejtmag közötti jelátviteli útvonalon (Strand és mtsai., 2003). Analógia útján azt is feltételezhetjük, hogy a Chl lebomlási termékei, mint például a feofitin, klorofillid vagy feoforbid jelzőmolekulaként működhetnek (Krieger-Liszkay, 2005). Egy ilyen molekulát egy ABC fehérje szállíthat ki a kloroplasztiszból a citoszolba, ahol jelet közvetít a sejtmag felé, ezáltal szabályozva a gének expresszióját. Kimutatták, hogy funkcionális ABC fehérje szükséges a protoporfirin IX transzportjához (Møller és mtsai., 2001), valamint, hogy a tonoplaszt membránban található ABC transzporter képes Chl

katabolitokat a vakuólumba szállítani (Lu és mtsai., 1998), így valószínűsíthető, hogy egy ilyen transzportmechanizmus a kloroplaszt külső membránjában is jelen lehet.

Alternatív megoldásként elképzelhető még az is, hogy a lipid-peroxidok jelzőmolekulákként működhetnek, mivel a telítetlen zsírsavak a $^1O_2$ kedvelt célpontjai. A $^1O_2$ által közvetített nem-enzimatikus lipidperoxidáció növekedése azonban nem tapasztalható a flu mutánsban, amely protoklorofillt halmoz fel és nagyobb $^1O_2$ képződést mutat, mint a vad típusú növények (Op Den Camp és mtsai., 2003). A linolénsav gyorsan oxidálódott a flu mutáns megvilágítására, de a megfigyelt oxidációs minták enzimatikus oxidációra utaltak és nem a $^1O_2$ általi nem-enzimatikus oxidációra. Általánosságban elmondható, hogy a zsírsavból származó jelek részt vehetnek a sejthalálhoz kapcsolódó jelátviteli útvonalakban és a stresszhez kapcsolódó gének expressziójában (Weber, 2002).

1.8. Fotoszenzitizátor festékek, $^1O_2$ generálás és detekció

A fotoszenzitizátorok, vagy fényérzékenyítő szerek olyan kromofórok, amelyek fénybesugárzás hatására reaktív oxigénfajtákat hoznak létre. Számos olyan vegyület létezik, amely fotoszenzitizátorként működhet. A fényérzékeny vegyületek fotoaktiválása során többféle ROS képződhet.

A fotoszenzitizátorokat évek óta a fotodinámiás terápiában alkalmazzák, hatékonyan elpusztítva a daganatsejteket a rák kezelésében (Latorre-Esteves és mtsai., 2010). Az elmúlt években több kísérlet is történt a fotodinamikus terápia alkalmazására bakteriális, élesztőgombák és gombák okozta fertőzések kezelésére (Jori, 2006; Jori & Brown, 2004). Ezeknek a vegyületeknek az előnye, hogy a bakteriális betegségek ellen anélkül lehet küzdeni, hogy rezisztencia alakulna ki, mint például az antibiotikumok alkalmazása esetén. A cianobaktériumoknak általánosságban nagyobb érzékenységük van a ROS-ra, ellentétben a zöldalgákkal (Sundukov, 2006).

A $^1O_2$ fotoszintetikus apparátus általi előállítása szintén a $^1O_2$ fő természetes forrása az anoxigenikus fotoszintetikus mikroorganizmusokban (J. Glaeser és mtsai., 2011). Az oxigén termelő fotoszintetikus organizmusok PSII-je és az anoxigenikus fotoszintetizáló proteobaktériumok RC-i homológok egymással. Az RC-kat tartalmazó vad típusú BChl azonban nagyon kis mennyiségű $^1O_2$-t fejleszt. Korábbi munkák azt sugallták, hogy az *R.*

sphaeroides RC nem fejleszt $^1O_2$-t mérhető sebességgel, mivel a karotinoidok kioltják a $^1O_2$-t és a gerjesztett BChla molekulák feleslegét (Osmond és mtsai., 2000). Ennek következtében az anoxigenikus fotoszintetizáló proteobaktériumokról azt gondolják, hogy kevésbé érzékenyek a $^1O_2$ termelés miatti fotoinhibícióra.Viszont az újabb munkák azt mutatják, hogy a $^1O_2$ képződés *in vivo* detektálható a DanePy $^1O_2$ specifikus fluoreszcens csapdával (Jens Glaeser & Klug, 2005), illetve izolált fotoszintetikus membránokban a SOSG (singlet oxygen sensor green) használatával (Berghoff és mtsai., 2011). Illetve azt is igazolták, hogy magas fényhatás alatt a $^1O_2$ képződése révén károsodik a *Rhodobacter sphaeroides* karotinoidmentes reakcióközpontja. Ez a mechanizmus nagy valószínűséggel a reakcióközpont klorofill triplett állapotának a molekuláris oxigénnel való kölcsönhatásán keresztül megy végbe, hasonlóan, mint a PS II-ben (Tandori és mtsai., 2001) Egy részletes tanulmány kimutatta, hogy a vad típusú RC-kban a triplett állapotú BChl-a energiát ad át a molekuláris oxigénnek, ezáltal $^1O_2$-t képez (Uchoa és mtsai., 2008).

A fotoszenzitizátorok, ellentétben a II. típusú fotodinámiás reakcióval, ahol csak $^1O_2$ képződik (4. ábra) az I. típusú fotodinámiás reakció során többféle ROS generálására is képesek, mely esetben az egyes elektronok a molekuláris oxigénre kerülnek. Például mikor a $O_2^{\bullet-}$ molekulák nem specifikus elektrontranszferrel jönnek létre, majd spontán vagy enzimatikusan katalizált diszmutáció H_2O_2 -ot képez. Szabad kétértékű fémionok, például Fe^{2+} jelenlétében a H_2O_2-ból a Fenton-reakció révén hidroxilgyökök képződhetnek (Barry Halliwell & Gutteridge, 2015). Bár ez a folyamat mennyiségileg kevésbé fontos a fényérzékenyítő szerek, például a rosebengál (Rb) vagy a metilénkék (Mb) esetében.

1.8.1. $^1O_2$ kioltás

A fotoszintetikus mikroorganizmusokban és a kloroplasztiszokban lévő karotinoidok hatékony védelmet nyújtanak a $^1O_2$ képződése ellen a gerjesztett Chl-ok és BChl-ok és a $^1O_2$ közvetlen kioltásával (Krieger-Liszkay és mtsai., 2008; Osmond és mtsai., 2000). A nem-fotoszintetikus mikroorganizmusok is karotinoidokat használnak a $^1O_2$ kioltójaként (Kruk & Szymańska, 2021). Az oxigéntermelő fotoautotrófok további kioltókat használhatnak, mint a tokoferol (Trebst, 2003) és PQ (Kruk & Trebst, 2008). A $^1O_2$ molekulával reagáló $^1O_2$ megkötők közé tartoznak az aminosavak, mint például az L-hisztidin (Rehman és mtsai., 2013) és a triptofán (Davies, 2004), a tiolok, például a GSH (Devasagayam és mtsai., 1991), a tioredoxin (Das & Das, 2000), a mikosporin (Suh és mtsai., 2003), és a poliaminok (Das & Misra, 2004).

1.8.2. $^1O_2$ detekciós módszerek

Jelenleg az egyik fő kihívást az intracelluláris $^1O_2$ az intakt sejten belüli jelenlétének és mennyiségének kimutatása jelenti. Ha vizsgálni szeretnénk a sejten belüli $^1O_2$ által mediált szignalizációs folyamatokat, nyomon kell követnünk és azonosítanunk kell a $^1O_2$ molekulát, mint szignált. Ehhez olyan detekciós módszerek szükségesek, melyek pontos és aktuális $^1O_2$ koncentrációkat képesek érzékelni. Jelenleg számos $^1O_2$ detekciós módszer létezik, mint amilyenek a különböző spin-csapdák (TEMP; TEMPD-HCL követő elektron paramágneses rezonancia (EPR), valamint a fluoreszcens festékek, mint az SOSG és DaNePy). Emellett a $^1O_2$ rendelkezik egy egyedi lumineszcenciával az infravörös tartományban 1270 nm-es hullámhosszon, ami szintén egy detekciós lehetőséget rejt magában (Macpherson és mtsai., 1993).

A tilakoid izolátumokban az EPR spin-csapdázás sikeresen használható $^1O_2$ detektálására TEMP (Fufezan és mtsai., 2007; Hideg és mtsai., 1994) vagy TEMPD-HCl (Leisinger és mtsai., 2001b) alkalmazásával. A direkt 1270 nm-es lumineszcencia mérések izolált PSII komplexekben is alkalmazhatók (Tomo és mtsai., 2012). Intakt növényi rendszerekben a DanePy (Hideg és mtsai., 2007) és a SOSG (Flors és mtsai., 2006; Rehman és mtsai., 2021) fluoreszcens $^1O_2$ csapdákat már sikeresen alkalmazták.

A $^1O_2$ termelés kimutatása ép cianobaktérium sejtekben azonban lényegesen nagyobb kihívást jelent, mivel az EPR és a fluoreszcens spincsapdák nem hatolnak be a sejtek belsejébe

és a direkt 1270 nm-es lumineszcencia módszer alkalmazása a háttér Chl fluoreszcencia miatt akadályozott (Rehman és mtsai., 2013, 2021). Megjegyzendő, hogy történt kísérlet SOSG alkalmazására intakt *Synechocystis* sejtekben (SINHA és mtsai., 2012), azonban a hosszú idejű megvilágítási követelmény a fotogátlásos körülmények között a SOSG fluoreszcencia jel indukálására, valamint maga a megvilágított SOSG $^1O_2$ termelése, amely mesterséges fluoreszcencia-növekedést indukál exogén $^1O_2$ forrás hiányában, korlátozza ennek a módszernek az alkalmazhatóságát a $^1O_2$ kvantitatív kimutatására *Synechocystis*-ben.

Létezik egy úgynevezett hisztidin-mediált kémiai csapdázódáson alapuló módszer, mely során a hisztidin (His) a $^1O_2$ általi oxidálódása révén molekuláris oxigént fogyaszt a közegből (Telfer és mtsai., 1994). Ezt az oxigén koncentráció-függő reakciót nyomon tudjuk követni egy standard Clark elektróddal és következtethetünk a $^1O_2$ koncentrációra az oxigén fogyásának mértékéből, így lehetséges intakt mikroalga sejtekben a pillanatnyi intracelluláris $^1O_2$-t érzékelése (Rehman és mtsai., 2013).

Sajnos ezen detekciós módszerek hiányossága az, hogy egyik sem képes az intakt mikroalga sejtekben *in vivo* az intracelluláris $^1O_2$ szintek hosszútávú időbeli viszonyait nyomon követni. Így nem alkalmazhatóak az intracelluláris $^1O_2$ sejten belüli jelátviteli folyamatait célzó kutatások során.

1.9. Magas fényhatásra adott válaszok cianobaktériumokban

A *Synechocystis* sejtek fénystresszel szembeni védelmében a túlélés szempontjából elengedhetetlen fehérjék expressziós indukciója figyelhető meg. Ezen fehérjéket HL hatására indukálódó fehérjéknek (Hli proteins) nevezték el, melyekből öt azonosítható a S*ynechocystis* cianobaktériumban (He és mtsai., 2001). Az ezen fehérjék génjeire deléciós mutáns sejtvonalak elemzései azt sugallják, hogy ezek a fehérjék egyaránt szerepet játszanak a ROS elleni védekezésben és a fotoakklimatizációban (Havaux és mtsai., 2005).

A homológ NblS (*Synechococcus elongatus* PCC 7942) és a DspA (*Synechocystis* PCC 6803) szabályozza a Hli fehérjék expresszióját, így az erős fényhatás során a túlélés kulcsszereplői (Hsiao és mtsai., 2004; Van Waasbergen és mtsai., 2002). Cianobaktériumokban és más oxigén-termelő fototróf szervezetekben a fotooxidatív stresszre adott egyik specifikus válasz a PSII komplex $^1O_2$ által károsított D_1 fehérjéjének pótlása (Krieger-Liszkay, 2005). A

D_1 fehérje újraszintetizálása alacsony fényintenzitások mellett is megtörténik, és erős fényhatás esetén megnő. Úgy gondolják, hogy ez a válasz minőség-ellenőrzésként szolgál ahhoz, hogy a sejt a fotoinhibíciót a lehető legalacsonyabb szinten tartsa és reagáljon a fényintenzitás hirtelen változásaira (Murata és mtsai., 2007). Egyes cianobaktériumokban a Fe-hiány olyan fehérjék szintéziséhez vezet, mint az IdiA és IsiA, melyek megvédik a fotorendszereket az oxidatív stressztől (Michel & Pistorius, 2004). A vashiány hatással van a ROS képződésére a fotoszintetikus szervezetekben, mivel a fotoszintetikus ETC nagyszámban tartalmaz Fe kofaktorral működő fehérjéket. Az IdiA képződését az IdiB és a Fur fehérjék szabályozzák (Michel & Pistorius, 2004). A HL az *isiAB* transzkripció derepressziójához, valamint az IsiA és a flavodoxin felhalmozódásához vezet vashiány esetén. Kimutatták azt is, hogy az IsiA megvédi a *Synechocystis* sejteket a fotooxidatív stressztől (Havaux és mtsai., 2005) és egy kis nem-kódoló RNS, az IsrR szabályozza ezt (Dühring és mtsai., 2006).

1.9.1 Magas fényhatás indukálta (*hli*) gének *Synechocystis*-ben

A fotoszintetikus szervezetek esetében a sejtek növekedésének és túlélésének egyik kritikus pontja a különböző környezeti fényviszonyokhoz való gyors alkalmazkodás képessége. Az alacsony fényintenzitás (LL) korlátozza a sejtnövekedést, míg a HL a fehérjék, a lipidek és az örökítőanyag olyan mértékű károsodáshoz vezethet, mely a sejtek életképességét jelentősen befolyásolja. Mind a mikroalgák, mind a magasabbrendű növények hatékony védekezési mechanizmusokkal rendelkeznek a fény abszorpciója következtében kialakuló túlzott gerjesztés és a fotoszintézis során keletkező ROS hatékony eliminálására. Mindemellett a fotoszintetikus organizmusok úgynevezett stressz-indukált fehérjék termelésére is képesek a magas intenzitású fénynek való kitettség hatására. Ezen fehérjéknek rendkívül fontos szerepe van a sejtek HL-hoz való alkalmazkodásában. A HL-indukált gének családjába az ún. *hli* vagy *scp* gének sorolhatóak, melyek transzkripciója HL hatására aktiválódik és olyan fehérjéket kódolnak, amelyek homológiát mutatnak a növények fénybegyűjtő Chl a/b-kötő fehérjéivel (LHCP). Ezen fehérjék működése az, amely lehetővé teszi a cianobaktériumok HL körülmények közötti túlélését (Q. Wang és mtsai., 2008).

A high-light-inducible (*hli*) vagy más néven *scp* gének egyetlen transzmembrán hélixet tartalmazó fehérjéket kódolnak, melyek átlagos molekuláris súlya 6-8 kDa között változik, homológok a vörös algák és magasabb rendű növények Chl-a és Chl-b kötő fehérjéivel és

elsőként a *Synechococcus elongatus* PCC 7942 cianobaktériumban azonosították őket (Dolganov és mtsai., 1995). Az *scp* gének minden eddig megszekvenált cianobakteriális genomban jelen vannak, legmagasabb kópiaszámot a HL-hoz jól adaptálódott tengeri algákban mutatnak. A *Synechocystis* cianobaktériumban négy *scp* gént azonosítottak (*scpB-E* megfelel a *hliC, hliA, hliB* és *hliD* géneknek) (Promnares és mtsai., 2006).

Az SCP fehérjecsalád összesen öt kis molekulasúlyú fehérjét foglal magába, melyek a HliA (ScpC/ssl2542), HliB (ScpD/ssr2595), HliC (ScpB/ssl1633), HliD (ScpE/ssr1789), valamint az ScpA, amely a HemH ferrokelatáz enzim C-terminálisa. A LilA (slr1544) szintén az SCP fehérjecsaládba sorolható, azonban a csoporthoz való kötődése kisebb mértékű (Cheregi & Funk, 2015). Ugyanakkor az *scpD* (*hliB*) és *slr1544* gének transzkripciója közös promóter szabályozása alatt áll, a két gént *Synechocystisben* mindössze 49 nukleotid választja el egymástól. A *lilA* gén egy 12 kDa molekulasúlyú transzmembrán fehérjét kódol, mely szintén a PSII komplexszel asszociál (Kufryk és mtsai., 2008). A magasabb rendű növények fénybegyűjtő antenna komplexével mutatott magas homológia alapján a membránba ágyazott SCP fehérjék a fénybegyűjtő (light-harvesting-like) proteinek csoportjába tartoznak. Az SCP-k tartalmaznak egy CAB domént (Chlorofill-a binding domain), amely a növények esetében kiemelt szerepet tölt be a Chl-a molekulák megkötésében. Az ScpB-E fehérjék esetében kísérletesen igazolt, hogy képesek *in vitro*, míg az ScpE *in vivo* is, pigmentek megkötésére. Számos eddigi, az Scp fehérjék funkciójára irányuló tanulmány igazolta, hogy a fehérjecsalád tagjai asszociációban állnak a PSII-vel és fő funkciójuk a naszcens PSII fehérjék stabilizációja és védelme. Nemrégiben az is igazolást nyert, hogy két SCP fehérje is a HL indukálta karotenoid-kötő komplex (HLCC) tagja, mely szerepe a tilakoid membrán fokozott oxidatív stressz okozta károsodásokkal szembeni védelme. Mindezen kívül az Scp fehérjék részt vesznek a tetrapirrol bioszintézis szabályozásában, illetve megakadályozzák a sérült PSII reakciócentrumokban a további $^1O_2$ képződést. A *Synechocystis* sejteken végzett transzkriptom analízis alapján az *scp* gének egyetlen expressziós klasztert alkotnak, így a különböző stresszkörülmények hatására az egyéni szabályozásuk ellenére hasonló expressziós mintázatot mutatnak (Cheregi & Funk, 2015).

Az *scp* gének promóterének upstream régiójában két szabályozó elemet fedeztek fel: az NtcA motívum az *scpB* és *scpE* gének promóterében található meg, míg egy palindrom (5’ GCGATCGC 3’) motívum, a *HIP1* (Highly Iterated Palindrome) az *scpB* és *scpC* géneknél fordul elő. Ezen *HIP1* szekvencia igazoltan polifiletikus eredetű, így számos, távoli

cianobakteriális sejtvonalban jelen van. Kísérleti eredmények alapján a *HIP1* területén DNS metiláció zajlik és *Synechocystis* sejtekben ezen régióban az *sll1130* transzkripciós faktor kötődését mutatták ki, amely a gén upstream régiójában az *slr1788* HIP1 motívumhoz való kötődését szabályozza.

Mindemellett a High Light Regulatory 1 (HLR1) elem is gyakran előfordul a HL hatására indukálódó gének, mint a *psbA2, psbA3 nblA, hliA* gének esetében a *Synechocystis* sejtekben. Jelenlétét kimutatták továbbá mindegyik *scp* gén esetében is. Az *scpD* esetében a HLR1 motívumhoz az RpaB fehérje kapcsolódik, melyről bizonyított, hogy a PSI rendszer fehérjéit kódoló gének promótereivel is interakcióba lép LL mellett és stimulálja azok expresszióját (Cheregi & Funk, 2015).

Korábbi kísérleti eredmények alapján feltételezik, hogy a *Synechocystis* sejtek *hli* génjeinek expressziója a szenzor-hisztidin-kináz Hik33 szabályozása alatt áll. A Hik33 szintén esszenciális a PSII D_1 alegységének HL által indukált szintéziséhez és az FtsH2 (*slr0118*), valamint az FtsH3 (*slr1604*) proteázok szintéziséhez. A Hik33 deficiens sejtek esetében számos gén, köztük a *hli* gének expressziója is gátolt; LL mellett a *hli* gének transzkript szintje magas, azonban HL hatására ez a mennyiség csak mérsékelt emelkedést mutat (Komenda & Sobotka, 2016).

A HliA-D fehérjéket kódoló gének transzkripciója különböző stresszkörülmények hatására indukálódik, mint a HL, az alacsony hőmérséklet, a nitrogén vagy a kén hiánya. A *hli* gének kópiaszáma függ az adott fajtól és az ökotípustól is (Akulinkina és mtsai., 2015). A *hli* gének a *Synechocystis* sejtekben nem esszenciálisak, melyet jól mutat, hogy a *hli* gének egyenkénti vagy együttes hiánya esetében is életképes cianobaktérium sejteket kapunk. Ugyanakkor ezek a mutáns sejtek rendkívül érzékennyé válnak a megemelkedett sugárzással és oxidatív stresszel szemben, amely egyértelműen igazolja, hogy a *hli* gének kulcsszerepet töltenek be a sejtek stresszkörülményekhez való akklimatizációjában (Komenda & Sobotka, 2016). Azon mutáns cianobaktériumok, melyek esetében a *hliA-D* géneket inaktiválták, a HL-al szemben mutatott megemelkedett szenzitivitás mellett a vad típusú sejtekétől eltérő pigmenttartalommal rendelkeztek. Mindemellett a mutáns sejtek elveszítették az abszorbeált fényenergia nem-fotokémiai disszipációjára való képességüket (Akulinkina és mtsai., 2015).

A *hli* (*scp*) gének transzkripciója tehát stressz hatására indukálódik a sejtekben, azonban a PSI-deficiens mutánsok esetében expressziójuk konstitutív, így a PSI-mentes háttér kiválóan

alkalmas a *hli* géntermékek funkcióinak vizsgálatára. Az eddigi kísérletek eredményei alapján a *hli* gének termékei részt vesznek a Chl bioszintézisének szabályozásában, asszociációt mutatnak a PSI monomer, PSI trimer és PSII komplexekkel, részt vesznek a Chl PSII rendszerhez történő szállításában, valamint elengedhetetlenek a stresszkörülményekhez való alkalmazkodáshoz és a fotoszintetikus rendszer oxidatív stresszel szembeni védelméhez (Tibiletti és mtsai., 2016).

2. Célkitűzés

Munkánkat két fő irány határozta meg, melyeket egy közös pont fűzött össze: az egész sejtes bioriporterek fejlesztése *Synechocystis* PCC 6803 cianobaktérium sejtek alkalmazásával.

Az egyik fő kutatási irányunknak a nehézfém (HM) bioszenzor törzsek kimutatási tartományának növelését tűztük ki. A munkahipotézisünk az volt, hogy a nehézfémeket a sejtekből eltávolító transzporterek inaktiválásával megnövelhető a sejteken belüli nehézfém koncentráció, ami a nehézfémek által történő génindukciós választ felerősítheti.

Mindenekelőtt egy Δ*nrsRSBACD*: Δ*coaRT*: Δ*ziaRA* genetikai hátterű deléciós mutáns törzs (NiCoZia) elkészítését terveztük, mely hiányos a korábban ismertetett HM érzékeny klaszterre. A NiCoZia *Synechocystis* törzs elkészítését követő munkafázisban a *nrsR és nrsS; coaR* valamint a *ziaR* promóter által hajtott HM-re reagáló lumineszcens bioszenzor konstrukciók elkészítését tűztük ki célul, majd HM érzékenységüket a vad típusú genetikai háttérrel rendelkező bioszenzor törzsekben hasonlítottuk össze.

Másik fő célkitűzésünk, a $^1O_2$ jelmolekulaként betöltött szerepének tanulmányozása volt *Synechocystis*-ben, a specifikusan $^1O_2$ hatására indukálódó gének azonosítása, valamint az, hogy egy ilyen génhez tartozó promóter felhasználásával $^1O_2$ -specifikus teljes sejtes bioszenzor törzset alakítsunk ki, ami lehetővé teszi a $^1O_2$ specifikus *in situ, in vivo* kimutatását.

Ehhez korábban ismeretlen $^1O_2$-függő expressziót mutató gének keresésébe kezdtünk. Egy teljes transzkriptom analízissel $^1O_2$ érzékeny gének azonosítását terveztük. Ennek függvényében különböző mutánsok elkészítését tűztük ki célul az egyes $^1O_2$-érzékeny génekre nézve. A legígéretesebb génjelöltre deléciós mutáns és bioriporter törzsek elkészítését terveztük, melyek alkalmasak lehetnek a $^1O_2$ koncentrációk sejten belüli viszonyainak folyamatos nyomon követésére, így biztosítva alapot egy olyan módszernek, mellyel a $^1O_2$, mint jelátviteli szignál elkülöníthető lehet az egyéb transzdukciós folyamatoktól.

Emellett célul tűztük ki a további $^1O_2$-függő gének expressziójának nyomon követését a különböző $^1O_2$ kezelések alatt.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Az alkalmazott cianobaktériumtörzsek növekedési körülményeinek és nehézfémsó kezelések hatásainak vizsgálata

Kísérleteink során vad típusú USA PCC 6803 *Synechocystis* cianobaktérium törzset (WT), valamint az általunk létrehozott, HM klaszter hiányos Δ*nrsSRBACD:* Δ*coaRT:* Δ*ziaRA* (röviden NiCoZia) törzsekkel dolgoztunk. Ezen kívül létrehoztuk még a Δ*hli*B törzset, melyben a *hliB (ssr2595, SGL_RS16470)* gén kiütésre került, valamint több általunk előállított lumineszcens bioszenzor törzset, melyek előállítása a pILA promóter próba vektor használatán alapul (Kunert és mtsai., 2000). A *Synechocystis* sejteket fotoautotróf 3% CO_2-tartalmú atmoszférikus körülmények között neveltük, 30-40 μmol foton m^{-2} s^{-1} fehér fényen és 30°C hőmérsékleten, BG-11 (Rippka és mtsai., 1979) folyékony tápközegben növesztve. Az indító kultúra előállításához 1,5 mL fagyasztott tenyészetet oltottunk le 50 mL folyékony BG-11 tápoldatba, a megfelelő antibiotikum hozzáadásával. A NiCoZia és a Δ*hliB* törzshöz 50μg / mL Spec-t, a bioszenzor törzsekhez pedig 50 μg / mL Km-t használtunk fel a szegregációhoz.

A kísérletekhez a stacioner fázisú starter tenyészetből 1 mL-t oltottunk be 200 mL BG-11 oldatba antibiotikumok hozzáadása nélkül, majd logaritmikus fázisig növesztettük (OD_{720} 0,8-1). A kezeléseket BG-11 folyékony tápközegben, glükóz hozzáadása nélkül hajtottuk végre.

A rutin DNS-manipulációkhoz és a plazmid konstrukciók létrehozásához *Escherichia coli* DH5α törzset alkalmaztunk. Az *E. coli* sejteket Luria broth (LB) táptalajban neveltük 37°C-on (J. Sambrook, D.W. Russell, 2001).

3.1.1. Nehézfém kezelések

A nehézfémsó kezeléseket 96 lyukú fekete alacsony autofluoreszcenciájú (Perkin-Elmer Opti-Plate) sejttenyésztő lemezen hajtottuk végre, 25°C-on; normál CO_2 tartalmú légkörben, 40 μmol foton m^{-2} s^{-1} megvilágítás alatt. Minden lyuk 200 μL log fázisú cianobaktérium sejtkultúrát (OD_{720} 0,8-1) és 100 μL különböző koncentrációjú nehézfémsó oldatot tartalmazott. Az indukció vizsgálatokhoz csak a megfelelő nehézfémek oldatait használtuk, tekintettel arra, hogy Blasi és munkatársai (Blasi és mtsai., 2012) korábban megmutatták e promóterek

indukciójának specifikus voltát. A nehézfémsókból 10 mM-os törzsoldatot készítettünk desztillált vízzel, melyet a 144 µM – 0,014 nM koncentráció tartományú hígítási sor előállításához használtunk fel. A lemezeket lyukasztott átlátszó fóliával borítottuk be (Peca és mtsai., 2008). A 3 órás kezelést követően lumineszcenciát mértünk.

3.1.2. Szinglet oxigén generálás fotoszenzitizátor festékekkel

A kezeléseket 10 mL térfogatban LED fényforrással ellátott vízfürdő rendszerben hajtottuk végre, 30°C-on, normál CO_2 tartalmú légkörben. Az alacsony, nevelési fénykezelések során (LL) 40 µmol foton m^{-2} s^{-1} intenzitású megvilágítást, míg a fénystressz kiváltására 200 µmol foton m^{-2} s^{-1} (HL) intenzitású megvilágítást használtunk. A Rb és Mb hatáskeresztmetszete különbözhet, az ebből eredő bizonytalanságok kivédése érdekében kísérleteinket mindkettővel végrehajtottuk és az eredményeket összehasonlítva vontuk le a $^1O_2$ hatására vonatkozó következtetéseket. A fotoszenzitizátor festékeket egyaránt alacsony, mindössze 0,5 µM végkoncentrációban alkalmaztuk, mivel az itt be nem mutatott előkísérleteink szerint ezen koncentráció mellett mindkét reagens jól kimutatható hatást gyakorolt a génexpressziókra magas fénykezelés alatt, de alacsony fény mellett nem tapasztaltunk változást. Magasabb koncentrációk mellett azonban aspecifikus hatások mutatkoztak. A mérés alatt a megfelelő oxigén ellátottság érdekében mágneses kevertetést vagy buborékoltatást alkalmaztunk és folyamatosan nyomon követtük a hőmérsékletet.

3.2. Molekuláris biológiai módszerek

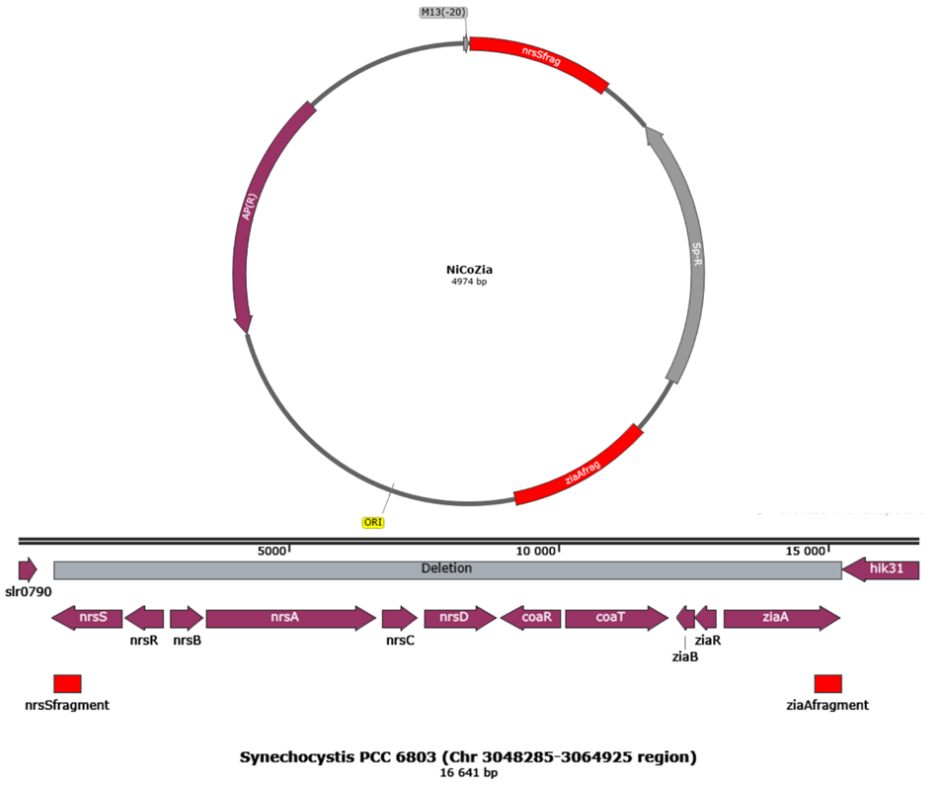
3.2.1. *Synechocystis* transzformáció és a mutánsok szelekciója

Az transzformáláshoz a természetes transzformáción alapuló módszert használtuk (Kunert és mtsai., 2000). A WT vagy NiCoZia *Synechocystis* sejt kultúrából (OD_{720} 0,6) 6 mL-t centrifugáltunk (5 perc 6000 rpm), majd 60 µL friss BG-11 tápoldatban újra szuszpendáltuk a kiülepített sejteket. Ezután 1 µg tisztított plazmid DNS-t adunk a sejtszuszpenzióhoz és sötétben, 30°C-on inkubáltuk egy éjszakán át. Ezt követően a mintákat 1,5%-os agar BG-11 lemezekre szélesztettük, antibiotikum nélküli (WT esetében), vagy a megfelelő antibiotikum jelenlétében (*Spec* a NiCoZia esetében). Három nap elteltével a lemezeket 10 µg / mL Km-nel

vagy Spec-nel egészítettük ki. A teljes szegregáció érdekében a transzformált telepek megnövelt antibiotikum koncentráció mellett (50 µg / mL) nőttek, és folyékony BG-11 táptalajra kerültek.

3.2.2. A NiCoZia (Δ*nrsRSBACD:*Δ*coaRT:*Δ*ziaAR) és a* Δ*hliB* törzs tervezése, valamint létrehozása

Készítettünk egy mutánst, ahol a fentebbiekben már részletesen tárgyalt HM exportért felelős génklasztert egy Spec rezisztencia kazettával (Sp-R) helyettesítettük. Munkánk során egy inszertet építettünk be a pUC19 vektorba PCR-rel amplifikált fragmensekből a *ziaR* (*Pst*I, *Xba*I), *nrsS* (*Kpn*I, *Eco*R) disztális végeinek restrikciós helyeivel, melyhez *Synechocystis* genom DNS-t és Sp-R (*Xba*I, *Kpn*I) használtunk fel (lásd 2. táblázat). A Sp-R -hoz a pDF trc (Guerrero és mtsai., 2012) vektort használtuk fel sablonként (6. ábra).



6. ábra: A NiCoZia törzs létrehozásához használt klónozási stratégia sematikus ábrázolása. Az ábra felső része a pUC19 plazmid térképét mutatja az nrs-SpR-zia fragmenttel. Az ábra alsó része a HM klaszter és a homológ régiók felépítését mutatja.

Készítettünk egy Δ*hliB* mutánst, ahol a *hliB* (*ssr2595* vagy *SGL_RS06470*) gént Sp-R-rel helyettesítettük. A *Synechocystis* genomi DNS-t és a pND6LuxAB vektort templátként használva, PCR-rel amplifikált fragmentumokból összeállított inszertet építettünk be a pUC19 vektorba (7. ábra).

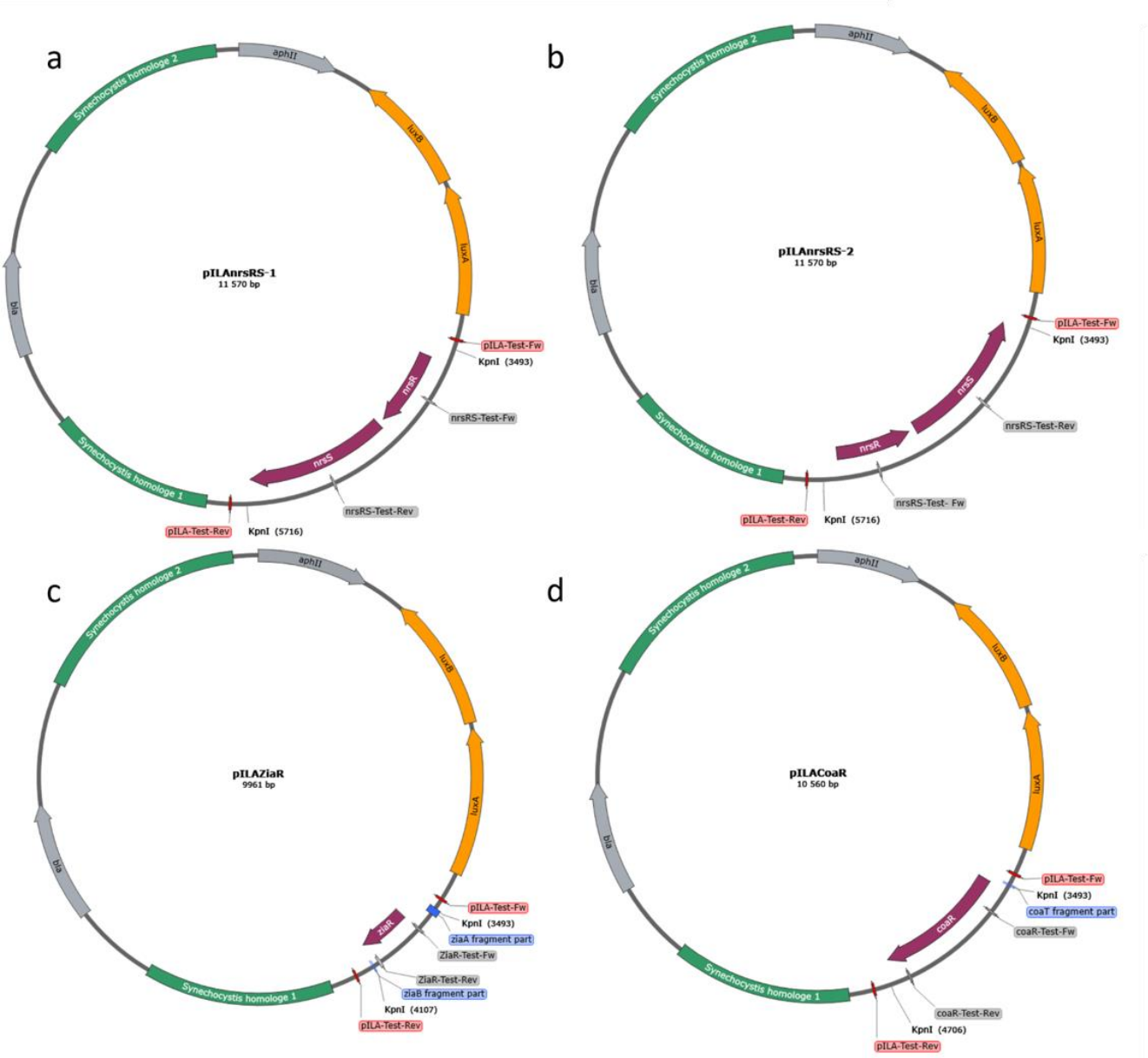
A plazmidokat *E. coli*-ban amplifikáltuk, majd WT *Synechocystis*-be transzformáltuk. A létrejött mutánsokat 50 µg mL^{-1} Spec-t tartalmazó szelektív BG-11 lemezen növesztettük.

7. ábra: A Δ*hliB* törzs létrehozásához használt klónozási stratégia sematikus ábrázolása. A pUC19 plazmidtérképe a *hliB* (*ssr2595*) és Sp-R fragmenssel.

3.2.3. A *Synechocystis* PCC 6803 pILA*coaR*; pILA*nrsRS*; pILA*ziaR* bioriporter törzsek előállítása WT és NiCoZia törzsekből

A HM bioriporter törzsek előállításához a pILA promóter próbavektort (Kunert és mtsai., 2000) használtuk, mely LuxAB lumineszcencia riporter rendszerrel bír. A *coaR* inszertet; valamint a *ziaR* és *nrsS* + *nrsR* (röviden: *nrsRS*) promóterrégiót PCR-rel amplifikáltuk, templátként a WT *Synechocystis* kromoszómális DNS-ét és a megfelelő primerpárt használtuk mindkét primer 5' végén egy *Kpn*I hasító hellyel (2. táblázat). A promóter fragmentumokat inszertáltuk a pILA egyedi *Kpn*I vágóhelyére. A megfelelő orientációjú *E. coli* transzformánsokat kolónia-PCR-rel választottuk ki teszt primer párok felhasználásával (2. táblázat). Az újonnan létrehozott pILA*coaR*, pILA*ziaR* és pILA*nrsRS*-1 és pILA*nrsRS*-2 plazmidokat (8. ábra) amplifikáltuk és *E. coli*-ból izoláltuk. A vad típusú és NiCoZia

Synechocystis törzseket transzformáltuk (Kunert és mtsai., 2000), és a klónokat Km szelekcióval szelektáltuk a fent leírtak szerint.



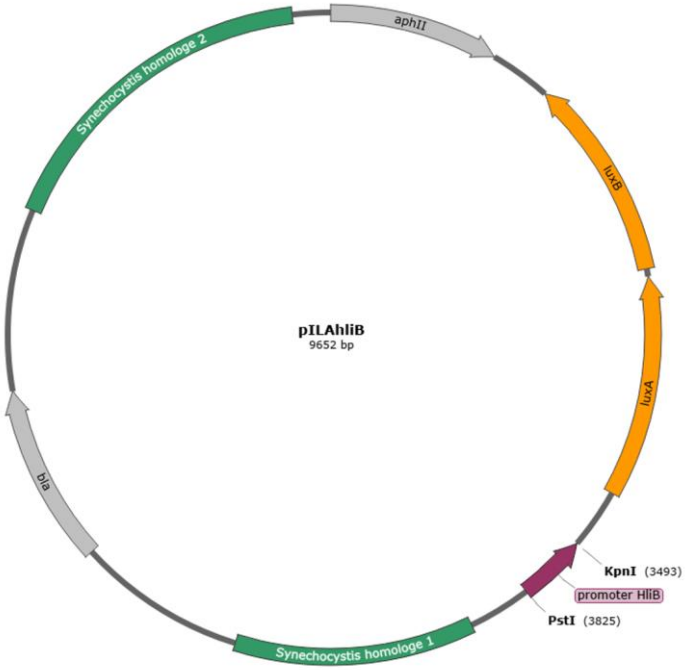
8. ábra: A promóter próba vektorok sematikus ábrája. A pILA promóter próba vektor sematikus ábrája (Kunert és mtsai., 2000) a *coaR* (d), *ziaR* (c) és a két eltérő orientációjú *nrsRS* (a; b) inszertekkel. A megfelelő primereket (2. táblázat) használtuk a WT *Synechocystis* genomból származó fragmentumok amplifikációjához, és *Kpn*I emésztést alkalmaztunk. A *luxA* és *luxB* gének kódolják a luciferáz riporter fehérjéket, amelyek szükségesek a kimutatáshoz. Az *aphII* és *bla* olyan génekre utalnak, amelyek rezisztenciát biztosítanak ampicillinnel (aphII) és Km-nel (bla) szemben.

2. táblázat: A munkánk során felhasznált oligonukleotidok

primerek jelölése	oligonukleotid szekvecia
nrsS-Frg-Fw	5’TTGAATTCGTAACTGGATGGTGAATAAACTTCCCTT
nrsS-Frg-Rev	5’TTGGTACCTACGGATTTATTGCTACTAAGTCGCTTA
ziaA-Frg-Fw	5’TTTCTAGAGAGACCTAAAACGCATGGGAGTTGAAAA
ziaA-Frg-Rev	5’TTCTGCAGCTTAGCAATCCGAGTAGCATTCAAAATC
SpecR-XbaI	5’TTTCTAGACCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAG
SpecR-KpnI	5’TTGGTACCATGTATGCTCTTCTGCTCCTGCCGGCCGA
CoaR-pILA-Fw	5’AAAAAGGTACCTTCACCATCCTTTCCCTATC
CoaR-pILA-Rev	5’AAAAAGGTACCACCTTCTCAGCCTAAACC
CoaR-Test-Fw	5’CAGGGCTTTCAGTTGTCT
CoaR-Test-Rev	5’GGTGATATGGGGAATGGG
NrsRS-pILA-Fw	5’AAAAAGGTACCGACGGCGTAAAGTTGATAAA
NrsRS-pILA-Rev	5’AAAAAGGTACCTCCCCCGCTAAGATCAGA
NrsRS -Test-Fw	5’TATTAGCAAGACTGCGGG
NrsRS-Test-Rev	5’TGTTGTTGTTGTTGGTAGG
ZiaR-pILA-Fw	5’AAAAAGGTACCCATCGTCCATCTCCTTAATC
ZiaA-pILA-Rev	5’AAAAAGGTACCCCGACTTGCATTTGCTGA
ZiaR-Test-Fw	5’TCCTAACGCCAACCTCTA
ZiaR-Test-Rev	5’CCCGATACAAATTCATCACA
pILA-Test-Fw	5’ACAACCAAATTTTCCCCAAG
pILA-Test-Rev	5’TCGATAGTGGCTCCAAGT
prom-ssr2595-pILA-Fw	5’AAAACTGCAGCGCACTTCTGGTCAGTTT
prom-ssr2595-pILA-Rev	5’AAAAGGTACCGTTGATCTCCTTGATTGGGT
pssr2595_PstI_F	5’ AAAACTGCAGCGCACTTCTGGTCAGTTT
pssr2595_KpnI_R	5’ AAAAGGTACCGTTGATCTCCTTGATTGGGT
pUC19fw	5’ AAGGATCCCCCAACATTAAGGCACTA
pUC19rev	5’ AAAAAAGCTTCAACGACTTTTCTCTCCA
2595Sp-R_Fwd	5’cctaggcaagCAATTCGTCCACCAACAAAAAGCTCCATTGCAGGAACAAAAACAG
2595Sp-R_Rev	5’cggcgtattCAGTCCAACCGGCTTGAACACTGCTGGCAAAAGCCAATGAGTGTA
Δ2595_confirm_F	5’TCACAACCCTTCTCATCC
Δ2595_confirm_R	5’CTAAACCGTCAATTTCCC
rrn16Sa.fas-914F	5’ CAACGCGAAGAACCTTACCAA
rrn16Sa.fas-1048R	5’ CTGCGGAAACGTGGGAGTGCCT
hliBssr2595_qPCR_F	5’ GTCTCAACAACTTCGCCA
hliBssr2595_qPCR_R	5’ CAAGAGAGAAACAAAGCCAA
slr1544 Fw	5’ACGCCGACACTGATA
slr1544 Rev	5’TTGCCCAGTTGCTTATC
hliA ssl2542 Fw	5’AATAAGGAGGGAGGCAAAAC
hliA ssl2542 Rev	5’ACAACCGTCTCAACAACT
hliC ssl1633 Fw	5’GATCAGGGCAGAGGAAAA
hliC ssl1633 Rev	5’ACATAGACAACCCTCCCA
hliD ssr1789 Fw	5’ACTACAACCGAACCAAAC
hliD ssr1789 Rev	5’ACCAGGATGAGGAGAAAT
sll0846Fw	5’TTTCCCTCGAGTCTCTCT
sll0846Rev	5’TTCCTGCTTGGTTGTCTT
sll1483Fw	5’AACCACCGAAAAATCTGC
sll1483Rev	5’CTTCACCGGATTGAACCT
ssr2016Fw	5’CGTTATCTTGGTTCGTCA
ssr2016Rev	5’GTTTTGCCGTTGGACTTA
ssr6062Fw	5’GTGGCCTACCCATAAACAA
ssr6062Rev	5’GTAAAAATCCAGCGGCAA
Thrc1Fw	5’GCCGCGTTTGAAATTGTT
Thrc1Rev	5’ATTCCCCATTACTTTCCCT
coaT_Fw	5’CAAAATCCATCAACCCCC
coaT_Rev	5’AAGCCACCACGAGAAAAA
slr7008Fw	5’AGCAGTAATGGATAGAGG
slr7008Rev	5’GGCAATCAGTCTATTCAG
hspAFw	5’AAGAAGTTTTTGTCCCTACG
hspARev	5’CTTCTGTGTTTTGGATTGCT
SigDFw	5’ACCTACTTGACCTCATCC
SigDRev	5’TCCAAATATTCCCGCACT

3.2.4. A *Synechocystis* PCC 6803 pILA*hliB* bioriporter törzs előállítása WT-ból

Az *hliB* (*ssr2595*) promótert tartalmazó bioriporter törzsek előállításához, hasonlóan a HM szenzorok előállításához felhasznált vektorhoz, a pILA promóter próbavektort (Kunert és mtsai., 2000) használtuk. A vektor LuxAB lumineszcencia riporter rendszert használ. Az *hliB* gén előtti promóter régiót PCR-rel amplifikáltuk, templátként a WT *Synechocystis* kromoszómális DNS-ét és a megfelelő primerpárt használtuk, a forward primer 5' végén *Pst*I, míg a reverz primer 5’ végén egy *Kpn*I hasító hellyel (2. táblázat). A 346 bp-os promóter fragmentumot inszertáltuk a pILA *Pst*I és *Kpn*I vágóhelyének hasításával. A megfelelő *E. coli* transzformánsokat kolónia-PCR-rel ellenőriztük a teszt primerpár (2. táblázat) felhasználásával. Az újonnan létrehozott pILA*hliB* plazmidot (9. ábra) amplifikáltuk és *E. coli*-ból izoláltuk. A vad típusú *Synechocystis* törzset transzformáltuk (Kunert és mtsai., 2000), és a klónokat Km szelekcióval szelektáltuk a fent leírtak szerint.



9. ábra: A pILA vektor sematikus ábrája (Kunert és mtsai., 2000) az *ssr2595*-ös (*hliB*) gén promóterét tartalmazó inszerttel, melynek eredménye a pILA*hliB* promóter próba vektor. A megfelelő primereket (2. táblázat) használtuk a WT *Synechocystis* genomból származó fragmentum amplifikációjához, és KpnI -PstI emésztést alkalmaztunk. A *luxA* és *luxB* gének kódolják a luciferáz riporter fehérjéket, amelyek szükségesek a kimutatáshoz. Az *aphII* és *bla* olyan génekre utalnak, amelyek rezisztenciát biztosítanak ampicillinnel (aphII) és Km-nel (bla) szemben.

3.3. Génexpressziós vizsgálatok

3.3.1. RNS izolálás és tisztítás

RNS izolálásához mintánként 15 mL sejttenyészetet használtunk. A mintákat azonos térfogatú, 5% fenolt (v/v) tartalmazó etanolban fixáltuk és centrifugáltuk (10000 g, 10 min, 4 C°). Az így ülepített sejteket 500 µL reszuszpenziós pufferben (0.3 M szacharóz, 10 mM NaOAc, pH 4.5) mostuk, amit újabb centrifugálás (13000 g, 5 min, 4 °C) és a felülúszó eltávolítása után 250 µL reszuszpenziós puffer hozzáadása követett. Ehhez az elegyhez 37,5 µL EDTA-t (0,5 M) adtunk és háromszor ismételt fagyasztás-felolvasztási ciklusnak (-80/+4 °C) vetettük alá. Az így roncsolt sejtfalú sejtek elegyéhez 375 µL lízis puffert adunk (2% (m/v) nátrium-dodecil-szulfát (SDS), 10 mM NaOAc, pH 4.5) és ebből forró-fenol módszerrel tisztítottunk össz-RNS-t (Mohamed & Jansson, 1989). Ehhez 65 °C-ra melegített vízfürdőben kevertük óvatosan a mintákat, a szintén 65 °C-ra hevített, 700 µL vízzel telített fenollal. Ezt 3x3 percig ismételtük, majd minden alkalommal a folyamat végén 2 perces jegelés következett, ezután pedig centrifugáltuk (13000 g, 5 min, 4 °C) a mintákat, a felülúszókat pedig új csövekben, újabb adag fenollal keverve ismételtük meg a folyamatot. Egy utolsó lépésben a felülúszóhoz 700 µL kloroformot adtunk az esetleges fenol maradványok eltávolítására, óvatosan kevertük és centrifugáltuk (13000 g, 5 min, 4 °C). Az így kapott felülúszóhoz az RNS kicsapódását elősegítve LiCl-ot (2 M) adagoltunk és legalább 30 percig inkubáltuk -20 °C-on. Inkubálás után a jégen felolvasztott minták centrifugálásával (20000 g, 60 min, 4 °C) ülepítettük a nukleinsavakat, majd pedig 400 µL 70%-os etanollal mostuk, melyet újbóli centrifugálás követett (20000 g, 15 min, 4 °C). A felülúszótól megszabadulva a mintát szobahőmérsékleten szárítottuk és MilliQ vízben vettük fel.

A mintát, RNS koncentrációjának meghatározása után (ND-1000, Nanodrop Technologies) a DNS eltávolítása érdekében DNáz enzimmel történő kezelésnek vetettük alá (Turbo DNA-Free Kit, Biolabs), jellemzően a következő kísérleti felállásban: 43,9 µL minta, 5 µL DNáz puffer, 1 µL DNáz, 0,1 µL RNáz gátló enzim (Invitrogen). Az így összeállított elegyet 1 órán keresztül, 37 °C-on inkubáltuk, majd 5 µL inaktivációs reagenssel keverve (10 min, 25°C) leállítottuk a reakciót. A mintát centrifugáltuk (10000 g, 10 min, 4 °C), a felülúszóból pedig megmértük a tiszta RNS koncentrációját. Ennek alapján állítottuk össze a reverz transzkripciós elegyet, amely reakciótérfogata 10 µL volt: 1 µL (500 ng) RNS minta, 4 µL 5x reverz transzkripciós puffer, 2 µL dNTP mix (10 mM), 1 µL 10x random primer, 1 µL

reverz transzkriptáz, 1 µL RNáz gátló enzim (Ribolock) (FIREscript cDNA Reverse Transcription Kit, Solis Biodyne).

3.3.2. Teljes transzkriptom analízis

Az RNS minták koncentrációját Qubit 4 Fluorométer (Thermo Fischer), valamint Bionalyzer (RNA 6000 Nano) eszközökkel újraellenőriztük, majd a cDNS-könyvtárakat 0,5 µg teljes RNS-ből állítottuk elő NEBNext rRNA depletion Kit for Bacteria #E7850, #E7860 (New England Biolabs) segítségével, a 2-es protokoll (Protocol for Library Preparation of Intact RNA using NEBNext rRNA Depletion Kit (Bacteria) and NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina) alapján. A szekvenálást Illumina platformon keresztül végeztük el.

3.3.3. qPCR protokoll

A génexpresszió további vizsgálatához a transzkriptom analízis során felhasznált tisztított RNS mintákat felhasználva reverz transzkripciós reakcióban komplementer DNS-t (cDNS) szintetizáltunk. Az így kapott cDNS-t qPCR reakcióban használtuk templátként és a felszaporodó amplikonok C_T értékét a 16S riboszómális RNS-t kódoló *rrn16Sa* gén C_T értékeihez viszonyítottuk. Ez utóbbit, konstitutív kifejeződése révén, kontroll génként használtuk. Ezen felül az ábrákon látható transzkript szintek értékei a kezeletlen minták C_T értékeire vannak normálva. A qPCR reakciókhoz a reakciók térfogata 5 µL volt, amit 1 µL 5 X HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne), 0,1 µL cDNS minta, 3,8 µL MilliQ víz, 0,1 µL génspecifikus primer vegyület (5 pmol/µL) alkotott. A kapott C_T értékeket a Bio-Rad CFX Maestro 1.1 szekvencia detekciós szoftver segítségével nyertük ki és értékeltük.

3.4. Bioluminescencia mérés

A kezeléseket 96 lyukú fekete (Perkin-Elmer Opti-Plate) sejttenyésztő lemezen hajtottuk végre, alacsony autofluoreszcenciával, 25 °C-on. Minden lyuk 300 µL log fázisú kezelt cianobaktérium sejtkultúrát (OD_{720} 0,8-1) tartalmazott. A lemezeket lyukasztott átlátszó fóliával borítottuk be (Peca és mtsai. 2008). A kezelés után 6 µL 50 mM decanalt adtunk 50%-

os metanolban oldva a lyukakba helyezett mintákhoz. A dekanál a 300 µL cianobakteriális és nehézfémsó oldatban, így 1 mM végkoncentrációban volt jelen (Kunert és mtsai., 2000). A szubsztrát hozzáadása után a mintákat 2 percig sötétben előinkubáltuk a lumineszcencia mérés előtt. A vizsgálatokat négy párhuzamos mintával végeztük. A lumineszcenciát Top Count NXT luminométerrel (Packard Instruments) határoztuk meg, beütés per másodperc (CPS) értékkel.

3.5. Növekedésgörbék összehasonlítása

A WT és NiCoZia cianobaktérium kultúrákban a fémionok intracelluláris felhalmozódása által okozott növekedési különbségeket úgy számszerűsítettük, hogy az optikai denzitást 2–4 napig 680 nm-en és 720 nm-en mértük 30-40 µmol foton m^{-2} s^{-1} fényintenzitáson és 30 °C hőmérsékleten. A starter *Synechocystis* kultúra optikai sűrűségét minden mérésnél azonos kiindulási értékre állítottuk (OD_{720} 0,15), és nehézfémsót adtunk hozzá 8 különböző koncentrációban (0 µM; 0,05 µM; 0,1 µM; 0,25 µM; 0,5 µM; 1 µM; 2,5 µM; 5 µM) 50 mL végtérfogatban. Két paramétert határoztunk meg minden fémion esetében: minimális gátló koncentráció (IC_{min}) és maximális gátló koncentráció (IC_{max}). Az IC_{min} a legalacsonyabb tesztelt koncentrációra utal, amely növekedésgátlást eredményez, az IC_{max} pedig a legmagasabb tesztelt koncentrációra utal, ahol teljes növekedés gátlást észleltünk.

A WT és Δ*hliB* cianobaktérium tenyészetekben a $^1O_2$ felesleg által okozott növekedési intenzitásbeli különbségeket úgy határoztuk meg, hogy az optikai denzitást 680 nm-en mértük 40 µmol foton m^{-2} s^{-1} fehér fényintenzitással (LL) vagy 200 µmol foton m^{-2} s^{-1} fehér fényben (HL) 30 °C hőmérsékleten 4 napig. A starter *Synechocystis* tenyészet optikai sűrűségét OD_{720} 0,15-re állítottuk 50 mL végtérfogatban, majd LL és HL körülmények között neveltük, megfelelő fotoszenzitizátor festék (Mb vagy Rb) hozzáadásával vagy anélkül 0,5 µM-os koncentrációban. A méréshez egy foto-multikultivátor MC-1000 (Photon Systems Instrument) készüléket használtunk óránkénti automatikus OD protokollal.

3.6. Az intracelluláris HM koncentráció meghatározása

Az intracelluláris kobalt-, cink- és nikkeltartalmat a WT és a NiCoZia *Synechocystis* törzsekben határoztuk meg, melyek a bioriporter törzsek alapjául szolgáltak. A sejtkultúrákat a kontroll (0 μM hozzáadott nehézfémsó) mellett 5 μM nehézfémsóval kezeltük; $ZnSO_4$; $CoCl_2$ vagy $NiCl_2$ –al a fentiek szerint, 3 órás inkubálás után centrifugálással (6000 rpm 10 perc) gyűjtöttük össze, majd BG-11 oldattal mostuk és fagyasztva szárítottuk. 50 mL-es tenyészetekből 40 ± 5 mg nedves tömegű sejtpelletet tudtunk kinyerni, amelyből 5 ± 1 mg száraz anyagot lehetett nyerni. A minták HM tartalmát a korábban már leírtak szerint határoztuk meg (Blasi és mtsai., 2012).

3.7. Adatelemzés és ábrázolás

A kísérleteink eredményeit Microsoft Office Excel 2016 táblázat kezelő program, valamint OriginPro 2021b adatelemző program segítségével értékeltük ki. A molekuláris biológiai munkák *in silico* tervezése és a teljes transzkriptom adataink elemzését CLC Genomics Workbench 20.0.2 program segítségével hajtottuk végre.

A molekuláris biológiai elemek vizualizációját SnapGene Viewer program segítségével készítettük el. Az egyéb magyarázó és folyamatábrákat a Biorender.com online ábraszerkesztő program segítségével készítettük. A 22. ábra az UpSet 2.0 elnevezésű Venn-diagram vizualizációs program segítségével készült (Lex és mtsai., 2014).

A statisztikai analízishez Student féle t-próbát használtunk, ahol a kapott eredmények $P \leq 0,05$ (*), 0,001 (**), vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól.

4. Eredmények és kiértékelésük

4.1 Nehézfém bioriporterek érzékenységének növelése

4.1.1. Növekedési sebesség különbségek a NiCoZia (Δ*nrsRSBACD:*Δ*coaRT:*Δ*ziaAR)* törzs és WT törzs között

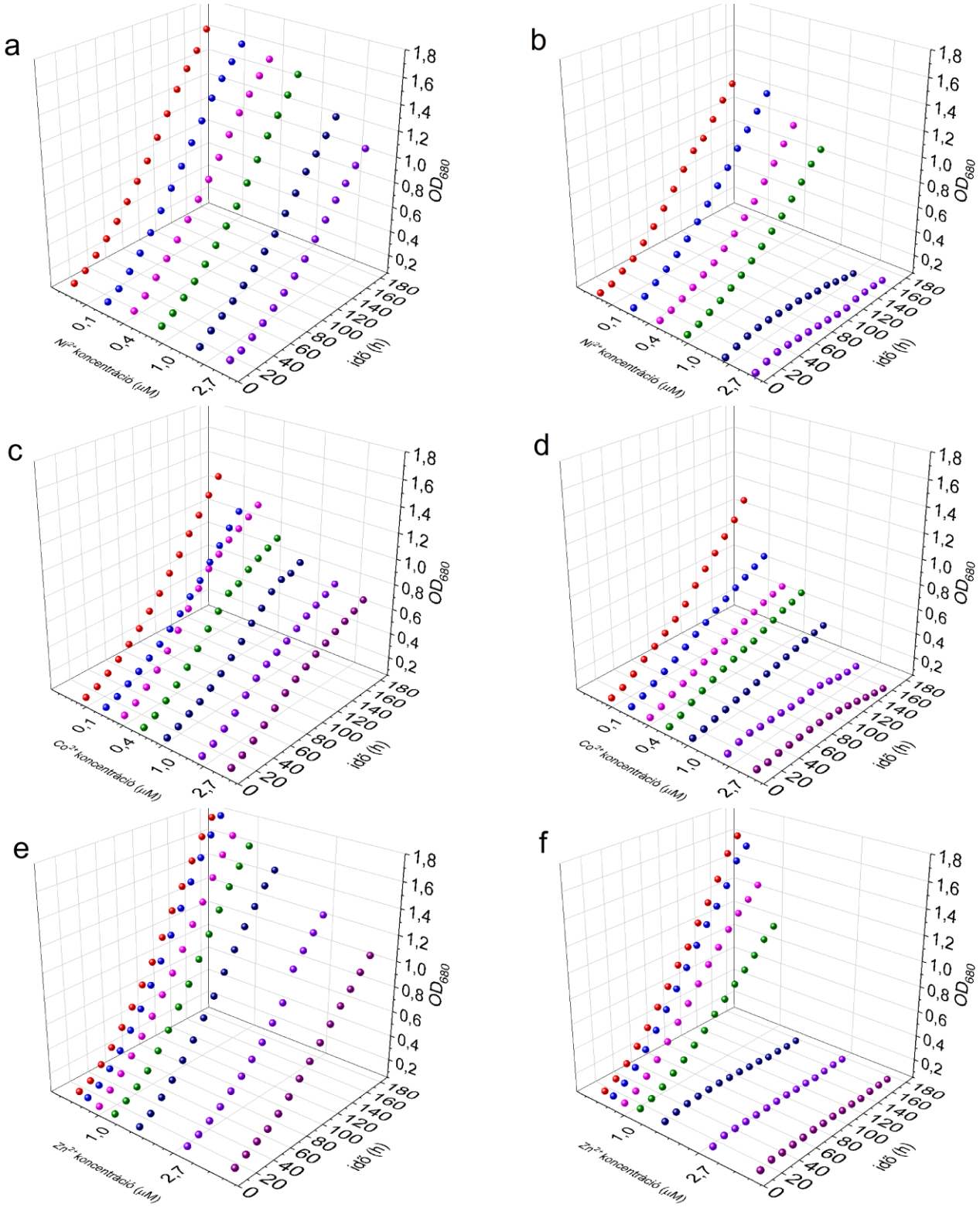
Először azt vizsgáltuk, hogy a *Synechocystis* genomjából a HM-specifikus klaszter eltávolítása milyen hatással van a tenyészetek növekedésére. Ennek okán a WT és NiCoZia sejteket 98 órán át $CoCl_2$, $ZnSO_4$ és $NiCl_2$ –al kezeltük, 8 különböző koncentrációban (0 μM; 0,05 μM; 0,1 μM; 0,25 μM; 0,5 μM; 1 μM; 2,5 μM; 5 μM), és egyidejűleg mértük 680 nm-en a sejtkultúrák OD-ját. Összeségében elmondható, hogy a WT gyorsabb növekedést mutatott a mutánshoz képest, még HM-hozzádása nélkül is, kontroll körülmények között (10. ábra). Ez a jelenség megfelelt a várakozásainknak, hisz az HM exportért felelős gének kiütésével gyengült a cianobaktérium sejtek HM-ekkel szembeni ellenálló képessége. A kiütött transzporterek és szabályozó faktorok hiánya felborította a sejtek HM transzportját.

A növekvő Co^{2+}-tartalom a vizsgált koncentráció tartományban egyre kifejezettebb növekedésgátlást eredményezett a NiCoZia törzsben, ami 2,5 μM és 5 μM mellett elérte a sejteknél a teljes növekedési leállást. A WT törzsben a növekedésgátlás szintén koncentrációfüggő volt, de sokkal kevésbé kifejeződő (10. c, d. ábra).

A 0,25 μM és az annál nagyobb Zn^{2+} koncentráció súlyos növekedés gátlást okozott a NiCoZia törzsben, míg ezen koncentrációk esetén a WT-ban enyhe volt a gátlás. A WT esetén súlyos gátlás 1 μM Zn^{2+}-től volt megfigyelhető (10. e, f ábra).

A Ni^{2+} alacsony koncentrációban nem okozott súlyos növekedésgátlást a NiCoZia törzsben, de a teljes növekedés leállás 2,5 μM és 5 μM mellett bekövetkezett, míg ugyanezen koncentrációknál csak enyhe növekedésgátlás volt megfigyelhető a WT törzsben (10. a, b ábra).

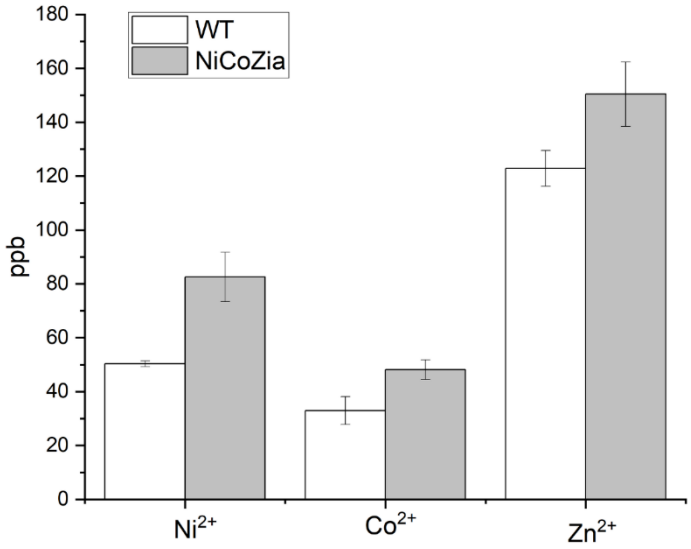
A növekedésbeli különbségek hátterében a baktérium sejt intracelluláris HM tartalmának felborulását sejtettük, mely megmagyarázza a HM-ek jelenlétében tapasztalt lassú növekedést vagy a teljes növekedésgátlást.



10. ábra: A WT (a, c, e) és NiCoZia (b, d, f) S*ynechocystis* sejtvonalak növekedési görbéi Ni^{2} (a;b); Co^{2+} (c;d) és Zn^{2+} (e;f) HM-ek eltérő koncentrációban való jelenlétében. A BG-11 tápoldatban nevelt *Synechocystis* tenyészetek növekedése 0 µM; 0,05 µM; 0,1 µM; 0,25 µM; 0,5 µM; 1 µM; 2,5 µM és 5 µM fémsó hozzáadását követően, OD_{680} mérésével nyomon követve.

4.1.2. Intracelluláris nehézfém tartalom

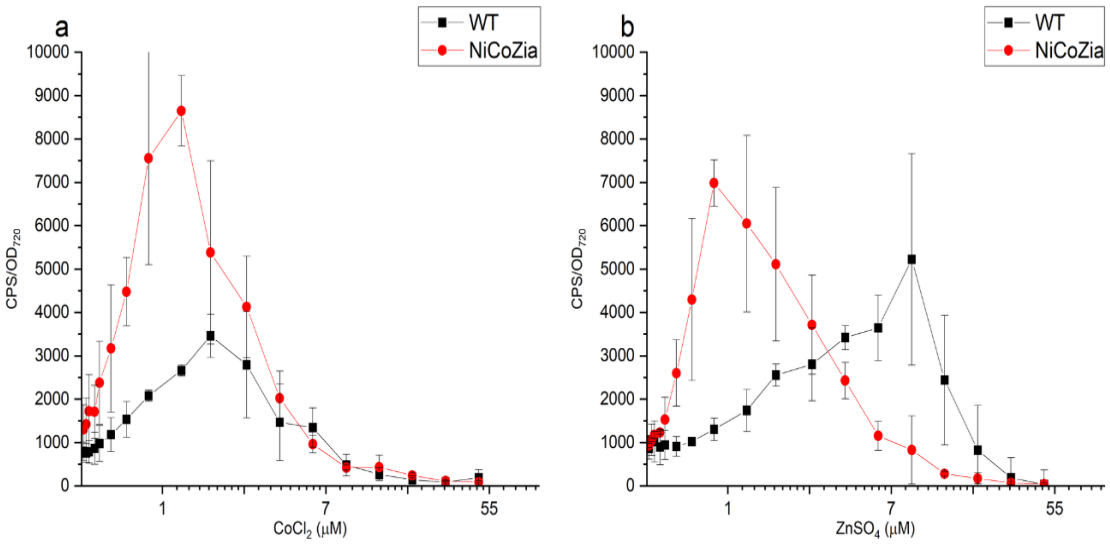
A növekedésgörbék elemzésével arra a következtetésre jutottunk, hogy a *coa, zia* és *nrs* gének által kódolt kation kiáramlási rendszerek hiányában az intracelluláris HM-koncentráció magasabb, mint a vad típusban. Ennek tisztázása érdekében az intracelluláris HM-tartalmat ICP-MS segítségével megmértük mind a WT, mind a NiCoZia törzsekben 3 órás kobalt-, nikkel- és cinkkezelés után. A BG-11 tápoldatot 5 µM HM-el egészítettük ki, majd ezek intracelluláris HM-koncentrációit összehasonlítottuk a kezeletlen mintákkal. Az adatok egyértelműen azt mutatták, hogy a NiCoZia törzs több HM-et halmoz fel a sejten belül, mint vad típusú társa. Ez a jelenség mindhárom vizsgált HM-nél nyilvánvaló volt, a legnagyobb akkumulációs különbséget a nikkelnél figyeltük meg (11. ábra), ahol a nikkel-kezelt NiCoZia törzsben körülbelül 40%-os növekedést figyeltünk meg az intracelluláris nikkelkoncentrációban. A mutáció körülbelül intracellulárisan 20%-os Zn^{2+}- és szintén körülbelül 20%-os Co^{2+}-tartalom növekedéséhez vezetett a WT-hez képest, ami megfelel a várt, HM export rendszert kódoló, kiütött régióval kapcsolatos hatásokkal szembeni elvárásoknak.



11. ábra: Az intracelluláris Co^{2+} Ni^{2+} és Zn^{2+} tartalom WT és NiCoZia mutáns *Synechocystis* sejtekben. 3 órás, 5 µM HM-el történő kezelést követően, 30 µmol foton m^{-2} s^{-1} fényintenzitás mellett, 25 ºC hőmérsékleten. A HM-tartalmat ICP-MS méréssel határoztuk meg és ppb-ben (parts per billion) adtuk meg. (Átlag+SE, n=3)

4.1.2. WT-pILACoaR és NiCoZia-pILACoaR bioriporter törzsek Co^{2+} és Zn^{2+} nehézfémekre való érzékenységének összehasonlítása

Célunk az volt, hogy csökkentsük a bioriporterek detekciós határait, vagyis olyan fenotípust kapjunk, amely a vad típusú cianobaktériumnál kisebb extracelluláris koncentráció mellett is képes az adott anyag kimutatására. Ezért először a WT és NiCoZia törzsekből származó *coaR* (Co^{2+} és Zn^{2+} érzékeny) promóter vezérelt biolumineszcens pILAcoaR *Synechocystis* bioriporter törzsek lumineszcenciáját különböző kobalt- vagy cink koncentrációk mellett értékeltük. Így meghatározhattuk és összehasonlíthattuk érzékenységüket és specificitásukat az adott HM-re. Ahogy az várható volt, a HM-kezelések során a NiCoZia genomi hátterű bioriporter törzs nagyobb érzékenységet mutatott a kobaltra. A maximális lumineszcenciát 3 µM kobalt koncentrációnál találtuk WT-ben. Míg a maximális lumineszcencia válasz 1 µM kobalt koncentrációnál volt megfigyelhető a NiCoZia-ban. Sőt, míg a Co^{2+}-érzékenység körülbelül háromszorosára nőtt (12. a ábra), addig a Zn^{2+}-érzékenység növekedése körülbelül tízszeres volt. A bioluminescencia válasz maximumát 7 és 10 µM cink koncentráció körül találtuk WT-ben és ez az érték 1 µM-ra változott a NiCoZia-ban (12. b ábra).

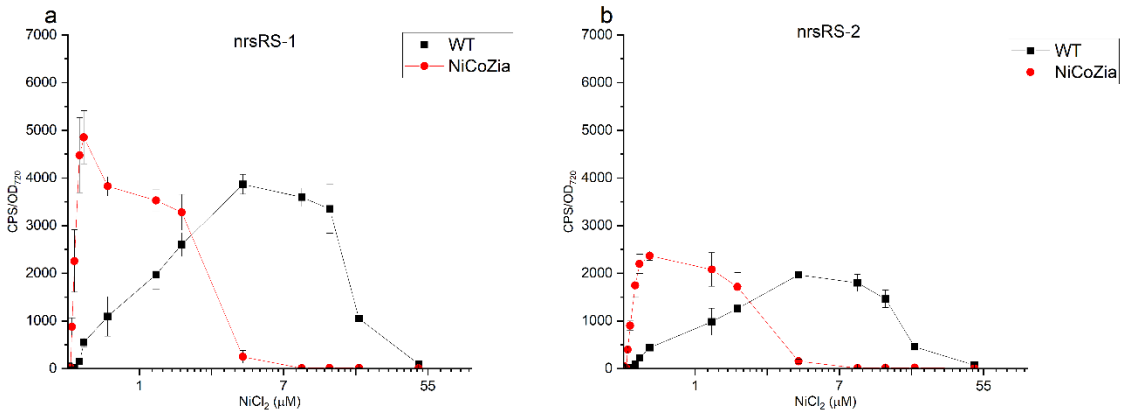


12. ábra: A pILACoaR WT és a pILACoaR NiCoZia $CoCl_2$ (a) és $ZnSO_4$ (b) biolumineszcens válasza. A sejteket 3 órán át inkubáltuk BG-11 tápoldatban, különböző koncentrációjú (48 µM tól 30 nM-ig) nehézfémsókkal kezelve. A bioluminescenciát a korábbiakban leírtak szerint mértük. (Átlag+SE, n=3)

4.1.3. WT-pILAnrsRS-1 és NiCoZia-pILAnrsRS-1 bioriporter törzsek Ni^{2+}-re való érzékenységének összehasonlítása és a pILAnrsRS-1 és pILAnrsRS-2 promóter irányultság indukciós különbsége

A pILAnrsRS promóter által szabályozott konstrukcióval rendelkező WT törzs 0,2 µM és 50 µM nikkelkoncentráció közötti lumineszcenciát mutatott. Az azonos konstrukcióval rendelkező NiCoZia bioriporter törzsben ez a tartomány körülbelül tízszer alacsonyabb koncentráció tartományba (0,05-50 µM $NiCl_2$) tolódott el a WT-hoz képest (13. ábra). A maximális indukció 0,2 µM $NiCl_2$-ra változott (a mutánsban) 4 µM $NiCl_2$-ról (a WT-ben megfigyelt).

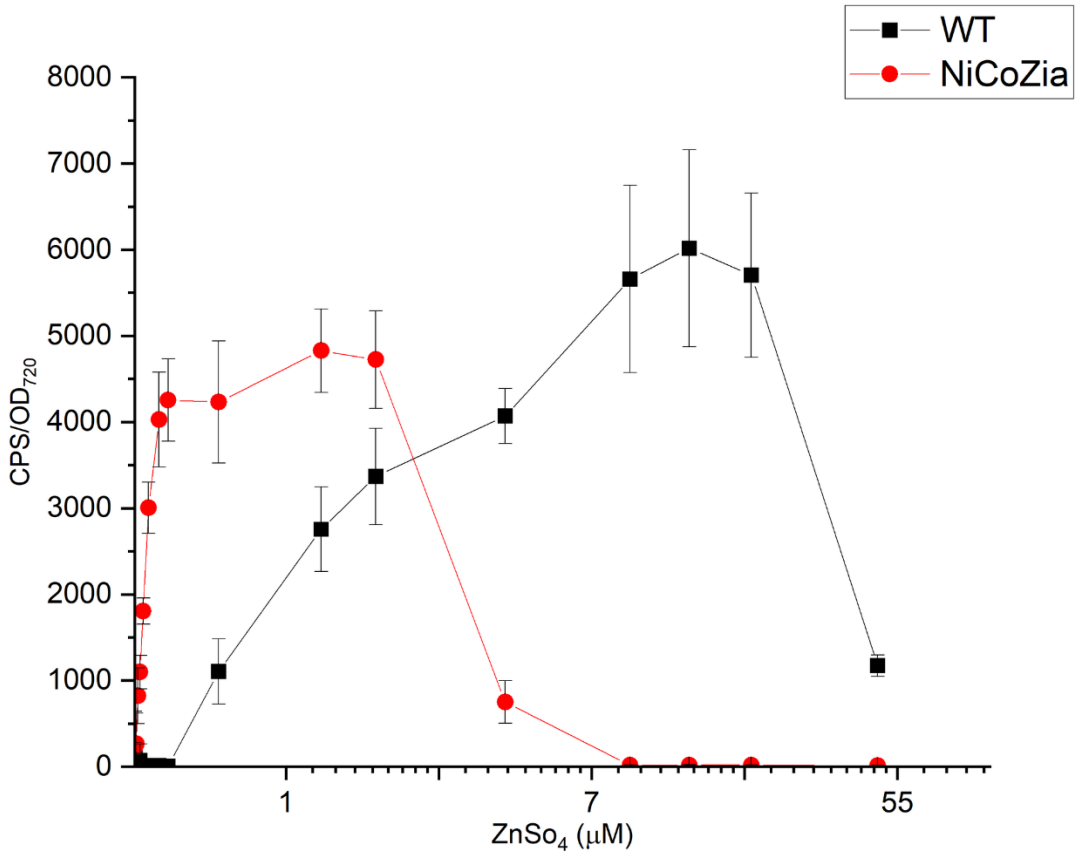
Tekintettel arra, hogy ezeknek az operonoknak kétirányú promótereik vannak, úgy gondoltuk, érdemes lehet megvizsgálni, hogy a promóter melyik irányát érdemes alkalmazni a *lux* gének esetében ahhoz, hogy az általunk kitűzött célok megvalósítására a konstrukció a lehető legalkalmasabb legyen. Ehhez a vizsgálathoz az *nrs* promótert választottuk. A promótert és az *nrsRS* génpárt tartalmazó inszertet mindkét orientációban klónoztuk: az első orientációban (nrsRS-1) a promóter közvetlenül a *luxA* gén előtt helyezkedik el (upstream irányban), hasonlóan ahhoz, ahogyan a *Synechocystis* genomjában az *nrsB* géntől felfelé orientálódik. A második, ellentétes orientációban (nrsRS-2) a *luxA* gén az *nrsR*-től és az *nrsS* mögött található az inszert másik végén (downstream irányban) (8. a és b ábra). A WT és NiCoZia törzsek két konstrukcióját összehasonlítva egyértelmű, hogy az eredeti nrsRS-1 orientáció (13. a ábra) nagyobb lumineszcencia-indukciót fejt ki a nikkelkezelés során, mint az nrsRS-2 orientáció (13. b ábra). Az nrsRS-2 orientáció azonban nem elhanyagolható lumineszcencia-indukcióra képes. Igaz, az nrsRS-1 orientáció nagyobb indukciós hatásfoka esetünkben előnyösebb.



13. ábra: A pILAnrsRS konstrukciók biolumineszcens válaszai a két *nrsRS* promóter orientációban a WT és NiCoZia törzsekben. A sejteket 3 órán át inkubáltuk BG-11 tápoldatban, amelyet különböző koncentrációjú (30 nM-tól 48 µM-ig) nehézfémsóval egészítettünk ki. A biolumineszcenciát a korábban leírtak szerint mértük. (Átlag+SE, n=3)

4.1.4. WT-pILAziaR és NiCoZia-pILAziaR bioriporter törzsek Zn^{2+} nehézfémre való érzékenységének összehasonlítása

A *ziaR* promóterrel rendelkező bioriporter törzseket 0,015-50 µM $ZnSO_4$-dal kiegészített BG- 11 tápoldattal kezeltük 3 órán keresztül és a lumineszcencia-indukció különbsége (14. ábra) hasonló volt ahhoz, amit a *coaR* és *nrsRS* promóter vezérelt riporterrel kaptunk. A pILAziaR WT lumineszcens jelet mutatott a 0,5 - 50 µM $ZnSO_4$ koncentráció tartományban, a detekciós csúcsot a 14 µM-os $ZnSO_4$ kezelésnél érte el. Ez a konstrukció hasonlóan a többihez érzékenyebb a NiCoZia törzsben, mint a WT háttérben, nevezetesen indukciója 20 nM-tól kb. 5 µM $ZnSO_4$ koncentráció tartományig figyelhető meg, 1,5 µM $ZnSO_4$ kezelés körüli csúcsértékkel. Így a NiCoZia törzsben a konstrukció körülbelül 10-szer érzékenyebbnek bizonyult, mint a WT-ben, így akár 0,03 µM $ZnSO_4$ koncentráció kimutatására is használható. Ez az érték jóval alacsonyabb, mint a WT-ban mért 0,5 µM $ZnSO_4$ korábbi minimális kimutatási határa.



14. ábra: A pILAziaR WT és a pILAziaR NiCoZia biolumineszcens válasza $ZnSO_4$ kezelésre. A sejteket 3 órán át inkubáltuk BG-11 tápoldatban, amelyet különböző koncentrációjú (48 µM-tól 30 nM-ig terjedő) nehézfémsókkal egészítettünk ki. A biolumineszcenciát a korábban leírtak szerint mértük. (Átlag+SE, n=3)

Összességében mind a három vizsgált HM-nél sikerült a detekciós határt több nagyságrenddel lecsökkenteni a WT-hoz képest, amit az exportereket kódoló génszakasz kiütésén alapuló intracelluláris HM koncentráció növelésével értünk el a HM érzékeny NiCoZia törzsben.

4.2. Szinglet oxigén érzékeny gének azonosítása *Synechocystis*-ben

4.2.1. Génexpressziós változások exogén és endogén $^1O_2$ kezelések alatt

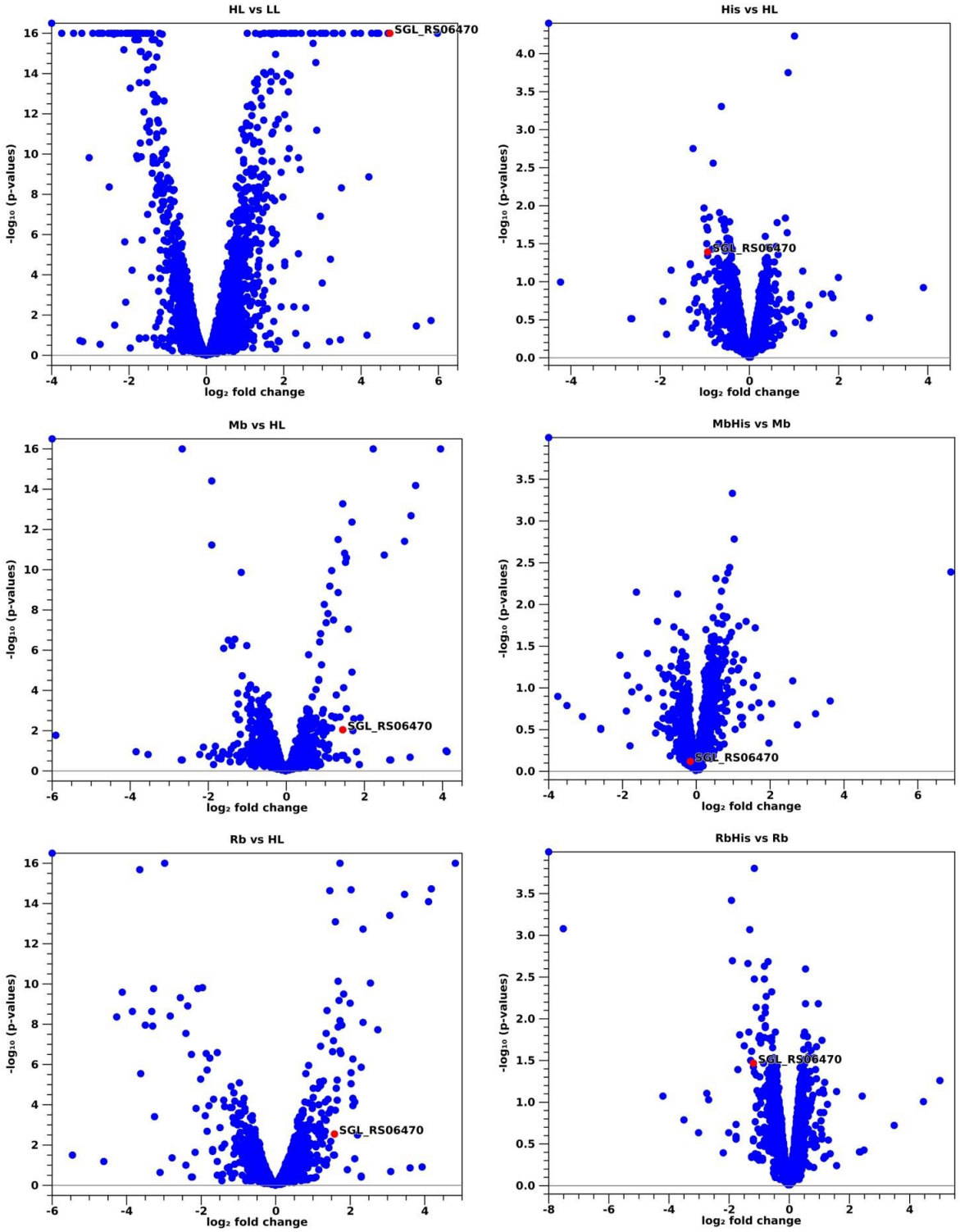
Egyik fő célunk $^1O_2$ specifikus gének azonosítása volt, melyek segítségével még többet tudhatunk meg a $^1O_2$-ről, mint jelátviteli molekuláról és annak szignalizációs útjairól, kölcsönhatásairól.

Ennek érdekében olyan kezeléseket hajtottunk végre, ahol mind az endogén úton keletkező $^1O_2$-nek (HL), mind pedig az exogén (fotoszenzitizátor festékkel generált) $^1O_2$-nek kitettük a baktérium sejteket. Ezzel olyan gének expressziós változását követhettük nyomon, melyek érzékenyek lehetnek a $^1O_2$-re. A His, mint $^1O_2$ kioltó vegyszer, alkalmazása indukciós kísérleteink alatt lehetővé tette, hogy a $^1O_2$-re indukálódó gének His visszagátlódása által meggyőződhessünk a gének $^1O_2$ hatására mutatott specificitásáról.

Fő szempontunk a teljes transzkriptom viszgálata során olyan gének azonosítása volt, melyek expressziója a HL kezelés során az endogén $^1O_2$-re indukálódik, míg HL + His kezelés során gátlódik. Így azonosíthatóvá válhatnak az endogén $^1O_2$-re reszponzív gének. Annak vizsgálatára, hogy ezen gének mellett léteznek-e olyanok, melyek exogén, fotoszenzitizátor festékkel generált $^1O_2$-re érzékenyek, vagy esetleg mind endogén és exogén $^1O_2$-re is együttesen képesek indukálódni, Mb és Rb festékkel való kezeléseket is végre hajtottunk His jelenlétében és anélkül.

A teljes transzkriptom analízisünk során, amikor a normál fényen kezelt mintákat hasonlítottuk össze a magasfény kezelt minták expressziós eredményeivel (LL vs HL) jól látható volt a HL génexpresszióra gyakorolt erőteljes hatása. Mintegy 500 db gén esetében mutatkozott valamilyen expressziós változás, mely indukció ($log_2FC > 1$) vagy represszió ($log_2FC < -1$) formájában mutatkozott meg a kísérlet során (15. ábra).

Munkánk során a legígéretesebb az *ssr2595* (SGL_RS06740) jelölésű, *hliB* elnevezésű gén volt. A HL vs LL expressziós adatok alapján ez volt az egyik legerősebb expressziós növekedést ($log_2FC = 4,7$) mutató gén (15. ábra). A gén magasfény és oxidatív stressz függését már korábban leírták, amit korábban már részleteztem, ugyanakkor teljes transzkriptom analízisünk szerint $^1O_2$ -reszponzív szabályozása is lehet a génnek.



15. ábra: *Synechocystis* vad típusú cianobaktérium sejtek teljes transzkriptom analízise alacsony (LL-30 µmol foton m^{-2} s^{-1}), valamint magas (HL-200 µmol foton m^{-2} s^{-1}) fényintezitáson, 0,5 µM Mb, vagy 0,5 µM Rb festék, valamint 5 mM His egyedüli és együttes alkalmazásával. Pirossal kiemelve a *hliB* (*SGL_RS06470*) gén expressziós eredményei láthatóak a kezelések során. (n=3)

A HL kezelés során keletkező endogén $^1O_2$ hatást His hozzáadásával gátoltuk meg, a HL vs HL+His expressziós eredményekből jól látszott, hogy a kísérlet nagyon érzékeny finomhangolt hatást váltott ki. Ugyanis csekély számú gén expressziós változása mutatkozott, ugyanakkor a *hliB* (*SGL_RS06470*) gén expressziós aktivitás-gátlódása így is megfigyelhető volt (15. ábra). Ez a *hliB* HL kezelés során keletkező endogén $^1O_2$ függését sugallta. Mindez felvetette a lehetőséget, hogy a *hliB* HL indukciója mögött a fénystressz során keletkező endogén $^1O_2$ állhat. Annak érdekében, hogy tisztán lássuk a gén expressziós változása és a jelen lévő $^1O_2$ közötti kapcsolatot, exogén $^1O_2$ kezeléseket is végrehajtottunk.

Mivel a fotoszenzitizátor festékek által történő $^1O_2$ generáláshoz magas fénnyel történő kezelés szükséges, ezért a Mb és a Rb kezelt minták génexpressziós változásainak kiértékelésénél kontrollként a HL kezelés expressziós eredményeit alkalmaztuk, így próbálva kiküszöbölni a HL génexpresszióra gyakorolt háttérhatást.

A Mb-val folytatott kísérletek során a HL kezelések alatt megfigyelt erőteljes magasfény indukción túlmenően egy vélhetően exogén $^1O_2$ hatást is megfigyeltünk. Mikor a HL+Mb kezelés expressziós eredményeit vetettük összse HL kezelés eredményeivel (Mb vs HL+Mb), jól látszott, hogy az exogén $^1O_2$ képes volt a HL általi indukción felül megemelni a *hliB* gén expresszióját. A gén $\log_2$FC értéke mintegy 1,45 volt (15. ábra). A Mb és His együttes jelenlétében a gén expressziós szintje számottevően nem változott a csak Mb kezelést kapott sejtek expressziós értékeihez képest $\log_2$FC = -0,16 (Mb+His vs Mb).

A Rb, mint másik lehetséges fotoszenzitizátor festék alkalmazásával még többet tudhattunk meg az exogén $^1O_2$ hatásáról *Synechocystis*-ben. A Rb szemmel láthatóan több gén expressziójára gyakorolt hatást a kezelések során, mint a Mb. Amikor a Rb kezelt minták expressziós eredményeit vetettük össze a HL kezelt mintákéval (Rb vs HL), az exogén $^1O_2$ hatás szignifikánsan megmutatkozott a *hliB* esetében (15. ábra). A gén expressziója kétszeresére nőtt ($\log_2$FC = 1,5) a csak HL kezelt mintákéhoz képest. Ezzel összhangban a Rb+His vs Rb kezelések génexpressziós összehasonlításában a gén több mint kétszeres expressziós gátlást ($\log_2$FC = -1,17) szenvedett el a His jelenlétében (15. ábra).

Mindezek a *hliB* gén HL általi indukciója mellett, vagy annak hátterében az exogén $^1O_2$ hatást érzékeltetik.

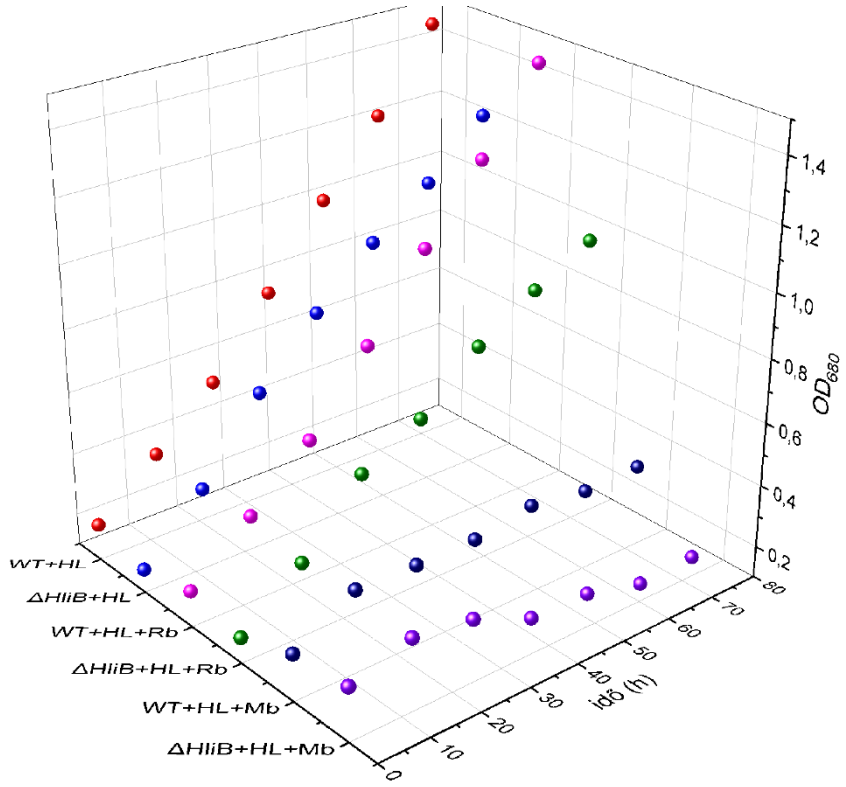
A *hliB* génen kívül számos más gén mutatott hasonló expressziós változást, ugyanakkor ezen gének többsége ismeretlen vagy csekély read-számú és nem minden esetben feleltek meg

a $^1O_2$ indukált vagy $^1O_2$ gátlódó gének számára előírt génexpressziós mintázatnak. Így ennek függvényében további munkánk során érdemileg a *hliB* génnel foglalkoztunk. A további, a *hliB*-nél kevésbé ígéretesnek bizonyult, $^1O_2$ indukált vagy $^1O_2$ gátlódó gének bemutatása a későbbiekben még részletesebben foglalkozunk (4.2.5. alfejezet).

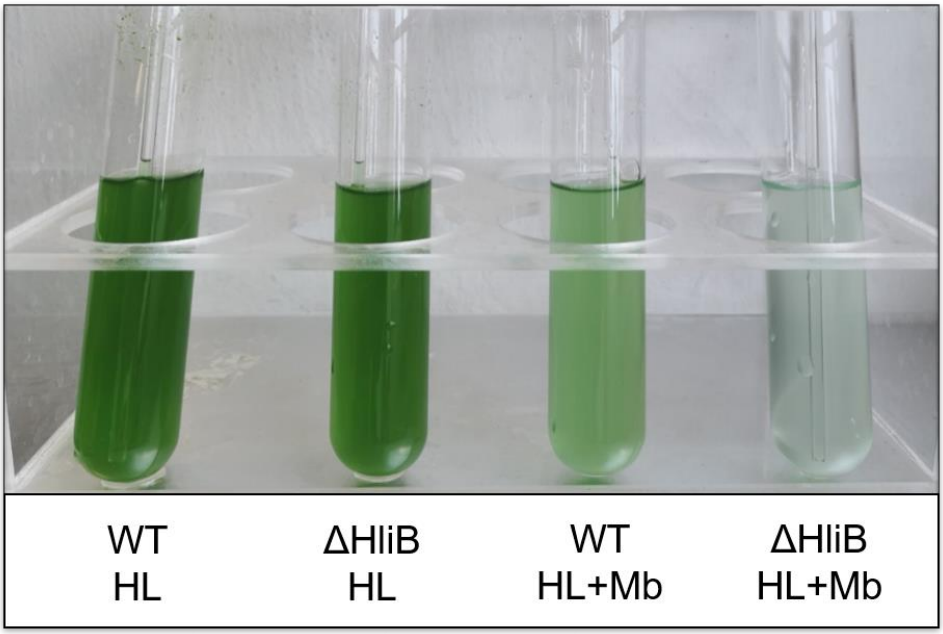
4.2.2. WT és Δ*hliB* növekedésbeli különbségei Mb és Rb jelenlétében

A *hliB* gén funkciójának részletesebb tanulmányozása érdekében létrehoztunk *Synechocystis*-ben egy delécios mutánst a génre. A mutánsban a *hliB* génszakasza kiütésre került a teljes genomban egy Spectinomycin rezisztencia kezettával, melynek eredménye a *hliB* gén expressziójára nem képes, Δ*hliB* elnevezésű *Synechocystis* mutáns törzs (lásd a 4.2.3 fejezetben).

Először is a WT-tól eltérő fenotipus különbséget kerestünk a mutáns törzsben. A *ΔhliB* mutáns sejteket elsőként folyamatos $^1O_2$ kezelésnek vetettük alá, mely során HL megvilágítást alkalmaztunk 0,5 µM Mb vagy Rb folyamatos jelenlétében. Így teszteltük a folyamatos $^1O_2$ jelenlétére adott válaszát a sejteknek. A Δ*hliB* növekedését összevetve az azonos kezeléseknek kitett WT sejtekével látható volt egy növekedésbeli lemaradás a mutáns törzsnél. A Mb folyamatos jelenléte erőteljesebb növekedésgátlást eredményezett, mint a Rb kezelés, ugyanakkor mindkét festék számottevő visszaesést eredményezett a Δ*hliB* mutánsban a WT-hoz képest (16. és 17. ábra). Ez a növekedés-intenzitásban érintett fenotípus visszavezethető a Δ*hliB* gén hiányára, mely tovább erősíti azt a feltételezésünket, hogy a gén fontos szerepet játszik a $^1O_2$ elleni védekezésben *Synechocystis*-ben.



16. ábra: A Δ*hliB* és WT *Synechocystis* sejtek növekedésének mértéke HL megvilágítás alatt, folyamatos Mb vagy Rb 0,5 µM koncentrációban való jelenlétében, a sejtek optikai denzitásának nyomonkövetésével.



17. ábra: A Δ*hliB* és WT *Synechocystis* sejtek szemmel látható növekedésgátlásának mértéke HL megvilágítás alatt, a Mb folyamatos jelenlétében (0,5 µM).

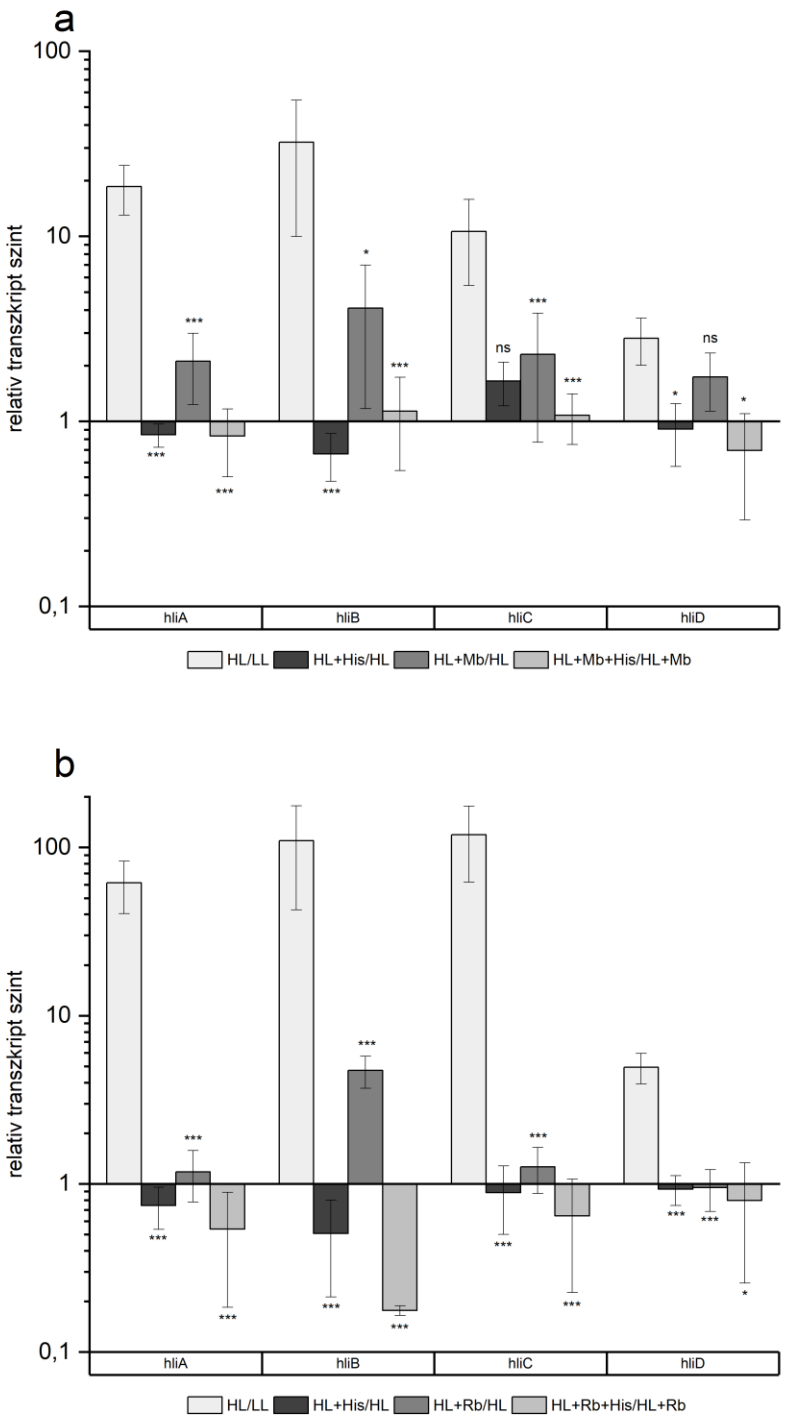
4.2.3. A *hli* gének génexpressziós változásai

Mivel az *hliB* egy HL indukált (*hli)* gén, kíváncsiak voltunk a többi *hli* gén expressziójára is a $^1O_2$ kezelés során. Ennek okán a transzkriptom minták expressziós eredményeit qPCR-el visszaellenőriztük. A kapott génexpressziós adatainkból jól látszott, hogy a Mb és Rb kezelések során a *hli* gének részben hasonló expressziós mintázatot mutatnak, mint a *hliB* (18. ábra). Ugyanakkor a transzkriptom és a qPCR egyes esetekben eltérő eredményeket adott (18. ábra és 3. táblázat).

A $^1O_2$ kezelések (Mb vagy Rb) hatására mind a LL mind pedig a HL kezelésekhez való viszonyítás során erőteljesen emelkedett a *hliB* expressziója, melyet a His képes volt visszafogni. A His jelenlétében, mind a HL, mind pedid a HL+Mb kezelések alatti *hliB* génexpressziója csökkent, mely endogén és exogén $^1O_2$ specificitást feltételez (18. ábra).

kezelés / gén	HL	+His	+Mb	+Mb+His	+Rb	+Rb+His	géncsoport
Hik31	0,80	-0,28	-1,88	0,79	0,10	0,35	Hik rendszer tagjai
Hik33	-0,15	0,00	-0,06	0,22	0,06	0,02	
Hik34	2,04	0,30	-0,98	-0,10	-0,60	0,56	
Hik35	-1,90	0,09	0,05	-0,05	0,04	-1,09	
rre31/rpaA	0,25	-0,06	-0,26	0,22	0,02	0,04	
rre15	-2,77	0,04	3,37	0,00	1,12	-1,90	
hliA	3,83	-0,38	0,63	0,07	0,71	-0,58	hli gének
hliB	4,76	-0,92	1,46	-0,16	1,60	-1,18	
hliC	4,60	-0,14	-0,26	0,13	0,01	0,17	
hliD	1,49	-0,17	0,18	-0,10	0,05	0,01	
sll1483	2,29	0,12	1,26	-0,17	1,35	-0,95	$^1O_2$ indukált gének
ssr2016	4,71	-0,70	1,90	-0,41	1,43	-1,30	
slr1544	4,40	-0,67	1,75	-0,26	1,49	-1,15	
ssr6062	1,70	1,06	1,30	-0,74	2,12	-1,12	
SigD	1,72	-0,18	0,92	-0,16	0,95	-0,48	
ThrC	1,28	-0,19	1,47	-0,16	1,09	-0,68	
isiA	-0,89	0,29	1,28	-0,23	2,70	-1,08	
idiA/FutA1	-0,70	0,09	1,40	-0,22	3,08	-0,41	
idiB/FutA2	-0,39	0,10	1,18	-0,12	1,22	-0,28	
slr7008 *	5,82	-0,93	-5,88	6,89	-5,40	5,01	$^1O_2$ gátolt gének
hspA	2,38	0,30	-1,19	0,16	-0,97	0,91	
sll0846	2,00	0,68	-1,17	-0,16	-1,04	0,97	
coaT	0,26	0,03	-1,47	-0,04	-1,84	0,40	

3. táblázat: A teljes transzkriptom analízis során $^1O_2$-re indukálódó (zöld) és gátlódó (piros), illetve a $^1O_2$-re nem reagáló (sárga) gének,expressziós mértéke (log_2FC), kiegészítve a *hli* génekkel és az irodalom alapján fontosabb hisztidin kináz szenzor (*Hik*) és válaszregulátor (*rre/rpa*) gének értékeivel (Los és mtsai., 2010). *alacsony read számú (átírású) gén



18. ábra: A *hli* gének expressziós változása WT *Synechocystis*-ben LL illetve HL megvilágításnak kitett sejtekben 0,5 µM Mb (a), vagy Rb (b) és azok együttes 5 mM His-nel való együttes alkalmazása mellett (Átlag+SE, n=3). A *-gal jelölt kezelt minták a HL kontrolltól P<0,05 (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinten szignifikánsan különböznek.

A többi *hli* gén (*hliA, hliC, hliD*) csak részben hasonló expressziós mintázatot mutatott a transzkriptom analízissel. Hasonlóság, hogy mindegyik gén erőteljes indukciót mutatott HL hatására a LL kezelt sejtekhez képest. Ugyanakkor eltérés, hogy a *hliA* HL alatti indukcióját a His gátolta (18. ábra).

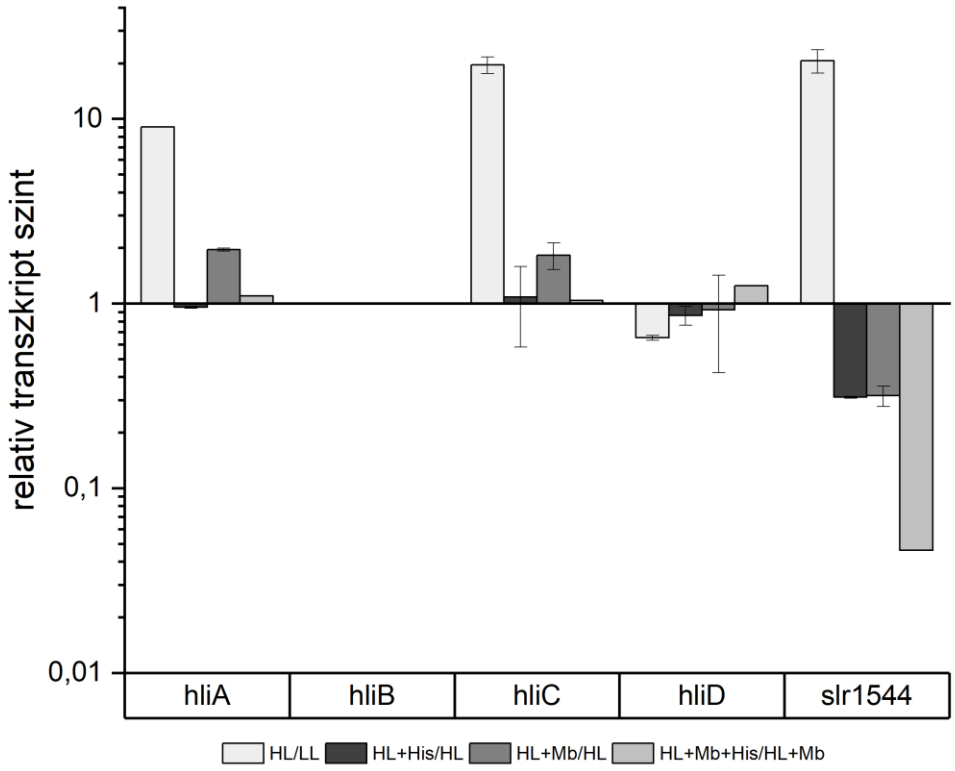
Szintén eltérés, hogy a Mb-val való $^1O_2$ kezelés hatására, mind a *hliA, hliC* és *hliD* is expressziós növekedést mutattak a HL mintához képest, melyet a His jelenléte számottevően nem gátolt (18. a ábra). Ez a *hliA, hliC* és *hliD* Mb általi indukció a transzkriptom analízis során nem mutatkozott meg.

Eltérések a transzkriptom eredményektől a Rb kezelések alatt is megfigyelhetőek voltak. A *hliA* és *hliC* hasonlóan indukálódott (+Rb) vagy gátlódott (Rb+His), mint a *hliB*, amit a transzkriptom nem mutatott ki, igaz ezek nem voltak olyan erősek, mint a *hliB* expressziós változásai. A *hliD*, hasonlóan a transzkriptom adatokhoz, a HL indukción kívül nem változott a Rb kísérletek során (18. b ábra).

Mindezekből arra következtethetünk, hogy a fotoszenzitizátor festékek (Mb és Rb), valamint a His jelenléte, a *hliB* gént kivéve, számottevően nem befolyásolják a többi *hli* gén expresszióját, vagy legalábbis génexpressziós befolyásuk csekély, így szignifikánsan nem kimutatható.

A Δ*hliB* mutánsban végzett hasonló génexpressziós eredményekből jól látható, hogy a *hliA* és *hliC* WT-ban megfigyelt expressziójához képest nem történt változás a *hliB* kiütésének hatására, ugyanakkor a *hliD* HL hatására nem expresszálódott a deléciós mutánsban HL-ra, mely eddig a WT-ban hasonló körülmények között megnövekedett expresszót mutatott **(**21. ábra). Az *slr1544*-es (*lilA*) gén, mely a *hliB*-vel egy transzkripciós egységet alkot, HL-ra

indukálódott, míg a többi kezelésnél gátlódott. Ugyanakkor ez a gén WT-ban indukálódott a Mb kezelés hatására (3. táblázat és 23. ábra).



21. ábra: A Δ*hliB Synechocystis* deléciós mutáns, HL + 0,5 µM Mb jelenlétében valamint 5 mM His-nel végzett kísérlet génexpressziós eredményei. (Átlag+SE, n=3)

4.2.4. A pILA*hliB* biolumineszcens riporter törzs

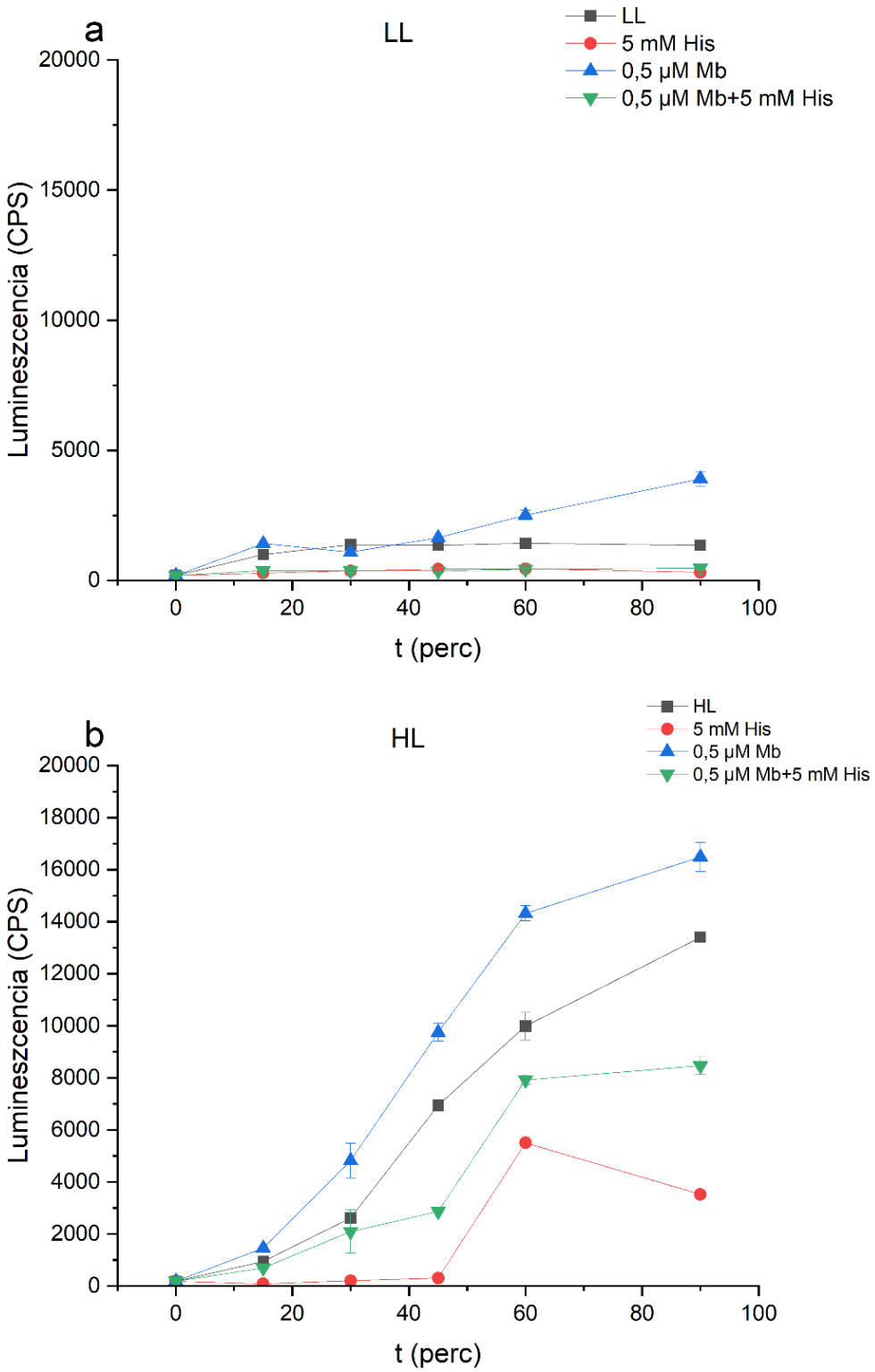
A teljes transzkript analízis és qPCR-es visszaellenőrzése (15. és 18. ábra) valamint a Δ*hliB* törzs növekedésgátlása alapján (16. és 17. ábra) feltételezhető, hogy a *hliB* gén szerepet játszhat a $^1O_2$ jelátvitelben és a vele kapcsolatos védekezési rendszerben. Ezen oknál fogva, a gén promóterét felhasználva készítettünk egy a luciferáz riporter rendszert használó bioszenzor konstrukciót a *Synechocystis*-ben; mely az úgynevezett pILA*hliB* bioriporter törzs elnevezést kapta. Ezt a cianobaktérium bioriporter törzset alkalmazva különböző $^1O_2$ kezeléseket végeztünk el a WT sejtekkel végzett génexpressziós eredmények tükrében (18. ábra).

Mind a Mb, mind pedig a Rb kísérletek során a bioszenzor erőteljes lumineszcens választ adott csak a HL kezelést kapott kontroll mintában, mely tükrözte a gén már leírt fényfüggő indukcióját. Ugyanakkor ezt a HL indukciót a hozzáadott His megszüntette (19. és 20. ábra). Ugyanis a His kezelt HL minták lumineszcenciája elmaradt a csak HL kezelt mintákéhoz képest, mely megegyezik a génexpressziós kísérletek alatt tapasztalt eredményekkel. Mindezek alapján az endogén $^1O_2$ hatás a *hliB* génre mind a génexpresszió, mind pedig a lumineszcens fehérje expresszió szintjén igazolttá vált (18, 19, 20. ábra). Emellett fontos megemlíteni, hogy ez az endogén $^1O_2$ függés erősen kapcsolt a HL jelenlétéhez.

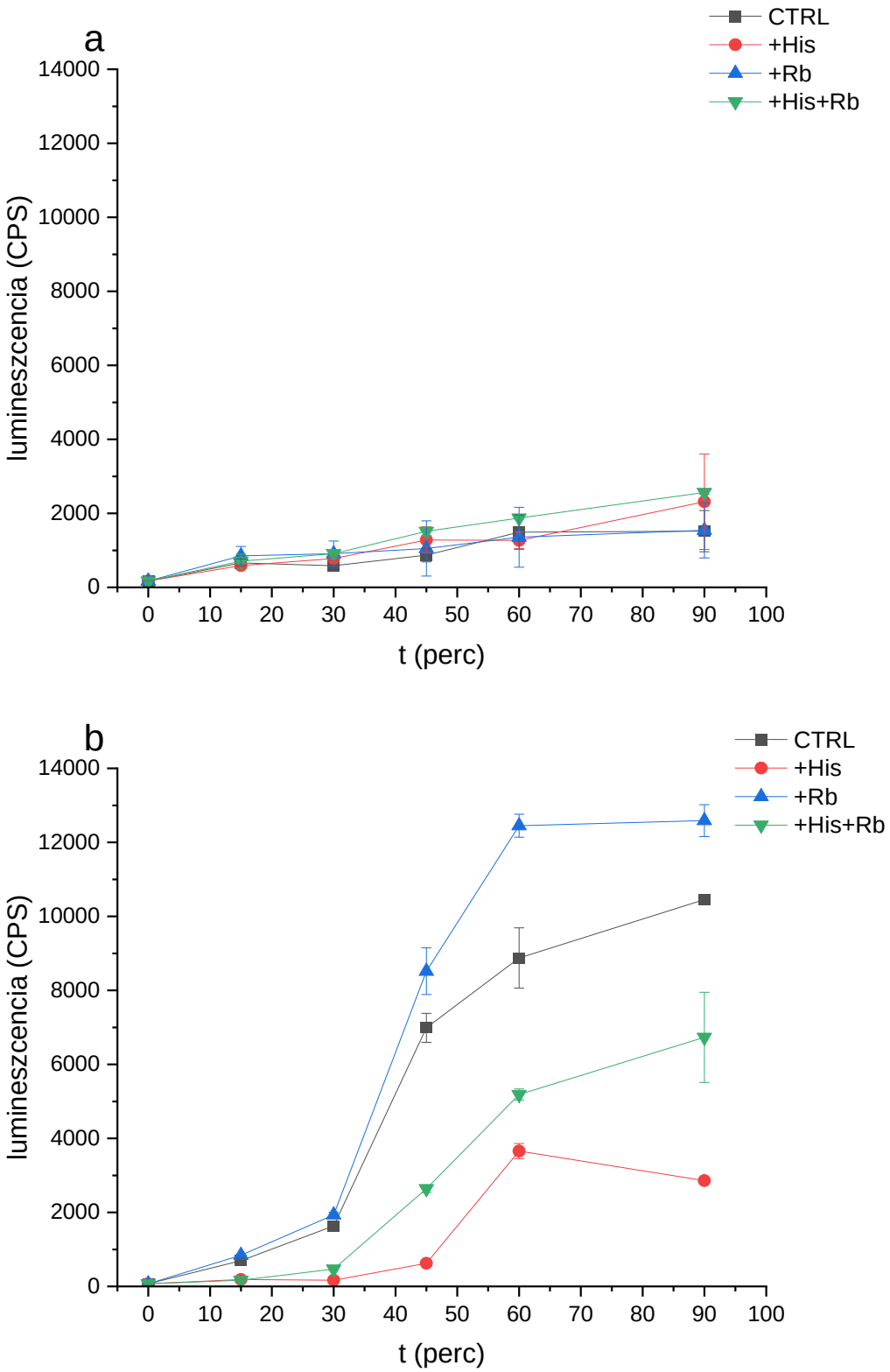
A lumineszcencia viszont tovább növekedett a HL mintákhoz képest azokban a mintákban, ahol a Mb jelen volt (19. b ábra). Ezt a jelenséget alátámasztja a génexpressziós kísérletek során tapasztalt Mb kezelés hatására bekövetkező *hliB* génexpressziós növekedés is (18 a. ábra). A HL + Mb mintákban, a kezelést követő 30. perctől szignifikánsan nagyobb választ váltott ki a Mb generálta $^1O_2$, mint csak az endogén, HL generált (19. b ábra). Ez az exogén, Mb generálta $^1O_2$ képes volt még jobban emelni a *hliB* génexpresszióján, mely tovább erősíti azt az elképzelést, miszerint a gén expressziója $^1O_2$ szabályozott, természetesen a HL függése mellett.

A Rb-lal kezelt lumineszcencia indukciós kísérletek során a HL+Rb kezelést követő 40. perctől a minták lumineszcenciája sziginfikánsan tovább nőtt a HL kontrollhoz képest. Vagyis a csak endogén $^1O_2$ kezelést kapott sejtek lumineszcencia értékei elmaradtak a HL+Rb kezeltekétől, ami a *hliB* exogén $^1O_2$ általi indukcióját jelzi ennél a festéknél is (20. ábra). Mindeközben ugyanezen, csak His kezelt minták lumineszcencia intenzitása elmaradt a HL+Rb kezelt mintákétól, vagyis a His képes volt csökkenteni a *hliB* gén kifejeződését a HL+Rb kezelés során is (20. b ábra).

Mindezek alátámasztják, hogy a *hliB* egyaránt érzékeny a Rb és Mb fotoszenzitizátorral generált $^1O_2$-re, melyet a His mind két esetben kiolt. Endogén és exogén$^1O_2$-specifikus indukció is fennáll a *hliB* génnél, mely nehezen, de elkülöníthető a HL indukciótól. Mindezen bioriporter indukciós eredmények alapján a gén $^1O_2$ jelátviteli útvonalában betöltött szerepe egyre jobban igazolást nyer.



19. ábra: pILAhliB *Synechocystis* lumineszcencia gerjesztésének vizsgálata 5 mM His és 0,5 µM Mb jelenlétében LL (a); és HL (b) fényintenzitáson. (Átlag+SE, n=3)



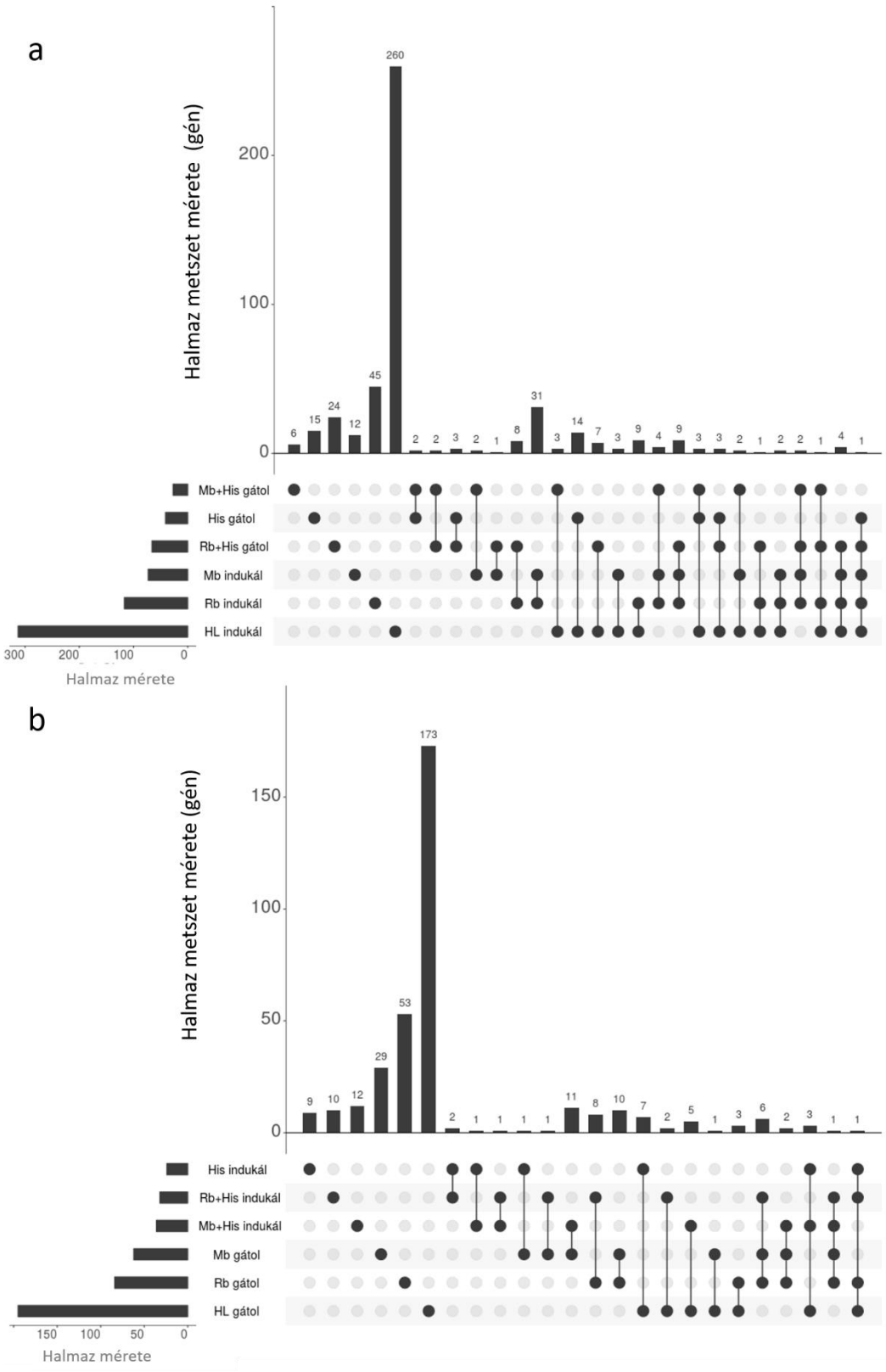
20. ábra: pILAhliB *Synechocystis* lumineszcencia gerjesztésének vizsgálata 5 mM His és 0,5 µM Rb jelenlétében LL (a) és HL [1] (b) fényintenzitáson. (Átlag+SE, n=3)

4.2.5. További $^1O_2$-érzékeny gének

A *hliB* mellett több hasonló expressziós változást mutató gént is azonosítottunk a teljes transzkriptom kísérletek során (22, 21, 22. ábra), melyek említésre méltóak. Az analízis során több gén csak azért mutatott magas FC értékeket, mert kis read számmal rendelkeznek, ezek félrevezető eredményeket adhatnak, így csak olyan génekkel foglalkoztunk érdemileg tovább, melyek megfelelő read számokkal rendelkeztek (max group mean értékük ≥ 10).

Egyes gének az exogén $^1O_2$ kezelés hatására indukálódtak, míg a His jelenlétében ezek a gének gátlódtak. Ugyanez fordítva is elmondható más génekről ($^1O_2$ gátolta, His indukálta). Ezen szempontok szerint elkülönítettünk két nagy géncsoportot, a $^1O_2$-indukált géneket ($^1O_2$-indukál és His gátol), valamint a $^1O_2$-gátolt géneket ($^1O_2$ gátol és His indukál) (22. ábra).

Ha teljes egészében vizsgáljuk a hat kísérlet expressziós eredményeit és azokat összevetjük a megfelelő kontrollokkal (22. ábra), valamint az előbb említett két nagy géncsoportra osztjuk a mozgó géneket, ráláthatunk az endogén és exogén $^1O_2$ által szabályozott gének kapcsolataira. A legtöbb gént a HL hatás indukálta (több mint 300 gén), melyek közül 14 gén volt az, amit a His gátolt. A Mb és a Rb együttesen mintegy 31 gént indukált (22. a ábra), melyek között több olyan gén is szerepel, amelyekről korábban már felvetődött a $^1O_2$ függés (J. Glaeser és mtsai., 2011). Ide tartoznak az *isiA* és az *idiA/idiB* gének, melyek erőteljes génexpressziós növekedést mutattak az exogén $^1O_2$ hatására kísérletünkben. Az *isiA* expressziót ezen felül, mely a Rb kezelés során indukálódott, a hozzáadott His gátolta, ami szintén megerősíti a gén exogén $^1O_2$ függését.



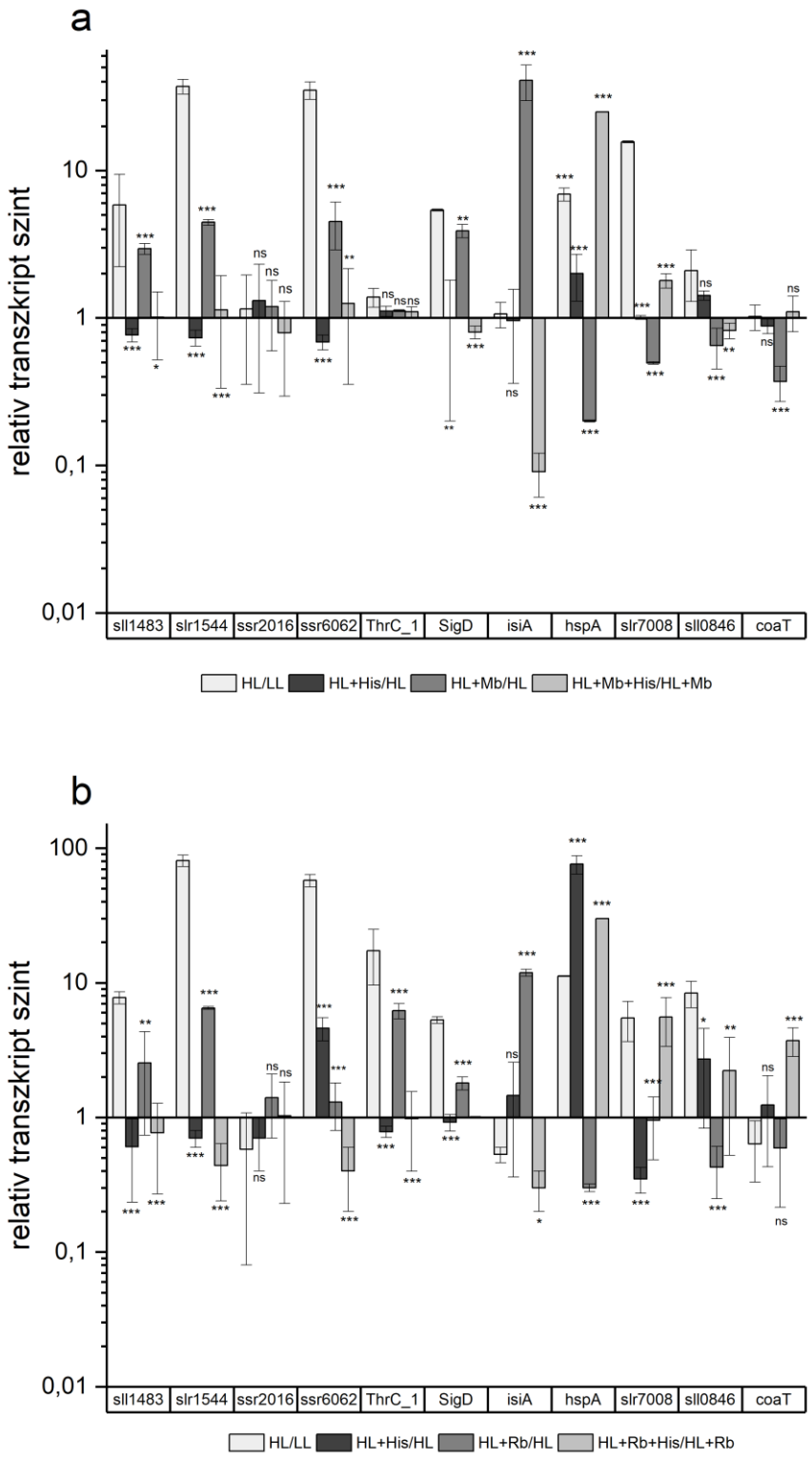
22. ábra: A teljes transzkriptom analízis $^1O_2$-indukált (a) és $^1O_2$-gátolt (b) génhalmazának ábrája, feltüntetve az egyes csoportok kapcsolata és az azokba tartozó gének száma (db).

Négy olyan gén volt, mely HL-ra, valamint a két fotoszenzitizátor (Mb és Rb) hatására indukálódott és a His gátolta expressziójukat a Rb kezelés alatt (23. a, 24. ábra). Ezek a gének főként hipotetikus fehérjéket kódoló gének (*slr1544, sll1483, ssr2016, ssr6062*).

A *slr1544*-es vagy *lilA* (light-harvesting-like) egy transzkripciós egységet alkot a *hliB*-vel, így kotranszlálódik vele, illetve szerkezetileg hasonló az SCP-khez (Kufryk és mtsai., 2008). Mindkét fehérje egy hosszú hidrofil N-terminális régiót és egy transzmembrán C-terminális domént tartalmaz. Ebben a transzmembrán régióban két reziduális konzervált régió található, melyekben Chl kötő domének találhatóak, emellett kimutatták, hogy stressz alatt képes a LilA is kötődni a PSII-höz (Hernández-prieto, 2009). Az általunk végzett kísérletek során az *slr1544*-es gén a Δ*hliB* törzsben HL-ra indukálódott, míg a többi kezelésnél gátlódott (21. ábra). Ugyanakkor ez a gén WT-ban indukálódott a Mb és Rb kezelés hatására és gátlódott a Rb+His jelenlétében (3. táblázat és 23. ábra), ami arra enged következtetni, hogy a *slr1544* kifejeződése az exogén $^1O_2$ esetében *hliB* függő lehet.

A *sll1483* egy periplazmatikus fasciclin domént tartalmazó fehérjét kódol, melynek homológjai erős kölcsönhatást mutatnak más fajok NADH komplex fehérjéivel (Caufield és mtsai., 2017). Emellett hasonló fehérjét (UniprotKB: P73392) találtak már a *Synechocystis*-ben és a *T. elongatus* BP-1-ben (Q8DMA1), és CupS-nek nevezték el, ami valójában a NDH-1MS elnevezésű NADH komplex kis alegysége. Az NMR vizsgálatok kimutatták, hogy a fehérje szerkezetileg hasonló a fasciclin szupercsaládhoz, valamint a CupS kölcsönhatásba lép az NdhD/NdhF/CupA-val, azonban funkciója még mindig ismeretlen (Korste és mtsai., 2015).

Az *ssr2016*, vagy másik nevén *prg5* egy a Hik-ekkel kapcsolatban álló válasz regulátor fehérjét kódol (Shoumskaya és mtsai., 2005). Ugyan a transzkriptom elemzés (15. ábra) HL, Mb és Rb indukciót és His gátlást mutatott ki (a Rb kezelés során), a qPCR-el való visszaellenőrzés alatt ez szignifikánsan nem volt kimutatható (23. ábra). Egyébként a Pgr5 fehérjék közvetlen szerepet játszanak alternatív ETC útvonalakban a növényekben és az eukarióta fitoplanktonokban. Számos cianobaktérium faj genomja Pgr5-szerű fehérjéket kódol, de funkciójuk még bizonytalan. Margulis és munkatársai olyan eredményeket mutattak be, amelyek alátámasztják a kapcsolatot a *Synechocystis* Pgr5-szerű fehérje és az intracelluláris redox egyensúly szabályozásában (Margulis és mtsai., 2020). Az *ssr2016*-os gént ezen felül több más stresszhatás során is kapcsolatba hozták már, mint a só vagy a hideg stressz, ahol az *slr1544* (*lilA*), a *sigD, slr1483* és a többi *hli* génnel (köztük a *hliB*-vel) együtt fejeződtek ki (Los és mtsai., 2010), az általunk kapott eredményekhez hasonlóan (23. és 24. ábra).



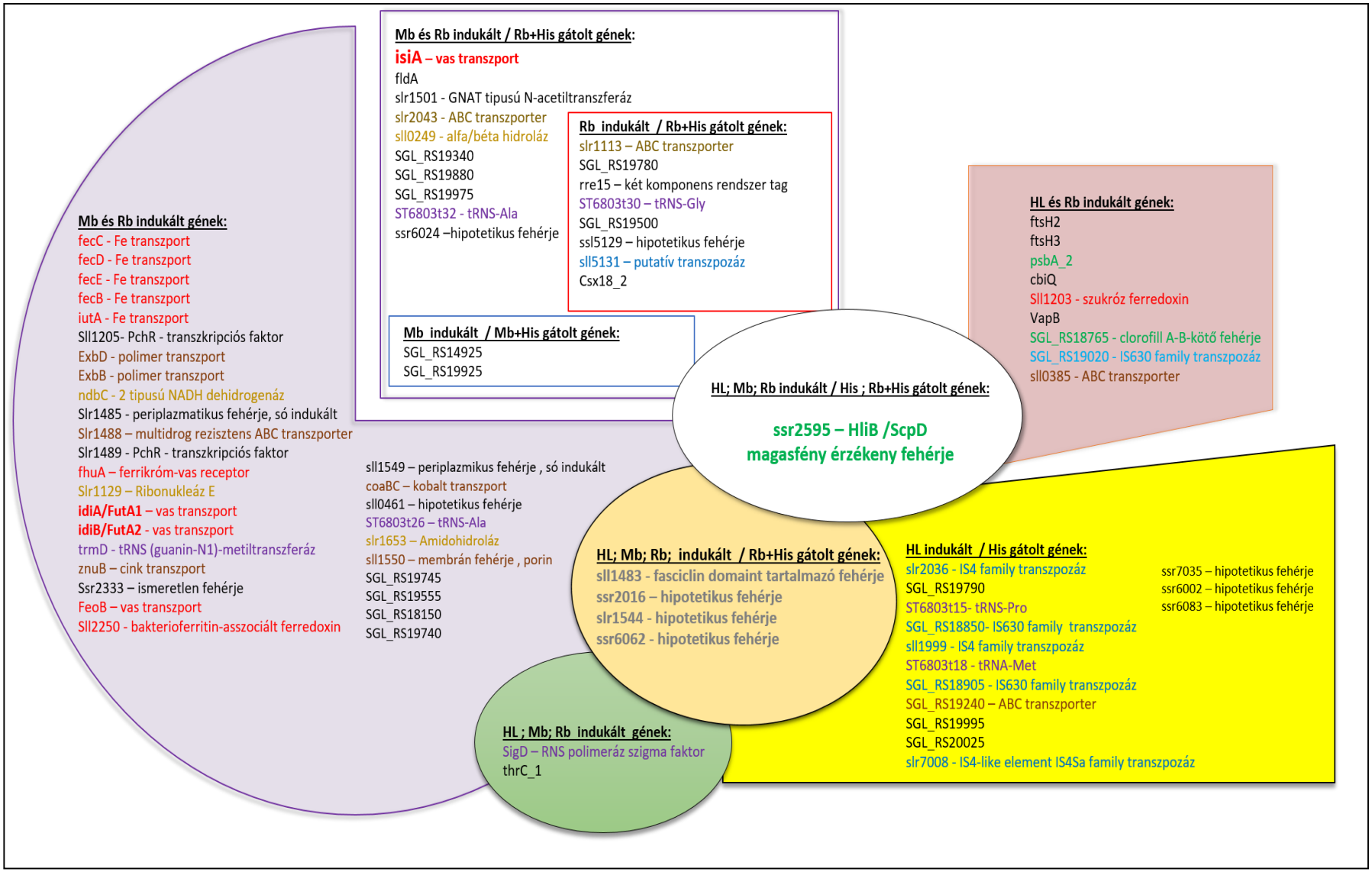
23. ábra: A transzkriptom analízis során kiválasztott további gének qPCR-rel való visszakövetése (Átlag+SE, n=3). A *-gal jelölt kezelt minták a HL kontrolltól P<0,05 (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinten szignifikánsan különböznek.

Az *ssr6062* erőteljes indukciót mutatott HL, Mb és Rb hatására, amit a Rb+His gátolt, és ezt a qPCR-rel való ellenőrzés megerősítette (23. és 24. ábra). Az *ssr6062* egy a *Synechocystis* pSYSX plazmidján elhelyezkedő, hipotetikus fehérjét kódoló génszakasz (Kaneko és mtsai., 2003). A pSYSX-on elvégzett CyanoClust adatbázist használó elemzés azt mutatta, hogy ez a plazmid 30 kb-os homológ régiókat tartalmaz, az *ssr6002–slr6038* és az *ssr6062–slr6094* régiókkal (Tajima és mtsai., 2011). A pSYSX-ben azonosított mutációk mind a GT-AR, mind a GT-CH esetében az *slr6040*, *slr6070*, *slr6037*, *ssr6062*, *sll6059*, *slr6045* génekben is jelen vannak, melyek többek között DNS kötő válasz regulátort, kétkomponensű szenzor hisztidinkinázt (Hik), helyspecifikus integrázt és hipotetikus DUF domaint kódoló fehérjéket kódolnak (Chen és mtsai., 2018).

A *sigD* RNS polimeráz szigma faktorát kódoló gén transzkriptom analízisünk során indukciót mutatott a HL valamint a Mb és Rb kezelésekre is (24. ábra). A SigD fehérje több stresszhatásban is szerepel, például a Hik válasz regulátorokkal kapcsolatos szabályozásban (Los és mtsai., 2010; Shoumskaya és mtsai., 2005). Hasonlóan a *sigD*-hez a HL, valamint a Mb és Rb kezelésekre a *thrC1* (treonin szintáz) gén is expressziós növekedést mutatott (24. ábra), ugyanakkor a qPCR-rel való ellenőrzés során a HL és Rb kiváltotta indukciója nyert bizonyítást, a Mb indukciója kétséges (23. ábra és 3. táblázat).

Ha a $^1O_2$ gátolt géneket vizsgáljuk, általánosságban elmondható, hogy a legtöbb, körülbelül 200 gént a HL kezelés gátolta. Mintegy 10 db olyan gént azonosítottunk, amit a Mb és a Rb egyaránt gátolt, többek között a *coaT*-t is, illetve egy Fe-S kötő fehérjét kódoló gént: az *sll3044-et* (22. b ábra). Ezen gének mellett több olyan gén is megfigyelhető volt, melyeket a hozzáadott His gátolt valamelyik kísérlet során (23. és 25. ábra).

Ilyen gén a *hspA* illetve az *sll0846*-os gén. A *hspA* egy kis hősokk fehérjét kódol, ez a második legerősebben expresszált gén sóstressz alatt *Synechocystis*-ben (Asadulghani és mtsai., 2004). Emellett a SigB RNS polimeráz szigma faktorral áll kölcsönhatásban, illetve kimutatták, hogy megnövekedett expressziót mutat só-, ozmotikus- és magasfény stressz során is (Mironov és mtsai., 2019).

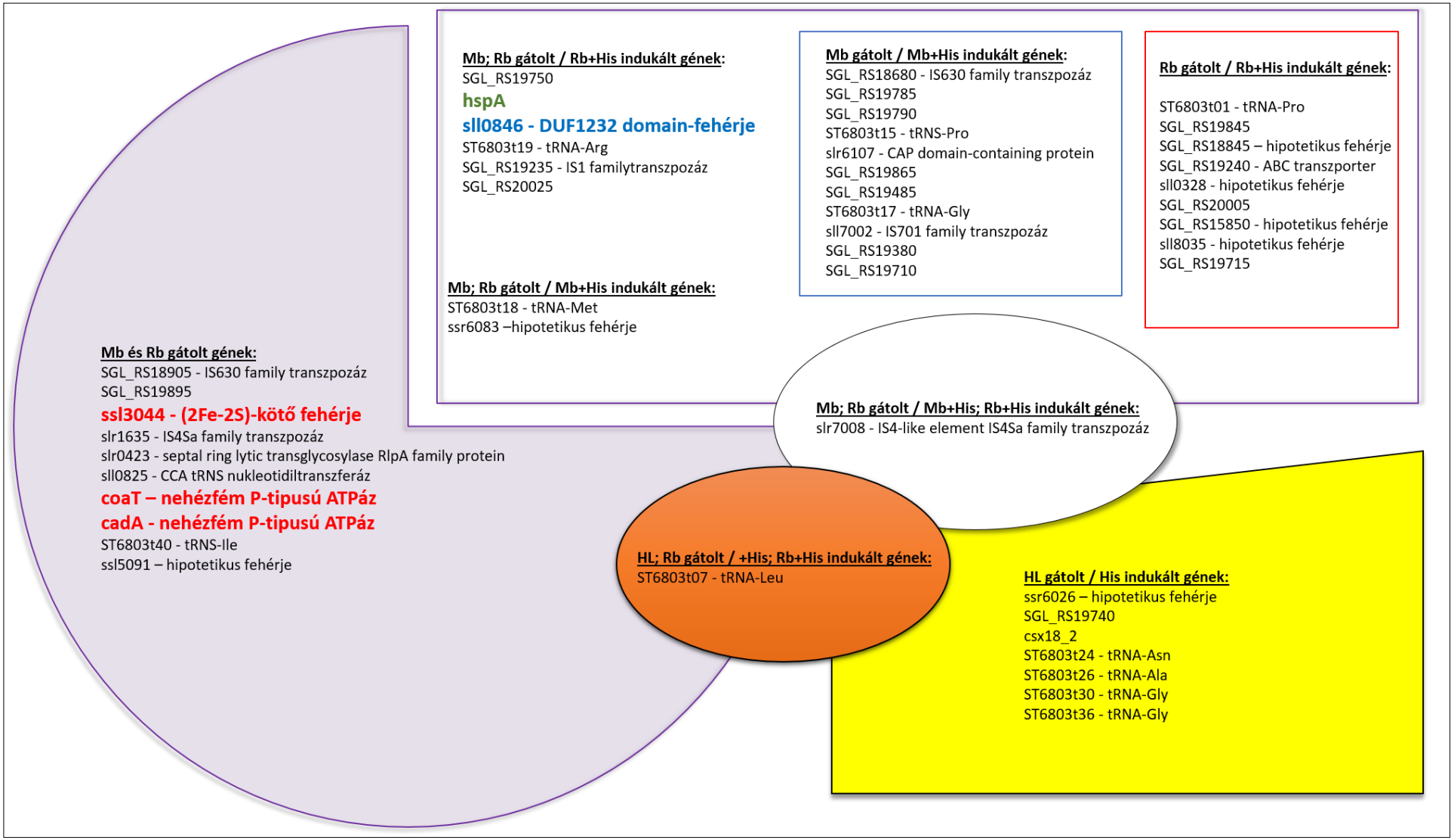


24.ábra: Összegző ábra a $^1O_2$-indukált génekről az egyes kezelések alatt.

Az *sll0846* egy DUF domént tartalmazó hipotetikus fehérjét kódol, mellyel megegyező fehérje nem található a rokon fajokban. Az *sll0846* HL indukcióját a 20 mM-os NaCl kezelés még jobban megemeli (Allakhverdiev és mtsai., 2002). A *hik34*-et túlexpresszáló *Synechocystis* mutánsban az *sll0846* represszálódik hősokk során, míg a Hik34 hiányos mutáns 60 perces hősokkot (44ºC) követően magasabb *sll0846* génexpressziót mutatott a WT-hoz képest (Suzuki és mtsai., 2005). Azt is kimutatták, hogy a *sll0846*-os gén nem a Hik33, Hik34, Hik16, Hik41 és PerR szabályozása alatt áll H_2O_2 kezelés során, hasonlóan a *hspA* és *isiA*-hoz (Kanesaki és mtsai., 2007). Ugyanakkor nemrégiben kapcsolatba hozták a *Hik34* és *Rre1* génekkel ozmotikus stressz során (Los és mtsai., 2010).

Az *slr7008*-as volt az egyetlen olyan gén, melyet a Mb és Rb gátolt, ugyanakkor a His jelenléte a festék mellett indukált. Igaz, a gén kis readszámmal szerepelt a transzkriptom analízisben, így expresszió megkérdőjelezhető, az érdekes indukciós eredményei miatt tovább vizsgáltuk génexpresszióját, ahol a Mb gátlása a génnek jól látszott, illetve a His mindkét festékkel való kezelés során indukálta a gént. Az *slr7008*-as egy IS4-szerű IS4Sa családba tartozó transzpozázt kódol és a pSYSA plazmidon kódolt (Kaneko és mtsai., 2003). Az *slr7008*-as egy WYL domaint tartalmaz, mely motívummal rendelkező fehérjékről feltételezik, hogy a DNS károsodás és annak javításának folyamatában játszhatnak szerepet (Müller és mtsai., 2019). Illetve az *slr7008-as* génről a GGCC helyek hiánya és WYL motívuma miatt feltételezik, hogy horizontális géntranszferrel egy másik organizmusból került a *Synechocystis*-be (Scholz és mtsai., 2019).

Összességében elmondható, hogy az exogén $^1O_2$ változatos funkciójú gének csoportjait indukálja ill. gátolja. Szinte az összes azonosított génről megállapították már, hogy valamilyen stresszfolyamatban érintett, mint például a DNS javítás (*slr7008*), sóstressz (*slr0846*) vagy redoxhomeosztázis (*ssr2016*), illetve alternatív ETC-ban szerepet játszó fehérjéket (*slr1483*) és hősokk fehérjéket (*hspA*) kódoló géneket is találtunk. Emellett a Hik rendszerben való érintettség a fentebb tárgyalt gének szinte mindegyikénél jellemző volt.



25.ábra: Összegző ábra a $^1O_2$ gátolt génekről az egyes kezelések alatt.

5. Összefoglaló

5.1. Nehézfém bioriporterek detekciós érzékenységének növelése

Számos egész sejtes riporter organizmust fejlesztettek már ki a *Synechocystis* sejtek alkalmazásával, amelyek különféle fémkationok jelenlétét jelzik szennyezett talajokban vagy szennyvízmintákban. Az ilyen típusú egész sejtes bioriporterek széles körben való alkalmazását sok esetben a detekciós küszöbértékük akadályozza (1.táblázat). Az egyes fémionokra adott sejtválaszok a fémionok intracelluláris koncentrációjától függenek, amelyet a kiáramlási és beáramlási rendszerek, valamint az ioncsatornák együttes működése határoz meg. A három nehézfém (HM) exportjáért felelős génklaszter eliminálásával olyan mutánst hoztunk létre (NiCoZia), amelynek intracelluláris HM-koncentrációja megnövekedett a vad típushoz képest. Ez a mutáns gátolt növekedést mutatott a vad típusú törzshöz képest, a már korábban leírt IC_{min} koncentrációk alatt is. A kobalt IC_{min} értéke 2 μM volt a WT törzsben, míg ez a NiCoZia mutánsban 0,1 μM $CoCl_2$ koncentrációnál volt megfigyelhető, ami mintegy 20-szoros növekedési érzékenységet jelent a kobalt esetében (10. c, d ábra). A NiCoZia mutáns szintén érzékenyebb volt a cinkre, mint a WT, IC_{min} értéke 0,5 μM $ZnSO_4$ volt (10. e f ábra) és a nikkel esetében 1 μM $NiCl_2$ koncentráció (10 a, b ábra).

A NiCoZia törzs magasabb érzékenysége a megnövekedett intracelluláris HM-koncentráció hatása volt, melynek hátterében a megfelelő transzporterek hiánya állt, ezt az intracelluláris HM tartalom ICP-MS-meghatározása is megerősítette (11. ábra). Ez a tulajdonság felhasználható volt a specifikus bioriporter konstrukciók érzékenységének javítására, amelyek lumineszcens fehérjék HM-érzékeny promóter által vezérelt expresszióját használják. A lumineszcencia mérések (12. a ábra) azt mutatták, hogy a pILA*coaR* NiCoZia bioriporter törzs háromszor nagyobb érzékenységet mutatott a kobaltra és 10-szer nagyobb érzékenységet a cinkre, mint a bioriporter a WT háttérben. A pILA*ziaR* NiCoZia bioriporter törzs közel 10-szer nagyobb érzékenységet mutatott a Zn^{2+} iránt, mint a WT variánsa (12. b ábra). A pILAnrsRS NiCoZia konstrukció is fokozott érzékenységet mutatott.

Tekintettel arra, hogy kétirányú promóter rendszereket alkalmaztunk, megvizsgáltuk a klónozott DNS szegmens orientációjának hatását is. Mind az *nrsRS*-1, mind az *nrsRS*-2 orientált konstrukciók koncentrációfüggő fluoreszcencia indukciót mutattak. Az *nrsRS*-1 orientáció, ahol a *Synechocystis*-ben eredetileg is fennálló gén és promóter irány fennmaradt,

csak az eredeti transzporter gének helyébe a luciferáz riporter fehérje génjei léptek, magasabb szintű indukciót eredményezett, és hatékonyabb, mint az ellenkező orientáció (13. ábra).

Kimutattuk, hogy a cianobaktérium genomból az efflux transzporter gének eltávolításával és a kétirányú promóter rendszer megfelelő orientációjának megválasztásával jelentős, akár tízszeres érzékenységnövekedés érhető el a bioriporter törzsek esetében (12, 13. és 14. ábra).

Figyelemre méltó az is, hogy a sejten belüli Zn^{2+} koncentráció durván 20%-os növekedése a megfelelő bioriporter törzs kimutatási határának tízszeres csökkenését eredményezte. Ez az eredmény azt mutatja, hogy a genom korlátozott manipulálásával jelentős javulás érhető el, ami a bioszenzorok alkalmazását még versenyképesebbé és értékesebbé teheti a környezeti monitorozásban (11. és 14. ábra).

A Ni^{2+}, Co^{2+} vagy Zn^{2+} kimutatására az elmúlt években publikált bioszenzorokat az 1. táblázat tartalmazza, melyek közül a riporter fehérje rendszert használó bioriporterek tekintetében a mi konstrukciónk a legjobb detekciós értékekkel rendelkezik. Bár a többi, felsorolt bioriporterek érzékenysége figyelemre méltó lehet, ezek a bioanalitikai eszközök még fejlesztésre várnak. Kutatásunk ezen része a teljes sejt alapú bioszenzorok használhatóságának további megkönnyítését segíti elő azáltal, hogy lehetővé teszi a környezeti minták korábbinál alacsonyabb szennyezőanyag-szintjének kimutatását. Emellett egy új szemszögből közelítheti meg a cianobakteriális bioremediációt.

5.2. Szinglet oxigén érzékeny gének a *Synechocystis*-ben

Mostanáig számos tanulmány foglalkozott a $^1O_2$ szignalizációs útvonalainak feltérképezésével, ugyanakkor máig nem találtak a cianobaktériumokban $^1O_2$ specifikus géneket, noha ilyen gének más élőlényekben már ismertek (Meskauskiene és mtsai., 2001; Uchoa és mtsai., 2008).

Munkánk során sikerült egy olyan teljes transzkript analízist végrehajtani, ahol HL megvilágítás során képződő endogén $^1O_2$ mellett exogén $^1O_2$-nel kezeltük a baktérium sejteket. Ehhez Mb és Rb fotoszenzitizátor festékeket alkalmaztunk kis koncentrációban (0,5 μM), mely nem toxikus a baktériumnak, de elegendő $^1O_2$-t generált a stressz kiváltásához. A $^1O_2$ –re adott válaszok specifitását a $^1O_2$ képződését gátló His alkalmazásával igazoltuk. Sikerült ezzel a teljes

transzkript analízissel (15. ábra) olyan génjelölteket találni, melyek endogén és exogén generált $^1O_2$ jelenlétében indukciót, míg a $^1O_2$ gátlószer His jelenlétében repressziót mutattak (3. táblázat), ami alátámasztja, hogy kifejeződésüket közvetve vagy közvetlenül a $^1O_2$ szabályozza. A gének közül kiemelkedő jelöltnek bizonyult a *hliB* magasfény indukált gén, melynek HL indukciója melletti endogén és exogén $^1O_2$ által kiváltott génexpressziója többszörösen bizonyítást nyert (15. és 18. ábra). A *hliB* gén hiányában a *ΔhliB Synechocystis* sejtek erőteljes növekedésgátlást mutatnak konstans exogén $^1O_2$ kezelés során (16., 17. ábra).

A *hli* géncsalád többi tagjának (*hliA*; *hliC* és *hliD*) génexpressziós aktivitását is nyomon követtük, főként a *hliB* érintettsége miatt, mely során az eddig leírt HL indukciójukat kivéve, nem találtunk szignifikáns indukciót arra, hogy a *hliB* génen kívül a géncsalád többi tagja kapcsolatban állna a $^1O_2$-nel és annak szignáltraszdukciós szabályozásával (18. ábra). Ezen gének vagy nem, vagy ha részben kötődnek is a $^1O_2$ szignalizációhoz, szerepük nagyon csekély, és ennek vizsgálata nem szerepelt céljaink között.

Munkánkat a $^1O_2$ specifikus gének felkutatását követően a legígéretesebb génjelöltre fókuszálva, a bioriporter tervezéssel folytattuk. Ennek során a *hliB* gén promóterét felhasználva készítettük el a pILA*hliB* biolumineszcens riporter törzset WT *Synechocystis*-ben (9. ábra) Majd ezzel a bioriporterrel $^1O_2$ indukciós kísérleteket hajtottunk végre, a génexpressziós eredmények alapján.

A pILA*hliB* riporterrel folytatott lumineszcencia mérések során jól látható volt a riporter gén HL indukciója, hasonlóan a génexpressziós kísérletekhez. A lumineszcencia kísérletek megerősítették azokat a korábbi génexpressziós eredményeket is, melyek szerint a *hliB* HL indukcióján felül az endogén és a külsőleg hozzáadott exogén $^1O_2$ is képes a gént indukálni. A lumineszcencia a Mb és Rb kezelt mintákban jóval magasabb volt, mint a csak HL kezelt mintákban. Ezzel párhuzamosan, a His jelenléte a lumineszcencia csökkenését eredményezte ezekben a mintákban, mely igazolja a jelenség $^1O_2$ specifitását (19. és 20. ábra).

A fenti eredmények tükrében sikerült a *hliB* gén $^1O_2$ függőségét igazolni a génexpressziós és biolumineszcencia mérésekkel, illetve a *ΔhliB* törzs $^1O_2$ jelenléte alatt bekövetkező növekedési ütem csökkenésének nyomon követésével. Utóbbi megfigyelésünkből arra is bizonyítást nyertünk, hogy a HliB fehérje részt vesz a $^1O_2$ sejtkárosító hatásainak csökkentésében, hiszen hiányában a sejtek erőteljes növekedésgátlást mutatnak. Ezek az eredmények lehetővé tették azon célunk elérését, hogy specifikus, szelektív és érzékeny $^1O_2$

mérési módszert dolgozzunk ki a cianobaktériumokban, jelen esetben a *Synechocystis* PCC 6803-ban.

Munkánk során kitértünk további, feltehetőleg $^1O_2$ specifikus, vagy legalábbis azzal valamilyen kapcsolatban álló gének expressziójának és kapcsolatának jellemzésére. A transzkriptom analízis során az összes $^1O_2$-re indukálódó és gátlódó gént egy egész halmazként jellemeztük, majd ábrázoltuk, hogy a különböző gének mely kisérletek során mutatnak hasonló expressziós mintázatot (22. ábra). Az egyes kezelés csoportokban ígéretes eredményeket mutató (22., 24. és 25. ábra) génekkel tovább foglalkoztunk génexpressziós szinten.

A *hliB*-n kívül a $^1O_2$-re indukálódó gének, illetve a gátolt gének között több érdekes, már korábban is az oxidatív stresszel kapcsolatba hozott (J. Glaeser és mtsai., 2011; Los és mtsai., 2010) gén is megfigyelhető volt. Ilyen gének például az *idiA* és *idiB*, vagy az *isiA*, melyek vashiány érzékenységük mellett $^1O_2$-re is érzékenyek (J. Glaeser és mtsai., 2011), illetve a mi munkánk során is ezek a gének egyes esetekben (Rb kezelés) indukálódtak (3. táblázat), sőt az *isiA*-t a His jelenléte gátolta.

Ugyanakkor a $^1O_2$-re indukálódó gének (23., 24. ábra és 3. táblázat) többsége teljesen ismeretlen, vagy funkcióját tekintve nem sokat tudunk meg róluk az irodalomból. Ezen gének között szerepelt egy Scp-szerű, magasfény függő és Chl kötő fehérjét kódoló gén; egy fasciclin domént tartalmazó fehérjét kódoló gén, valamint az RNS polimeráz szigma faktorát kódoló gén, illetve egy treonin szintázt kódoló gén, melyeket már együttesen vagy külön–külön többször is kapcsolatba hoztak különböző *Synechocystis* stresszfolyamatokkal. Teljes funkciójuk és egymással való kapcsolatuk azonban máig tisztázatlan (Červený és mtsai., 2015; Los és mtsai., 2010; Margulis és mtsai., 2020; Shoumskaya és mtsai., 2005).

Sikeresen kimutattuk, hogy léteznek olyan $^1O_2$-re gátlódó gének (23., 25. ábra és 3. táblázat), melyek specifikus génexpressziós csökkenést mutatnak a $^1O_2$ jelenlétében, igaz jóval kisebb számban, mint a $^1O_2$ indukált gének. A $^1O_2$ génexpressziójának ezen oldalával az irodalom eddig még számottevően nem foglalkozott, mi viszont kimutattuk, hogy érdemes foglalkozni a $^1O_2$ represszios hatásával is. A $^1O_2$-re gátlódó gének között szintén akadt olyan, melyet már korábban kapcsolatba hoztak az oxidatív és egyéb stresszhatásokkal *Synechocystis*-ben (Los és mtsai., 2010). Ezen gének közül a *hspA*-t és a *coaT*-t kivéve mind hipotetikus fehérjét kódoló gén. Ilyen gén az *sll0846*-os gén, valamint az *slr7008*-as gén is.

Számos olyan gént azonosítottunk tehát, amelyek expressziója $^1O_2$ kezelés hatására megváltozott, és korábban a szakirodalom kapcsolatba hozta oxidatív stresszel illetve Hik szabályozási rendszerrel (Los és mtsai., 2010; Shoumskaya és mtsai., 2005). Azonban ezen kapcsolatok részletes felderítése túlmutat a jelen tanulmány keretein. A fentiek szerint kiválasztott gének további vizsgálata szükséges ahhoz, hogy pontos következtetéseket vonjunk le szerepükről a $^1O_2$-jelátvitelben. Ugyanakkor a céljainknak legjobban megfelelő $^1O_2$ specikus gént, a *hliB*-t mind génexpressziós szinten mind pedig a promóterének riporter konstrukcióban történő felhasználásával is megvizsgáltuk (15., 18., 19., és 20. ábra). Kísérleteink során azt is sikerült igazolnunk, hogy a *hliB* magasfény függése mellett exogén $^1O_2$ specifitást is mutat, ami a jövőben biztos alapot nyújt az intracelluláris $^1O_2$ folyamatos *in vivo* kimutatásához a cianobaktérium sejtekben.

6. Summary of the Ph.D. thesis

6.1 Increasing the detection limit of heavy metal bioreporters

Several whole-cell reporter organisms have been developed using *Synechocystis* cells to indicate the presence of various metal cations in contaminated soils or wastewater samples. The widespread use of this type of whole-cell bioreporters is in many cases limited by their detection threshold (Table 2). Cell responses to individual metal ions depend on their intracellular concentration, which is determined by the combined operation of the efflux and influx systems and ion channels. By eliminating the three gene clusters responsible for HM export, we created a mutant with an increased intracellular HM concentration compared to the wild type. This mutant showed inhibited growth compared to the wild-type strain, even below the previously described IC_{min} concentrations. The IC_{min} value of cobalt was 2 μM in the WT strain, while this was observed in the NiCoZia mutant at a concentration of 0.1 μM $CoCl_2$, which means 20-fold increase sensitivity for cobalt (Fig. 10 c, d). The NiCoZia mutant was also more sensitive to zinc than the WT, with an IC_{min} value of 0.5 μM ZnSO4 (Fig. 10 e f) and for nickel with a concentration of 1 μM NiCl2 (Fig. 10 a, b).

The higher sensitivity of the NiCozia strain was an effect of the increased intracellular HM concentration, due to the lack of the appropriate transporters, which was also confirmed by the ICP-MS determination of the intracellular HM content (Figure 11). This feature could be used to improve the sensitivity of specific bioreporter constructs that use HM-sensitive promoter-driven expression of luminescent proteins. Luminescence measurements (Fig. 12 a) showed that the pILAcoaR NiCoZia bioreporter strain showed a three-fold higher sensitivity to cobalt and a 10-fold higher sensitivity to zinc than the bioreporters with the WT background. The pILAziaR NiCoZia bioreporter strain showed nearly 10 times greater sensitivity to Zn^{2+} than the WT variant (Figure 12 b). The pILAnrsRS NiCoZia construct also showed increased sensitivity.

Since we used bidirectional promoter systems, we also investigated the effect of the orientation of the cloned DNA segment. Both nrsRS-1 and nrsRS-2 oriented constructs showed concentration-dependent fluorescence induction. The nrsRS-1 orientation, where the original gene and promoter direction in *Synechocystis* was preserved and only the original transporter genes were replaced by the genes of the luciferase reporter protein, resulted in a higher level of induction and seemed to be more effective than the opposite orientation (Figure 13).

Our study showed that by removing the efflux transporter genes from the cyanobacterial genome and selecting the appropriate orientation of the bidirectional promoter system, a significant, up to tenfold increase in sensitivity can be achieved in the creation of bioreporter strains (Figures 12, 13 and 14).

It is also noteworthy that a roughly 20% increase in the internal Zn^{2+} concentration resulted in ten fold increase in the detection limit of the corresponding bioreporter strain. This result shows that a significant improvement can be achieved by limited manipulation of the genome, which may make the use of biosensors even more competitive and valuable in environmental monitoring (Figures 11 and 14).

Biosensors published in recent years for the detection of Ni^{2+}, Co^{2+} or Zn^{2+} are listed in Table 1. Although their sensitivity can be remarkable, these bioanalytical tools still need to be developed. This part of our research helps to further increase the usability of whole cell-based biosensors by enabling the detection of lower pollutant levels in environmental samples. In addition, it can approach the cyanobacterial bioremediation from a new perspective.

6.2 Singlet oxygen responsive genes in *Synechocystis*

Until now many studies have been devoted to the mapping of $^1O_2$ signaling pathways. However, no specific $^1O_2$ gene has been found in *Synechocystis*, although such genes have long been known in other species (Meskauskiene et al., 2001; Uchoa et al., 2008).

In our work, we managed to perform a complete transcript analysis, where, in addition to the endogenous $^1O_2$ formed during HL, we also treated the bacterial cells with exogenous $^1O_2$. For this, we used Mb and Rb photosensitizer dyes in low concentration (0,5 μM), which are not toxic to the bacterial cell, but generated sufficient $^1O_2$ to induce stress. The specificity of the responses to $^1O_2$ was verified by using His, which inhibits the formation of $^1O_2$. With a whole transcript analysis (Figure 15), it was possible to find candidate genes that showed induction in the presence of endogenously and exogenously generated $^1O_2$, and repression in the presence of the $^1O_2$ inhibitor His (Table 3), thus suggesting their $^1O_2$ dependence. Among the genes, the high light-induced gene *hliB* proved to be an outstanding candidate, which is endogenously and exogenously $^1O_2$-induced and its HL induction was repeatedly confirmed (Figures 15 and 18). In the absence of the *hliB* gene, Δ*hliB Synechocystis* cells show strong growth inhibition during constant exogenous $^1O_2$ treatment (Figures 16, 17).

We also monitored the gene expression activity of the other members of the *hli* gene family (*hliA*; *hliC* and *hliD*), mainly due to the involvement of *hliB*, during which, except for their HL induction described so far, we did not find any significant signs that the other members of the gene family were functionally related to the *hliB* gene with $^1O_2$ and its signal transduction regulation (Figure 18). These genes are either not, or just partially linked to $^1O_2$ signaling.

After searching for $^1O_2$ specific genes, we continued our work with the bioreporter design, focusing on the most promising gene candidate. During this process, we used the promoter of the *hliB* gene to create the bioluminescent reporter strain pILA*hliB* in WT *Synechocystis* (Figure 9). Then we performed $^1O_2$ induction experiments with this bioreporter, based on the gene expression results.

The HL induction of the *hliB* gene was clearly visible during the luminescence measurements with the pILA*hliB* reporter, similar to the gene expression experiments. The luminescence experiments also confirmed the results of previous gene expression experiments, where the externally added exogenous $^1O_2$ was also able to induce the gene. The luminescence in the Mb and Rb treated samples was much higher compared to the samples treated only with HL. In parallel, the presence of His resulted in a decrease in luminescence in these samples, which confirms the $^1O_2$ specificity of the phenomenon (Figures 19 and 20).

With the above results, it was possible to verify the $^1O_2$ dependence of the *hliB* gene by gene expression and bioluminescence measurements, and by the monitoring of the Δ*hliB* strain growth inhibition in the presence of $^1O_2$. This makes it possible to achieve the goal of developing a specific, selective and sensitive measurement method for the detection of singlet oxygen in *Synechocystis* PCC 6803.

We further addressed our work for the characterization of the expression and relationship of presumably $^1O_2$-specific or at least $^1O_2$ linked genes. During the transcriptome analysis, all genes induced and inhibited by $^1O_2$ were characterized as a whole set, and then we plotted which genes were common in the different experiments (Figure 22). This also provides another insight into our work. The genes showing promising results in the individual treatment groups (Figures 22, 24 and 25) were further investigated at the gene expression level.

Besides *hliB*, several interesting genes already associated with oxidative stress showed induction or repression in response to $^1O_2$ (J. Glaeser et al., 2011; Los et al., 2010). For example genes like *idiA* and *idiB*, or *isiA* proved to be sensitive to $^1O_2$ in addition to their iron sensitivity

(J. Glaeser et al., 2011). In our work, these genes were also induced in some cases (Rb treatment) (Table 3), even *isiA* was inhibited by the presence of His.

At the same time, most of the genes induced by $^1O_2$ (Figures 23, 24 and Table 3) have unknown function. Among these genes, there was a Scp-like, high-light-dependent and Chl-binding protein encoding gene; a fasciclin domain containing protein coded gene, a gene encoding an RNA polymerase sigma factor, and a gene encoding a threonine synthase, which together or separately have been repeatedly associated with various stress processes in *Synechocystis*, but their full function and their relationship to each other are still unclear (Červený et al., 2015; Los et al., 2010; Margulis et al., 2020; Shoumskaya et al., 2005).

During our work, we found also $^1O_2$ inhibited genes (Figures 23, 25 and Table 3), and among them there were also genes that were previously associated with oxidative and other stress effects in *Synechocystis* (Los et al, 2010). These genes, except for *hspA* and *coaT*, all are hypothetical protein-coding genes (e.g. *sll0846* and *slr7008*).

The set of $^1O_2$ responsive genes (either induced and repressed) is very interesting and contains genes previously associated with the oxidative stress process of *Synechocystis*, and is expanded with interesting novel genes with unknown functions. Involvement of the histidine kinases (Hik) in oxidative stress is also suggested by several previous studies (Los et al., 2010; Shoumskaya et al., 2005), to which our work does not provide further information since it was not among our goals. Further examination of these genes is necessary to gain more detailed conclusions about their roles in $^1O_2$ signaling. Our main goal was successfully completed, the $^1O_2$-specific gene, *hliB*, was examined in detail at the levels of gene expression and protein induction (Figures 15, 18, 19 and 20). We were able to prove that, in addition to its HL dependence, the *hliB* expression also shows $^1O_2$ specificity, which provides a solid background for future studies aiming the continuous *in vivo* detection of intracellular $^1O_2$ in microalgae cells.

7. Idézett Irodalom

Akulinkina, D. V., Bolychevtseva, Y. V., Elanskaya, I. V., Karapetyan, N. V., & Yurina, N. P. (2015). Association of high light-inducible HliA/HliB stress proteins with photosystem 1 trimers and monomers of the cyanobacterium Synechocystis PCC 6803. *Biochemistry (Moscow)*, *80*(10), 1254–1261. https://doi.org/10.1134/S0006297915100053

Alam, T.-. (2019). Extraction of Natural Colors from Marine Algae. *Journal of Agricultural and Marine Sciences [JAMS]*, *23*(1), 81. https://doi.org/10.24200/jams.vol23iss1pp81-91

Allakhverdiev, S. I., Nishiyama, Y., Miyairi, S., Yamamoto, H., Inagaki, N., Kanesaki, Y., & Murata, N. (2002). Salt stress inhibits the repair of photodamaged photosystem II by suppressing the transcription and translation of psbA genes in Synechocystis. *Plant Physiology*, *130*(3), 1443–1453. https://doi.org/10.1104/pp.011114

Allen Easton, J., Thompson, P., & Crowder, M. W. (2006). Time-dependent translational response of E. coli to excess Zn(II). *Journal of Biomolecular Techniques*, *17*(5), 303–307.

Andersson, L., Hedbrant, A., Bryngelsson, I.-L., Persson, A., Johansson, A., Ericsson, A., Vihlborg, P., Sjögren, B., Särndahl, E., Stockfelt, L., & Westberg, H. (2020). Respiratory Health and Inflammatory Markers—Exposure to Cobalt in the Swedish Hard Metal Industry. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, *62*(10). https://journals.lww.com/joem/Fulltext/2020/10000/Respiratory_Health_and_Inflammatory.8.aspx

Asadulghani, Nitta, K., Kaneko, Y., Kojima, K., Fukuzawa, H., Kosaka, H., & Nakamoto, H. (2004). Comparative analysis of the hspA mutant and wild-type Synechocystis sp. strain PCC 6803 under salt stress: Evaluation of the role of hspA in salt-stress management. *Archives of Microbiology*, *182*(6), 487–497. https://doi.org/10.1007/s00203-004-0733-x

Baptista, M. S., & Vasconcelos, M. T. (2006). Cyanobacteria metal interactions: Requirements, toxicity, and ecological implications. *Critical Reviews in Microbiology*, *32*(3), 127–137. https://doi.org/10.1080/10408410600822934

Barber, J., & Andersson, B. (1992). Too much of a good thing: light can be bad for photosynthesis. *Trends in Biochemical Sciences*, *17*(2), 61–66. https://doi.org/10.1016/0968-0004(92)90503-2

Baumann, B., & van der Meer, J. R. (2007). Analysis of Bioavailable Arsenic in Rice with Whole Cell Living Bioreporter Bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(6), 2115–2120. https://doi.org/10.1021/jf0631676

Belkin, S., Smulski, D. R., Vollmer, A. C., Van Dyk, T. K., & Larossa, R. A. (1996). Oxidative stress detection with Escherichia coli harboring a katG'::lux fusion. *Applied and Environmental Microbiology*, *62*(7), 2252–2256. https://doi.org/10.1128/aem.62.7.2252-2256.1996

Berezhetskyy, A. L., Durrieu, C., Nguyen-Ngoc, H., Chovelon, J. M., Dzyadevych, S. V., & Tran-Minh, C. (2007). Conductometric biosensor based on whole-cell microalgae for assessment of heavy metals in wastewater. *Biopolymers and Cell*, *23*(6), 511–518. https://doi.org/10.7124/bc.000786

Berghoff, B. A., Glaeser, J., Nuss, A. M., Zobawa, M., Lottspeich, F., & Klug, G. (2011). Anoxygenic photosynthesis and photooxidative stress: A particular challenge for Roseobacter. *Environmental Microbiology*, *13*(3), 775–791. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02381.x

Blasi, B., Peca, L., Vass, I., & K??s, P. B. (2012). Characterization of stress responses of heavy metal and metalloid inducible promoters in synechocystis PCC6803. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *22*(2), 166–169. https://doi.org/10.4014/jmb.1106.06050

Borrelly, G. P. M., Rondet, S. A. M., Tottey, S., & Robinson, N. J. (2004). Chimeras of P1-type ATPases and their transcriptional regulators: Contributions of a cytosolic amino-terminal domain to metal specificity. *Molecular Microbiology*, *53*(1), 217–227. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04106.x

Brocklehurst, K. R. (2002). *ZntR is a Zn II -responsive MerR-like transcriptional regulator of zntA in.pdf*. Molecular Microbiology 31(3), 893–902 ZntR.

Campbell, D., Hurry, V., Clarke, A. K., Gustafsson, P., & Öquist, G. (1998). Chlorophyll Fluorescence Analysis of Cyanobacterial Photosynthesis and Acclimation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *62*(3), 667–683. https://doi.org/10.1128/mmbr.62.3.667-683.1998

Camsund, D., Heidorn, T., & Lindblad, P. (2014). Design and analysis of LacI-repressed promoters and DNA-looping in a cyanobacterium. *Journal of Biological Engineering*, *8*(1), 1–23. https://doi.org/10.1186/1754-1611-8-4

Camsund, D., & Lindblad, P. (2014). Engineered transcriptional systems for cyanobacterial biotechnology. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *2*(OCT), 1–9. https://doi.org/10.3389/fbioe.2014.00040

Cassier-Chauvat, C., & Chauvat, F. (2015). Responses to oxidative and heavy metal stresses in cyanobacteria: Recent advances. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(1), 871–886. https://doi.org/10.3390/ijms16010871

Caufield, J. H., Wimble, C., Shary, S., Wuchty, S., & Uetz, P. (2017). Bacterial protein meta-interactomes predict cross-species interactions and protein function. *BMC Bioinformatics*, *18*(1), 1–14. https://doi.org/10.1186/s12859-017-1585-0

Cavet, Jennifer S.; Borrelly, G. P. M. (2003). Zn, Cu and Co in cyanobacteria: selective control of metal availability. *FEMS Microbiology Reviews*, *27*(2–3), 165–181.

Cayron, J., Prudent, E., Escoffier, C., Gueguen, E., Mandrand-Berthelot, M. A., Pignol, D., Garcia, D., & Rodrigue, A. (2017). Pushing the limits of nickel detection to nanomolar range using a set of engineered bioluminescent Escherichia coli. *Environmental Science and Pollution Research*, *24*(1), 4–14. https://doi.org/10.1007/s11356-015-5580-6

Červený, J., Sinetova, M. A., Zavřel, T., & Los, D. A. (2015). Mechanisms of high temperature resistance of Synechocystis sp. PCC 6803: An Impact of histidine kinase 34. *Life*, *5*(1), 676–699. https://doi.org/10.3390/life5010676

Chen, J., Shi, W., Li, W., Chen, G., & Qin, S. (2018). Specific genetic variation in two non-motile substrains of the model cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803. *Journal of Oceanology and Limnology*, *36*(6), 2322–2332. https://doi.org/10.1007/s00343-019-7291-1

Cheregi, O., & Funk, C. (2015). Regulation of the scp Genes in the Cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803 What is New? *Molecules*, *20*(8), 14621–14637. https://doi.org/10.3390/molecules200814621

Cheregi, O., Sicora, C., Kós, P. B., Barker, M., Nixon, P. J., & Vass, I. (2007). The role of the FtsH and Deg proteases in the repair of UV-B radiation-damaged Photosystem II in the cyanobacterium Synechocystis PCC 6803. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1767*(6), 820–828. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2006.11.016

Choi, S. H., & Gu, M. B. (2002). A portable toxicity biosensor using freeze-dried recombinant bioluminescent bacteria. *Biosensors and Bioelectronics*, *17*(5), 433–440. https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00303-7

Das, K. C., & Das, C. K. (2000). Thioredoxin, a singlet oxygen quencher and hydroxyl radical scavenger: Redox independent functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *277*(2), 443–447. https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3689

Das, K. C., & Misra, H. P. (2004). Hydroxyl radical scavenging and singlet oxygen quenching properties of polyamines. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *262*(1–2), 127–133. https://doi.org/10.1023/B:MCBI.0000038227.91813.79

Daunert, S., Barrett, G., Feliciano, J. S., Shetty, R. S., Shrestha, S., & Smith-Spencer, W. (2000). Genetically Engineered Whole-Cell Sensing Systems: Coupling Biological Recognition with Reporter Genes. *Chemical Reviews*, *100*(7), 2705–2738. https://doi.org/10.1021/cr990115p

Davies, M. J. (2004). Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen. *Photochemical and Photobiological Sciences*, *3*(1), 17–25. https://doi.org/10.1039/b307576c

Demmig-Adams, B., & Adams, W. W. (1992). Photoprotection and Other Responses of Plants to High Light Stress. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, *43*(1), 599–626. https://doi.org/10.1146/annurev.pp.43.060192.003123

Devasagayam, T. P. A., Sundquist, A. R., Di Mascio, P., Kaiser, S., & Sies, H. (1991). Activity of thiols as singlet molecular oxygen quenchers. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*, *9*(1), 105–116. https://doi.org/10.1016/1011-1344(91)80008-6

Dmitrieva, V. A., Tyutereva, E. V., & Voitsekhovskaja, O. V. (2020). Singlet oxygen in plants: Generation, detection, and signaling roles. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(9). https://doi.org/10.3390/ijms21093237

Dolganov, N. A. M., Bhaya, D., & Grossman, A. R. (1995). Cyanobacterial protein with similarity to the chlorophyll a/b binding proteins of higher plants: Evolution and regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(2), 636–640. https://doi.org/10.1073/pnas.92.2.636

Dong, G., & Golden, S. S. (2008). How a cyanobacterium tells time. *Current Opinion in Microbiology*, *11*(6), 541–546. https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.10.003

Dühring, U., Axmann, I. M., Hess, W. R., & Wilde, A. (2006). An internal antisense RNA regulates expression of the photosynthesis gene isiA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(18), 7054–7058. https://doi.org/10.1073/pnas.0600927103

Dytłow, S., & Górka-Kostrubiec, B. (2021). Concentration of heavy metals in street dust: an implication of using different geochemical background data in estimating the level of heavy metal pollution. *Environmental Geochemistry and Health*, *43*(1), 521–535. https://doi.org/10.1007/s10653-020-00726-9

Eberhard, S., Finazzi, G., & Wollman, F. A. (2008). The dynamics of photosynthesis. *Annual Review of Genetics*, *42*, 463–515. https://doi.org/10.1146/annurev.genet.42.110807.091452

Elowitz. (2000). A synthetic oscillatory network repressilator. *Nature*, *403*, 335–338.

Erbe, J. L., Adams, A. C., Taylor, K. B., & Hall, L. M. (1996). *Cyanobacteria carrying an*. *May 1995*, 80–83.

Flors, C., Fryer, M. J., Waring, J., Reeder, B., Bechtold, U., Mullineaux, P. M., Nonell, S., Wilson, M. T., & Baker, N. R. (2006). Imaging the production of singlet oxygen in vivo using a new fluorescent sensor, Singlet Oxygen Sensor Green®. *Journal of Experimental Botany*, *57*(8), 1725–1734. https://doi.org/10.1093/jxb/erj181

Foote, C. S., & Clennan, E. L. (1995). Properties and Reactions of Singlet Dioxygen. In C. S. Foote, J. S. Valentine, A. Greenberg, & J. F. Liebman (Eds.), *Active Oxygen in Chemistry* (pp. 105–140). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0874-7_4

Friedland, A., Lu, T., Wang, X., Shi, D., Church, G., & Collins, J. (2009). Synthetic Gene Networks That Count. *Science (New York, N.Y.)*, *324*, 1199–1202. https://doi.org/10.1126/science.1172005

Fry, R. C., Begley, T. J., & Samson, L. D. (2005). Genome-wide responses to DNA-damaging agents. *Annual Review of Microbiology*, *59*, 357–377. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.59.031805.133658

Fufezan, C., Gross, C. M., Sjödin, M., Rutherford, A. W., Krieger-Liszkay, A., & Kirilovsky, D. (2007). Influence of the redox potential of the primary quinone electron acceptor on photoinhibition in photosystem II. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(17), 12492–12502. https://doi.org/10.1074/jbc.M610951200

García-Domínguez, M., Lopez-Maury, L., Florencio, F. J., & Reyes, J. C. (2000). A gene cluster involved in metal homeostasis in the cyanobacterium Synechocystis sp. strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology*, *182*(6), 1507–1514. https://doi.org/10.1128/JB.182.6.1507-1514.2000

Giner-Lamia, J., López-Maury, L., & Florencio, F. J. (2014). Global transcriptional profiles of the copper responses in the cyanobacterium synechocystis sp. PCC 6803. *PLoS ONE*, *9*(9). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108912

Glaeser, J., Nuss, A. M., Berghoff, B. A., & Klug, G. (2011). Singlet Oxygen Stress in Microorganisms. In *Advances in Microbial Physiology* (1st ed., Vol. 58). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381043-4.00004-0

Glaeser, Jens, & Klug, G. (2005). Photo-oxidative stress in Rhodobacter sphaeroides: Protective role of carotenoids and expression of selected genes. *Microbiology*, *151*(6), 1927–1938. https://doi.org/10.1099/mic.0.27789-0

Grass, G., Fan, B., Rosen, B. P., Lemke, K., Schlegel, H. G., & Rensing, C. (2001). NreB from Achromobacter xylosoxidans 31A is a nickel-induced transporter conferring nickel resistance. *Journal of Bacteriology*, *183*(9), 2803–2807. https://doi.org/10.1128/JB.183.9.2803-2807.2001

Grass, Gregor, Fan, B. I. N., Rosen, B. P., Lemke, K., & Rensing, C. (2001). *NreB from*. *183*(9), 2803–2807. https://doi.org/10.1128/JB.183.9.2803

Green, B. R. (2019). What happened to the phycobilisome? *Biomolecules*, *9*(11). https://doi.org/10.3390/biom9110748

Guerrero, F., Carbonell, V., Cossu, M., Correddu, D., & Jones, P. R. (2012). Ethylene Synthesis and Regulated Expression of Recombinant Protein in Synechocystis sp. PCC 6803. *PLoS ONE*, *7*(11). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050470

Gummin, D. D., Mowry, J. B., Beuhler, M. C., Spyker, D. A., Brooks, D. E., Dibert, K. W., Rivers, L. J., Pham, N. P. T., & Ryan, M. L. (2020). 2019 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers' National Poison Data System (NPDS): 37th Annual Report. *Clinical Toxicology (Philadelphia, Pa.)*, *58*(12), 1360–1541. https://doi.org/10.1080/15563650.2020.1834219

Guo, J., Kang, Y., & Feng, Y. (2017). Bioassessment of heavy metal toxicity and enhancement of heavy metal removal by sulfate-reducing bacteria in the presence of zero valent iron. *Journal of Environmental Management*, *203*, 278–285. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.07.075

Halliwell, B, & Gutteridge, J. M. C. (1999). *Free radicals in biology and medicine*. *BOOK*, xxxi, 936p. http://worldveg.tind.io/record/30378

Halliwell, Barry, & Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford university press, USA.

Havaux, M., Eymery, F., Porfirova, S., Rey, P., & Dörmann, P. (2005). Vitamin E protects against photoinhibition and photooxidative stress in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell*, *17*(12), 3451–3469. https://doi.org/10.1105/tpc.105.037036

He, Q., Dolganov, N., Björkman, O., & Grossman, A. R. (2001). The high light-inducible polypeptides in Synechocystis PCC6803. Expression and function in high light. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(1), 306–314. https://doi.org/10.1074/jbc.M008686200

Heidorn, T., Camsund, D., Huang, H.-H., Lindberg, P., Oliveira, P., Stensjö, K., & Lindblad, P. (2011). Chapter Twenty-Four - Synthetic Biology in Cyanobacteria: Engineering and Analyzing Novel Functions. In C. B. T.-M. in E. Voigt (Ed.), *Synthetic Biology, Part A* (Vol. 497, pp. 539–579). Academic Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385075-1.00024-X

Hernández-prieto, M. A. (2009). *The Small Cab-like Proteins in the cyanobacterium Synechocystis sp . PCC 6803 by If , to Man , the cricket seems to hear with its legs , it is possible that to the cricket Man seems to walk on his ears* .

Hideg, É., Kós, P. B., & Vass, I. (2007). Photosystem II damage induced by chemically generated singlet oxygen in tobacco leaves. *Physiologia Plantarum*, *131*(1), 33–40. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.00913.x

Hideg, É., Ogawa, K., Kálai, T., & Hideg, K. (2001). Singlet oxygen imaging in a Arabidopsis thaliana leaves under photoinhibition by excess photosynthetically active radiation. *Physiologia Plantarum*, *112*(1), 10–14. https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1120102.x

Hideg, É., Spetea, C., & Vass, I. (1994). Singlet oxygen production in thylakoid membranes during photoinhibition as detected by EPR spectroscopy. *Photosynthesis Research*, *39*(2), 191–199. https://doi.org/10.1007/BF00029386

Höhner, R., Pribil, M., Herbstová, M., Lopez, L. S., Kunz, H. H., Li, M., Wood, M., Svoboda, V., Puthiyaveetil, S., Leister, D., & Kirchhoff, H. (2020). Plastocyanin is the long-range electron carrier between photosystem II and photosystem i in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *117*(26), 15354–15362. https://doi.org/10.1073/pnas.2005832117

Hsiao, H. Y., He, Q., Van Waasbergen, L. G., & Grossman, A. R. (2004). Control of photosynthetic and high-light-responsive genes by the histidine kinase DspA: Negative and positive regulation and interactions between signal transduction pathways. *Journal of Bacteriology*, *186*(12), 3882–3888. https://doi.org/10.1128/JB.186.12.3882-3888.2004

Huang, H. H., Camsund, D., Lindblad, P., & Heidorn, T. (2010). Design and characterization of molecular tools for a synthetic biology approach towards developing cyanobacterial biotechnology. *Nucleic Acids Research*, *38*(8), 2577–2593. https://doi.org/10.1093/nar/gkq164

Huang, H. H., & Lindblad, P. (2013). Wide-dynamic-range promoters engineered for cyanobacteria. *Journal of Biological Engineering*, *7*(1), 1–11. https://doi.org/10.1186/1754-1611-7-10

Huertas, M. J., López-Maury, L., Giner-Lamia, J., Sánchez-Riego, A. M., & Florencio, F. J. (2014). Metals in cyanobacteria: Analysis of the copper, nickel, cobalt and arsenic homeostasis mechanisms. *Life*, *4*(4), 865–886. https://doi.org/10.3390/life4040865

Hynninen, A., & Virta, M. (2010). Whole-Cell Bioreporters for the Detection of Bioavailable Metals. In S. Belkin & M. B. Gu (Eds.), *Whole Cell Sensing System II: Applications* (pp. 31–63). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/10_2009_9

Imamura, S., & Asayama, M. (2009). Sigma Factors for Cyanobacterial Transcription. *Gene Regulation and Systems Biology*, *3*, GRSB.S2090. https://doi.org/10.4137/grsb.s2090

Ivask, A., Virta, M., & Kahru, A. (2002). Construction and use of specific luminescent recombinant bacterial sensors for the assessment of bioavailable fraction of cadmium, zinc, mercury and chromium in the soil. *Soil Biology and Biochemistry*, *34*, 1439–1447. https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00088-3

J. Sambrook, D.W. Russell. (2001). Molecular cloning : a laboratory manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. In *Zool. Res.* https://doi.org/10.3724/SP.J.1141.2012.01075

Jori, G. (2006). Photodynamic Therapy of Microbial Infections: State of the Art and Perspectives. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, *25*(1–2), 505–520. https://www.dl.begellhouse.com/journals/0ff459a57a4c08d0,5d84548f012e18bf,70ad294f57d6fc57.html

Jori, G., & Brown, S. B. (2004). Photosensitized inactivation of microorganisms. *Photochemical and Photobiological Sciences*, *3*(5), 403–405. https://doi.org/10.1039/b311904c

Kaneko, T., Nakamura, Y., Sasamoto, S., Watanabe, A., Kohara, M., Matsumoto, M., Shimpo, S., Yamada, M., & Tabata, S. (2003). Structural Analysis of Four Large Plasmids Harboring in a Unicellular Cyanobacterium, Synechocystis sp. PCC 6803. *DNA Research*, *10*(5), 221–228. https://doi.org/10.1093/dnares/10.5.221

Kanesaki, Y., Yamamoto, H., Paithoonrangsarid, K., Shoumskaya, M., Suzuki, I., Hayashi, H., & Murata, N. (2007). Histidine kinases play important roles in the perception and signal transduction of hydrogen peroxide in the cyanobacterium, Synechocystis sp. PCC 6803. *Plant Journal*, *49*(2), 313–324. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02959.x

Kauss, D., Bischof, S., Steiner, S., Apel, K., & Meskauskiene, R. (2012). FLU, a negative feedback regulator of tetrapyrrole biosynthesis, is physically linked to the final steps of the Mg++-branch of this pathway. *FEBS Letters*, *586*(3), 211–216. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.12.029

Khan, Z. I., Arshad, N., Ahmad, K., Nadeem, M., Ashfaq, A., Wajid, K., Bashir, H., Munir, M., Huma, B., Memoona, H., Sana, M., Nawaz, K., Sher, M., Abbas, T., & Ugulu, I. (2019). Toxicological potential of cobalt in forage for ruminants grown in polluted soil: a health risk assessment from trace metal pollution for livestock. *Environmental Science and Pollution Research*, 15381–15389. https://doi.org/10.1007/s11356-019-04959-9

Kim, C., Meskauskiene, R., Zhang, S., Lee, K. P., Ashok, M. L., Blajecka, K., Herrfurth, C., Feussner, I., & Apela, K. (2012). Chloroplasts of Arabidopsis are the source and a primary target of a plant-specific programmed cell death signaling pathway. *Plant Cell*, *24*(7), 3026–3039. https://doi.org/10.1105/tpc.112.100479

Kim, S.-Y., Jeong, W.-J., Suh, K.-H., Liu, J.-R., & Park, Y.-I. (2008). Cyanobacterial bioreporters for detection of heavy metals, herbicide, and antibiotics. *Journal of Plant Biotechnology*, *35*(2), 141–145. https://doi.org/10.5010/jpb.2008.35.2.141

Kirtania, P., Hódi, B., Mallick, I., Vass, I. Z., Fehér, T., Vass, I., & Kós, P. B. (2019). A single plasmid based CRISPR interference in Synechocystis 6803 – A proof of concept. *PLOS ONE*, *14*(11), e0225375. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225375

Kobielska, P. A., Howarth, A. J., Farha, O. K., & Nayak, S. (2018). Metal–organic frameworks for heavy metal removal from water. *Coordination Chemistry Reviews*, *358*, 92–107. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.12.010

Koch, D., Nies, D. H., & Grass, G. (2007). The RcnRA (YohLM) system of Escherichia coli: A connection between nickel, cobalt and iron homeostasis. *BioMetals*, *20*(5), 759–771. https://doi.org/10.1007/s10534-006-9039-6

Köhler, S., Belkin, S., & Schmid, R. D. (2000). Reporter gene bioassays in environmental analysis. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, *366*(6–7), 769–779. https://doi.org/10.1007/s002160051571

Komenda, J., & Sobotka, R. (2016). Cyanobacterial high-light-inducible proteins - Protectors of chlorophyll-protein synthesis and assembly. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1857*(3), 288–295. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2015.08.011

Korste, A., Wulfhorst, H., Ikegami, T., Nowaczyk, M. M., & Stoll, R. (2015). Solution structure of the NDH-1 complex subunit CupS from Thermosynechococcus elongatus. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1847*(10), 1212–1219. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2015.05.003

Krieger-Liszkay, A. (2005). Singlet oxygen production in photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, *56*(411), 337–346. https://doi.org/10.1093/jxb/erh237

Krieger-Liszkay, A., Fufezan, C., & Trebst, A. (2008). Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanism. *Photosynthesis Research*, *98*(1–3), 551–564. https://doi.org/10.1007/s11120-008-9349-3

Kruk, J., & Szymańska, R. (2021). Singlet oxygen oxidation products of carotenoids, fatty acids and phenolic prenyllipids. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *216*(November 2020). https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2021.112148

Kruk, J., & Trebst, A. (2008). Plastoquinol as a singlet oxygen scavenger in photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1777*(2), 154–162. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2007.10.008

Kufryk, G., Hernandez-Prieto, M. A., Kieselbach, T., Miranda, H., Vermaas, W., & Funk, C. (2008). Association of small CAB-like proteins (SCPs) of Synechocystis sp. PCC 6803 with Photosystem II. *Photosynthesis Research*, *95*(2–3), 135–145. https://doi.org/10.1007/s11120-007-9244-3

Kumar, A., Chaturvedi, A. K., Yadav, K., Arunkumar, K. P., Malyan, S. K., Raja, P., Kumar, R., Khan, S. A., Yadav, K. K., Rana, K. L., Kour, D., Yadav, N., & Yadav, A. N. (2019). Fungal Phytoremediation of Heavy Metal-Contaminated Resources: Current Scenario and Future Prospects. In A. N. Yadav, S. Singh, S. Mishra, & A. Gupta (Eds.), *Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi: Volume 3: Perspective for Sustainable Environments* (pp. 437–461). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-25506-0_18

Kunert, A., Hagemann, M., & Erdmann, N. (2000). Construction of promoter probe vectors for Synechocystis sp. PCC 6803 using the light-emitting reporter systems Gfp and LuxAB. *Journal of Microbiological Methods*, *41*(3), 185–194. https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00162-7

Latorre-Esteves, E., Akilov, O. E., Rai, P., Beverley, S. M., & Hasan, T. (2010). Monitoring the efficacy of antimicrobial photodynamic therapy in a murine model of cutaneous leishmaniasis using L. major expressing GFP. *Journal of Biophotonics*, *3*(5–6), 328–335. https://doi.org/10.1002/jbio.201000008

Lee, S. W., Glickmann, E., & Cooksey, D. A. (2001). Chromosomal Locus for Cadmium Resistance in Pseudomonas putida Consisting of a Cadmium-Transporting ATPase and a MerR Family Response Regulator. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*(4), 1437–1444. https://doi.org/10.1128/AEM.67.4.1437-1444.2001

Leedjärv, A., Ivask, A., & Virta, M. (2008). Interplay of different transporters in the mediation of divalent heavy metal resistance in Pseudomonas putida KT2440. *Journal of Bacteriology*, *190*(8), 2680–2689. https://doi.org/10.1128/JB.01494-07

Leisinger, U., Rüfenacht, K., Fischer, B., Pesaro, M., Spengler, A., Zehnder, A. J. B., & Eggen, R. I. L. (2001a). The glutathione peroxidase homologous gene from Chlamydomonas reinhardtii is transcriptionally up-regulated by singlet oxygen. *Plant Molecular Biology*, *46*, 395–408.

Leisinger, U., Rüfenacht, K., Fischer, B., Pesaro, M., Spengler, A., Zehnder, A. J. B., & Eggen, R. I. L. (2001b). The glutathione peroxidase homologous gene from Chlamydomonas reinhardtii is transcriptionally up-regulated by singlet oxygen. *Plant Molecular Biology*, *46*(4), 395–408. https://doi.org/10.1023/A:1010601424452

Lex, A., Gehlenborg, N., Strobelt, H., Vuillemot, R., & Pfister, H. (2014). UpSet: Visualization of intersecting sets. *IEEE Transactions on Visualization and Computer Graphics*, *20*(12), 1983–1992. https://doi.org/10.1109/TVCG.2014.2346248

Li, L., Aro, E. M., & Millar, A. H. (2018). Mechanisms of Photodamage and Protein Turnover in Photoinhibition. *Trends in Plant Science*, *23*(8), 667–676. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.05.004

Lingvay, M., Akhtar, P., Sebők-Nagy, K., Páli, T., & Lambrev, P. H. (2020). Photobleaching of Chlorophyll in Light-Harvesting Complex II Increases in Lipid Environment. *Frontiers in Plant Science*, *11*(June), 1–14. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00849

Liu, P., Huang, Q., & Chen, W. (2012). Construction and application of a zinc-specific biosensor for assessing the immobilization and bioavailability of zinc in different soils. *Environmental Pollution*, *164*, 66–72. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.01.023

López-Maury, L., García-Domínguez, M., Florencio, F. J., & Reyes, J. C. (2002). A two-component signal transduction system involved in nickel sensing in the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803. *Molecular Microbiology*, *43*(1), 247–256. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02741.x

Los, D. A., Zorina, A., Sinetova, M., Kryazhov, S., Mironov, K., & Zinchenko, V. V. (2010). Stress sensors and signal transducers in cyanobacteria. *Sensors*, *10*(3), 2386–2415. https://doi.org/10.3390/s100302386

Lu, Y. P., Li, Z. S., Drozdowicz, Y. M., Hörtensteiner, S., Martinoia, E., & Rea, P. A. (1998). AtMRP2, an Arabidopsis ATP binding cassette transporter able to transport glutathione S-conjugates and chlorophyll catabolites: Functional comparisons with AtMRP1. *Plant Cell*, *10*(2), 267–282. https://doi.org/10.1105/tpc.10.2.267

Macpherson, A. N., Telfer, A., Barber, J., & Truscott, T. G. (1993). Direct detection of singlet oxygen from isolated Photosystem II reaction centres. *BBA - Bioenergetics*, *1143*(3), 301–309. https://doi.org/10.1016/0005-2728(93)90201-P

Maisch, T., Baier, J., Franz, B., Maier, M., Landthaler, M., Szeimies, R. M., & Bäumler, W. (2007). The role of singlet oxygen and oxygen concentration in photodynamic inactivation of bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(17), 7223–7228. https://doi.org/10.1073/pnas.0611328104

Maitra, S. (2016). Study of Genetic Determinants of Nickel and Cadmium Resistance in Bacteria-A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *5*(11), 459–471. https://doi.org/10.20546/ijcmas.2016.511.053

Margulis, K., Zer, H., Lis, H., Schoffman, H., Murik, O., Shimakawa, G., Krieger-Liszkay, A., & Keren, N. (2020). Over expression of the cyanobacterial pgr5-homologue leads to pseudoreversion in a gene coding for a putative esterase in synechocystis 6803. *Life*, *10*(9), 1–14. https://doi.org/10.3390/life10090174

Marie R.B. Binet, R. K. P. (2000). *Cd II Pb II and Zn II ions regulate expression of the metal-transporting P-type ATPase.pdf*. FEBS Letters 473 67^70.

Martín-Betancor, K., Rodea-Palomares, I., Muñoz-Martín, M. A., Leganés, F., & Fernández-Piñas, F. (2015). Construction of a self-luminescent cyanobacterial bioreporter that detects a broad range of bioavailable heavy metals in aquatic environments. *Frontiers in Microbiology*, *6*(MAR), 1–11. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00186

Maslin, P., & Maier, R. M. (2000). Rhamnolipid-Enhanced Mineralization of Phenanthrene in Organic-Metal Co-Contaminated Soils. *Bioremediation Journal*, *4*(4), 295–308. https://doi.org/10.1080/10889860091114266

Mermet-Bouvier, P., Cassier-Chauvat, C., Marraccini, P., & Chauvat, F. (1993). Transfer and replication of RSF1010-derived plasmids in several cyanobacteria of the generaSynechocystis andSynechococcus. *Current Microbiology*, *27*, 323–327. https://doi.org/10.1007/BF01568955

Meskauskiene, R., Nater, M., Goslings, D., Kessler, F., Op den Camp, R., & Apel, K. (2001). FLU: A negative regulator of chlorophyll biosynthesis in arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(22), 12826–12831. https://doi.org/10.1073/pnas.221252798

Michel, K. P., & Pistorius, E. K. (2004). Adaptation of the photosynthetic electron transport chain in cyanobacteria to iron deficiency: The function of IdiA and IsiA. *Physiologia Plantarum*, *120*(1), 36–50. https://doi.org/10.1111/j.0031-9317.2004.0229.x

Mironov, K. S., Sinetova, M. A., Shumskaya, M., & Los, D. A. (2019). Universal molecular triggers of stress responses in cyanobacterium Synechocystis. *Life*, *9*(3), 1–18. https://doi.org/10.3390/life9030067

Mohamed, A., & Jansson, C. (1989). Influence of light on accumulation of photosynthesis-specific transcripts in the cyanobacterium Synechocystis 6803. *Plant Molecular Biology*, *13*(6), 693–700. https://doi.org/10.1007/BF00016024

Mohseni, M., Abbaszadeh, J., Maghool, S. S., & Chaichi, M. J. (2018). Heavy metals detection using biosensor cells of a novel marine luminescent bacterium Vibrio sp. MM1 isolated from the Caspian Sea. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *148*(January 2017), 555–560. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.11.002

Møller, S. G., Kunkel, T., & Chua, N. H. (2001). A plastidic ABC protein involved in intercompartmental communication of light signaling. *Genes and Development*, *15*(1), 90–103. https://doi.org/10.1101/gad.850101

Mosinger, J., Jirsák, O., Kubát, P., Lang, K., & Mosinger, B. (2007). Bactericidal nanofabrics based on photoproduction of singlet oxygen. *J. Mater. Chem.*, *17*(2), 164–166. https://doi.org/10.1039/B614617A

Müller, A. U., Leibundgut, M., Ban, N., & Weber-Ban, E. (2019). Structure and functional implications of WYL domain-containing bacterial DNA damage response regulator PafBC. *Nature Communications*, *10*(1), 1–14. https://doi.org/10.1038/s41467-019-12567-x

Murata, N., Takahashi, S., Nishiyama, Y., & Allakhverdiev, S. I. (2007). Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1767*(6), 414–421. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2006.11.019

Nagajyoti, P. C., Lee, K. D., & Sreekanth, T. V. M. (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: A review. *Environmental Chemistry Letters*, *8*(3), 199–216. https://doi.org/10.1007/s10311-010-0297-8

Nelson, N. (2011). Photosystems and global effects of oxygenic photosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1807*(8), 856–863. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2010.10.011

Nies, D. H., Nies, A., Chu, L., & Silver, S. (1989). Expression and nucleotide sequence of a plasmid-determined divalent cation efflux system from Alcaligenes eutrophus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *86*(19), 7351–7355. https://doi.org/10.1073/pnas.86.19.7351

Nies, Dietrich H. (2003). Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, *27*(2–3), 313–339. https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00048-2

Nucifora, G., Chu, L., Misra, T. K., & Silver, S. (1989). Cadmium resistance from Staphylococcus aureus plasmid pI258 cadA gene results from a cadmium-efflux ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *86*(10), 3544–3548. https://doi.org/10.1073/pnas.86.10.3544

Op Den Camp, R. G. L., Przybyla, D., Ochsenbein, C., Laloi, C., Kim, C., Danon, A., Wagner, D., Hideg, É., Göbel, C., Feussner, I., Nater, M., & Apel, K. (2003). Rapid Induction of Distinct Stress Responses after the Release of Singlet Oxygen in Arabidopsis. *Plant Cell*, *15*(10), 2320–2332. https://doi.org/10.1105/tpc.014662

Osmond, C. B., Foyer, C. H., Bock, G., Cogdell, R. J., Howard, T. D., Bittl, R., Schlodder, E., Geisenheimer, I., & Lubitz, W. (2000). How carotenoids protect bacterial photosynthesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *355*(1402), 1345–1349. https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0696

Patterson, C. J., Pernil, R., Foster, A. W., & Robinson, N. J. (2016). Cyanobacterial models that address cross-talk in metal homeostasis. In *Metals in Cells*.

Patterson, C. J., Pernil, R., Foster, A. W., & Robinson, N. J. (2013). *Metal Homeostasis: Cyanobacterial Models That Address Cross-Talk*.

Patyi, G., Hódi, B., Solymosi, D., Vass, I., & Kós, P. B. (2021). Increased sensitivity of heavy metal bioreporters in transporter deficient Synechocystis PCC6803 mutants. *Plos One*, *16*(12), e0261135. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261135

Peca, L., Kós, P. B., Máté, Z., Farsang, A., & Vass, I. (2008). Construction of bioluminescent cyanobacterial reporter strains for detection of nickel, cobalt and zinc. *FEMS Microbiology Letters*, *289*(2), 258–264. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01393.x

Peca, L., Kós, P. B., & Vass, I. (2007). Characterization of the activity of heavy metal-responsive promoters in the cyanobacterium Synechocystis PCC 6803. *Acta Biologica Hungarica*, *58 Suppl*, 11–22. https://doi.org/10.1556/ABiol.58.2007.Suppl.2

Peca, L., Nagy, C. I., Ôrdog, A., Vass, I., & Kós, P. B. (2017). Development of a bioluminescent cyanobacterial reporter strain for detection of arsenite, arsenate and antimonite. *Environmental Engineering and Management Journal*, *16*(11), 2443–2450. https://doi.org/10.30638/eemj.2017.252

Pennella, M. A., Shokes, J. E., Cosper, N. J., Scott, R. A., & Giedroc, D. P. (2003). Structural elements of metal selectivity in metal sensor proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(7), 3713–3718. https://doi.org/10.1073/pnas.0636943100

Pope, B., & Kent, H. M. (1996). High efficiency 5 min transformation of Escherichia coli. *Nucleic Acids Research*, *24*(3), 536–537. https://doi.org/10.1093/nar/24.3.536

Pospíšil, P. (2009). Production of reactive oxygen species by photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1787*(10), 1151–1160. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2009.05.005

Promnares, K., Komenda, J., Bumba, L., Nebesarova, J., Vacha, F., & Tichy, M. (2006). Cyanobacterial small chlorophyll-binding protein ScpD (HliB) is located on the periphery of photosystem II in the vicinity of PsbH and CP47 subunits. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(43), 32705–32713. https://doi.org/10.1074/jbc.M606360200

Ramachandra, T. V., Sudarshan, P. B., Mahesh, M. K., & Vinay, S. (2018). Spatial patterns of heavy metal accumulation in sediments and macrophytes of Bellandur wetland, Bangalore. *Journal of Environmental Management*, *206*, 1204–1210. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.10.014

Rampley, C. P. N., Whitehead, P. G., Softley, L., Hossain, M. A., Jin, L., David, J., Shawal, S., Das, P., Thompson, I. P., Huang, W. E., Peters, R., Holdship, P., Hope, R., & Alabaster, G. (2020). River toxicity assessment using molecular biosensors: Heavy metal contamination in the Turag-Balu-Buriganga river systems, Dhaka, Bangladesh. *Science of the Total Environment*, *703*, 134760. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134760

Ravikumar, S., Ganesh, I., Yoo, I. K., & Hong, S. H. (2012). Construction of a bacterial biosensor for zinc and copper and its application to the development of multifunctional heavy metal adsorption bacteria. *Process Biochemistry*, *47*(5), 758–765. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.02.007

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. *Physiologia Plantarum*, *172*(1), 7–18. https://doi.org/10.1111/ppl.13265

Rehman, A. U., Cser, K., Sass, L., & Vass, I. (2013). Characterization of singlet oxygen production and its involvement in photodamage of Photosystem II in the cyanobacterium Synechocystis PCC 6803 by histidine-mediated chemical trapping. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1827*(6), 689–698. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2013.02.016

Rengstl, B., Knoppová, J., Komenda, J., & Nickelsen, J. (2013). Characterization of a Synechocystis double mutant lacking the photosystem II assembly factors YCF48 and Sll0933. *Planta*, *237*(2), 471–480. https://doi.org/10.1007/s00425-012-1720-0

Rich, P. R. (2008). A perspective on Peter Mitchell and the chemiosmotic theory. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, *40*(5), 407–410. https://doi.org/10.1007/s10863-008-9173-7

Rippka, R., Deruelles, J., & Waterbury, J. B. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, *111*(1), 1–61. https://doi.org/10.1099/00221287-111-1-1

Rutherford, J. C., Cavet, J. S., & Robinson, N. J. (1999a). Cobalt-dependent transcriptional switching by a dual-effector MerR-like protein regulates a cobalt-exporting variant CPx-type ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(36), 25827–25832. https://doi.org/10.1074/jbc.274.36.25827

Rutherford, J. C., Cavet, J. S., & Robinson, N. J. (1999b). Cobalt-dependent transcriptional switching by a dual-effector MerR-like protein regulates a cobalt-exporting variant CPx-type ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(36), 25827–25832. https://doi.org/10.1074/jbc.274.36.25827

Scheller, H. V., & Haldrup, A. (2005). Photoinhibition of photosystem I. *Planta*, *221*(1), 5–8. https://doi.org/10.1007/s00425-005-1507-7

Schirrmeister, B. E., Gugger, M., & Donoghue, P. C. J. (2015). Cyanobacteria and the Great Oxidation Event: Evidence from genes and fossils. *Palaeontology*, *58*(5), 769–785. https://doi.org/10.1111/pala.12178

Schmidt, T., & Schlegel, H. G. (1994). Combined nickel-cobalt-cadmium resistance encoded by the ncc locus of Alcaligenes xylosoxidans 31A. *Journal of Bacteriology*, *176*(22), 7045–7054. https://doi.org/10.1128/jb.176.22.7045-7054.1994

Scholz, I., Lott, S. C., Behler, J., Gärtner, K., Hagemann, M., & Hess, W. R. (2019). Divergent methylation of CRISPR repeats and cas genes in a subtype I-D CRISPR-Cas-system. *BMC Microbiology*, *19*(1), 1–11. https://doi.org/10.1186/s12866-019-1526-3

Seán Turner, Tan-Chi Huang, and S.-M. C. (2001). *Molecular phylogeny of nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria*. Bot. Bull. Acad. Sin. https://ejournal.sinica.edu.tw/bbas/content/2001/3/bot423-04.html

Selifonova, O., Burlage, R., & Barkay, T. (1993). Bioluminescent sensors for detection of bioavailable Hg(II) in the environment. *Applied and Environmental Microbiology*, *59*(9), 3083–3090. https://doi.org/10.1128/aem.59.9.3083-3090.1993

Selvi, A., Rajasekar, A., Theerthagiri, J., Ananthaselvam, A., Sathishkumar, K., Madhavan, J., & Rahman, P. K. S. M. (2019). Integrated remediation processes toward heavy metal removal/recovery from various environments-A review. *Frontiers in Environmental Science*, *7*(May). https://doi.org/10.3389/fenvs.2019.00066

Shahzad, B., Tanveer, M., Che, Z., Rehman, A., Cheema, S. A., Sharma, A., Song, H., Rehman, S. ur, & Zhaorong, D. (2018). Role of 24-epibrassinolide (EBL) in mediating heavy metal and pesticide induced oxidative stress in plants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *147*(September 2017), 935–944. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.09.066

Shi, W., Wu, J., & Rosen, B. P. (1994). Identification of a putative metal binding site in a new family of metalloregulatory proteins. *Journal of Biological Chemistry*, *269*(31), 19826–19829. https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)32094-x

Shoumskaya, M. A., Paithoonrangsarid, K., Kanesaki, Y., Los, D. A., Zinchenko, V. V., Tanticharoen, M., Suzuki, I., & Murata, N. (2005). Identical Hik-Rre systems are involved in perception and transduction of salt signals and hyperosmotic signals but regulate the expression of individual genes to different extents in Synechocystis. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(22), 21531–21538. https://doi.org/10.1074/jbc.M412174200

Sinetova, M. A., & Los, D. A. (2016). New insights in cyanobacterial cold stress responses: Genes, sensors, and molecular triggers. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, *1860*(11), 2391–2403. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.07.006

SINHA, R. K., KOMENDA, J., KNOPPOVÁ, J., SEDLÁŘOVÁ, M., & POSPÍŠIL, P. (2012). Small CAB-like proteins prevent formation of singlet oxygen in the damaged photosystem II complex of the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803. *Plant, Cell \& Environment*, *35*(4), 806–818. https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02454.x

Sposito, G., & Page, A. L. (1984). Cycling of metal ions in the soil environment. *Metal Ions in Biological Systems*, *18*, 287–332.

Strand, A., Asami, T., & Ecker, J. R. (2003). Chloroplast comunication triggered by accumulation of Mg-protoporphyrinknix. *Nature*, *421*(October 2002), 79–83. https://doi.org/10.1038/nature01250.1.

Suh, H.-J., Lee, H.-W., & Jung, J. (2003). Mycosporine Glycine Protects Biological Systems Against Photodynamic Damage by Quenching Singlet Oxygen with a High Efficiency¶. *Photochemistry and Photobiology*, *78*(2), 109. https://doi.org/10.1562/0031-8655(2003)078<0109:mgpbsa>2.0.co;2

Sundararaju, S., Arumugam, M., & Bhuyar, P. (2020). Microbacterium sp. MRS-1, a potential bacterium for cobalt reduction and synthesis of less/non-toxic cobalt oxide nanoparticles (Co3O4). *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, *9*(1). https://doi.org/10.1186/s43088-020-00070-y

Sundukov, Y. N. (2006). First record of the ground beetle Trechoblemus postilenatus (Coleoptera, Carabidae) in Primorskii krai. *Far Eastern Entomologist*, *165*(April), 16. https://doi.org/10.1002/tox

Suzuki, I., Kanesaki, Y., Hayashi, H., Hall, J. J., Simon, W. J., Slabas, A. R., & Murata, N. (2005). The histidine kinase Hik34 is involved in thermotolerance by regulating the expression of heat shock genes in Synechocystis. *Plant Physiology*, *138*(3), 1409–1421. https://doi.org/10.1104/pp.104.059097

Tajima, N., Sato, S., Maruyama, F., Kaneko, T., Sasaki, N. V., Kurokawa, K., Ohta, H., Kanesaki, Y., Yoshikawa, H., Tabata, S., Ikeuchi, M., & Sato, N. (2011). Genomic structure of the cyanobacterium synechocystis sp. PCC 6803 strain GT-S. *DNA Research*, *18*(5), 393–399. https://doi.org/10.1093/dnares/dsr026

Tandori, J., Hideg, É., Nagy, L., Maróti, P., & Vass, I. (2001). Photoinhibition of carotenoidless reaction centers from Rhodobacter sphaeroides by visible light. Effects on protein structure and electron transport. *Photosynthesis Research*, *70*(2), 175–184. https://doi.org/10.1023/A:1017907404325

Telfer, A., Bishop, S. M., Phillips, D., & Barber, J. (1994). Isolated photosynthetic reaction center of photosystem II as a sensitizer for the formation of singlet oxygen. Detection and quantum yield determination using a chemical trapping technique. *Journal of Biological Chemistry*, *269*(18), 13244–13253. https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)36825-4

Teodor, A. H., & Bruce, B. D. (2020). Putting Photosystem I to Work: Truly Green Energy. *Trends in Biotechnology*, *38*(12), 1329–1342. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.04.004

Thelwell, C., Robinson, N. J., & Turner-Cavet, J. S. (1998). An SmtB-like repressor from Synechocystis PCC 6803 regulates a zinc exporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(18), 10728–10733. https://doi.org/10.1073/pnas.95.18.10728

Tibazarwa, C., Corbisier, P., Mench, M., Bossus, A., Solda, P., Mergeay, M., Wyns, L., & Van der Lelie, D. (2001). A microbial biosensor to predict bioavailable nickel in soil and its transfer to plants. *Environmental Pollution*, *113*(1), 19–26. https://doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00177-9

Tibiletti, T., Hernández-Prieto, M. A., Matthijs, H. C. P., Niyogi, K. K., & Funk, C. (2016). Deletion of the gene family of small chlorophyll-binding proteins (ScpABCDE) offsets C/N homeostasis in Synechocystis PCC 6803. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1857*(4), 396–407. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2015.11.011

Tomo, T., Kusakabe, H., Nagao, R., Ito, H., Tanaka, A., Akimoto, S., Mimuro, M., & Okazaki, S. (2012). Luminescence of singlet oxygen in photosystem II complexes isolated from cyanobacterium Synechocystis sp. PCC6803 containing monovinyl or divinyl chlorophyll a. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1817*(8), 1299–1305. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2012.02.018

Trang, P. T. K., Berg, M., Viet, P. H., Mui, N. Van, & van der Meer, J. R. (2005). Bacterial Bioassay for Rapid and Accurate Analysis of Arsenic in Highly Variable Groundwater Samples. *Environmental Science & Technology*, *39*(19), 7625–7630. https://doi.org/10.1021/es050992e

Trebst, A. (2003). Function of β-Carotene and Tocopherol in Photosystem II. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, *58*(9–10), 609–620. https://doi.org/10.1515/znc-2003-9-1001

Trebst, A., Depka, B., & Holländer-Czytko, H. (2002). A specific role for tocopherol and of chemical singlet oxygen quenchers in the maintenance of photosystem II structure and function in Chlamydomonas reinhardtii. *FEBS Letters*, *516*(1–3), 156–160. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02526-7

Trögl, J., Chauhan, A., Ripp, S., Layton, A. C., Kuncová, G., & Sayler, G. S. (2012). Pseudomonas fluorescens HK44: Lessons learned from a model whole-cell bioreporter with a broad application history. *Sensors*, *12*(2), 1544–1571. https://doi.org/10.3390/s120201544

Uchoa, A. F., Knox, P. P., Turchielle, R., Seifullina, N. K., & Baptista, M. S. (2008). Singlet oxygen generation in the reaction centers of Rhodobacter sphaeroides. *European Biophysics Journal*, *37*(6), 843–850. https://doi.org/10.1007/s00249-008-0287-y

Van Der Meer, J. R., & Belkin, S. (2010). Where microbiology meets microengineering: Design and applications of reporter bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, *8*(7), 511–522. https://doi.org/10.1038/nrmicro2392

Van Dyk, T. K., Majarian, W. R., Konstantinov, K. B., Young, R. M., Dhurjati, P. S., & LaRossa, R. A. (1994). Rapid and sensitive pollutant detection by induction of heat shock gene-bioluminescence gene fusions. *Applied and Environmental Microbiology*, *60*(5), 1414–1420. https://doi.org/10.1128/aem.60.5.1414-1420.1994

Van Waasbergen, L. G., Dolganov, N., & Grossman, A. R. (2002). nblS, a gene involved in controlling photosynthesis-related gene expression during high light and nutrient stress in Synechococcus elongatus pcc 7942. *Journal of Bacteriology*, *184*(9), 2481–2490. https://doi.org/10.1128/JB.184.9.2481-2490.2002

Vass, I. (2011). Role of charge recombination processes in photodamage and photoprotection of the photosystem II complex. *Physiologia Plantarum*, *142*(1), 6–16. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01454.x

Vass, I., Cook, K. M., Deák, Z., mayes, S. R., & Barber, J. (1992). Thermoluminescence and flash-oxygen characterization of the IC2 deletion mutant of Synechocystis sp. PCC 6803 lacking the Photosystem II 33 kDa protein. *BBA - Bioenergetics*, *1102*(2), 195–201. https://doi.org/10.1016/0005-2728(92)90100-G

Verma, N., & Singh, M. (2006). A Bacillus sphaericus based biosensor for monitoring nickel ions in industrial effluents and foods. *Journal of Automated Methods and Management in Chemistry*, *2006*, 1–4. https://doi.org/10.1155/JAMMC/2006/83427

Virta, M., Lampinen, J., & Karp, M. (1995). A Luminescence-Based Mercury Biosensor. *Analytical Chemistry*, *67*(3), 667–669. https://doi.org/10.1021/ac00099a027

Vranova, E., Inze, D., & Breusegem, F. Van. (2002). <*SignaltransOxidStress-Inze.pdf*>. *53*(372), 1227–1236.

Wang, L., Kim, C., Xu, X., Piskurewicz, U., Dogra, V., Singh, S., Mahler, H., & Apel, K. (2016). Singlet oxygen- and EXECUTER1-mediated signaling is initiated in grana margins and depends on the protease FtsH2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(26), E3792–E3800. https://doi.org/10.1073/pnas.1603562113

Wang, Q., Jantaro, S., Lu, B., Majeed, W., Bailey, M., & He, Q. (2008). The high light-inducible polypeptides stabilize trimeric photosystem I complex under high light conditions in Synechocystis PCC 6803. *Plant Physiology*, *147*(3), 1239–1250. https://doi.org/10.1104/pp.108.121087

Weber, H. (2002). Fatty acid-derived signals in plants. *Trends in Plant Science*, *7*(5), 217–224. https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02250-1

Whitton, B. A. (2012). *Brian A. Whitton, Malcolm Potts (auth.), Brian A. Whitton (eds.)-Ecology of Cyanobacteria II_ Their Diversity in Space and Time-Springer Netherlands (2012)*.

WHO, W. H. O. (2017). *Guidelines for drinking-water quality. incorporating the first addendum. Geneva, Switzerland: WHO; 2017*. ISBN 978-92-4-154995-0.

Wuana, R. A., & Okieimen, F. E. (2011). Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. *ISRN Ecology*, *2011*, 1–20. https://doi.org/10.5402/2011/402647

Yoon, K. P., & Silver, S. (1991). A second gene in the Staphylococcus aureus cadA cadmium resistance determinant of plasmid pI258. *Journal of Bacteriology*, *173*(23), 7636–7642. https://doi.org/10.1128/jb.173.23.7636-7642.1991

Yu, Y., You, L., Liu, D., Hollinshead, W., Tang, Y. J., & Zhang, F. (2013). Development of synechocystis sp. PCC 6803 as a phototrophic cell factory. *Marine Drugs*, *11*(8), 2894–2916. https://doi.org/10.3390/md11082894

8. Publikációs lista

(MTMT:10045428)

8.1. A doktori eljárás alapját képező 2 db közlemény

Patyi, G., Hódi, B., Solymosi, D., Vass, I., & Kós, P. B. (2021). Increased sensitivity of heavy metal bioriporters in transporter deficient Synechocystis PCC6803 mutants. Plos One, 16(12), e0261135. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261135 **IF:3.58**

Poór, Péter, **Gábor Patyi**, Zoltán Takács, András Szekeres, Nikolett Bódi, Mária Bagyánszki, and Irma Tari. 2019. "Salicylic Acid-Induced ROS Production by Mitochondrial Electron Transport Chain Depends on the Activity of Mitochondrial Hexokinases in Tomato (Solanum Lycopersicum L.)." Journal of Plant Research 132 (2): 273–83. https://doi.org/10.1007/s10265-019-01085-y. **IF:2.19**

8.2. Referált folyóiratban megjelent közlemények

8.2.1 A disszertáció témájához kapcsolódó közlemények

Patyi, G., Hódi, B., Solymosi, D., Vass, I., & Kós, P. B. (2021). Increased sensitivity of heavy bmetal bioriporters in transporter deficient Synechocystis PCC6803 mutants. *Plos One*, *16*(12), e0261135. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261135 **IF:3.58**

8.2.2. Egyéb közlemények

Poór, Péter, **Gábor Patyi**, Zoltán Takács, András Szekeres, Nikolett Bódi, Mária Bagyánszki, and Irma Tari. 2019. "Salicylic Acid-Induced ROS Production by Mitochondrial Electron Transport Chain Depends on the Activity of Mitochondrial Hexokinases in Tomato (Solanum Lycopersicum L.)." Journal of Plant Research 132 (2): 273–83. https://doi.org/10.1007/s10265-019-01085-y. **IF:2.19**

Poór, P., Z. Takács, **G. Patyi**, P. Borbély, O. Bencsik, A. Szekeres, and I. Tari. 2018. "Dark-Induced Changes in the Activity and the Expression of Tomato Hexokinase Genes Depend on the Leaf Age." South African Journal of Botany 118: 98–104. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.06.006. **IF:1.63**

ÖSSZ. IF.:7.4

8.2.3. Folyamatban lévő közlemények

Gábor Patyi, Barbara Hódi, Ivy Mallick, Péter B. Kós, Imre Vass. 2022. Investigation of the singlet oxygen dependence of the *hliB* high light induced gene in *Synechocystis* PCC 6803 cyanobacteria (kézirat előkészületben)

8.3. Egyéb szakmai anyagok

1. Péter Borbély, Péter Poór, Judit Kovács, Zoltán Takács, **Gábor Patyi**, Ágnes Szepesi, Irma Tari (2014) Exogenous sodium nitroprusside alleviates salt-induced changes in photosynthesis of tomato leaves. 11th Congress of the Hungarian Society of Plant Biology, Szeged, Hungary

2. Judit Kovács, Péter Poór, **Gábor Patyi**, Péter Borbély, Ágnes Szepesi, Zoltán Takács, Irma Tari (2014) Investigation of salt stress induced changes in cysteine protease activity in abscisic aciddeficient sitiens tomato (*Solanum lycopersicum*) mutant. 11th Congress of the Hungarian Society of Plant Biology, Szeged, Hungary

3. Péter Poór, Ágnes Gallé, Judit Kovács, Zoltán Takács, Péter Borbély, **Gábor Patyi**, Ágnes Szepesi, Irma Tari (2014) Analysis of light dependent cis-regulatory elements of hexokinase genes in tomato (*Solanum lycopersicum*). 11th Congress of the Hungarian Society of Plant Biology, Szeged, Hungary

4. Péter Poór, **Gábor Patyi**, Irma Tari (2015) In Silico Analysis of cis-Regulatory Elements of Hexokinase Genes in Tomato (Solanum lycopersicum) JOURNAL OF CURRENT PLANT SCIENCE RESEARCH : 1 1 pp 1-10

5. Poór Péter, Németh Edit, **Patyi Gábor**, Czékus Zalán, Takács Zoltán, Szepesi Ágnes, Tari Irma (2015) Fény és sötét által szabályozott oxidatív robbanás és antioxidáns rendszer szalicilsav kezelt paradicsom levelekben. A Magyar Szabadgyök-Kutató Társaság VIII. Kongresszusa : Program és előadáskivonatok Budapest, Magyarország

6. Péter Borbély, Péter Poór, **Gábor Patyi**, Irma Tari (2015) Effect of Ethylene Precursor ACC Pre-Treatment on Photosynthesis Under Salt Stress. Plant Abiotic Stress Tolerance III : Programme and Abstracts Wien, Austria

7. Péter Poór, Zoltán Takács, Péter Borbély, Zalán Czékus, **Gábor Patyi**, Irma Tari (2016) Involvement of ethylene in hydrogen-peroxide metabolism in the leaves of salicylic-acid treated tomato. Plant Biology Europe EPSO/FESPB 2016 Congress : Abstracts

8. Péter Poór, Judit Kovács, Ágnes Szepesi, Péter Borbély, **Gábor Patyi**, Zoltán Takács, Irma Tari (2016) Salt stress-induced oxidative stress in ethylene signaling mutant, Never ripe tomato. Joint development of higher education and training programmes in plant biology in support of knowledge-based society, CLOSING CONFERENCE : Book of abstracts Novi Sad, Serbia

9. Péter Poór, Zalán Czékus, **Gábor Patyi**, Péter Borbély, Judit Kovács, Zoltán Takács, Irma Tari (2016) Investigation of Salt Stress-Induced Changes in Water Status, Photosynthetic Parameters and Cysteine Protease Activity in Wild Type and Abscisic Acid-Deficient Sitiens Mutant of Tomato (*Solanum Lycopersicum cv. Rheinland Ruhm*) Plant Model Species: Fundamentals and Applications : Programme and abstracts Wien, Austria

10. **Gábor Patyi**, Ivy Mallick, Imre Vass and Péter Kós (2017) Singlet oxygen sensing in cyanobacteria. Straub Conference at BRC-HAS, Szeged Hungary

11. **Gábor Patyi**, Barbara Hódi, István Zoltán Vass, Imre Vass, Péter Kós (2019) Assessment of intracellular singlet oxygen by GFP fluorescence in Synechocystis PCC6803. Straub Conference at BRC-HAS, Szeged Hungary

12. **Gábor Patyi**, Barbara Hódi, István Zoltán Vass, Imre Vass, Péter 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.

13. Barbara Hódi, István Zoltán Vass, Ivy Mallick, **Gábor Patyi**, Péter B. Kós, 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.

14. Boglárka Bereczky, **Gábor Patyi**, Lilla Futó-Dékány, Krisztián Laczi, Péter B. Kós (2022) Straub Conference at BRC-HAS, Szeged Hungary

15. **Patyi Gábor**, Hódi Barbara, Solymosi Dániel, Vass Imre, Kós Péter (2022) NEHÉZFÉM BIORIPORTEREK ÉRZÉKENYSÉGÉNEK FOKOZÁSA TRANSZPORTER HIÁNYOS *SYNECHOCYSTIS* PCC6803 CIANOBAKTÉRIUM MUTÁNSOKBAN. Sraub napok ELKH-SZBK, Szeged, Magyarország

Nyilatkozat

Mint az alábbi tudományos közlemények felelős első szerzője, nyilatkozom, hogy a tudományos közleményben foglalt tudományos eredményeket PhD fokozat megszerzéséhez nem használtam fel és azokat ilyen célból a jövőben sem fogom használni. Elismerem, hogy Patyi Gábornak az alábbi közlemények eredményeinek elérésében meghatározó fontosságú szerepe volt, így a közleményeket a doktori eljárásban felhasználhatja.

Péter Poór, **Gábor Patyi**, Zoltán Takács, András Szekeres, Nikolett Bódi, Mária Bagyánszki, and Irma Tari. 2019. "Salicylic Acid-Induced ROS Production by Mitochondrial Electron Transport Chain Depends on the Activity of Mitochondrial Hexokinases in Tomato (Solanum Lycopersicum L.)." Journal of Plant Research 132 (2): 273–83. https://doi.org/10.1007/s10265-019-01085-y.

P Poór, Z. Takács, **G. Patyi**, P. Borbély, O. Bencsik, A. Szekeres, and I. Tari. 2018. "Dark-Induced Changes in the Activity and the Expression of Tomato Hexokinase Genes Depend on the Leaf Age." South African Journal of Botany 118: 98–104. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.06.006.

Szeged, 2022. 08. 25.

Dr. Poór Péter
egyetemi adjunktus
Növénybiológiai Tanszék
SZTE TTIK Biológiai Intézet
6726 Szeged, Közép fasor 52.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Dr. Vass Imrének, hogy lehetőséget biztosított, hogy a Növényi Stressz, Lipid és Fenomika Csoportban végezhettem doktori tanulmányaimat és kutatásaimat.

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőimnek Dr. Vass Imrének és Dr. Kós Péternek, hogy szakismeretükkel és tanácsaikkal segítették a munkámat.

Köszönet illeti Dr. Szabó Milánt, Dr. Mallick Ivyt, Kozma Bognárné Hajdú Anitát és Sass Lászlót akik szakmai tudásukkal hozzájárultak munkám sikerességéhez.

Külön köszönet illeti Dr. Kós Pétert és feleségem Patyiné Hódi Barbarát, akikhez mindig bizalommal fordulhattam bármilyen kérdésben és rengeteg szakmai tudást és bátorítást kaptam.

Köszönöm Futó-Dékány Lilla lelkiismeretes munkáját, amivel nap mint nap megkönnyítette mindenki tevékenységét a laboratóriumban.

Köszönöm a Növényi Stressz, Lipid és Fenomika Csoport összes tagjának a munkámban nyújtott segítségét.

Köszönöm a családom és barátaim segítségét, akik mindvégig támogattak munkám során.